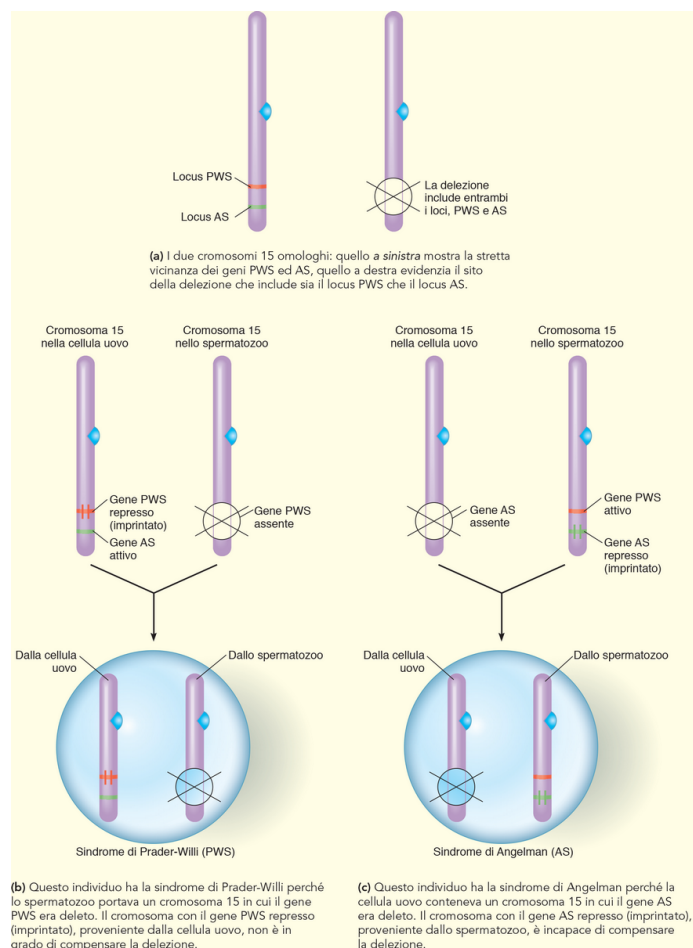


Due rare malattie genetiche ci forniscono una formidabile dimostrazione di cosa sia l'imprinting genomico. Nella sindrome di Prader-Willi (PWS) gli individui sono affetti da alimentazione eccessiva su base compulsiva ed obesità; essi sono inoltre di bassa statura e affetti da ritardo mentale da lieve a moderato. Nella sindrome di Angelman (AS) i pazienti sono iperattivi, presentano ritardo mentale, sono incapaci di parlare e in alcuni casi sono affetti da crisi epilettiche. Una piccola delezione che interessa numerosi loci all'interno di un'unica regione del cromosoma 15 è responsabile sia della PWS sia della AS (FIG. 16-7a).

Uno dei loci deleti è responsabile della PWS, un altro della AS. Analisi dell'albero genealogico hanno dimostrato che quando il paziente eredita la delezione dal padre, la patologia che si manifesta è la PWS, mentre nei casi di trasmissione materna la patologia è la AS. Il meccanismo di ereditarietà suggerisce che l'allele PWS normale è espresso solo nel cromosoma paterno e quello normale per la AS è espresso solo in quello materno. La PWS quindi si manifesta perché in presenza

di delezione nel cromosoma paterno, l'allele materno non è in grado di compensarne la mancanza in quanto è esso stesso silenziato, (improntato ossia represso, FIG. 16-7b). In modo del tutto simile, la AS si manifesta quando l'allele AS paterno è improntato (represso) e quindi è incapace di sopperire alla delezione avvenuta nel cromosoma materno (FIG. 16-7c).



PUNTO CHIAVE Nei mammiferi sono stati trovati molti esempi di imprinting genomico e, senza dubbi, molti altri saranno scoperti in futuro.

FIGURA 16-7 *Imprinting genomico e sviluppo della sindrome di Prader-Willi (PWS) e di Angelman (AS)*

Il locus genico PWS è attivo nel gamete maschile e represso (improntato) nel gamete femminile. Al contrario, il locus AS è attivo nel gamete femminile e represso (improntato) in quello maschile.

Verifica

- Quali sono le anomalie cromosomiche specifiche della sindrome di Down, della sindrome di Klinefelter e della sindrome di Turner?
- Qual è l'anomalia cromosomica responsabile della sindrome cri-du-chat?
- Qual è l'anomalia cromosomica responsabile della sindrome dell'X fragile?

16.3 MALATTIE GENETICHE

OBIETTIVO DI APPRENDIMENTO

- Stabilire se ciascuno dei seguenti difetti genetici è ereditato come autosomico recessivo, autosomico dominante o recessivo legato all'X: fenilchetonuria (PKU), anemia falciforme, fibrosi cistica, malattia di TaySachs, morbo di Huntington ed emofilia A.

Abbiamo visto che alcune malattie umane sono basate su anomalie cromosomiche. Però, centinaia di quadri patologici dell'uomo sono legati a difetti enzimatici e sono dovuti a mutazioni in singoli geni.

La **fenilchetonuria (PKU)** e l'**alcaptonuria** (vedi Capitolo 13) sono esempi di queste malattie che vengono spesso definite errori congeniti del metabolismo , ossia patologie causate da mutazioni in geni codificanti per enzimi coinvolti nelle principali vie metaboliche. Sia la PKU che l'alcaptonuria comportano un blocco nel metabolismo di specifici aminoacidi.

Molte malattie genetiche sono ereditate come caratteri autosomici recessivi

Molte malattie genetiche nell'uomo presentano un quadro di ereditarietà semplice autosomica recessiva e, pertanto, si esprimono solo in omozigosi. Perché generalmente questi caratteri sono recessivi? La maggior

parte delle mutazioni recessive consiste in un allele mutato il cui prodotto o non funziona o è sintetizzato in quantità insufficiente. Nello stato eterozigote, è presente una copia funzionale del gene assieme ad una mutata. La cellula compensa quindi la presenza della mutazione con l'attività dell'allele normale che è solitamente in grado di produrre quantitativi sufficienti di proteina. Negli individui omozigoti recessivi entrambi gli alleli del gene sono non funzionali; questi individui sviluppano pertanto i sintomi della malattia.

La fenilchetonuria (PKU) è dovuta ad una deficienza enzimatica

La fenilchetonuria (PKU), che è più comune nelle persone con origini nell'Europa occidentale, è una malattia autosomica recessiva causata da un difetto nel metabolismo aminoacidico. Nel Nord America, colpisce circa 1 neonato su 10.000 nati. I soggetti omozigoti recessivi mancano di un enzima che trasforma un aminoacido, la fenilalanina, in un altro aminoacido, la tirosina. Questi individui accumulano alti livelli di fenilalanina, acido fenilpiruvico e composti simili.

La fenilalanina che si accumula è convertita in fenilchetoni, che danneggiano il sistema nervoso centrale, incluso il cervello, dei bambini. Il risultato ultimo è un severo ritardo mentale: un neonato omozigote per la PKU è di solito sano alla nascita perché la madre, che è eterozigote, produce abbastanza enzima per prevenire l'accumulo della fenilalanina prima della nascita. Tuttavia, durante l'infanzia e verso l'adolescenza, i prodotti tossici causano danni irreversibili al sistema nervoso centrale.

Negli anni '50 si vide che, se i bambini con PKU venivano identificati e trattati prima possibile con una dieta speciale povera di fenilalanina, i sintomi potevano essere ridotti drasticamente. Questa dieta è difficile da effettuare, in quanto non contiene carne, pesce, derivati del latte, pane o noccioline. Anche il sostituto dello zucchero, l'aspartame, presente nelle bibite e nei cibi dietetici, non può essere utilizzato, poiché anch'esso contiene fenilalanina. Sono stati messi a punto test biochimici per la PKU e lo screening dei neonati con un semplice test sul sangue è obbligatorio negli Stati Uniti. Questo programma di screening e la possibilità di un trattamento efficace hanno consentito di salvare migliaia di bambini da gravi ritardi mentali. La maggior parte di questi bambini deve continuare la dieta anche durante l'adolescenza. I medici raccomandano anche che la dieta sia seguita durante tutto l'arco della vita, in quanto alcuni adulti che non hanno seguito questo consiglio mostrano una diminuzione di alcune facoltà mentali, come la perdita della concentrazione e della memoria a breve termine.

Per ironia della sorte, il successo del trattamento della PKU durante l'infanzia presenta oggi un problema nuovo. Se una femmina omozigote, che si è salvata dal ritardo mentale, rimane incinta, gli alti livelli di fenilalanina nel suo sangue possono danneggiare il cervello del feto che ha in utero, anche se il feto è eterozigote. Perciò, ella dovrà riprendere la dieta, preferibilmente prima di entrare in gravidanza. Tale procedimento generalmente (ma non sempre) riesce a prevenire gli effetti della PKU materna. È quindi molto importante che la donna con PKU sia al corrente della sua situazione, in modo da ricevere una consulenza appropriata e un trattamento medico adeguato durante la gravidanza.

L'anemia falciforme deriva da un difetto dell'emoglobina

L'anemia falciforme viene ereditata come carattere autosomico recessivo. La malattia è maggiormente presente negli individui di origine africana (circa 1 su 500 Afro-Americani), e circa 1 su 12 Afro-Americani è eterozigote. A basse concentrazioni di ossigeno, i globuli rossi di una persona affetta da anemia falciforme hanno la forma a falce, o a mezza luna, mentre le cellule normali sono dei dischi biconcavi.

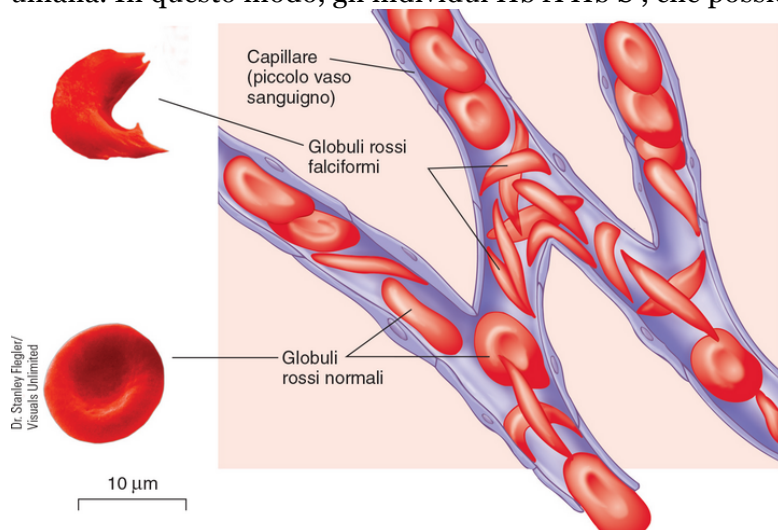
La mutazione che causa l'anemia falciforme è stata identificata per la prima volta nel 1957. Le cellule falciformi contengono un'emoglobina anomala che possiede nella catena β globina l'aminoacido valina al posto dell'acido glutammico in posizione 6 (il sesto aminoacido a partire dall'estremità amminica) (vedi Fig. 3-22a). La sostituzione di un acido glutammico con una valina rende l'emoglobina meno solubile, appiccicosa, e quindi predisposta a formare strutture pseudocristalline responsabili del cambiamento di forma del globulo rosso. Questo si verifica nelle vene dopo che l'ossigeno è stato rilasciato dall'emoglobina. La forma anomala a falce delle cellule del sangue fa rallentare il flusso sanguigno e causa ostruzioni nei piccoli capillari (FIG. 16-8), con conseguente danno tissutale (per la mancanza di ossigeno e delle sostanze nutritive essenziali) e crisi dolorose; queste cellule inoltre hanno una vita breve, il che provoca, nelle persone affette, una grave anemia.

Le terapie a disposizione per l'anemia falciforme comprendono rimedi contro il dolore, trasfusioni e, più recentemente, medicine come l'idrossiurea, che attiva il gene per la produzione di emoglobina fetale, normalmente non espresso dopo la nascita. La presenza nei globuli rossi dell'emoglobina fetale diluisce quella falcemica, diminuendo il dolore e la richiesta di trasfusioni. Attualmente, non si conosce l'effetto a lungo termine della idrossiurea, ma esiste il timore che possa indurre la formazione di tumori.

Sono in atto ricerche e studi mirati alla scoperta di una terapia genica per questi pazienti. Lo sviluppo di un modello murino dell'anemia falciforme ha permesso ai ricercatori di provare potenziali farmaci e terapie geniche. Nel primo esperimento di terapia genica nei topi, è stato utilizzato un retrovirus murino come vettore, un trasportatore che può trasferire l'informazione genetica. Tuttavia, il retrovirus non riusciva a

trasportare il gene per l'emoglobina normale all'interno del midollo osseo, dove le nuove cellule del sangue sono prodotte dalle cellule staminali. Nel 2001, i ricercatori sono riusciti a curare l'anemia falciforme nei topi utilizzando come vettore una forma di HIV modificata. Prima di poter provare questo tipo di trattamento sull'uomo, si deve dimostrare che il vettore HIV è assolutamente sicuro. Anche il trapianto di midollo osseo è un promettente trattamento per i pazienti gravemente malati.

La ragione per cui l'allele per l'anemia falciforme si trova con una frequenza più alta in alcune zone dell'Africa e dell'Asia è ben nota. Gli individui eterozigoti (Hb A Hb S), che portano gli alleli sia per l'emoglobina normale (Hb A) che per l'emoglobina responsabile dell'anemia falciforme (Hb S), sono più resistenti al parassita *Plasmodium falciparum*, che provoca una grave forma, spesso mortale, di malaria. Il parassita, che trascorre parte del suo ciclo vitale all'interno dei globuli rossi, non prospera quando è presente l'emoglobina anomala. (Un individuo eterozigote per l'anemia falciforme produce sia l'emoglobina normale che quella mutata). Le aree dell'Africa dove c'è la malaria da *P. falciparum* corrispondono esattamente alle aree in cui la frequenza dell'allele per l'anemia falciforme è più comune nella popolazione umana. In questo modo, gli individui Hb A Hb S, che possiedono una copia di un allele mutato per l'anemia



falciforme, hanno un vantaggio selettivo sugli individui omozigoti, sia Hb A Hb A (che possono morire di malaria) sia Hb S Hb S (che possono morire di anemia falciforme). Questo fenomeno è conosciuto come vantaggio degli eterozigoti ed è trattato ulteriormente nel Capitolo "Cambiamenti evolutivi nelle popolazioni".

FIGURA 16-8
Anemia falciforme

Le cellule falciformi, al contrario dei globuli rossi normali, non passano facilmente attraverso i piccoli capillari, causando blocchi del flusso sanguigno che impediscono la distribuzione dell'ossigeno ai tessuti.

