

INTRODUZIONE

La **diagnostica molecolare** individua l'insieme delle tecniche di biologia molecolare che consentono l'analisi di specifici geni, dei loro prodotti, della loro funzione, non che di ogni altro tipo di indagini di RNA, DNA o dei cromosomi, finalizzato ad individuare o escludere variazioni della sequenza del DNA associate a patologie genetiche.

Noi analizziamo o direttamente il DNA (nella maggior parte dei casi) o l'RNA o i cromosomi e l'obiettivo finale è quello di cercare di capire cosa nel DNA provoca la malattia genomica, perché tutto parte proprio da una modifica a livello del DNA (nostro materiale genetico) e di riflesso questa alterazione si può ripercuotere sulla struttura del DNA o produrre a livello dei cromosomi delle alterazioni (i cromosomi sono il DNA ma entrare nella sequenza è importante come vedremo per alcune applicazioni, conoscere in maniera precisa i punti di rottura anche a livello dei cromosomi è importante ai fini clinici)

Quindi la diagnostica molecolare è la parte applicativa della biologia molecolare clinica, che è quel settore della medicina di laboratorio che racchiude l'insieme dei test genetici che però sono sviluppati ed eseguiti sulla base di approcci metodologici-concettuali tipici della biochimica, della biologia molecolare e della genetica molecolare.

Parlare della biologia molecolare clinica è parlare di un ragionamento, l'elaborazione di concetti che richiedono poi l'utilizzo di metodologie che servono a giungere al risultato finale che ci dice "qual è l'alterazione del DNA che produce un certo effetto" ragionando su:

- biologia molecolare → perché ragioniamo su acidi nucleici;
- biochimica → perché molto spesso le alterazioni interessano geni che codificano per proteine che sono oggetto di studio della biochimica;
- e genetica molecolare o genetica medica → che servono a ragionare su un tipo di patologia, modalità di trasmissione, ecc.

L' **obbiettivo** dei test applicati alla diagnosi di malattie genetiche umane, che possono essere sia ereditarie che acquisite, è quello di evidenziare presenza di eventuali differenze qualitative e/o quantitative nella sequenza di DNA. (Questo DNA può essere estratto da cellule di uno o più tessuti relativamente ad un individuo affetto da patologie) e queste differenze devono essere valutate: se c'è una differenza nella comparazione rispetto a quella di un soggetto considerato normale= ossia in buono stato di salute nei confronti alla condizione.

Oggi le eventuali differenze qualitative e quantitative possono essere anche valutate. È importante valutare contemporaneamente oltre al soggetto che stai valutando anche un soggetto normale appartenente alla stessa popolazione perché esistono delle differenze genetiche popolazione-specifiche che potrebbero non essere riportate nei database che contengono le sequenze di riferimento dei geni umani. Noi possiamo fare la valutazione rispetto alla sequenza di DNA di un individuo che per noi è normale, oppure possiamo riferirci ad una sequenza genica di riferimenti che è quella riportata nel database dei geni che è quella che viene considerata normale. Però qualche volta capita che facendo questo termine di paragone si trova che nel tuo paziente si trova una variante, una variazione che ti sembra una differenza rispetto a quello che c'è nella sequenza genica portata nelle banche dati ma poi infondo quando si analizzano i soggetti appartenenti alla tua popolazione quella mutazione è sempre presente perché è una tipicità oppure c'è un errore nelle sequenze riportate nelle banche dati (perché le sequenze nelle banche dati vengono digitate da qualcuno quindi potrebbero esserci errori). Per questo motivo è importante che la sequenza sia confrontata con quella di un soggetto normale, cioè colui che non ha nessuna alterazione in quel pezzo di DNA, è il "**Termine di paragone**", il

