

Diagnostica molecolare delle malattie genetiche: metodi diretti

R. Galanello^a, C. Sollaino^a, L. Perseu^b, L. Cipollina^a, C. Perra^a, A. Cadeddu^a, F. Deidda^a

^aDipartimento di Scienze Biomediche e Biotecnologie, Università degli Studi, Cagliari

Ospedale Regionale per le Microcitemie, Cagliari

^bIstituto CNR, Cagliari

Negli ultimi 25 anni sono stati compiuti progressi straordinari nella conoscenza della struttura e funzione dei geni. Questo è stato reso possibile dallo sviluppo di metodi di analisi del DNA che hanno consentito l'isolamento dei geni, la definizione della loro struttura normale e delle mutazioni responsabili di numerose malattie ereditarie e non. Alcuni metodi di analisi del DNA hanno raggiunto oramai una vasta applicazione clinica in quanto consentono, in maniera rapida e relativamente semplice, di identificare le diverse mutazioni (puntiformi e non) che sono alla base delle malattie ereditarie.

L'introduzione da parte di Mullis e coll. nel 1986 (1) della Polymerase Chain Reaction (PCR), in biologia molecolare, ha rappresentato la tappa forse più importante per lo studio e la diagnosi delle malattie genetiche. Infatti tutte le metodiche di analisi si basano sulla amplificazione del DNA mediante reazione a catena con polimerasi (PCR). Le procedure per l'identificazione di una mutazione possono essere distinte in due gruppi. Il primo consiste in tecniche che identificano mutazioni conosciute, il secondo gruppo comprende metodi che servono a definire mutazioni sconosciute. Tali metodi sono esaurientemente descritti in vari lavori (2). Descriveremo qui in dettaglio l'applicazione di tali metodi alla diagnosi molecolare diretta di: α -talassemia, difetto di glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PD), sindrome di Gilbert, emocromatosi ereditaria.

α -Talassemia

Circa il 10% della popolazione Sarda presenta riduzione di MCV ed MCH con HbA₂ ed F normali e sideremia normale. Diverse forme di talassemia sono associate con questo fenotipo e precisamente α -talassemia, $\gamma\delta\beta$ -talassemia e doppia eterozigosi per δ e β -talassemia. La differenziazione tra α -talassemia e gli altri alleli talassemici al locus β , è un aspetto essenziale nella consultazione genetica. Infatti, mentre l' α -talassemia non determina, almeno nell'area mediterranea, quadri clinici gravi, gli altri due alleli β -talassemici,

possono determinare il grave quadro clinico della talassemia major. L'identificazione dei portatori di α -talassemia può essere eseguita con lo studio della sintesi globinica in vitro nei reticolociti del sangue periferico, o con l'analisi del DNA mediante Southern Blotting. Entrambi i metodi però sono lunghi, complessi, costosi e implicano l'uso di sostanze radioattive. In questi ultimi anni sono stati messi a punto metodi basati sulla PCR che consentono una diagnosi rapida e semplice di α -talassemia. I difetti da delezione, che sono i più comuni (α^+ -talassemia: $-\alpha/\alpha\alpha$ e $-\alpha/-\alpha$), vengono diagnosticati mediante l'utilizzo di un primer comune alla regione 5' di entrambi i geni $\alpha 2$ e $\alpha 1$, e di due primers specifici per le regioni 3' divergenti dei geni. La presenza della delezione da luogo ad un frammento riarrangiato corrispondente al singolo gene α che si origina a seguito del crossing over ineguale, responsabile della delezione stessa. Con la stessa amplificazione è possibile rivelare anche l'eventuale presenza di un gene α triplicato ($\alpha\alpha\alpha^{\text{anti } 3,7}$), in soggetti che presentano HbA₂ borderline. Per la diagnosi di α^+ -talassemia ($-\alpha/\alpha\alpha$) si utilizzano invece due primers che fiancheggiano i punti di rottura della delezione. Questi oligonucleotidi consentono l'amplificazione di un segmento di DNA solo se è presente la delezione. In caso contrario il frammento è troppo grande e non può essere amplificato (3). Come controllo viene contemporaneamente amplificato il DNA di un cromosoma normale utilizzando uno dei primers fiancheggianti la delezione ed un primer omologo ad una regione di DNA rimossa dalla delezione.