La fibrosi cistica è la conseguenza di un sistema di trasporto ionico difettoso

La fibrosi cistica è la più comune malattia autosomica recessiva fra i bambini di origini europee (1 su 2500 nati). Circa 1 persona su 25 negli Stati Uniti è portatrice del gene per la fibrosi cistica, disturbo caratterizzato da secrezioni anormali. L'effetto più grave di questa malattia è a carico dell'apparato respiratorio, che produce muco molto viscoso. Le ciglia bronchiali non possono rimuovere facilmente il muco, che diventa così un mezzo di coltura per batteri nocivi. Questi batteri, o le loro tossine, attaccano i tessuti circostanti, dando origine a polmoniti ricorrenti ed altre complicazioni. Il muco molto viscoso si trova anche in altre parti del corpo, dove provoca problemi digestivi ed altri effetti.

Come è stato discusso in precedenza, il gene della fibrosi cistica codifica la proteina CFTR, che controlla il trasporto degli ioni cloruro attraverso le membrane cellulari. La proteina difettiva, presente nella membrana plasmatica delle cellule epiteliali che tappezzano i polmoni, l'intestino, il pancreas, il fegato, le ghiandole sudoripare e gli organi genitali, è responsabile della produzione di un muco molto denso, che alla fine porta a danni tissutali. Sebbene esistano forme differenti di questa malattia che si manifesta con quadri sintomatologici polimorfici (variabili), la fibrosi cistica è generalmente una malattia molto grave.

Per controllare le infezioni batteriche si usano gli antibiotici, ed ogni giorno è necessaria la fisioterapia per ripulire le vie respiratorie dal muco (FIG. 16-9). Anche il trattamento con la Dornasi Alfa (DNasi), un enzima prodotto con la tecnologia del DNA ricombinante, è di valido aiuto nel tentativo di fluidificare il muco. Senza questi trattamenti la morte sopravviene durante l'infanzia, mentre con la terapia l'aspettativa di vita per le persone affette è di circa 38 anni. Visti i grossi limiti delle terapie a disposizione, si sta cercando di sviluppare una terapia genica per la fibrosi cistica.

L'allele mutato per le forme più gravi di fibrosi cistica predomina nell'Europa del Nord, mentre un altro, meno grave, è prevalente nell'Europa del Sud. È presumibile che questi alleli mutati siano il frutto di mutazioni indipendenti che sono state mantenute dalla selezione naturale. Alcune osservazioni sperimentali suffragano l'ipotesi che gli individui eterozigoti abbiano maggiori possibilità di sopravvivenza qualora contraggano malattie infettive gravi, che producono diarrea grave, come avviene per esempio nel colera. Questo è un altro esempio di vantaggio dell'eterozigote.



FIGURA 16.9 *Trattamento della fibrosi cistica*

Uno dei trattamenti tradizionali della fibrosi cistica comporta la percussione del torace o una lieve pressione su di esso per ripulire le vie respiratorie intasate dal muco. Tale tecnica viene tipicamente adoperata dopo una terapia aerosolica, che serve per fluidificare il muco.

La malattia di Tay-Sachs è il risultato di un anomalo metabolismo lipidico nel cervello

La malattia di Tay-Sachs è una malattia autosomica recessiva del sistema nervoso centrale, che provoca cecità e grave ritardo mentale. I sintomi compaiono nel primo anno di vita e si concludono con la morte entro cinque anni. Per l'assenza di un enzima, un lipide che è normalmente presente nelle membrane delle cellule del cervello non viene demolito e si accumula nei lisosomi (organuli intracellulari discussi nel Capitolo 4). I lisosomi si rigonfiano, causando il malfunzionamento delle cellule nervose. Sfortunatamente, anche se molte ricerche sono in corso, al momento non è disponibile nessuna terapia efficace per la malattia di Tay-Sachs. Tuttavia, una strategia terapeutica efficace per il trattamento della malattia di Tay-Sachs è stata descritta nel 1997 in seguito a ricerche svolte su un modello murino. Questo trattamento, che richiede l'assunzione orale di un inibitore che riduce la sintesi del lipide che si accumula nei lisosomi, offre la speranza di affrontare in modo più efficiente la malattia di Tay-Sachs nell'uomo.

L'allele anomalo è particolarmente frequente negli Stati Uniti, fra gli ebrei i cui antenati provengono dall'Europa orientale (ebrei Ashkenazi). Invece, gli ebrei che provengono dalle regioni mediterranee (ebrei Sefarditi) hanno una bassissima frequenza dell'allele.

Alcune malattie genetiche sono ereditate come caratteri autosomici dominanti

La malattia di Huntington (HD), chiamata così perché è stata descritta per la prima volta nel 1872 dal medico americano George Huntington, è determinata da un raro allele autosomico dominante che colpisce il sistema nervoso. La malattia provoca un grave deterioramento fisico e mentale, spasmi incontrollati dei muscoli, cambiamento della personalità ed infine la morte. Non è stata trovata una terapia efficace. Ogni figlio di un genitore affetto dalla patologia ha il 50% di probabilità di esserne anche lui affetto (e di trasmettere a sua volta l'allele anomalo a metà della sua prole). Generalmente, ci aspetteremmo che un allele dominante con tali aspetti devastanti sia presente solo come effetto di una mutazione nuova e che non possa essere trasmesso alle generazioni successive. Tuttavia, questa malattia si manifesta relativamente tardi (di solito non prima dei 40 anni), cosicché un soggetto può avere dei figli prima di rendersi conto della presenza dell'allele mutato (FIG. 16-10). Nel Nord America, la HD ha una frequenza di 1 su 20.000 nati vivi.

Il gene responsabile della malattia di Huntington è localizzato ad un'estremità del cromosoma 4. La mutazione è una tripletta di nucleotidi (CAG) ripetuta molte volte; l'allele normale ha da 6 a 35 CAG ripetute, mentre l'allele mutante ha la tripletta CAG ripetuta da 40 a più di 150 volte. Dal momento che la tripletta CAG codifica per l'aminoacido glutammina, la proteina che ne deriva, detta "huntingtina", ha un lungo filamento di glutammine. Il numero delle triplette ripetute sembra essere importante nel determinare l'età di esordio della malattia e la sua gravità; un maggior numero di triplette è correlato con un esordio più precoce e con una maggiore gravità.

Molte ricerche sono indirizzate a studiare come la mutazione sia connessa alla neurodegenerazione cerebrale. Un modello murino della malattia di Huntington fornisce validi indizi sullo sviluppo della patologia. Utilizzando questo modello, i ricercatori hanno dimostrato che la versione difettiva dell'huntingtina si lega ad enzimi chiamati *acetiltransferasi* nelle cellule cerebrali, bloccandone l'azione. Le acetiltransferasi sono implicate nell'accensione dell'espressione genica, per cui, nelle cellule cerebrali degli individui affetti da HD, gran parte della normale trascrizione non può avvenire. Una volta compreso meglio il meccanismo d'azione della HD sulle cellule nervose, sarà anche possibile sviluppare trattamenti efficaci per rallentare la progressione della malattia.

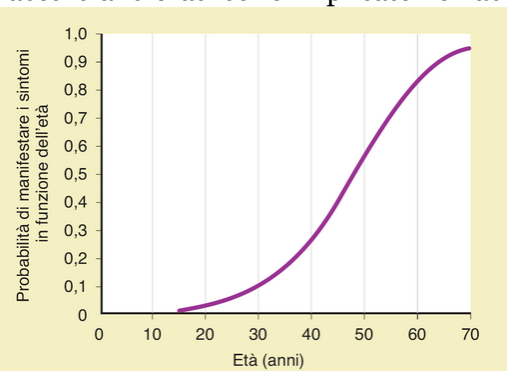


FIGURA 16-10

Età di insorgenza della malattia di Huntington

Il grafico mostra la probabilità cumulativa che un individuo che possiede l'allele responsabile della malattia di Huntington manifesti i sintomi ad una determinata età. (Adattato da P. S. Harper, *Genetic Counseling*, 5th edition, Butterworth-Heinemann, Oxford, 1998).

Il clonaggio dell'allele HD è diventato la base per i test che permettono alle persone a rischio di sapere se sono portatrici dell'allele. La decisione di sottoporsi a tali test è inequivocabilmente molto personale, ma indubbiamente può essere utile per chi deve decidere di avere o meno dei figli. Tuttavia, chi risulta positivo per l'allele HD deve vivere con la certezza che alla fine svilupperà questa malattia devastante e incurabile. Si spera che le persone che scelgono di essere identificate come persone affette prima della manifestazione dei sintomi possano contribuire allo sviluppo di terapie efficaci.

Alcune malattie genetiche sono ereditate come caratteri recessivi legati al cromosoma X

L'emofilia A veniva citata una volta come malattia delle case regnanti, a causa della sua alta incidenza fra i

discendenti maschi della regina Vittoria; essa si trova tuttavia anche in alberi genealogici di famiglie comuni. Caratterizzata dalla mancanza di un fattore della coagulazione del sangue, il fattore VIII, l'emofilia A provoca emorragie all'interno della testa, nelle articolazioni ed in altre aree, anche per piccole ferite. Siccome la modalità di trasmissione è di tipo recessivo legato all'X, le persone affette sono quasi esclusivamente maschi, avendo ereditato dalla madre portatrice eterozigote l'allele mutato presente sul cromosoma X. (Una femmina, per essere affetta da una malattia legata all'X, deve ereditare gli alleli mutati da entrambi i genitori, mentre un maschio deve ereditare un solo allele mutato dalla madre). Oggi la terapia consiste in trasfusioni sanguigne e somministrazione in vena di fattore VIII (il prodotto del gene non funzionante). Sfortunatamente, questi trattamenti sono costosi e molte preparazioni di fattore VIII, ottenute da plasma umano, sono risultate contaminate, negli anni '80, dall'HIV-1, il virus che causa l'AIDS. Come conseguenza, molti malati di emofilia sono deceduti per AIDS. Però, dal 1992 è disponibile il fattore VIII esente da contaminazioni virali, che deriva sia dal plasma umano sia dalla tecnologia del DNA ricombinante.

I genetisti stanno iniziando ad identificare i geni associati al cromosoma X che influiscono sull'intelligenza

Il cromosoma X contiene una frazione sproporzionata degli oltre 200 geni finora identificati che hanno effetti sulle capacità cognitive, ad esempio codificando per proteine necessarie per il normale funzionamento del cervello. Non è sorprendente che molti tipi di ritardo mentale siano associati a difetti in geni presenti sul cromosoma X. Il cromosoma X umano contiene meno del 4% del genoma umano, ma il 10% dei geni responsabili di qualche forma di ritardo mentale si trova sul cromosoma X. Poiché i maschi posseggono un solo cromosoma X, sono più numerosi i maschi affetti da qualche forma di ritardo mentale che non le femmine, un'osservazione nota da oltre un secolo.

Verifica

- Quali delle seguenti malattie genetiche sono ereditate come caratteri autosomici recessivi? Fenilchetonuria, morbo di Huntington, malattia di Tay-Sachs.
- Quali delle seguenti malattie genetiche sono ereditate come caratteri autosomici dominanti? Anemia falciforme, emofilia A, morbo di Huntington.
- Quali delle seguenti malattie genetiche sono ereditate come caratteri recessivi legati al cromosoma X? Emofilia A, fibrosi cistica, malattia di Tay-Sachs.

16.4 LA TERAPIA GENICA

OBIETTIVO DI APPRENDIMENTO

7. Discutere brevemente il procedimento della terapia genica, inclusi alcuni dei problemi tecnici che presenta.

Molte sono le difficoltà relative al trattamento delle malattie genetiche più gravi e pertanto gli scienziati sognano da sempre di riuscire a scoprire rimedi efficaci per queste patologie. Oggi, grazie all'ingegneria genetica, i loro sogni si avvicinano alla realtà. Una strategia è la terapia genica ovvero un approccio terapeutico basato sulla sostituzione dell'allele difettivo mutato con l'allele normale (e la sua proteina espressa) in alcune cellule del corpo. Il ragionamento alla base di questa strategia è che, nonostante un particolare allele possa essere presente in tutte le cellule, esso si esprime solo in alcune; l'espressione dell'allele normale nelle sole cellule che lo richiedono può essere sufficiente a conferire un fenotipo normale (FIG. 16-11).

Questo approccio presenta una serie di ostacoli tecnici, la cui soluzione deve essere trovata considerando la natura del gene stesso, del suo prodotto e dei tipi di cellule nelle quali si deve esprimere. Prima il gene deve essere clonato, poi il suo DNA deve essere introdotto nelle cellule appropriate.

La tecnica migliore è quella di impacchettare il materiale genetico in un virus, creando un vettore virale, cioè un'entità biologica in grado di introdurre l'allele normale all'interno delle cellule mutate. Idealmente, il virus dovrebbe infettare un'alta percentuale di cellule e, ancora più importante, non dovrebbe essere pericoloso, specialmente a lungo termine. Inizialmente la terapia genica ha sfruttato le proprietà di un adenovirus, l'agente eziologico del comune raffreddore, tuttavia alcuni pazienti hanno avuto una forte reazione immunitaria che ha portato a privilegiare, negli studi clinici successivi, i virus adeno-associati che non causano effetti collaterali.

Fino ad oggi, la terapia genica ha avuto successo nel 90% dei casi di ricostituzione del sistema immunitario in 30 bambini affetti da **immunodeficienza combinata grave** (SCID). (La SCID è un gruppo di disordini ereditari che compromettono seriamente il sistema immunitario). Il successo ottenuto con questo approccio terapeutico è decisamente superiore al 50% precedentemente raggiunto con la terapia tradizionale, basata sul trapianto di midollo osseo.

Sebbene gli ostacoli da superare siano molti, la terapia genica per parecchie malattie genetiche è in fase di avanzato sviluppo o di sperimentazione clinica su pazienti. I ricercatori attualmente si orientano sullo studio dei singoli problemi presentati da ciascuna malattia.

I programmi di terapia genica sono sotto stretto controllo

Fino a poco tempo fa, i continui progressi tecnologici avevano condotto ad un incremento costante degli studi clinici sulla terapia genica. Tuttavia, la morte di un paziente durante un trial clinico nel settembre 1999, e cinque casi più recenti di leucemia in bambini, uno dei quali è deceduto, hanno provocato il brusco calo di molte sperimentazioni, in attesa di ulteriori valutazioni sui possibili rischi della terapia genica per la salute. Il maggiore obiettivo di queste valutazioni riguarda la potenziale tossicità dei vettori virali. Il vettore utilizzato nel giovane paziente morto era un adenovirus, richiesto in alte dosi per ottenere una terapia efficace, basata sul trasferimento di un elevato numero di copie dell'allele normale. Sfortunatamente, le alte dosi virali hanno indotto nel paziente una forte risposta immunitaria, risultata poi fatale. I bambini che hanno sviluppato la leucemia erano in trattamento per la SCID. In questi casi, il vettore era un retrovirus, il quale ha inserito il proprio genoma in prossimità di un oncogene che causa la leucemia nell'infanzia, attivandolo.

