

LEZIONE DI GENETICA CLINICA  
(prof. Banfi, 27/04/2017)

NUOVE PROCEDURE DIAGNOSTICHE PER LE MALATTIE GENETICHE

TEST GENETICO: per test genetico si intende una determinazione analitica orientata all'identificazione di alterazioni correlate a malattie ereditarie. Conosciamo diversi tipi di test genetici:

- 1) **TEST DIRETTO** -> analisi diretta del DNA o dell'RNA.
- 2) **TEST INDIRECTO** -> analisi dei marcatori genetici co-ereditati con il gene che provoca la malattia o delle sequenze geniche prossime al suddetto gene di cui non si conosce la sequenza (Linkage). Attualmente questo test non è più utilizzato perché abbiamo a disposizione l'intera sequenza genomica.
- 3) **TEST BIOCHIMICO** -> analisi dei metaboliti. Viene studiato l'effetto che la mutazione causa sulla proteina/enzima prodotto. Si usa per lo più nello studio di malattie metaboliche come ad esempio per la FENILCHETONURIA [ in questo caso viene effettuato un test biochimico pre-natale con una goccia di sangue su cui viene ricercata la fenilalanina-idrossilasi ].
- 4) **TEST CITOGENETICO** -> esame dei cromosomi impiegato per la diagnosi di malattie non mendeliane.

**TEST DIRETTO** : il test diretto ricerca la specifica mutazione sequenziando il gene responsabile.

Per questo tipo di test sono a disposizione tecniche di sequenziamento di I generazione e tecniche di sequenziamento di II generazione.

SEQUENZIAMENTO DI I GENERAZIONE (metodo Sanger ) -> Prendiamo il sangue del soggetto, estraiamo il DNA, isoliamo il gene da sequenziare, amplifichiamo il gene e ne sequenziamo i frammenti. Ogni gene è costituito dall'alternanza di esoni ( sequenze codificanti ) ed introni ( non codificanti).

Il sequenziamento di un gene prevede il sequenziamento degli esoni, è dunque necessario procedere all'isolamento e all'amplificazione di questi ultimi.

Malattie per cui viene usato il sequenziamento di I generazione: fibrosi cistica, accondroplasia.

SEQUENZIAMENTO DI II GENERAZIONE ( next generation sequencing ) -> con queste metodiche viene sequenziato un volume enorme di DNA con costi e tempi molto limitati. Conosciamo :

A) **TARGETED RESEQUENCING**

B) **WHOLE EXOME SEQUENCING**

C) **WHOLE GENOME SEQUENCING**

**TARGETED RESEQUENCING**: sequenziamento ristretto, possibile solo se conosciamo già qual è il gene responsabile della patologia. Una volta estratto il DNA, isolo i geni target e sequenzio solo quelli.

Viene impiegato con geni molto grandi o con un gruppo di geni. In particolare questa metodica trova indicazione nei casi di elevata ETEROGENEITA' GENETICA -> per eterogeneità genetica intendiamo una condizione in cui lo stesso fenotipo può essere causato da mutazioni in geni diversi, mutazioni che codificano per diverse unità o subunità di una proteina o per proteine che agiscono a stadi diversi di un processo metabolico.

[ rene policistico, cancro della mammella familiare, retinite pigmentosa, distrofie muscolari dei cingoli, osteogenesi imperfetta, NF. ]

Scaricato da [www.sunhope.it](http://www.sunhope.it)

**RENE POLICISTICO** : si tratta di uno dei più comuni disordini genetici e presenta trasmissione autosomica dominante e penetranza incompleta. Circa il 10% dei soggetti in dialisi è motivato dal rene policistico e il 60% delle persone affette da rene policistico raggiunge la dialisi prima dei 60 anni.

I geni implicati sono PKD1 e PKD2; nella popolazione sana c'è un'altissima variabilità di espressione di questi due geni, essendo così possibili diversi polimorfismi che non corrispondono a mutazioni.

CLINICA – numerose cisti a livello dei nefroni e dei dotti collettori, a livello epatico e pancreatico. L'eterogeneità fenotipica è elevata sia per la gravità della patologia renale, che per il numero di manifestazioni extrarenali e per l'età di insorgenza.

**RETINITE PIGMENTOSA** : è la forma più frequente di retinopatia ereditaria. L'esordio è caratterizzato da cecità notturna e degenerazione della retina periferica con elettroretinogramma ridotto.

La genetica della malattia è resa complicata dal fatto che ci sono più di 50 geni coinvolti e dall'evidenza che la trasmissione della patologia può essere autosomica dominante, autosomica recessiva, x linked o anche legata ai mitocondri.