nostro controllo negativo. Quindi se faccio una valutazione se il mio paziente ha una variazione devo ragionare sugli effetti di quella variazione. E infatti, i test genetici possono avere varie finalità: prevalentemente si tratta di test che hanno finalità diagnostiche, che quindi sono eseguiti sulla base di un sospetto clinico, o su una diagnosi clinica certa che però vuole conoscere qual è la base molecolare di quelle malattie. Ad esempio, per la β -talassemia è facile dire che si tratta di un deficit di β -globina, nella maggior parte dei casi, infatti non c'è bisogno di fare una diagnosi, il test genetico fa una valutazione di qual è la causa molecolare cioè qual è la variante che nel gene della β -globina altera l'espressione di quel gene che causa poi la malattia genetica. In altri casi, invece, ci sono dei veri test diagnostici per le malattie con segni clinici sovrapponibili, che possono essere causate da mutazioni dello stesso gene ma anche in geni diversi (es: il clinico formula un sospetto di malattia genetica che però gli stessi segni clinici potrebbero essere riconducibili anche ad altre malattie, e allora vogliamo una conferma di che malattia si tratta) quindi, la diagnostica molecolare spesso fa la diagnosi della malattia, cioè da un nome alla malattia del paziente. Questo è sempre più vero nell'era del sequenziamento di ultima generazione: ci sono dei progetti che analizzano le malattie cosiddette "orfane" cioè quelle malattie sconosciute per le quali si è consapevoli che si tratta di una patologia genetica con un fenotipo complesso. per queste malattie ci sono diversi approcci sia **citogenetico molecolari** → quelli che vanno a valutare la struttura dei cromosomi, quindi ampi riarrangiamenti o perdite di materiale quindi anche delezioni che portano via più geni, aneuploide); ma anche a livello molecolare si può vedere anche nel dettaglio la sequenza di un gene, quindi a livello delle singole basi nucleotidiche per numerosissimi geni. In questo caso, come per il sequenziamento complesso ad esempio dell'esoma, che ha consentito spesso di dare un nome a malattie genetiche per le quali non c'era nessuna associazione tra il fenotipo clinico ed un gene-malattia. Così sono stati scoperti numerosissimi geni ed in questo modo si è visto che il numero di geni malattia nuovi, quindi nuove associazioni geni-malattia o malattie già note con nuovi geni, aumentano ogni anno del circa 60%. Quindi sono Test diagnostici che permettono di ottenere l'informazione diagnostica ad un costo relativamente basso e ad un'invasività minima.

Una volta che è stata riconosciuta a causa molecolare di una malattia genetica possono essere studiati i familiari. Questi familiari possono essere considerati "affetti" e quindi vengono valutati per la presenza della mutazione; ma nella maggior parte dei casi, visto che oltre il 50% delle malattie ereditarie sono autosomiche recessive, i soggetti a rischio di avere figli affetti dalla malattia sono i cosiddetti "portatori sani". L'individuazione delle cause molecolari di una malattia di questo genere consente all'interno della famiglia di identificare i portatori che è importante per pianificare la riproduzione; una coppia di portatori deve essere a conoscenza di avere un rischio procreativo, (malattia autosomica recessiva è pari al 25%, quindi un soggetto che è portatore di una malattia genetica si deve creare il problema di qual è la probabilità che il suo partner possa essere anche esso portatore) se si conosce qual è la malattia genetica: es un uomo che ha avuto dal primo matrimonio due figli affetti da albinismo oculocutaneo (malattia prevalentemente trasmessa con modalità autosomica recessiva di cui sono noti 7/8 geni che se mutati possono causare l'albinismo) si è sottoposto al test genetico, è stata identificata la mutazione (perché i figli non sono stati analizzati) è stata trovata una mutazione del gene della tirosinasi, quest'uomo oggi ha intenzione di sposare un'altra donna e per questo, anche se l'albinismo è una malattia rara, anche per questa donna verrà eseguito il test di analisi del gene per la tirosinasi per vedere se anche lei è portatrice di questa mutazione (quindi si fa un test e si cercano eventuali varianti di quel gene:

- se si identificano → si individua lo stato di portatore;

- se non si identificano → si farà il conto del rischio residuo, che quella persona di cui non è stato indentificato quel gene malattia, abbia una mutazione che il mio test non è riuscito a vedere. (perché i test genetici hanno dei limiti)

Lo studio del portatore è facile per β talassemia; può essere più difficile per altri geni come quei geni che sono molto grandi e analizzarli non è così semplice.