I difetti da non delezione più comuni (codon iniziale ATG \rightarrow ACG, $\alpha 2$ IVS-1 - 5bp) vengono identificati digerendo il DNA amplificato, rispettivamente con gli enzimi di restrizione NcoI ed HphI, in quanto i siti di restrizione di questi enzimi sono aboliti dalla mutazione.

Il DNA amplificato ed eventualmente digerito (in caso di ricerca dei difetti da non delezione), viene sottoposto ad elettroforesi su gel di agaroso e colorazione con bromuro di etidio. Dal pattern elettroforetico ottenuto si può risalire al tipo di α -talassemia eventualmente presente (3).

Tabella I. Definizione di varianti G6PD mediante PCR ed enzimi di restrizione.

| Variante G6PD | Mutazione | Esoni amplificati | Enzima | DNA | | |
|---------------|-----------|-------------------|--------|------------------|-------------------------------------|---|
| | | | | Amplificato (bp) | Frammenti dopo digestione (bp) | |
| | | | | | Normale | Mutato |
| Mediterranea | 563 C→T | 6.7 | MbolI | 547 | 377, 119, 26, 26 | 277, 119, 100, 26, 26 |
| Seattle | 844 G→C | 8 | DcaI | 164 | 101, 58, 5 | 158, 5 |
| S.Antioco | 1342 A→G | 10.11 | HaeIII | 497 | 144, 130, 70, 87, 80, 25, 18, 12, 8 | 130, 115, 70, 67, 80, 29, 25, 18, 12, 8 |
| Union | 1360 C→T | 10.11 | FspI | 497 | 452, 45 | 497 |

In grassetto i frammenti specifici delle varianti.

Questi stessi metodi vengono utilizzati per definire a livello molecolare la malattia da HbH, una forma di α -talassemia intermedia caratterizzata da anemia emolitica microcitica ed ipocromica con lieve ittero e splenomegalia. Esistono due forme di gravità diversa di malattia da emoglobina H: da delezione (meno grave), e da non delezione (più grave). La loro differenziazione ha importanti implicazioni sia per la prognosi che per il trattamento e quindi la definizione a livello molecolare della malattia da HbH è essenziale.

Difetto di glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PD)

Il difetto di G6PD, uno dei più comuni difetti enzimatici nell'uomo, è caratterizzato da una notevole eterogeneità biochimica e molecolare. La caratterizzazione biochimica delle varianti è complessa, mentre la definizione molecolare è ora possibile con metodi semplici basati sull'analisi del DNA. Il difetto di gran lunga più comune (oltre il 90% dei casi) riscontrato in Sardegna è la variante Mediterranea, caratterizzata dalla sostituzione C→T al nucleotide 563. Con frequenza minore sono state trovate le varianti S. Antioco (nt 1342 A→G), Seattle (nt844 G→C), e Union (nt 1360 C→T) (Galanello R. e Sollaino C., risultati non pubblicati). Esclusa la Seattle, che appartiene alla classe III WHO, tutte le altre sono di classe II e quindi possono dare gravi crisi emolitiche acute conseguenti l'ingestione di fave, di farmaci ossidanti o in corso di processi infettivi.

Tutte le varianti indicate sono identificabili mediante digestione del DNA amplificato con enzimi di restrizione, in quanto le rispettive mutazioni creano o aboliscono i siti di restrizione, generando pattern di frammenti specifici e caratteristici (Tab. I) (4).