La conduzione di studi clinici sull'uomo comporta sempre rischi elevati. I pazienti devono essere accuratamente selezionati, e i potenziali benefici, insieme ai rischi (se noti), devono essere spiegati al paziente con grande chiarezza o, nel caso dei bambini, i genitori devono dare un consenso informato per la procedura che si intende effettuare. Comunque, le questioni sollevate negli ultimi anni sui problemi connessi alla terapia genica hanno spinto i ricercatori ad impegnarsi nello sviluppo di alternative più sicure rispetto ai vettori virali.

METODO DI RICERCA *Perché si usa?* I topi sono modelli sperimentali adatti allo sviluppo di nuove conoscenze sulla terapia genica, tecnica che consente di inserire alleli funzionali in sostituzione di altri

difettivi e responsabili di malattie genetiche. Questa procedura è applicata all'uomo per alcuni tipi di malattie genetiche.

Come funziona?

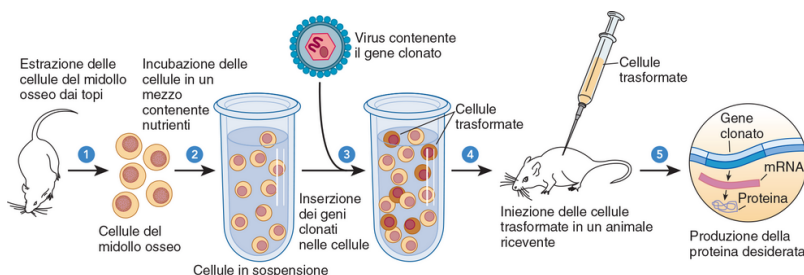


FIGURA 16-11

Terapia genica nelle cellule del midollo osseo di un topo

Verifica

- Come vengono usati i virus nella terapia genica umana?
- Perché i vettori virali rappresentano una potenziale preoccupazione nella terapia genica umana?

16.5 LA CONSULENZA E I TEST GENETICI

OBIETTIVO DI APPRENDIMENTO

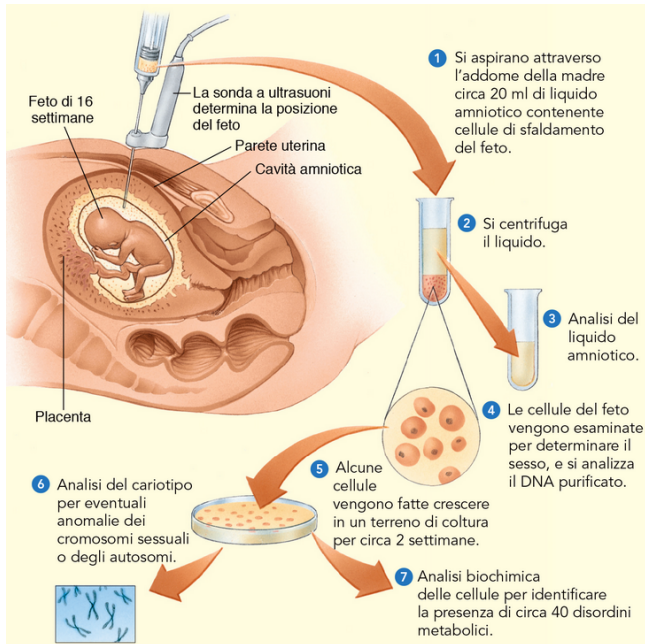
8. Indicare i relativi vantaggi e svantaggi di amniocentesi, prelievo dei villi coriali e diagnosi genetica preimpianto nella diagnosi prenatale di anomalie genetiche nell'uomo.
9. Distinguere tra programmi di screening genetico nei neonati e negli adulti e discutere le finalità e le implicazioni della consulenza genetica.

Sono stati fatti molti progressi nella diagnosi delle malattie genetiche. Questi progressi, che includono la diagnosi prenatale e lo screening genetico, forniscono utili informazioni alle coppie che siano esposte al rischio di generare figli affetti da malattie genetiche. Aiutare le coppie a capire e a confrontarsi con queste informazioni è un aspetto essenziale del campo, in rapida espansione, della consulenza genetica.

La diagnosi prenatale può rivelare anomalie cromosomiche e difetti genici

Negli ultimi venti anni, i medici hanno riportato crescenti successi nella diagnosi prenatale di una serie di malattie genetiche. In una tecnica diagnostica, conosciuta come amniocentesi, si preleva un campione del **liquido amniotico** che circonda il feto inserendo un ago nell'addome di una donna gravida, attraverso la parete dell'utero e aspirando dalla cavità amniotica una quota del fluido con una siringa (FIG. 16-12). Questa procedura è relativamente sicura, soprattutto perché attraverso l'ecografia si può determinare la posizione del feto, della placenta e dell'ago (la Figura 51-18 mostra un'ecografia di un feto umano). Tuttavia esiste una probabilità dello 0,5% (1 su 200) che l'amniocentesi induca un aborto.

Il liquido amniotico contiene cellule di sfaldamento del feto dalle quali è possibile determinare le sue caratteristiche genetiche. Queste cellule possono essere coltivate in laboratorio e dopo due settimane le cellule in divisione possono essere cariotipizzate per evidenziare eventuali anomalie cromosomiche ed altri difetti genetici. Sono stati messi a punto anche altri tipi di analisi per l'identificazione della maggior parte delle anomalie cromosomiche. L'amniocentesi viene eseguita dagli anni '60 principalmente su donne gravide sopra i 35 anni, la cui prole è a maggior rischio soprattutto per la sindrome di Down.



PUNTO CHIAVE Nell'amniocentesi viene prelevato il fluido che circonda il feto intorno alla sedicesima settimana di gravidanza per diagnosticare malattie genetiche o alterazioni dello sviluppo embrio-fetale.

FIGURA 16-12 Amniocentesi

L'amniocentesi consente la diagnosi prenatale di alcune malattie genetiche e di altre condizioni anomale.

Sono stati messi a punto ulteriori test prenatali per individuare una serie di malattie genetiche con quadri di ereditarietà semplici, ma si tratta di malattie abbastanza rare, tanto che i test vengono eseguiti solamente se ci sono sospetti per un particolare problema. Le deficienze enzimatiche sono spesso identificate incubando le cellule recuperate dal liquido amniotico con il substrato specifico e misurando, quindi, il prodotto. Questa tecnica è stata utile nella diagnosi prenatale di malattie come quella di TaySachs. I test per un gruppo di altre malattie, incluse

l'anemia falciforme, la malattia di Huntington e la fibrosi cistica, sono effettuati analizzando direttamente il DNA alla ricerca dell'allele difettivo.

L'amniocentesi è utile anche nell'identificare una condizione conosciuta come **spina bifida**, un'anomalia di sviluppo caratterizzata da una difettosa chiusura della impalcatura ossea del midollo spinale. Si tratta di una malformazione riscontrabile alla nascita ed è relativamente frequente (circa 1 su 300 nati). Questo difetto è associato a livelli eccezionalmente elevati di una proteina che si trova normalmente nel liquido amniotico, l' **α -fetoproteina**. Una certa quantità di questa proteina attraversa la placenta e si riversa nel sangue della madre, che viene analizzato per dosare la quantità di **α -fetoproteina presente nel siero materno** (MSAFP) come indicatore biochimico in grado di rivelare il difetto della spina bifida.

Se si riscontrano alti livelli di MSAFP, vengono condotti ulteriori test diagnostici, come l'ecografia e l'amniocentesi. (È interessante notare che livelli **bassi**, al di sotto della normalità, di MSAFP sono associati alla sindrome di Down e ad altre trisomie).

Un problema connesso con l'amniocentesi è che la maggior parte delle anomalie evidenziate è incurabile e che i risultati completi dell'analisi si possono ottenere nel secondo trimestre di gravidanza, quando l'aborto diventa più difficile sia dal punto di vista medico che psicologico. Perciò, si è cercato di sviluppare delle metodiche che diano risultati informativi in uno stadio più precoce della gravidanza. Uno di questi è il prelievo dei villi coriali (CVS), che comporta il prelievo e lo studio di cellule che andranno a contribuire alla parte fetale della placenta (FIG. 16-13). Il CVS, effettuato negli Stati Uniti dal 1983, è associato ad un rischio leggermente più alto di infezioni e di aborto rispetto all'amniocentesi, ma presenta il vantaggio che i risultati si possono ottenere nel primo trimestre.

Una procedura di screening embrionale relativamente nuova, conosciuta come diagnosi genetica preimpianto (PGD), è disponibile per le coppie portatrici degli alleli responsabili della malattia di Tay-Sachs, dell'emofilia, dell'anemia falciforme e di dozzine di altre condizioni genetiche ereditarie. La PGD è un supporto diagnostico introdotto con la tecnologia della riproduzione assistita. Il concepimento avviene con la fecondazione in vitro (IVF), in cui si raccolgono i gameti, si fecondano le uova in una piastra di

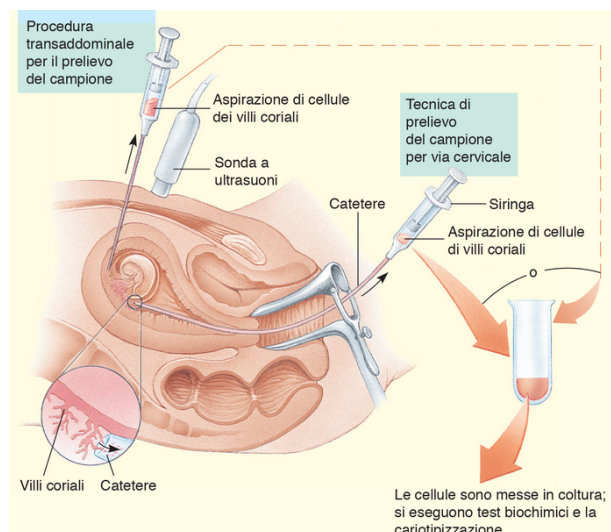
laboratorio e si impianta l'embrione risultante nell'utero per il successivo sviluppo (vedi **Approfondimenti: origini insolite**, nel Capitolo 50). Gli embrioni vengono analizzati per una o più malattie genetiche *prima* dell'impianto nell'utero della donna. La PGD differisce dall'amniocentesi e dal prelievo dei villi coriali in quanto è un test che viene eseguito prima che una donna sia gravida, in modo da evitare di dover prendere la decisione di interrompere o meno la gravidanza nel caso in cui l'embrione presenti un'anomalia genetica. Tuttavia, la PGD non è accurata come l'amniocentesi o il prelievo dei villi coriali ed è anche più costosa. Inoltre, spesso questa procedura è anche controversa, in quanto alcune coppie la utilizzano non allo scopo di effettuare uno screening delle malattie genetiche, bensì per scegliere il sesso del nascituro.

Tutte le tecniche (amniocentesi, prelievo dei villi coriali e diagnosi genetica preimpianto) possono diagnosticare alcune malattie genetiche con un alto grado di precisione, ma esse non sono completamente sicure e molte malattie possono non essere diagnosticate; pertanto, l'assenza di un risultato anomalo non garantisce una gravidanza normale.

PUNTO CHIAVE Nel prelievo dei villi coriali, si preleva un campione di cellule del corion, geneticamente identiche a quelle dell'embrione, solitamente durante l'ottava o la nona settimana di gestazione, per rilevare eventuali anomalie genetiche.

FIGURA 16-13 *Il prelievo dei villi coriali (CVS)*

Questo test consente la diagnosi precoce di alcune anomalie genetiche. I campioni si ottengono inserendo un ago attraverso la parete uterina o l'apertura cervicale.



Lo screening genetico ricerca particolari genotipi o cariotipi

Lo screening genetico rappresenta la ricerca sistematica, nella popolazione, di individui con un genotipo o un cariotipo che possa causare una malattia genetica in loro stessi o nei loro figli. Esistono due principali tipi di screening genetico, per i neonati e per gli adulti, ognuno dei quali ha uno scopo diverso. Lo screening dei neonati viene effettuato essenzialmente come primo passo della medicina preventiva, mentre quello sugli adulti ha la finalità di aiutarli ad acquisire informazioni sui possibili rischi legati alla riproduzione. I neonati sono analizzati per rivelare e trattare una o più malattie genetiche prima della manifestazione della sintomatologia. Lo screening routinario dei neonati per la PKU è iniziato nel 1962 in Massachusetts e oggi molti Stati hanno leggi che rendono questo screening obbligatorio. Anche l'anemia falciforme può essere curata più efficacemente se la diagnosi è effettuata precocemente. In questo caso, è possibile ridurre la mortalità infantile di circa il 15%, in quanto la somministrazione di antibiotici aiuta a prevenire le infezioni batteriche, cui sono suscettibili i neonati con anemia falciforme. Il numero delle malattie genetiche per cui è disponibile lo screening nei neonati è in rapido aumento e molti paesi stanno decidendo quale sia il modo migliore per implementare procedure addizionali di analisi, oltre ai 29 disordini, per lo più genetici, per i quali oggi è raccomandato lo screening.

Lo screening genetico negli adulti viene effettuato per identificare i portatori (eterozigoti) di malattie genetiche recessive. I portatori vengono quindi edotti circa il rischio di avere bambini malati se entrambi i genitori sono portatori. Dal 1970, circa un milione di ebrei negli Stati Uniti, in Israele e in altre nazioni si sono sottoposti volontariamente allo screening per la malattia di Tay-Sachs, e circa 1 su 30 è risultato portatore. Lo screening per la malattia di TaySachs ha ridotto l'incidenza della patologia quasi a zero.

I consulenti genetici informano le persone rispetto alle malattie genetiche

Coppie di genitori preoccupate circa il rischio di anomalie nei loro figli, perché hanno avuto un precedente figlio con patologie o un parente affetto da una malattia ereditaria, possono rivolgersi al consultorio genetico. I consulenti genetici forniscono informazioni mediche e genetiche, così come supporto e guida. Nelle maggiori città esistono delle strutture specializzate in genetica medica solitamente affiliate alle principali istituzioni accademiche.

I consulenti genetici, che hanno una preparazione specializzata in consulenza, medicina e genetica umana, forniscono informazioni necessarie per poter prendere decisioni. I consigli possono essere dati solo in termini di *probabilità* del verificarsi di una particolare situazione per ogni singolo discendente. Il genetista ha bisogno della storia familiare completa di entrambi i genitori e può usare test per individuare gli eterozigoti portatori di una certa condizione.

È molto importante che i portatori identificati ricevano una consulenza genetica appropriata. Un consulente genetico è preparato non solo a fornire informazioni necessarie nel caso di decisioni riproduttive, ma anche

ad aiutare i singoli individui a comprendere la loro situazione genetica e a non sentirsi discriminati.