Oppure possono essere nel contesto prevalentemente clinico per il monitoraggio delle malattie, per esempio mediante il **dosaggio qualitativo / quantitativo** di genomi virali che sono genomi esogeni (ad esempio oggi si parla tanto del corona virus, lì si fa un dosaggio qualitativo perché si va a cercare in maniera specifica il genoma virale, l'acido nucleico virale. Si fa lo stesso anche per l'HIV, HCV che sono retrovirus cioè virus a RNA che devono essere trattati usando tecniche di amplificazione genica previa retro-trascrizione. Questo dosaggio può essere sia **qualitativo** es il tampone per il virus ti dà una risposta del tipo "presente o assente"; però in certe condizioni può essere anche **quantitativi** per stabilire qual è la carica virale. Non si fa per il corona virus ma lo si fa per HCV per valutare il monitoraggio dell'efficacia di una terapia specifica). Il monitoraggio di una malattia specifica può essere fatto anche per la determinazione della **malattia residua minima**, ad esempio nel caso delle malattie emo-linfo-proliferative come alcuni tipi di leucemie, attraverso tecniche diagnostiche molecolari rilevare la presenza del oncogene, quindi dell'acido nucleico che produce l'effetto trasformante attraverso l'analisi qualitativa, quindi la definizione di qual è la definizione genetica che ha causato quel tipo di patologia, dopo di che si può applicare un'analisi quantitativa che ci dice il numero di cellule che continuano ad essere trasformate nonostante la terapia, quando poi il numero di queste cellule risulterà molto basso ci avviciniamo alla fase di dimissione della terapia.

Quindi è importante quest'altro tipo di alterazione perché consente di monitorare l'efficacia di una terapia e anche di cambiarla se non funziona.

Poi ci sono i test basati sull'analisi del "fingerprint" → si basa sull'analisi dei micro satelliti polimorfici presenti in tutto il genoma umano; è molto utilizzata ai fini forensi o medico legali per la determinazione dell'individualità genetica che però sono utili anche per gli studi di zigosità e di chimerismo in corso di trapianti (perché nel corso di un trapianto di midollo osseo le cellule del donatore vanno a rimpiazzare le cellule del soggetto che ha subito il trapianto quindi l'analisi del DNA estratto dal sangue periferico del paziente trapiantato, consente attraverso l'utilizzo del fingerprint genetico, consente di identificare se il midollo che è stato trapiantato ha rimpiazzato completamente quello precedente del soggetto ricevente del trapianto) anche per valutare l'identità di gemelli omozigoti.

Poi ci sono i **test predittivi** di malattia in cui la diagnosi precoce consente di intervenire riducendo la gravità o la mortalità della malattia o una terapia o consentendo una profilassi cioè un trattamento. I test predittivi per antonomasia sono i test di screening prenatale oppure i test molecolari prenatali. Per la maggior parte dei casi questi test non vengono fatti come screening nella popolazione ma vengono fatti nelle famiglie in cui ci sta un certo rischio predefinito; quindi, tra i vari test predittivi troviamo quelli di predisposizione alla malattia che è applicabile ad individui asintomatici con predisposizione genetica ad una specifica malattia. (ad esempio, se in una famiglia ci sta un'evidente predisposizione perché ci sono più individui con tumore alla mammella per il quale è stata fatta l'analisi molecolare ed è stata identificata la variante verosimilmente causativa di quella patologia i familiari, anche se in quel momento asintomatici, possono sottoporsi al test e conoscere la predisposizione ad ammalarsi). Quindi se hanno la mutazione possono avere, a seconda della malattia genetica, una certa predisposizione, che può essere del 100% o meno, ad ammalarsi.

Quindi, i **test pre-sintomatici** sono test predittivi che vengono effettuati su individui asintomatici con una storia positiva per un disordine genetico che chiedono di sapere se anche loro sono a rischio di sviluppare quel disordine.

(es. la corea di huntington che ha un esordio tardivo possiamo stabilire se ci sta la predisposizione a sviluppare la malattia). Poi, con quale **gravità** si svilupperà la malattia, è una cosa che si ragiona di volta in volta sulla base delle correlazioni genotipo- fenotipo; sulla base delle caratteristiche molecolari dell'alterazione, e di volta in volta ritorniamo allo stesso approccio metodologico: trovo l'alterazione, e devo ragionare su quella che è la prospettiva di quel risultato che dipende

- dalla malattia= genetica molecolare;
- dal tipo di alterazione= biologia molecolare
- sul tipo di prodotto che risulta alterato;
- sul perché; sul dove e sul come questa alterazione altera l'espressione del gene che la contiene.