Sindrome di Gilbert

La sindrome di Gilbert è una forma benigna di iperbilirubinemia indiretta fluttuante, causata da una ridotta attività dell'enzima uridin-difosfo-glucuronosiltransferasi (UGT). Sono state recentemente definite le basi molecolari di questa sindrome e la forma più comune (oltre il 90% dei casi) dipende da una

mutazione del promoter del gene UGT-1A (5). I soggetti normali presentano nel promoter di questo gene una sequenza conservata (TA) ripetuta 6 volte [(TA)₆]. E' stato dimostrato che la presenza di un dinucleotide TA aggiuntivo, per cui la sequenza diventa (TA)₇, determina la riduzione dell'attività enzimatica di circa il 30%. Questa condizione si associa frequentemente al quadro clinico della sindrome di Gilbert. Nella β -talassemia, sia allo stato eterozigote che omozigote, nel difetto di G6PD, nella sferocitosi ereditaria, la presenza di un genotipo (TA)₇/(TA)₇ si associa ad una iperbilirubinemia a volte anche marcata, con aumentato rischio di sviluppo di calcolosi della colecisti (6, 7).

Per la diagnosi la regione del promoter del gene UGT-1A viene amplificata mediante PCR utilizzando primers specifici (Bosma e coll., 1995). Uno dei primers in 5' è marcato con fluoresceina. I frammenti ottenuti, di 98 paia di basi (bp) se è presente il (TA)₆ e di 100 bp se è presente il (TA)₇, vengono separati con elettroforesi su un gel denaturante di acrilamide, utilizzando il sequenziatore automatico ABI-PRISM 377 (Fig. 1A). L'applicazione di questo metodo relativamente semplice ha notevolmente semplificato la diagnosi della sindrome di Gilbert, evitando test fastidiosi per il paziente (digiuno prolungato, assunzione di barbiturici) e non sempre indicativi.

Emocromatosi ereditaria

L'emocromatosi ereditaria è un disordine del metabolismo del ferro, a trasmissione autosomica recessiva, caratterizzato da un aumento dell'assorbimento intestinale del ferro alimentare. Fegato, cuore, ghiandole endocrine, cute ed articolazioni sono le sedi di maggior deposito. Cirrosi epatica, diabete mellito, ipopituitarismo, ipogonadismo, cardiomiopatia, iperpigmentazione cutanea ed artriti ne rappresentano le conseguenti manifestazioni cliniche.

Il gene responsabile dell'emocromatosi, denominato HFE, è stato identificato da Feder e coll. nel 1996 (8). La mutazione responsabile della maggior parte dei casi di emocromatosi ereditaria è una sostituzione nucleotidica G→A in posizione 845, corrispondente ad uno scambio tra gli aminoacidi tirosina e cisteina in posi-