Verifica

- Quali sono i relativi vantaggi e svantaggi di amniocentesi, prelievo dei villi coriali e diagnosi genetica preimpianto?
- Qual è la finalità dello screening genetico per i neonati?
- Qual è la finalità dello screening genetico per gli adulti?

16.6 GENETICA UMANA, SOCIETÀ ED ETICA

OBIETTIVO DI APPRENDIMENTO

10. Discutere le controversie relative alla discriminazione genetica.

Esistono molte idee sbagliate sulle malattie genetiche e sul loro effetto sulla società. Alcune persone pensano erroneamente che certi individui, o popolazioni, siano geneticamente non idonei e responsabili di molti dei mali della società. Per esempio, essi sostengono che il trattamento medico di individui affetti da malattie genetiche, particolarmente quelli in grado di riprodursi, possa aumentare la frequenza di alleli anormali nella popolazione. Tuttavia, queste nozioni non sono corrette: le malattie genetiche sono così rare che i moderni trattamenti medici possono avere solo un effetto trascurabile sulla loro incidenza.

Gli alleli mutanti recessivi sono presenti in tutti gli individui e in tutti i gruppi etnici; nessuno ne è esente. Ciascuno di noi è probabilmente eterozigote per diversi (da 3 a 15) alleli molto pericolosi, ognuno dei quali potrebbe provocare malattie debilitanti o la morte nella condizione di omozigosi. Perché allora le malattie genetiche sono relativamente poco frequenti? Ognuno di noi possiede molte migliaia di alleli essenziali, ognuno dei quali può mutare. È molto improbabile che un allele mutato presente in una persona si trovi anche nel coniuge. Naturalmente, questa possibilità aumenta se l'allele dannoso è relativamente comune, come quello per la fibrosi cistica.

I consanguinei hanno maggiori probabilità di possedere gli stessi alleli mutati rispetto a persone senza rapporti di parentela, perché li hanno ereditati da un antenato comune. Infatti, la maggiore frequenza di una particolare malattia genetica nella prole di matrimoni fra consanguinei è spesso la prima indicazione della modalità di eredità autosomica recessiva della patologia. I figli di genitori consanguinei hanno un rischio superiore di manifestare una malattia ereditaria, e rappresentano in una popolazione la percentuale più alta di individui affetti da difetti autosomici recessivi. A causa di questo notevole costo sociale, in molti stati USA vengono proibiti i matrimoni fra consanguinei, compresi i primi cugini. Tuttavia, tali matrimoni sono ancora frequenti in alcuni paesi in via di sviluppo.

La discriminazione genetica ha provocato un acceso dibattito

Lo screening genetico è una delle aree della diagnostica medica che cresce più in fretta, ed ogni anno aumentano i test per evidenziare malattie come la fibrosi cistica, l'anemia falciforme, il morbo di Huntington, il cancro del colon e della mammella. Tuttavia, l'analisi genetica solleva molte questioni sociali, etiche e legali che la società deve affrontare.

Una delle questioni più argomentate è se l'informazione genetica debba essere accessibile alle compagnie assicurative che stipulano polizze sulla vita e sulla salute. Molte persone sostengono che l'informazione genetica non debba essere comunicata alle compagnie di assicurazione, ma altri, come i datori di lavoro, gli assicuratori e molte associazioni che rappresentano le persone affette da malattie genetiche, pensano che questo modo di vedere non sia realistico. Se le persone usano i test genetici per essere aiutati a decidere quando e per quanto assicurarsi, anche gli assicuratori insistono per avere accesso alle stesse informazioni. Gli assicuratori dicono di aver bisogno di accedere ai dati genetici per calcolare premi equi (l'intero concetto di assicurazione si basa sul calcolo della media del rischio in una grande popolazione). Tuttavia, in questo caso ci sono preoccupazioni emergenti, perché gli assicuratori potrebbero usare i risultati dei test genetici per discriminare le persone con malattie genetiche o per negare loro la copertura assicurativa.

I medici argomentano che gli individui a rischio per una particolare malattia genetica potrebbero ritardare l'effettuazione delle analisi per il timore di essere discriminati da assicuratori e datori di lavoro. La discriminazione genetica è la discriminazione nei confronti di individui o membri di determinate famiglie a causa delle loro differenze rispetto al genoma "normale". La percezione della possibile discriminazione genetica è già evidente nella società. In uno studio del 1996, il 25% di 332 individui con una storia familiare di una o più malattie genetiche riteneva che gli fosse stata rifiutata l'assicurazione sulla vita, il 22% che gli fosse stata rifiutata l'assicurazione sanitaria e il 13% che gli fosse stato rifiutato un lavoro per discriminazione genetica. Da un'indagine effettuata nel 1998 dal National Center for Genetic Resources, è risultato che il 63% degli intervistati ha affermato che probabilmente, o certamente, non si sarebbe sottoposto ad un test genetico se i risultati fossero stati rivelati ai datori di lavoro o agli assicuratori.

A rendere questo punto ancora più complicato vi è il fatto che i test genetici sono talvolta difficili da interpretare, in parte perché esistono molte interazioni complesse tra geni ed ambiente. Se, per esempio, una donna è positiva ai test per un allele che è correlato al tumore della mammella, ha un rischio significativo; ma la positività al test non vuole necessariamente dire che ella svilupperà il tumore della mammella. Queste incertezze rendono difficile decidere la forma di intervento più appropriata da un punto di vista medico, che può andare da frequenti mammografie alla rimozione chirurgica preventiva delle mammelle sane.

Il programma di ricerca sulle implicazioni etiche, legali e sociali (ELSI) del National Human Genome Research Institute ha sviluppato dei principi per proteggere le persone dalla discriminazione genetica. Il Genetic Information Non-discrimination Act (GINA), emanato nel 2008, introduce alcuni principi importanti per la tutela dei diritti della salute e la non discriminazione sul luogo di lavoro. Questa legge proibisce ai datori di lavoro e alle compagnie assicurative di perseguire comportamenti discriminatori derivati dall'analisi di test genetici. Per esempio, né i datori di lavoro né le compagnie di assicurazione sono autorizzati a richiedere test genetici. I lavoratori sono tenuti, a loro volta, a non adottare comportamenti lavorativi inadeguati come conseguenza dell'effettuazione di analisi genetiche. Inoltre è fatto divieto alle compagnie assicurative di negare rimborsi o aumentare i costi delle polizze sulla base di informazioni genetiche.

Devono essere affrontate molte questioni etiche relative alla genetica umana

La discriminazione genetica è solo un esempio delle questioni etiche sollevate dalle crescenti scoperte e dai progressi tecnologici in genetica umana. Consideriamo i seguenti interrogativi, tutti concernenti l'ampia questione etica dei diritti degli individui: qual è l'età minima alla quale dovrebbe essere permesso effettuare un test genetico per la diagnosi di una malattia con insorgenza nell'età adulta, come il morbo di Huntington? Quali sono le conseguenze emotive e psicologiche negli individui a cui sia stata diagnosticata una malattia genetica incurabile? I test dovrebbero essere effettuati nel caso in cui alcuni membri della famiglia siano d'accordo ed altri no? I genitori dovrebbero avere il diritto di sottoporre i figli minorenni ad un test genetico? L'accesso ai dati derivanti da test genetici dovrebbe essere consentito nei casi di attribuzione di paternità o parentela? Gli Stati dovrebbero avere il diritto di raccogliere i dati genetici dei propri cittadini? Gli amministratori scolastici e gli enti esecutivi della legge dovrebbero avere accesso ai dati genetici? Questi interrogativi rappresentano soltanto una piccola parte degli innumerevoli problemi etici che bisogna prendere in considerazione, sia oggi che in futuro. Al crescere dell'importanza del ruolo sociale della genetica umana, dovranno essere affrontati i problemi relativi alla privacy genetica ed alla riservatezza dell'informazione genetica.

Verifica

- Perché non è corretto affermare che determinati individui o popolazioni portano la maggior parte degli alleli anormali presenti nell'uomo?
- Perché si esprima una malattia genetica autosomica recessiva, l'allele mutato deve essere in condizione di omozigosi. Che relazione c'è tra questo concetto ed i matrimoni tra consanguinei?
- Perché le compagnie di assicurazione che stipulano polizze sulla salute e sulla vita chiedono l'accesso alle informazioni genetiche dei loro clienti?

SOMMARIO: CONCENTRarsi SUGLI OBIETTIVI DI APPRENDIMENTO

16.1

1. Fare una distinzione tra analisi del cariotipo ed analisi degli alberi genealogici (pedigree).
 - Gli studi del cariotipo di un individuo, il numero ed il tipo di cromosomi presenti nel nucleo, permettono di rivelare varie anomalie cromosomiche.
 - Un albero genealogico (pedigree) è un grafico che mostra la trasmissione dei caratteri genetici all'interno di una famiglia, attraverso varie generazioni. L'analisi degli alberi genealogici è utile per l'identificazione, all'interno di una famiglia, di mutazioni autosomiche dominanti, autosomiche recessive e recessive legate al cromosoma X, nonché di difetti dovuti all'imprinting genomico, ovvero la diversa espressione di un gene a seconda dell'origine parentale.
2. Discutere le implicazioni del Progetto Genoma Umano.
 - Il genoma umano rappresenta tutta l'informazione genetica presente nelle cellule umane. Il Progetto Genoma Umano ha permesso di sequenziare tutto il DNA che costituisce il genoma nucleare umano. Ora che il genoma umano è stato sequenziato, i ricercatori saranno impegnati per molti decenni nell'identificazione dei geni e nella comprensione del ruolo di ogni gene, delle modalità di interazione tra i geni e delle modalità di regolazione dell'espressione di ciascuno di essi nei diversi tessuti. Per esempio, i ricercatori hanno iniziato ad utilizzare la tecnica dell'associazione genomica su larga scala (GWA) per

identificare le varianti genetiche associate a patologie umane complesse.

3. Discutere il modello murino per lo studio della fibrosi cistica.

- L'utilizzo di modelli animali aiuta notevolmente i ricercatori nello studio delle malattie genetiche. È stato utilizzato il gene targeting per generare ceppi di topi che fossero omozigoti ed eterozigoti per la fibrosi cistica; i risultati di tali studi potranno portare allo sviluppo di farmaci più efficaci per la cura di questa malattia.

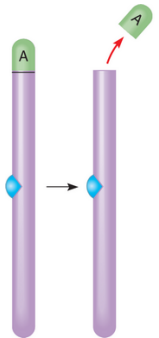
16.2

4. Spiegare come la non disgiunzione durante la meiosi possa essere responsabile di anomalie cromosomiche come la sindrome di Down, la sindrome di Klinefelter e la sindrome di Turner.

- Nelle aneuploidie ci sono copie mancanti, o in soprannumero, di certi cromosomi. Le aneuploidie comprendono la trisomia, in cui un individuo ha un cromosoma in più, e la monosomia, in cui manca un membro di una coppia di cromosomi.
- La trisomia 21, la forma più comune di sindrome di Down, e la sindrome di Klinefelter (XXY) sono esempi di trisomia. La sindrome di Turner (XO) è un esempio di monosomia.
- La trisomia e la monosomia sono causate dalla non disgiunzione meiotica, in cui i cromatidi fratelli o i cromosomi omologhi non si separano in modo appropriato durante la meiosi.

5. Distinguere tra le seguenti anomalie strutturali dei cromosomi: traslocazioni, delezioni e siti fragili.

- In una traslocazione, una parte di un cromosoma si unisce ad un altro cromosoma. Circa il 4% degli individui con la sindrome di Down ha una traslocazione in cui il braccio lungo del cromosoma 21 è attaccato al braccio lungo di uno dei cromosomi più grandi, come il cromosoma 14.
- In una delezione, un cromosoma si rompe e non si risalda. La delezione può variare in dimensioni, da poche coppie di basi ad un intero braccio del cromosoma. Una malattia da delezione nell'uomo è la sindrome "cri-du-chat", in cui una parte del braccio corto del cromosoma 5 è deleta.
- I siti fragili si possono presentare in posizioni specifiche su entrambi i cromatidi di un determinato cromosoma. Nella sindrome dell'X fragile, il sito fragile si trova vicino ad un'estremità del cromosoma X, dove la tripletta di nucleotidi CGG è ripetuta molte più volte del normale. La sindrome dell'X fragile è la causa più comune di ritardo mentale ereditario.



16.3

6. Stabilire se ciascuno dei seguenti difetti genetici è ereditato come autosomico recessivo, autosomico dominante o recessivo legato all'X: fenilchetonuria (PKU), anemia falciforme, fibrosi cistica, malattia di Tay-Sachs, morbo di Huntington ed emofilia A.

- La maggior parte delle malattie genetiche ad eredità semplice dell'uomo è trasmessa come carattere autosomico recessivo. La fenilchetonuria (PKU) è una malattia autosomica recessiva nella quale la presenza di fenilchetoni tossici danneggia il sistema nervoso durante lo sviluppo. L'anemia falciforme è una malattia autosomica recessiva nella quale viene prodotta un'emoglobina (la proteina che trasporta l'ossigeno nel sangue) anormale. La fibrosi cistica è una malattia autosomica recessiva nella quale si ha una secrezione anormale principalmente a livello delle vie respiratorie e digestive. La malattia di Tay-Sachs è una malattia autosomica recessiva causata da un anormale metabolismo lipidico nel cervello.
- La malattia di Huntington ha un quadro di ereditarietà autosomico dominante. Si manifesta nell'età adulta con deterioramento fisico e mentale.
- L'emofilia A è una malattia recessiva legata all'X. Consiste nel difetto di uno dei fattori della coagulazione del sangue.

16.4

7. Discutere brevemente il procedimento della terapia genica, inclusi alcuni dei problemi tecnici che presenta.

- Nella terapia genica, l'allele normale viene clonato ed il suo DNA è introdotto in determinate cellule del corpo, dove la sua espressione può essere sufficiente per ottenere un fenotipo normale.
- Un problema tecnico relativo alla terapia genica riguarda la possibilità di trovare dei vettori (di solito virus) sicuri ed efficaci, per indirizzare il gene di interesse all'interno delle cellule.

16.5

8. Indicare i vantaggi e gli svantaggi di amniocentesi, prelievo dei villi coriali e diagnosi genetica preimpianto nella diagnosi prenatale di anomalie genetiche nell'uomo.

- Nella amniocentesi, viene prelevato un campione del liquido amniotico che circonda il feto. Le cellule fetali in esso contenute vengono coltivate ed esaminate. L'amniocentesi consente

di effettuare la diagnosi nel secondo trimestre di gravidanza.

- Con il prelievo dei villi coriali (CVS), si studiano direttamente le cellule fetali prelevate dai villi. Il CVS fornisce risultati nel primo trimestre di gravidanza. Tuttavia, presenta un rischio di infezioni ed aborto leggermente maggiore rispetto all'amniocentesi.
- La diagnosi genetica preimpianto (PGD) si effettua durante la fecondazione in vitro. Gli embrioni vengono analizzati per la presenza di una o più malattie genetiche, per poter poi impiantare un embrione sano nell'utero della donna. La PGD non è sicura come l'amniocentesi ed il CVS, ed è anche più costosa.