Oltre ai test predittivi della malattia, ci sono quelli di **predisposizione a lungo termine** che è applicabile ad individui sia asintomatici, ma anche a quelli con segni clinici e storia familiare positiva per una condizione che non è necessariamente e interamente genetica, ma può essere poligenica, multifattoriale e che si sa che può avere un background genetico. tra queste ci sono trombofilia, rischio emorragico; diabete, obesità, sulle quali si può agire cambiando lo stile di vita o facendo dei monitoraggi per seguire o evitare la comparsa della malattia, perché a valle di un test predittivo di malattia ci può essere un follow up che in certi casi può essere efficace e in certi altri si fa per capire quando la malattia comincia a manifestare i vari sintomi oppure si inizia ad agire per rallentare la comparsa del sintomo o per evitarla completamente.

I test genetici possono essere anche di tipo **citogenetico**. Un soggetto che nasce con una condizione clinica complessa, una condizione sindromica, di solito, la prima cosa a che viene richiesta è **l'analisi del cariotipo**:

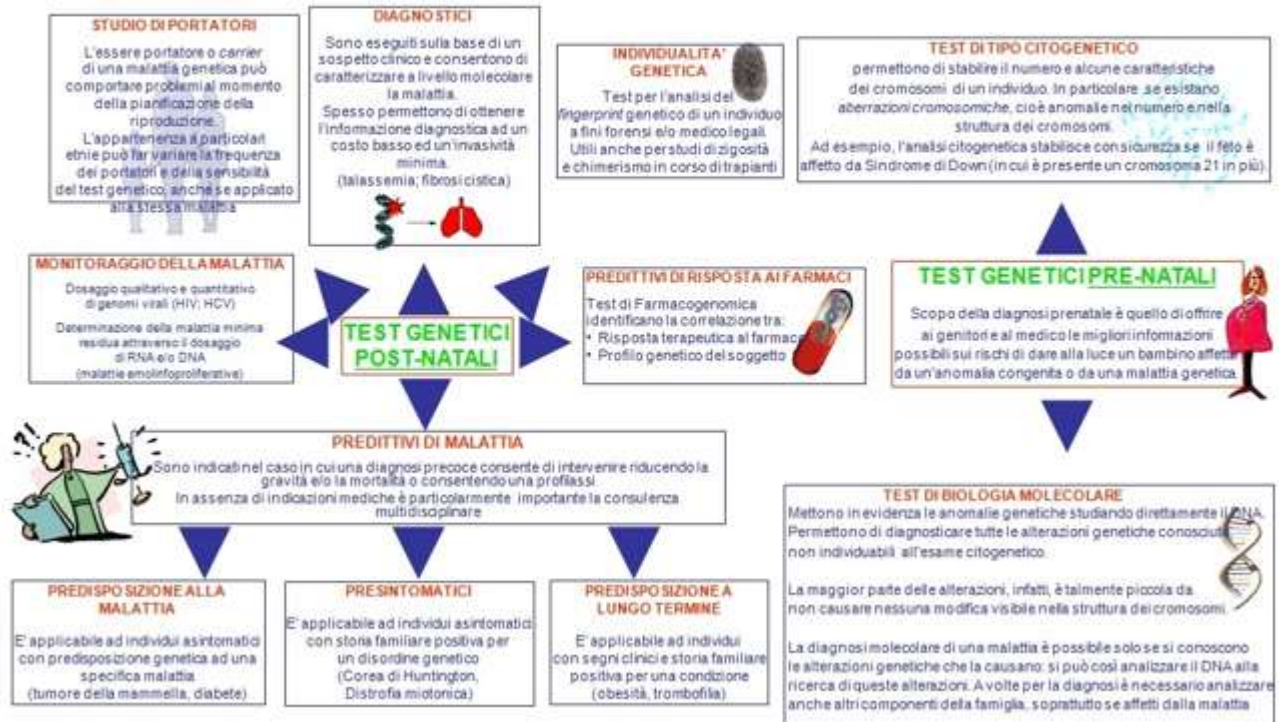
- **Cariotipo convenzionale** o

- **cariotipo molecolare**: La **citogenetica molecolare** permette di stabilire il numero e le caratteristiche dei cromosomi di un individuo; in particolare se esistono delle aberrazioni cromosomiche, cioè anomalie del numero e della struttura dei cromosomi, ma anche della dose genica, le cosiddette "varianti strutturali del genoma" che sono grosse perdite di materiale genetico o le duplicazioni e delezioni, ma anche molto altro. Queste sono utilizzate moltissimo anche in epoca prenatale con tecniche non invasive: infatti con tecniche molecolari di ultima generazione, come il sequenziamento di ultima generazione, è possibile valutare anche il numero di copie, aberrazioni come trisomie, aneuploidie, sindrome di down, cromosoma 13, e altre alterazioni che causano perdita di materiale genetico.

I test prenatali sono quelli più diffusi per fare prevenzione delle malattie genetiche, perché la conoscenza delle basi molecolari, quindi delle malattie genetiche parte proprio dalla diagnostica molecolare ci consente di capire quali sono i meccanismi citogenetici e quindi di capir poi agire cercando di correggere quel difetto. Un esempio è la SMA che la conoscenza della base della malattia ha consentito di creare due diversi tipi di terapia genica, una che agisce sull'RNA con degli ASO (oligonucleotidi antisenso che lavorano sull'RNA) e poi la terapia genica convenzionale che prevede l'inserimento del transgene nell'individuo affetto (il transgene può essere veicolato in maniera diversa, ad es. con vettori virali), in questo modo si possono correggere anche singole mutazioni. Ad esempio, si possono correggere alcuni tipi di distrofia muscolare di Duchenne/Becker con lo skipping di alcuni esoni. (Quindi se ci sono individui con una certa delezione, alcuni possono beneficiare della terapia molecolare e alcuni no, altri