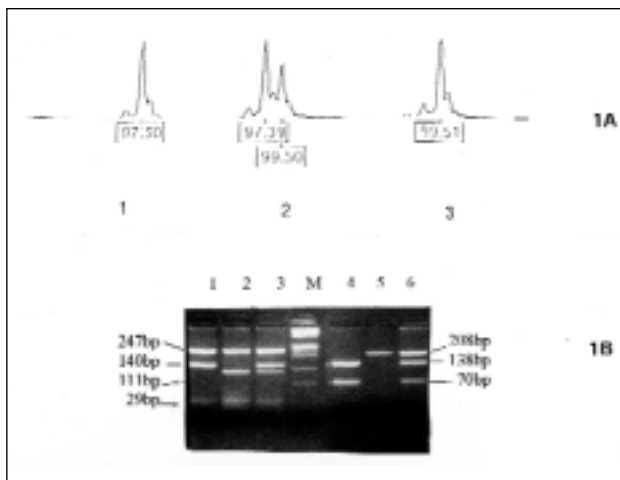


Figura 1. A: Diagnosi di sindrome di Gilbert mediante amplificazione del promoter del gene UGT-1A e separazione con ABI-PRISM 377. 1: normale (TA)6/(TA)6. 2: eterozigote (TA)6/(TA)7. 3: omozigote (TA)7/(TA)7. I numeri nei rettangoli indicano le dimensioni dei frammenti. B: Analisi di mutazioni del gene HFE. 1, 2, 3: mutazione C282Y: 1, normale. 2, omozigote mutato. 3, eterozigote. M: Marker per dimensioni frammenti. 4, 5, 6: mutazione H63D. 4, normale. 5, omozigote mutato. 6, eterozigote. I numeri a lato indicano le dimensioni dei frammenti.

zione 282 (C282Y). Questa mutazione può essere identificata direttamente mediante digestione del DNA amplificato con primers specifici, con l'enzima di restrizione RsaI. Dal DNA normale si ottengono 2 frammenti di 247 e 140 paia di basi, mentre dal DNA mutato si ottengono 3 frammenti di 247, 111 e 29 pb, in quanto la mutazione C282Y crea un nuovo sito di taglio per l'enzima RsaI (Fig. 1B). Mentre la mutazione C282Y è rara in Sardegna, un'altra mutazione del gene HFE, il cui ruolo non è stato ancora ben definito (semplice polimorfismo o coinvolgimento anche se lieve nel metabolismo del ferro) ha una prevalenza relativamente elevata. Tale mutazione consiste nella sostituzione di una istidina con un acido aspartico in posizione 63 (H63D). Questa sostituzione abolisce un sito di taglio per l'enzima MboI per cui dal DNA normale, dopo digestione con MboI, si ottengono due frammenti rispettivamente di 138 e 70 bp, mentre in presenza della mutazione H63D si ottiene un solo frammento di 208 bp (Fig. 1B). Diversi studi sono in corso per comprendere il ruolo di questa mutazione.

Conclusioni

Le metodiche di analisi del DNA sono oramai alla portata di molti laboratori e non più ristrette a Centri altamente specializzati. La tecnologia della PCR, oggi completamente automatizzata e miniaturizzata è ancora in evoluzione. Sono già disponibili sistemi analitici che utilizzano la PCR su microchips di silicene che contengono migliaia di sonde molecolari su una superficie molto ridotta. Questi sistemi consentiranno in futuro di analizzare simultaneamente migliaia di geni (o di pazienti) o i loro trascritti.

Bibliografia

1. Mullis KB, Faloona FA, Scharf FA, Saiki RK, Horn GT, Herlich HA. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symp. Quant Biol 1986; 51:263-73.
2. Cao A, Galanello R. Le emoglobinopatie. In: Burlina A, ed. Biochimica clinica speciale. Padova: Piccin 1994; pp 1-40.
3. Galanello R, Sollaino C, Paglietti E, Barella S, Perra C, Doneddu I, et al. α -Thalassemia carrier identification by DNA analysis in the screening for thalassemia. Am J Hematol 1998; 59:273-8.
4. Martinez di Montemuros F, Dotti C, Tavazzi D, Fiorelli G, Cappellini MD. Molecular heterogeneity of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) variants in Italy. Haematologica 1997; 82:440-5.
5. Bosma PJ, Chowdhury JR, Bakker C, et al. The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome. N Engl J Med 1995; 333:1171-5.
6. Galanello R, Cipollina MD, Dessì C, Giagu N, Lai E. Co-inherited Gilbert's syndrome: a factor determining hyperbilirubinemia in homozygous β -thalassemia. Haematologica 1999; 84:103-5.
7. Miraglia del Giudice E, Perrotta S, Nobili B, Specchia C, d'Urzo G, Iolascon A. Coinheritance of Gilbert syndrome increases the risk for developing gallstones in patients with hereditary spherocytosis. Blood 1999; 94:2259-62.
8. Feder JN, Gnirke A, Thomas W, et al. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary hemochromatosis. Nat Genet 1996; 13:399-408.