9. Distinguere tra programmi di screening genetico nei neonati e negli adulti e discutere le finalità e le implicazioni della consulenza genetica.

- Lo screening genetico identifica gli individui portatori di una grave malattia genetica. Lo screening dei neonati rappresenta il primo passo della medicina preventiva, mentre lo screening degli adulti è effettuato per aiutarli a prendere decisioni riproduttive consapevoli.
- Le coppie che sono preoccupate per il rischio di anomalie genetiche nei loro figli possono rivolgersi al consultorio genetico. I consulenti genetici forniscono informazioni genetiche e mediche relative alle decisioni da prendere ed aiutano le persone a comprendere la loro condizione e a non sentirsi discriminate.

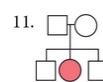
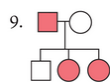
16.6

10. Discutere le controversie relative alla discriminazione genetica.

- La discriminazione genetica è la discriminazione nei confronti di un individuo o dei membri di una determinata famiglia a causa delle loro differenze rispetto al genoma "normale".
- Una delle questioni più complicate da affrontare riguardo la discriminazione genetica è se le informazioni genetiche debbano essere rese disponibili ai datori di lavoro e alle compagnie di assicurazione. Il Genetic Information Non-discrimination Act (GINA) proibisce ai datori di lavoro e alle compagnie assicurative di perseguire comportamenti discriminatori sulla base dei risultati di test genetici.

AUTOVERIFICHE

1. Un pedigree (albero genealogico) mostra: (a) incroci controllati tra membri di differenti ceppi isogenici; (b) l'informazione genetica totale delle cellule umane; (c) la comparazione del DNA umano con quello di altre specie; (d) le differenze genetiche tra individui non imparentati; (e) l'espressione di caratteri genetici nei membri di una o più generazioni di una famiglia.
2. Quale tipo di ereditarietà è associato ad un carattere che: (1) solitamente non è espresso nei genitori; (2) è espresso in circa un quarto dei figli; (3) è espresso sia nei figli maschi che nelle femmine? (a) Autosomico recessivo; (b) autosomico dominante; (c) recessivo associato all'X; (d) dominante associato all'X; (e) associato all'Y.
3. Un'anomalia in cui è presente un cromosoma in più o uno in meno rispetto al normale è detta: (a) cariotipo; (b) sito fragile; (c) aneuploidia; (d) trisomia; (e) traslocazione.
4. La non separazione dei cromosomi durante la divisione cellulare si dice: (a) sito fragile; (b) errore congenito del metabolismo; (c) satellite; (d) traslocazione; (e) non disgiunzione.
5. La composizione cromosomica di un individuo o di una cellula è detta: (a) cariotipo; (b) ripetizione di una tripletta nucleotidica; (c) pedigree; (d) microarray di DNA; (e) traslocazione.
6. Una malattia ereditaria causata da un enzima alterato o mancante si dice: (a) cariotipo; (b) trisomia; (c) traslocazione reciproca; (d) errore congenito del metabolismo; (e) aneuploidia.
7. Nel(la) _____, una mutazione genetica codifica per una emoglobina alterata che è meno solubile di quella normale e quindi ha più probabilità di alterare la forma dei globuli rossi. (a) Sindrome di Down; (b) malattia di Tay-Sachs; (c) anemia falciforme; (d) PKU; (e) emofilia A.
8. Durante questa procedura, si ottiene un campione del liquido che circonda il feto mediante l'inserzione di un ago attraverso la parete dell'addome e dell'utero. (a) DNA marcatore; (b) prelievo di villi coriali; (c) ecografia; (d) PGD; (e) amniocentesi.
9. Esaminate i seguenti pedigree e scegliete la modalità di ereditarietà più probabile per ciascuna malattia. (a) autosomica recessiva; (b) autosomica dominante; (c) recessiva legata all'X; (d) a, b o c; (e) a o c.



PENSIERO CRITICO

1. SCIENZA, TECNOLOGIA E SOCIETÀ. Immaginate di essere un consulente genetico; che suggerimento o consiglio daresti nelle seguenti situazioni?

- a) Si è presentata per un consiglio una coppia in cui la donna aveva una sorella morta per la

malattia di Tay-Sachs.

- b) Una ragazza ed un ragazzo non legati da vincoli di parentela hanno intenzione di sposarsi. Hanno saputo, però, che i genitori del ragazzo erano cugini di primo grado. Sono preoccupati perché pensano di correre il rischio di malattie ereditarie per i loro futuri figli.
 - c) Lo zio di una giovane donna (il fratello di suo padre) ha l'emofilia A. Suo padre non ha la malattia e non c'è mai stato un caso di emofilia nella famiglia della madre. Esiste la possibilità per i suoi figli di avere la malattia?
 - d) Un giovane di 20 anni si rivolge alla consulenza genetica perché a suo padre è stata appena diagnosticata la malattia di Huntington.
 - e) Ad una donna di 45 anni è stata appena diagnosticata la malattia di Huntington. Ella afferma di non avere intenzione di dirlo ai suoi figli adolescenti per non traumatizzarli. Dato che la donna è vostra paziente, ma non i suoi figli, pensate di avere l'obbligo di informare i figli? Spiegate il vostro ragionamento.
2. Un'idea sbagliata sulla genetica umana è che soltanto i geni siano capaci di determinare il destino di una persona. Spiegate perché questo non è corretto.
 3. Una delezione cromosomica è equivalente ad una mutazione frameshift (discussa nel Capitolo 13)? Perché o perché no?
 4. CONNESSIONE EVOLUTIVA. Illustrate alcune delle implicazioni evolutive che si possono dedurre dal fatto che il topo e l'uomo hanno circa 500 segmenti di DNA completamente identici.
 5. ANALISI DEI DATI. Esaminate la Figura 16-10 e stimate a che età la metà degli individui portatori di un allele della malattia di Huntington avrà sviluppato i sintomi. A che età i tre quarti di questi individui avranno sviluppato i sintomi?

Articolo II. Genetica dello sviluppo

17

La genetica dello sviluppo è lo studio dei geni coinvolti nel differenziamento cellulare e nello sviluppo di un organismo. Fino alla fine degli anni '70, si sapeva poco di come i geni agissero nel controllo dello sviluppo. Il chiarimento, infatti, delle interazioni genetiche che hanno luogo durante lo sviluppo non era affrontabile con approcci tradizionali. Tuttavia, i rapidi progressi nella tecnologia del DNA ricombinante hanno portato gli scienziati a cercare mutanti dello sviluppo e ad applicare le tecniche più sofisticate per studiarli. (Un *mutante* è un individuo che presenta un fenotipo alterato a causa di una mutazione genica).

L'organismo rappresentato nella fotografia è un embrione in via di sviluppo del moscerino della frutta *Drosophila melanogaster*. I genetisti hanno utilizzato la tecnica dell'immunofluorescenza, in cui una molecola fluorescente è legata ad un anticorpo che si lega a sua volta, in modo specifico, ad una determinata proteina, rendendone visibile la localizzazione. In questo caso, tre anticorpi diversi (rosso, blu e giallo) hanno legato tre specifiche proteine. Lo schema delle bande colorate indica che le diverse cellule dell'embrione hanno un'*espressione genica differenziale*, cioè geni differenti sono attivi contemporaneamente durante lo sviluppo.

La ricerca svolta su *Drosophila* e su altri organismi, ha profonde implicazioni sia per la comprensione dello sviluppo normale dell'uomo (incluso l'invecchiamento) sia per l'evidenziazione di alterazioni che possono portare a difetti congeniti ed al cancro. Le straordinarie similarità tra i geni che regolano lo sviluppo in un'ampia varietà di specie differenti, suggeriscono che i meccanismi genetici importanti per lo sviluppo hanno radici profonde nella storia evolutiva degli organismi pluricellulari. D'altra parte, esistono anche differenze nei quadri di sviluppo di specie diverse che riflettono i loro percorsi evolutivi separati. Come sarà discusso nel Capitolo 18, i geni dello sviluppo hanno svolto un ruolo chiave nel rimodellamento degli organismi nel corso della loro evoluzione.

Attualmente, i biologi stanno studiando in che modo i geni sono attivati, inattivati e modificati per il controllo dello sviluppo. In ultima analisi, ci si aspetta di comprendere in che modo una singola cellula (l'uovo fecondato) si sviluppi in un organismo pluricellulare complesso, come ad esempio l'uomo.

17.1 IL DIFFERENZIAMENTO CELLULARE E L'EQUIVALENZA NUCLEARE

OBIETTIVO DI APPRENDIMENTO

1. Fare una distinzione tra determinazione cellulare e differenziamento cellulare, e tra equivalenza nucleare e totipotenza.
2. Descrivere gli esperimenti classici di Steward, Gurdon e Wilmot.
3. Dare una definizione delle cellule staminali, distinguere tra cellule staminali embrionali e cellule staminali pluripotenti, nonché descrivere alcune delle promettenti aree di ricerca in cui sono implicate le cellule staminali.

Lo studio dello sviluppo, ciò che avvengono durante la vita di un individuo, affronta uno dei problemi più difficili e affascinanti dell'odierna biologia. Di particolare interesse è il processo attraverso il quale le cellule si specializzano e si organizzano in un organismo complesso. Durante le molteplici divisioni cellulari, attraverso le quali una singola cellula si sviluppa in un organismo pluricellulare, gruppi di cellule vengono indotte gradualmente a realizzare specifici schemi di attività genetica, attraverso un processo detto determinazione cellulare. Con il procedere della determinazione cellulare, si restringe il percorso di sviluppo di una cellula embrionale, in modo che il suo destino divenga sempre più limitato. La tappa finale che conduce alla specializzazione delle cellule è il differenziamento cellulare. Una cellula differenziata, che si può riconoscere per il suo aspetto e per le sue attività caratteristiche, sembra essere irreversibilmente indirizzata verso il suo destino.

Un'altra parte intrigante del "puzzle" dello sviluppo è rappresentata dalla costruzione del corpo. Nel processo di morfogenesi, ovvero di sviluppo della forma, le cellule che occupano specifiche posizioni si differenziano e si organizzano nello spazio in strutture riconoscibili. La morfogenesi procede attraverso il processo a più stadi della formazione strutturale (formazione del pattern di sviluppo), ossia l'organizzazione delle cellule in strutture tridimensionali. La formazione del pattern di sviluppo prevede la comunicazione tra le cellule, i cambiamenti della forma cellulare e le migrazioni cellulari. A seconda della loro localizzazione, le cellule sono esposte a concentrazioni differenti delle molecole segnale che portano informazioni di posizione. Pertanto, dove una cellula è posizionata (microambiente), determinerà spesso cosa quella cellula diventerà una volta matura.

Il corpo umano, come quello di altri vertebrati, contiene circa 250 differenti tipi di cellule (FIG. 17-1). Combinazioni di queste cellule specializzate, dette cellule differenziate, si trovano organizzate in strutture assai diverse e complesse, come l'occhio, la mano, il cervello, ognuna in grado di svolgere molte attività sofisticate. Degno di nota è il fatto che tutte le strutture corporee e le cellule che ne fanno parte provengono da una singola cellula uovo fecondata, lo zigote.

Tutti gli organismi pluricellulari obbediscono ad un complesso programma di sviluppo. Le cellule radicali delle piante, per esempio, hanno strutture e funzioni molto diverse da quelle di vario tipo che si trovano nelle foglie. Differenze notevoli si possono trovare anche a livello molecolare; più precisamente, ogni tipo di cellula animale o vegetale produce un insieme di proteine altamente specifico. In alcuni casi, come l'emoglobina nei globuli, avere un corredo di proteine altamente specifiche che, sebbene presenti in minime quantità, svolgono una funzione essenziale. Tuttavia, siccome certe proteine svolgono un ruolo essenziale in tutte le cellule (ad es., alcuni enzimi della glicolisi), di norma le proteine cellula-specifiche rappresentano solo una piccola frazione della componente proteica cellulare.

Una possibile spiegazione del fatto che ogni tipo di cellula differenziata produca un insieme unico di proteine potrebbe essere che, durante lo sviluppo, ogni gruppo di cellule perda i geni di cui non ha bisogno e conservi solo quelli necessari. Generalmente, ciò non corrisponde al vero. Secondo il concetto dell'equivalenza nucleare, i nuclei di tutte le cellule differenziate di un individuo sono geneticamente (ma non necessariamente metabolicamente) identici tra loro e identici allo zigote dal quale discendono. Ciò significa che virtualmente tutte le **cellule somatiche** in un individuo adulto possiedono gli stessi geni, che però si esprimono con diverse modalità nei diversi tessuti.

Le cellule somatiche sono tutte le cellule del corpo ad eccezione delle cellule della linea germinale. Negli animali, le cellule della linea germinale, i cui discendenti si differenziano in gameti mediante la meiosi, si separano precocemente dalle cellule somatiche. Nelle piante non c'è una netta distinzione fra cellule somatiche e cellule della linea germinale e la determinazione delle cellule che andranno incontro a meiosi si verifica molto più tardi nel corso dello sviluppo.

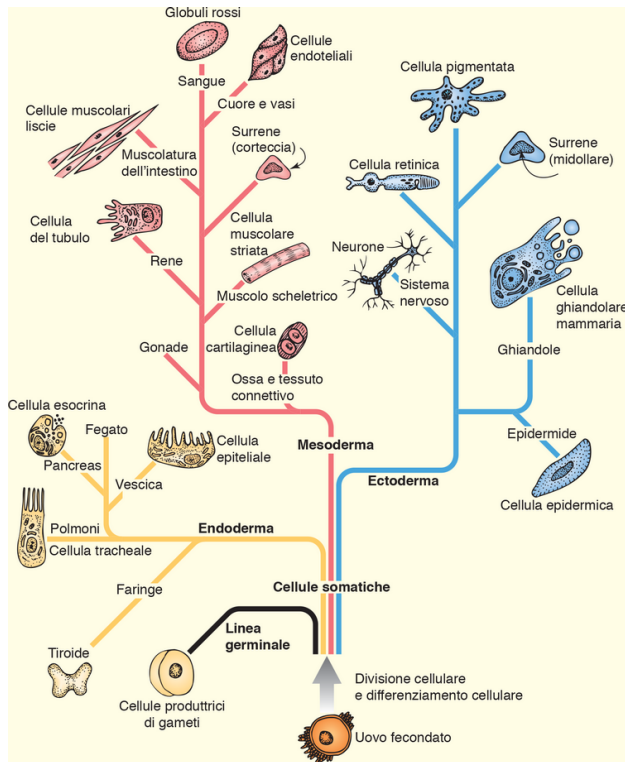
L'idea dell'equivalenza nucleare è nata da casi in cui si è dimostrato che le cellule già differenziate, o i loro nuclei, conservano la capacità di guidare lo sviluppo dell'intero organismo. Queste cellule o nuclei mostrano quella che è chiamata totipotenza.