possono beneficiare della terapia molecolare quando ci stanno degli stop codon, o quando ci sono delle alterazioni dello splicing) come scendo qual è l'effetto della variante genica sull'espressione di quel gene, e tutto parte ovviamente dall'identificazione di quella variante, ma lo studio consente di capire qual è il meccanismo e capire se quel meccanismo può essere corretto; e anche se si possono correggere solo certe mutazioni e altre no, può essere importante anche se per pochi pazienti.

- La Diagnostica Molecolare si basa sull'analisi qualitativa e quantitativa di DNA e RNA per risalire, o contribuire a risalire, alla causa della malattia e, quando possibile, al suo trattamento
- **Obiettivo:**
 - Evidenziare la presenza di eventuali alterazioni nella sequenza nucleotidica del DNA (**GENOTIPO**) rispetto a quelle di un soggetto considerato "normale", cioè in buono stato di salute nei confronti della condizione morbosa.



La diagnostica molecolare è la base per lo sviluppo della terapia, quindi per iniziare la ricerca finalizzata alla cura.

Tuttavia per molte malattie genetiche la cura ancora non c'è, ma in quel caso quando una famiglia è consapevole di avere un figlio affetto da una certa malattia genetica, può richiedere di effettuare un test molecolare prenatale e quindi individuare in epoca anche molto precoce, attraverso l'analisi del DNA fetale, quali sono le gravidanze a rischio e poi decidere per l'interruzione della gravidanza che dipende dalla malattia, dalle chance terapeutiche, ecc.

Prima si diceva che le malattie dovute ad alterazione del numero e della forma dei cromosomi sono le meno numerose ma le più frequenti perché è più facile che una malattia compaia come conseguenza di un grosso riarrangiamento del genoma, piuttosto che per piccole cose. Oggi invece sappiamo che sono moltissime le malattie genetiche e le alterazioni che causano delle condizioni diversissime, molte di queste molto rare e complessivamente sono le più numerose anche se meno frequenti, ma questo è da vedersi perché a volte non sono riconosciute come tali e quindi i numeri della frequenza sono sottostimati. Per questo è importante lo sviluppo e l'evoluzione tecnologica per lo studio degli acidi nucleici.

Quindi, i test di biologia molecolare permettono di mettere in evidenza anomalie genetiche studiando direttamente il DNA e permettono di diagnosticare tutte le alterazioni genetiche