La maggior parte delle differenze tra cellule è dovuta all'espressione differenziale dei geni

Siccome non risulta che durante lo sviluppo vi sia perdita di geni, le differenze nella composizione molecolare delle cellule devono essere dovute ad un sistema di regolazione che modula l'attività di geni differenti. Tale processo di regolazione genica nel corso dello sviluppo è spesso indicato espressione genica differenziale.

Come discusso nel Capitolo 14, l'espressione dei geni eucariotici può essere regolata con modalità molto

varie e a livelli molto diversi. Per esempio, un particolare enzima può essere prodotto in una forma inattiva e attivato successivamente. Tuttavia, la maggior parte dei processi di regolazione che sono importanti nello sviluppo si verifica a livello trascrizionale: viene cioè repressa la trascrizione di certi gruppi di geni, mentre altri vengono attivati. Anche l'espressione di geni **costitutivi** (cioè costantemente trascritti) può essere regolata durante lo sviluppo, di modo che la **quantità** di ciascun prodotto cambi da un tessuto ad un altro.



PUNTO CHIAVE Al procedere dello sviluppo, cellule somatiche che in precedenza avevano la potenzialità di dare origine ad una varietà di cellule, divengono sempre più orientate verso uno specifico destino.

FIGURA 17-1 Linee cellulari dei vertebrati

Ripetute divisioni dell'uovo fecondato (in basso) portano alla formazione di tessuti contenenti gruppi di cellule specializzate. Le cellule germinali, che producono i gameti, si separano molto presto nello sviluppo. Le cellule somatiche progrediscono lungo varie vie di sviluppo, esibendo una serie di limitazioni che man mano determinano i destini delle diverse linee cellulari.

Possiamo pensare al differenziamento come ad una serie di tappe che porta da una singola cellula alle molteplici cellule di ciascun tessuto specializzato, disposte secondo uno schema appropriato. Una cellula determina la linea di sviluppo che le sue discendenti seguiranno, restringendo il numero delle possibili vie di sviluppo che esse possono intraprendere e indirizzandole verso la formazione di un determinato gruppo di tessuti. Questa progressiva delimitazione del destino delle discendenti di una cellula è il processo di determinazione.

I cambiamenti che caratterizzano una cellula lungo una determinata linea di sviluppo possono non essere evidenti. Però, quando un particolare stadio di determinazione si è completato, i cambiamenti si trasmettono alla progenie e non sono facilmente reversibili. Il differenziamento cellulare è l'ultima tappa del processo di sviluppo. A questo punto, una cellula diventa strutturalmente e funzionalmente riconoscibile, ad esempio come osteocita, e il suo quadro di attività genica è diverso da quello di un neurone e di qualsiasi altro tipo cellulare.

Un nucleo totipotente contiene tutte le istruzioni per lo sviluppo

Nelle piante è possibile dimostrare che alcune cellule differenziate possono essere indotte a diventare l'equivalente di cellule embrionali. La **tecnica delle colture tissutali** consente di far crescere in un mezzo nutritivo cellule isolate da piante.

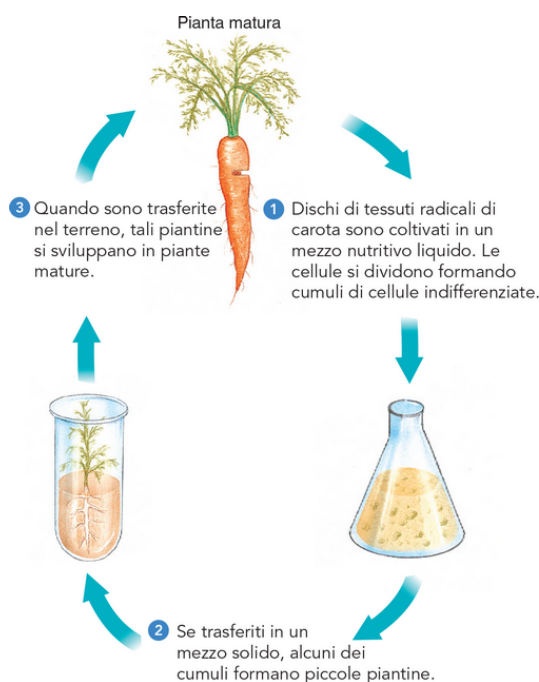
Negli anni '50, F. C. Steward e collaboratori condussero alla Cornell University alcuni dei primi esperimenti sulla totipotenza delle cellule vegetali (FIG. 17-2). Le cellule totipotenti hanno la potenzialità di dare origine a tutte le parti di un organismo, in quanto contengono un insieme completo delle istruzioni genetiche necessarie per dirigere il normale sviluppo di un intero organismo. Steward e colleghi indussero singole cellule isolate dalla radice della pianta di carota a dividersi in un mezzo nutritivo liquido, fino a formare gruppetti di cellule detti **corpi embrioidi** (simili ad embrioni). Queste masserelle di cellule, con capacità proliferativa, vennero trasferite in un terreno solido di agar, in grado di fornire nutrimento e una struttura solida di supporto per lo sviluppo delle cellule della pianta. Dopo il trasferimento in agar, alcune cellule embrioidi diedero origine a radici, fusto e foglie. Le **plantule** così ottenute vennero trasferite nel terreno, dove alla fine si svilupparono in piante adulte capaci di produrre fiori e semi vitali.

Piante derivate dalla stessa pianta parentale sono tutte geneticamente identiche e di conseguenza costituiscono un clone. Come è stato discusso nel Capitolo 15, un clone è costituito da singoli organismi, cellule o molecole di DNA che sono geneticamente identici ad un altro individuo, cellula o molecola di DNA da cui sono derivati. I metodi di coltura di tessuti vegetali sono ora largamente usati per produrre piante

geneticamente modificate; essi infatti consentono di rigenerare piante intere a partire da cellule che hanno incorporato molecole di DNA ricombinante. (vedi il Capitolo 38).

Negli anni '50 i ricercatori hanno avviato alcune sperimentazioni per verificare se i processi di determinazione sono reversibili nelle cellule animali; per far ciò essi hanno effettuato il trapianto del **nucleo** prelevato da una cellula in uno stadio di sviluppo relativamente avanzato, immettendolo in una cellula uovo enucleata (il cui nucleo era stato distrutto). In particolare, Robert Briggs e Thomas J. King dell'Institute for Cancer Research della Pennsylvania condussero esperimenti pionieristici di **trapianto nucleare**. Essi trasferirono nuclei di cellule di anfibio, a differenti stadi di sviluppo, all'interno di cellule uovo enucleate. Alcuni trapianti progredirono normalmente attraverso un certo numero di stadi di sviluppo e alcuni addirittura si svilupparono fino al normale girino. Come regola generale, i nuclei prelevati da cellule a stadi precoci avevano maggiori probabilità di condurre lo sviluppo fino allo stadio di girino. Man mano che il destino delle cellule si faceva più definito, la probabilità di un nucleo trapiantato di dirigere uno sviluppo normale diminuiva rapidamente.

Negli esperimenti condotti negli anni '60, il biologo britannico J. Gurdon dimostrò che, in pochissimi casi, nuclei isolati da cellule intestinali specializzate di girino erano in grado di dirigere lo sviluppo fino allo stadio di girino (FIG. 17-3). Questo risultato non si verificava frequentemente (circa nell'1,5% dei casi); tuttavia, in tali esperimenti, il successo conta più del fallimento. Egli poté concludere con sicurezza che almeno alcuni nuclei di cellule differenziate sono di fatto totipotenti.



ESPERIMENTO CHIAVE

PORSI DOMANDE CRITICHE: Le cellule somatiche differenziate di una pianta sono totipotenti?

SVILUPPARE UN'IPOTESI: Le singole cellule di una pianta di carota possono essere indotte a svilupparsi in una pianta intera.

EFFETTUARE ESPERIMENTI: F.C. Steward e collaboratori coltivarono i tessuti radicali della pianta di carota in un mezzo di coltura liquido. Le cellule si divisero a formare gruppi di cellule indifferenziate, che furono poi trasferiti in un mezzo di coltura solido. **RISULTATI E CONCLUSIONI:** Lo sviluppo di una pianta di carota completa da cellule somatiche differenziate ha dimostrato la totipotenza di tali cellule.

Fonte: Shantz, E. M., and F. C. Steward. "Investigations on Growth and Metabolism of Plant Cells VII: Sources of Nitrogen for Tissue Cultures under Optimal Conditions for Their Growth." *Annals of Botany*, Vol. 23, 371–390, 1959. By permission of Oxford University Press.

FIGURA 17-2

L'esperimento di Steward sulla totipotenza cellulare nelle carote

ESPERIMENTO CHIAVE

PORSI DOMANDE CRITICHE: I nuclei delle cellule animali differenziate sono totipotenti?

SVILUPPARE UN'IPOTESI: I nuclei delle cellule differenziate contengono tutte le informazioni necessarie per uno sviluppo normale.

EFFETTUARE ESPERIMENTI: Gurdon iniettò i nuclei di cellule differenziate (cellule intestinali di girino) in cellule uovo i cui nuclei erano stati distrutti mediante irraggiamento con luce UV.

RISULTATI E CONCLUSIONI: Il normale processo di sviluppo proseguì fino allo stadio di girino in circa l'1,5% dei tentativi, ad indicare che i geni per il programma di sviluppo fino a quel punto erano ancora presenti e potevano essere attivati in modo appropriato

Fonte: Gurdon, J. B. "The Developmental Capacity of Nuclei Taken from Intestinal Epithelium Cells of Feeding Tadpoles." *Journal of Embryology and Experimental Morphology* Vol. 10, Dec. 1962.

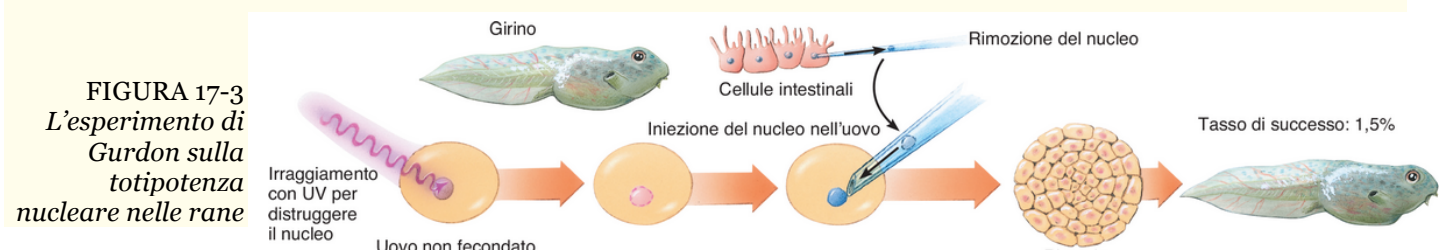


FIGURA 17-3
L'esperimento di Gurdon sulla totipotenza nucleare nelle rane

Per molti anni, non si è riusciti ad ottenere con embrioni di mammifero gli stessi successi sperimentali ottenuti con gli anfibi, facendo ritenere a molti biologi dello sviluppo che alcune delle caratteristiche fondamentali della riproduzione dei mammiferi potessero costituire una barriera impenetrabile alla loro clonazione. Questa convinzione cadde nel 1996 e nel 1997, quando furono riportati i primi casi di clonazione di mammiferi.

Il primo mammifero clonato è stato una pecora

Nel 1996, Ian Wilmut, Keith Campbell e i loro collaboratori all'Istituto Roslin di Edimburgo in Scozia riferirono di essere stati in grado di clonare pecore usando i nuclei derivati da embrioni precoci (allo stadio di *blastocisti*, vedi Capitolo 51). Questi scienziati attirarono l'attenzione di tutto il mondo all'inizio del 1997, quando annunciarono la nascita di un agnello, chiamato Dolly, il cui materiale genetico derivava da una cellula coltivata di ghiandola mammaria (di una pecora adulta) che era stata fusa con un oocita enucleato della stessa specie. La cellula che ne era derivata si era divisa, dando origine ad un embrione, che era stato poi coltivato in vitro fino al raggiungimento di uno stadio in cui poteva essere trasferito in una madre surrogata (madre ospite) (FIG. 17-4). Come ci si poteva aspettare, la percentuale di successo fu bassa: su 277 cellule manipolate, soltanto 29 si svilupparono in embrioni che poterono essere impiantati e Dolly fu l'unico agnello vivo nato.

Perché il gruppo di Wilmut ha avuto successo, mentre molti altri ricercatori hanno fallito? Applicando i principi di base della biologia cellulare, questi ricercatori capirono che il ciclo cellulare (vedi Capitolo 10) del citoplasma dell'uovo e del nucleo del donatore non erano sincroni; cioè la cellula uovo non si stava dividendo, ma era ferma in metafase II della meiosi, mentre la cellula somatica donatrice, che era in crescita attiva, era probabilmente in fase di sintesi del DNA (S) o in G₂. Togliendo alcune sostanze nutritive alle cellule donatrici, i ricercatori indussero uno stato di interruzione del ciclo detto G₀. Questo ebbe l'effetto di sincronizzare il nucleo donatore con il ciclo cellulare dell'uovo. Venne poi usata una scarica elettrica per far sì che il nucleo della cellula donatrice si fondesse con l'uovo ed iniziasse lo sviluppo dell'embrione.

Sebbene sia richiesto un alto livello di capacità tecnica, questi ed altri ricercatori sono stati capaci di apportare modifiche a questa tecnica per clonare vitelli, maiali, cavalli, ratti, topi, cani, gatti e possiamo pensare che l'elenco dei mammiferi clonati sia destinato a crescere. Nonostante il crescente numero di specie clonate, il tasso di successo per ogni serie di esperimenti continua ad essere basso, intorno all'1-2%, mentre è elevata l'incidenza di difetti genetici. Dolly fu sottoposta ad eutanasia all'età di 6 anni poiché soffriva di un tumore al polmone di origine virale, che aveva trasmesso anche ad altre pecore del suo stesso allevamento. Inoltre, Dolly aveva sviluppato l'artrite all'età di 5 anni e mezzo, un'età relativamente precoce per l'insorgenza di una simile malattia degenerativa in una pecora. Alcuni biologi ritengono che l'utilizzo del materiale genetico di un adulto per la produzione di un clone potrebbe determinare l'invecchiamento prematuro delle cellule dell'animale clonato (vedi la discussione sui telomeri e l'invecchiamento cellulare nel Capitolo 12). Ulteriori ricerche potranno fornire delle risposte a questo tipo di problema.

La produzione di organismi transgenici, in cui sono stati incorporati geni estranei, continua ad essere il maggiore obiettivo di questa linea di ricerca (vedi Capitolo 15). I ricercatori stanno mettendo a punto nuove tecniche per aumentare l'efficienza della procedura di clonazione. Solo allora sarà possibile produrre grossi numeri di animali transgenici clonati per una varietà di usi, quali ad esempio l'incremento delle popolazioni delle specie a rischio. Ad esempio, nel 2003 è nato il primo clone sano appartenente ad una specie a rischio, un "parente" selvatico del bue noto come *banteng*. Il nucleo utilizzato per la creazione di questo clone derivava da una cellula della pelle congelata, appartenente ad un banteng morto nel 1980 nello Zoo di San Diego.

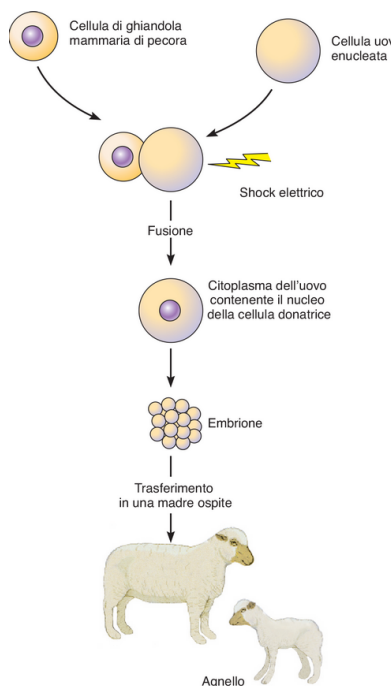
Le cellule staminali si dividono e danno origine a cellule differenziate

Le cellule staminali sono cellule indifferenziate che si possono dividere per dare origine a discendenti differenziati, ma conservano la capacità di dividersi per riprodurre se stesse, mantenendo così la popolazione di cellule staminali. Quando una cellula staminale si divide, le sue cellule figlie possono restare allo stato di cellula staminale o differenziarsi in cellule specializzate, ad esempio muscolari, nervose o sanguigne. Ciò che succede dipende dalla presenza o dall'assenza di una serie di segnali biochimici. Oggigiorno, uno dei settori più stimolanti della ricerca sulle cellule staminali riguarda la determinazione dell'identità, dell'ordine e delle quantità dei segnali chimici che danno origine ad uno specifico tipo di differenziamento cellulare.

ESPERIMENTO CHIAVE

PORSI DOMANDE CRITICHE: I nuclei delle cellule differenziate di mammifero sono totipotenti?

SVILUPPARE UN'IPOTESI: Il nucleo di una cellula differenziata di un mammifero adulto, se fuso con una cellula uovo enucleata, può fornire l'informazione genetica necessaria per dirigere un normale sviluppo.



EFFETTUARE ESPERIMENTI: Ian Wilmut e i suoi collaboratori produssero un embrione di pecora mediante la fusione di una cellula in coltura della ghiandola mammaria di una pecora adulta con un uovo di pecora enucleato. Quindi, impiantò l'embrione nell'utero di una madre ospite.

RISULTATI E CONCLUSIONI: Il normale sviluppo andò a termine, portando alla nascita di una femmina di agnello — il primo mammifero clonato al mondo. Un'ulteriore prova della completa funzionalità dell'agnello clonato fu fornita dal fatto che, una volta maturo, fu fatto accoppiare e diede origine ad una progenie normale.

Fonte: Campbell, K. H., J. McWhir, W. A. Ritchie, and I. Wilmut. "Sheep Cloned by Nuclear Transfer from a Cultured Cell Line." *Nature*, Vol. 380, 1996.

FIGURA 17-4

L'esperimento di Wilmut sulla clonazione dei mammiferi

Le cellule staminali più versatili, gli zigoti, sono definite totipotenti, cioè capaci di dare origine a tutti i tessuti del corpo, compresa la placenta. Le cellule staminali possono essere ottenute anche da embrioni o da cellule adulte. (Il termine **adulto** può essere fuorviante, in quanto le cellule staminali adulte possono essere raccolte dal cordone ombelicale, dai lattanti e dai bambini, oltre che dagli adulti). Le cellule staminali embrionali ed adulte sono note come cellule staminali pluripotenti, dal momento che possono dare origine a molti, ma non a tutti, i tipi cellulari di un organismo. Le cellule staminali embrionali (cellule ES), che si formano durante il processo di segmentazione dello zigote, cioè quando quest'ultimo subisce diversi cicli di divisione cellulare per formare una blastocisti allo stadio di sviluppo di 5-6 giorni, sono più versatili delle cellule staminali adulte (FIG. 17-5). Per esempio, le cellule ES sono pluripotenti ed hanno la potenzialità di svilupparsi in qualsiasi tipo di cellula del corpo; tuttavia, non sono totipotenti, in quanto non sono capaci di formare le cellule della placenta.

Le cellule staminali adulte sono state trovate nell'uomo all'interno del cervello, nella retina, nel cuore, nel midollo osseo, nella polpa dentale, nell'intestino ed in altri organi. Cellule staminali neurali adulte presenti nel cervello sono pluripotenti e possono dare origine a neuroni e cellule gliali. Le cellule staminali adulte presenti nel midollo osseo danno origine sia ai globuli rossi, sia ai vari tipi di globuli bianchi del sistema immunitario. La varietà di cellule in cui possono differenziarsi le cellule staminali adulte è più limitata di quella delle cellule ES. Tuttavia, studi recenti suggeriscono che persino le cellule staminali specializzate potrebbero essere più versatili di quanto si pensi. Ad esempio, le cellule staminali neurali formano cellule del sangue se trapiantate nel midollo osseo.

Le cellule staminali sono fonti potenziali di cellule da trapiantare in pazienti in condizioni degenerative serie. Per esempio, il morbo di Parkinson è dovuto ad una progressiva degenerazione delle cellule che producono il neurotrasmettitore dopamina in una specifica regione del cervello. Il trapianto di cellule staminali indotte a differenziarsi in cellule che producono dopamina sembra molto promettente per i trattamenti a lungo termine di questa malattia. Analogamente, le cellule staminali possono diventare una fonte di cellule che producono insulina nel pancreas dei pazienti con il diabete mellito; oppure potrebbero essere indotte a trasformarsi in neuroni negli individui che hanno subito danni al midollo spinale o altri danni neurologici.

L'obiettivo ultimo dei ricercatori è di realizzare linee di cellule umane pluripotenti a crescita continua, che possano essere indotte a differenziarsi in condizioni controllate, che mantengano stabilmente il loro stato differenziativo e che possano essere modificate geneticamente. A livello di ricerca, si cercherà di sviluppare linee di cellule staminali embrionali di pazienti affetti da cancro, diabete, malattie cardiovascolari e disordini neurodegenerativi (come il morbo di Parkinson), per studiare l'origine di tali malattie e comprenderne le basi molecolari e cellulari. Benché per molti anni si siano condotti studi sulle cellule staminali nel topo e in altri organismi, studi simili nell'uomo sono progrediti con lentezza malgrado le grandi promesse iniziali di queste ricerche.

Ad oggi, le uniche fonti conosciute di cellule staminali totipotenti sono gli embrioni umani precoci avanzati dalle procedure di fecondazione in vitro (vedi Capitolo 50). Molte nazioni pongono restrizioni governative sulle cellule staminali, basate su considerazioni etiche correlate all'origine e alla gestione degli embrioni. Altri paesi, in particolare alcuni stati asiatici, non pongono limitazioni a questo tipo di ricerca. Negli Stati Uniti, l'amministrazione Obama ha rimosso alcune delle restrizioni imposte dal precedente governo di George W. Bush e i finanziamenti pubblici hanno ripreso ad essere disponibili dal 2009.



FIGURA 17-5
Cellule staminali embrionali (ES) umane

Cellule staminali pluripotenti indotte (iPS) potranno forse rimpiazzare le cellule staminali embrionali (ES)

Nel biennio 2007-2008 i ricercatori hanno scoperto la possibilità di

produrre cellule staminali pluripotenti indotte (iPS) introducendo alcuni fattori trascrizionali in cellule mature di topo e umane, principalmente fibroblasti e cellule della cute (si ricordi dal Capitolo 14 che i fattori di trascrizione sono proteine in grado di legare il DNA e regolare la trascrizione genica negli eucarioti).

I fattori di trascrizione riprogrammano lo stadio di sviluppo delle cellule mature per ritrasformarle in cellule embrionali pluripotenti; il meccanismo attraverso il quale avviene questa conversione non è ancora stato scoperto. Si ipotizza che i fattori di trascrizione siano in grado di rimuovere i gruppi metilici che bloccano alcuni geni chiave nelle cellule adulte, riportandoli allo stato attivo caratteristico delle cellule embrionali. (Si ricorda dal Capitolo 14 che l'ereditarietà epigenetica consiste nell'inattivazione genica, per esempio a causa della metilazione del DNA). Nel caso di geni inattivati dalla metilazione, la rimozione dei gruppi metilici è in grado di riattivare i geni.

Gli scienziati devono tuttavia progredire ulteriormente nella comprensione delle iPS, prima di poter procedere con il loro utilizzo al posto delle cellule staminali embrionali. Qualora si dovesse raggiungere questo traguardo, le controversie legate alle questioni etiche sull'utilizzo delle cellule ES (che saranno discusse nel prossimo paragrafo) non avranno più senso di esistere, in quanto non sarà più necessario operare con cellule prelevate da embrioni.

Esistono questioni etiche relative alla clonazione umana

La ricerca sulla clonazione continua ad alimentare un acceso dibattito sulla possibile clonazione umana e sulle sue implicazioni etiche e religiose. Negli Stati Uniti, è stata stabilita una Commissione Nazionale di Bioetica, che ha il compito di esaminare questa ed altre questioni. Nel considerare questi problemi, è importante tener presente che il termine *clonazione* è abbastanza generico ed include una serie di procedure differenti per la produzione di cellule, tessuti, organi oppure organismi.

La clonazione riproduttiva umana ha lo scopo di generare un nuovo essere umano geneticamente identico ad un altro, di solito un adulto. Si tratta dell'impianto in utero di un embrione umano generato con un processo diverso dalla fecondazione. Molti paesi si sono opposti a questo tipo di clonazione.

La clonazione terapeutica umana consiste, invece, nella duplicazione di cellule ES umane o di cellule iPS per studi scientifici o scopi medici, ma senza raggiungere il completo sviluppo di un nuovo essere umano. Queste cellule forniscono riserve di tessuti da trapiantare, quali il muscolo cardiaco o il tessuto nervoso, per trattamenti medici rivoluzionari.

Molte persone sostengono la ricerca per la clonazione terapeutica ritenendola in grado di apportare grandi benefici alla cura delle malattie. Altre persone avanzano obiezioni etiche o religiose, specialmente nel caso in cui gli embrioni (cellule ES) siano creati specificamente a scopi di ricerca e poi distrutti.

Verifica

- Quali prove esistono a sostegno del principio dell'equivalenza nucleare?
- Come mai il gruppo di Wilmut ha avuto successo nella clonazione dei mammiferi mentre altri hanno fallito?
- Cosa sono le cellule staminali?

17.2 IL CONTROLLO GENETICO DELLO SVILUPPO

OBIETTIVO DI APPRENDIMENTO

4. Indicare le caratteristiche di *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Mus musculus* ed *Arabidopsis thaliana* che hanno reso tali organismi dei validi modelli per gli studi di genetica dello sviluppo.
5. Distinguere tra geni ad effetto materno, geni della segmentazione e geni omeotici in *Drosophila*.
6. Spiegare il rapporto esistente tra fattori di trascrizione e geni che controllano lo sviluppo.
7. Definire l'induzione e l'apoptosi e fornire esempi del ruolo che svolgono nello sviluppo.

Per molti anni, la biologia dello sviluppo è stata un'area importante di ricerca e uno sforzo consistente è stato fatto nello studio dello sviluppo di organismi invertebrati e vertebrati. Identificando i quadri di morfogenesi in specie diverse, i ricercatori sono stati capaci di mettere in evidenza somiglianze e differenze nei piani fondamentali dello sviluppo che si susseguono dallo zigote fino all'individuo adulto, in specie che vanno dal riccio di mare ai mammiferi (vedi Capitolo 51).

In aggiunta agli studi descrittivi, alcuni esperimenti classici hanno permesso di comprendere il differenziamento cellulare e ciò che avviene durante i vari processi di sviluppo. I ricercatori hanno sviluppato programmi di screening per mettere in evidenza mutazioni in grado di rivelare i geni dello sviluppo sia nelle piante che negli animali. Essi inoltre impiegano una grande varietà di tecnologie di genetica molecolare ed altre metodologie sofisticate, per determinare come questi geni funzionino e come interagiscano per coordinare i processi di sviluppo.

Esiste una varietà di organismi modello che forniscono informazioni sui processi biologici di base

Negli studi sul controllo genetico dello sviluppo è diventata sempre più importante la scelta dell'organismo da usare come modello sperimentale. Un organismo modello è una specie selezionata per la conduzione di studi biologici, in quanto presenta caratteristiche che consentono un'analisi efficace dei processi biologici. Poiché la maggior parte degli organismi modello è rappresentata da piccoli organismi, con tempi di generazione brevi, è facile farli crescere e studiarli in condizioni controllate. Per esempio, i topi sono modelli migliori dei canguri.

Uno degli approcci più potenti in genetica dello sviluppo comporta l'isolamento di mutanti in un organismo modello con anomalie dello sviluppo. Non tutti gli organismi hanno caratteristiche utili da permettere di isolare e mantenere mutanti per lo sviluppo da utilizzare in ricerca. La genetica del moscerino della frutta, *Drosophila melanogaster*, è conosciuta così a fondo che questo organismo è diventato uno dei sistemi più importanti per questo tipo di studi. Anche altri organismi sono diventati importanti in genetica dello sviluppo, come il verme nematode *Caenorhabditis elegans*, lo zebrafish *Danio rerio* ed il topolino di laboratorio, *Mus musculus*, così come alcune piante quali l'*Arabidopsis thaliana* ed alcuni eucarioti semplici come il lievito *Saccharomyces cerevisiae*. Ciascuno di questi organismi ha caratteristiche che lo rendono particolarmente utile per esaminare particolari aspetti dello sviluppo (FIG. 17-6).

Negli anni '90, i genetisti dello sviluppo che lavoravano su *C. elegans* hanno scoperto l'RNA interference, uno strumento di ricerca che può essere ancora più potente dell'identificazione di mutanti. Nell'RNA interference (RNAi) certe piccole molecole di RNA interferiscono con l'espressione dei geni o con i loro trascritti di RNA (vedi Capitolo 13). Una delle modalità di azione di tali molecole consiste nel silenziare i geni mediante il taglio selettivo delle molecole di mRNA che hanno sequenze complementari a quelle delle piccole molecole di RNA. L'utilizzo della RNAi rende possibile la soppressione dell'espressione di uno specifico gene nel corso dello sviluppo di un organismo e quindi la deduzione della funzione di quel gene.

Molti geni che controllano lo sviluppo sono stati identificati nel moscerino della frutta

La sequenza del genoma del moscerino della frutta *Drosophila*, disponibile dal 1999, contiene circa 13.600 geni che codificano per proteine. Tra questi, almeno 1.200 sono essenziali per lo sviluppo embrionale.

Due dei fondamentali vantaggi del modello sperimentale *Drosophila* risiede nei numerosi alleli mutanti (inclusi quelli dello sviluppo) disponibili per la ricerca e la relativa facilità con cui le nuove mutazioni possono essere direttamente localizzate sui cromosomi. Il biologo statunitense Edward B. Lewis (1918-2004), un pioniere nella genetica dello sviluppo, iniziò a lavorare con i mutanti di *Drosophila* negli anni '40. Successivamente, il lavoro del tedesco Christiane Nüsslein-Volhard e dell'americano Eric Wieschaus ampliarono le conoscenze sullo sviluppo del moscerino della frutta. Nel 1995, Lewis, Nüsslein-Volhard e Wieschaus hanno condiviso il premio Nobel per la Medicina per i decenni dedicati alla ricerca sulla genetica dello sviluppo di *Drosophila*. Molti dei geni che essi scoprirono nel moscerino della frutta sono adesso noti per essere importanti nella crescita e nello sviluppo di tutti gli animali.

Il ciclo vitale della *Drosophila* comprende gli stadi di uovo, larva, pupa ed adulto

Il ciclo vitale della *Drosophila* consiste di molti stadi distinti (FIG. 17-7). Alla fecondazione dell'uovo segue l'embriogenesi, in cui lo zigote si trasforma in un individuo sessualmente immaturo: la larva . Dopo la schiusa dall'uovo, la larva subisce numerose mute in cui perde l'involucro esterno, o cuticola. Ad ogni muta, la larva si ingrandisce, finché è pronta a divenire una pupa . L'impupamento comprende una muta e l'indurimento della cuticola neoformata, cosicché la pupa è completamente incapsulata nell'involucro esterno. A questo punto, l'insetto va incontro ad una completa metamorfosi (cambio di forma). In questo periodo, la maggior parte dei tessuti larvali degenera e altri tessuti si differenziano in parti del corpo proprie dell'insetto adulto sessualmente maturo.

Le larve sono vermiformi e non hanno alcuna somiglianza con l'insetto adulto; tuttavia, le cellule progenitrici di molte delle strutture adulte si organizzano precocemente nello stadio di larva in strutture bilaterali relativamente indifferenziate, chiamate dischi imaginali. Questo termine deriva da *imago*, come viene chiamato l'insetto adulto. Ogni disco imaginale ha una ben definita posizione nella larva e formerà una struttura specifica nel corpo dell'insetto, ad esempio l'ala o la zampa (FIG. 17-8). I dischi si formano al termine dell'embriogenesi, quando la larva inizia a nutrirsi. La larva può essere considerata un complesso stadio dello sviluppo che nutre e protegge le cellule progenitrici dell'individuo adulto, che rappresenta l'unica forma capace di riprodursi.

L'organizzazione degli abbozzi delle strutture dell'organismo adulto, come pure dei dischi imaginali, è sotto un complesso controllo genico. Sono stati identificati più di 50 geni per la formazione dei dischi, per la loro disposizione nella larva e per la loro funzione definitiva nell'adulto. Questi geni sono stati identificati per mezzo di mutazioni che impediscono ad alcuni dischi di formare o modificare strutture o di portare a termine il loro programma di sviluppo.

Mutazioni dello sviluppo in *Drosophila* modificano il piano corporeo

Sono stati identificati numerosi mutanti dello sviluppo in *Drosophila* i cui effetti in varie combinazioni sono stati esaminati e studiati in dettaglio a livello molecolare. Nella nostra discussione, prenderemo in considerazione gli effetti che si osservano sulla segmentazione del corpo sia dell'insetto adulto sia della larva.

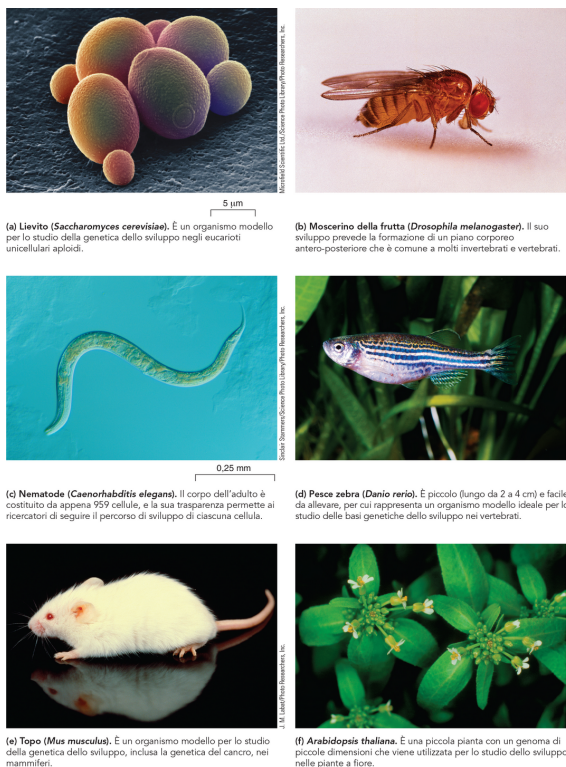
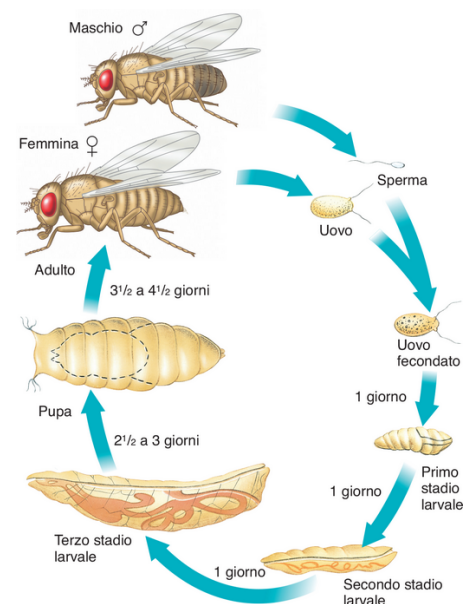


FIGURA 17-6 Organismi modello nella genetica dello sviluppo

FIGURA 17-7 Il ciclo vitale di *Drosophila*

Il moscerino della frutta attraversa diversi stadi mentre si sviluppa da zigote a mosca adulta sessualmente matura. Per completare il ciclo vitale a 25°C sono necessari circa 12 giorni. Le linee tratteggiate all'interno della pupa rappresentano l'animale durante la metamorfosi.

I primissimi stadi dello sviluppo di *Drosophila* coinvolgono l'organizzazione della struttura dell'uovo nell'ovario della femmina. Quando l'uovo si sviluppa, RNA messaggeri (mRNA), proteine del vitello e altre molecole citoplasmatiche sono trasferiti alla cellula uovo dalle cellule materne circostanti. Immediatamente dopo la fecondazione, il



nucleo zigotico si divide, iniziando una serie di 13 divisioni mitotiche consecutive.

Ognuna di queste impiega solo 5-10 minuti, ad indicare che il DNA dei nuclei è replicato in modo costante e ad elevata velocità. Durante questo periodo, la sintesi di RNA è bloccata, non avviene la citocinesi e i nuclei rimangono localizzati al centro dell'embrione fino all'ottava divisione. Raggiunta l'ottava divisione, la maggior parte dei nuclei inizia a migrare verso la periferia dell'embrione. Poiché i nuclei non sono circondati da singole membrane plasmatiche, questo stadio è noto come stadio del *blastoderma sinciziale*. (Un sincizio è una struttura che contiene molti nuclei circondati dallo stesso citoplasma). Successivamente si formano le membrane cellulari, e questo stadio è chiamato *blastoderma cellulare*.

Geni ad effetto materno I geni che organizzano la struttura dell'uovo sono detti geni ad effetto materno . Questi geni, localizzati nei tessuti materni circostanti, trascrivono molecole di mRNA che verranno trasportate all'interno dell'uovo in via di sviluppo. L'analisi di mutanti di questi geni ha evidenziato che molti sono coinvolti nella polarità dell'embrione, nel definire cioè quale parte dell'uovo sarà anteriore o posteriore, dorsale o ventrale (vedi Capitolo 30); questi geni sono quindi noti *come geni della polarità dell'uovo*.

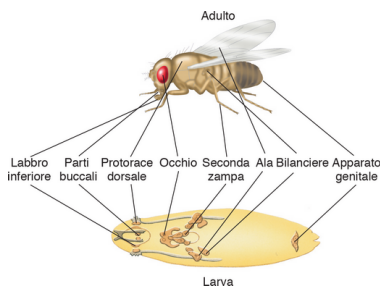


FIGURA 17-8 La posizione dei dischi imaginali

Ciascun paio di dischi in una larva di *Drosophila* (in basso) si sviluppa in uno specifico paio di strutture nella mosca adulta.

La FIGURA 17-9a illustra il gradiente di concentrazione per due tipi specifici di mRNA materno presenti nell'embrione in fase precoce. Questi trascritti di mRNA di alcuni dei geni ad effetto materno possono essere identificati attraverso l'ibridazione con sonde radioattive di DNA di geni clonati (vedi Capitolo 15). In alternativa, i loro prodotti proteici possono essere identificati da anticorpi fluorescenti in grado di legarli in modo specifico (come nella fotografia all'inizio del capitolo). Il gradiente proteico prodotto organizza il quadro precoce dello sviluppo dell'embrione definendo la porzione anteriore e quella posteriore.

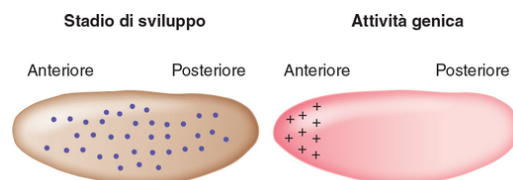
Una combinazione dei gradienti di proteine può fornire informazioni posizionali che specificano il destino di ciascun nucleo o cellula all'interno dell'embrione. Per esempio, mutazioni in geni ad effetto materno possono produrre un embrione con due teste o due estremità posteriori, per l'assenza di segnali specifici nell'uovo.

In molti casi, il fenotipo associato alle mutazioni di geni ad effetto materno può essere annullato iniettando mRNA materno normale nell'embrione mutante ed ottenendo uno sviluppo normale: ciò dimostra che il prodotto di questi geni è necessario per un periodo molto breve e solo nei primissimi stadi dello sviluppo. Geni della segmentazione Quando i nuclei iniziano a migrare alla periferia dell'embrione, comincia la sintesi di mRNA embrionale da parte dei geni della segmentazione . Finora, sono stati individuati almeno 24 geni della segmentazione che contengono l'informazione per generare un modello ripetitivo di segmenti nell'embrione e nel moscerino adulto. Sulla base di studi effettuati su fenotipi mutanti, i geni della segmentazione sono stati raggruppati in tre classi — geni gap (di intervallo), geni pair-rule (regolatori della coppia) e geni segment polarity (di polarità dei segmenti).

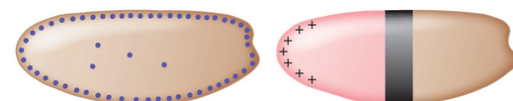
I geni gap sembrano essere il primo gruppo di geni ad entrare in azione: interpretano l'informazione materna presente nell'uovo che direziona in senso antero-posteriore lo sviluppo dell'embrione e iniziano ad organizzare i segmenti in una regione anteriore, una intermedia ed una posteriore (FIG. 17-9b). Una loro mutazione provoca la mancanza di uno o più segmenti nell'embrione (FIG. 17-10a).

FIGURA 17-9 Primi stadi dello sviluppo in *Drosophila*

Le sezioni longitudinali sulla sinistra mostrano due stadi dello sviluppo iniziale dell'embrione di *Drosophila* . Sulla destra sono riportati i quadri semplificati dell'attività genica corrispondenti ai due stadi. (Adattato da M.E. Akam, "The Molecular Basis for Metameric Pattern in the *Drosophila* embryo", Development , Vol. 101, 1987).



(a) A 1,25 ore dalla fecondazione, l'embrione è costituito da 128 nuclei (cerchietti viola) all'interno di un citoplasma comune. I geni ad effetto materno suddividono l'embrione in un settore anteriore ed uno posteriore. Le crocette nella regione anteriore rappresentano le molecole di mRNA trascritte da uno dei geni ad effetto materno. La sfumatura rosa rappresenta un diverso mRNA materno che è più concentrato nella regione anteriore.



(b) A due ore dalla fecondazione, circa 1500 nuclei sono migrati alla periferia dell'embrione ed hanno cominciato a produrre le proprie molecole di mRNA. I geni gap suddividono l'embrione in tre settori: anteriore, centrale e posteriore. L'mRNA materno mostrato in rosa è ora trascritto da geni di segmentazione (crocette) nei nuclei della regione anteriore. L'mRNA di un altro gene gap è trascritto nel settore centrale dell'embrione (regione scura).

Le altre due classi di geni della segmentazione non agiscono su piccoli gruppi di segmenti, ma su tutti i segmenti. Mutazioni dei geni pair-rule distruggono i segmenti pari o dispari, producendo una larva con la metà del numero normale di segmenti (FIG. 17-10b e FIG. 17-11). Mutazioni dei geni segment polarity producono segmenti in cui manca una parte, che è sostituita dall'immagine speculare della rimanente (FIG. 17-10c). Gli effetti delle diverse classi di mutanti sono riassunti nella TABELLA 17-1 .

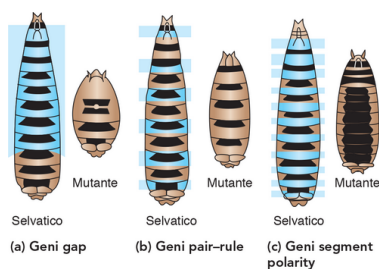


FIGURA 17-10 Confronto degli effetti delle mutazioni nei geni della segmentazione in *Drosophila*

Geni gap, geni pair-rule e geni segment polarity controllano la disposizione dei segmenti corporei nell'embrione di *Drosophila* . Le bande blu indicano le regioni in cui, nell'embrione normale (wild type), i prodotti proteici di questi geni sono espressi normalmente. Queste stesse regioni sono assenti negli embrioni in cui il gene è mutato, ovvero i mutanti sono privi delle regioni indicate in blu. Il fenotipo risultante è tipico della classe a cui il gene appartiene. (Adattato da C. Nüsslein-Volhard and E,

Wieschaus, "Mutations Affecting Segment Number and Polarity in *Drosophila* ". Nature , Vol. 287, 1980).