Nei casi in cui non si trovi in forma isolata è presente associazione con altri disturbi ( sordità + retinite pigmentosa = Sindrome di Usher )

**WHOLE EXOME SEQUENCING** : con questa tecnica andiamo ad analizzare l'ESOMA, insieme di esoni del nostro genoma ( 2% del genoma).

Si tratta della tecnica di scelta quando non si hanno ipotesi sul gene responsabile della patologia (ad es. un nuovo fenotipo) o in caso di una condizione eterogenea in cui il targeted resequencing abbia dato esito negativo.

**WHOLE GENOME SEQUENCING**: sequenziamento di tutto il genoma. Si tratta di una tecnica ancora troppo costosa per l'uso diagnostico. Dovrebbe essere utilizzata nei casi in cui i precedenti test diano esiti negativi o per un'eventuale studio delle sequenze introniche, responsabili di varianti associate a malattie complesse.

SVANTAGGI DELLE TECNICHE DI SEQUENZIAMENTO DI II GENERAZIONE:

- Difficile interpretazione dei dati ottenuti con una tabella particolarmente articolata
- Riconoscimento di mutazioni che non stavamo cercando ( reperti accidentali )

Nei reperti accidentali il problema è soprattutto di natura etica; è stato stabilito che è doveroso informare il paziente laddove ci può essere un chiaro rischio per la sua salute ( es. alcune cardiopatie, aritmie ecc.)

#### FORME DI TUMORI EREDITARI

Sono causati da fattori genetici che agiscono secondi principi dell'ereditarietà mendeliana. Sono da distinguere rispetto a semplici aggregazioni familiari di alcuni tumori.

La trasmissione è autosomica dominante e i geni implicati sono per lo più oncosoppressori->la mutazione è trasmessa per via germinale, al verificarsi della seconda mutazione a livello somatico si ha lo sviluppo del tumore.

**TUMORE EREDITARIO MAMMELLA E OVAIO** : BRCA1 e BRCA2 sono i geni implicati, si tratta di geni codificanti per proteine implicate nel processo di riparazione del DNA. Tali geni hanno un'enorme

variabilità d'espressione e riconoscono la presenza di numerosi polimorfismi [è perciò indispensabile utilizzare molta cautela nell'interpretazione dei dati ottenuti con i test, non tutte le anomalie corrispondono a mutazione]. La trasmissione è autosomica dominante con alta penetranza (incompleta). Gli individui eterozigoti hanno un rischio 4-5 volte maggiore alla popolazione con genotipo normale di sviluppare neoplasia. Tuttavia solo nel 20% dei casi con sospetta ereditarietà è presente mutazione di BRCA1 o BRCA2.

Viene utilizzato per questa forma il targeted resequencing proprio perché conosciamo già le sequenze coinvolte. Le indicazioni al test sono :

- Carcinoma mammario in età giovanile (<30-35 anni)
- Carcinoma mammario bilaterale
- Diagnosi di carcinoma mammario e ovarico
- Carcinoma mammario in soggetti di sesso maschile
- Multipli casi di carcinoma mammario in famiglia

Se il test ha un risultato positivo -> monitoraggio clinico = visita senologica, ecografia, mammografia, RMN, ecografia transvaginale. -> mastectomia bilaterale ed annessiectomia bilaterale.

#### **TUMORE DEL COLON-RETTO :**

- 1) POLIPOSIS FAMILIARE DEL COLON
- 2) SINDROME DI LYNCH

**POLIPOSIS FAMILIARE DEL COLON:** polipi adenomatosi nell'intestino crasso che tendono a degenerare in tumori maligni. *Centinaia* = forma classica, *migliaia* = forma diffusa, *< di 100* = forma attenuata.

È inevitabile la comparsa di carcinomi in età precoce (solitamente intorno ai 40 anni).

C'è anche un rischio aumentato di sviluppare altri tumori in età pediatrica (medulloblastoma).

La trasmissione è autosomica dominante con penetranza completa. Spesso si associa ad una ipertrofia dell'epitelio pigmentato retinico (amartomi).

La mutazione caratteristica di questo tumore è una perdita del gene APC, raramente ci troviamo di fronte ad una condizione autosomica recessiva causata da mutazioni del gene MUTYH

**DIAGNOSI:** amartomi retinici + test genetico che viene effettuato in soggetti minorenni visto la gravità della situazione.

**TRATTAMENTO:** nelle forme classiche -> colonscopia periodica (annuale) in soggetti eterozigoti, colectomia subtotali preventiva precoce (16-18 anni).

Nelle forme diffuse -> proctocolectomia totale.

**SINDROME DI LYNCH:** tumori ereditari colon-rettali non poliposici. Colpisce per lo più la regione prossimale del crasso. Spesso si associa a cancro dell'endometrio e ad altre neoplasie. L'età media alla diagnosi è 44 anni. I geni coinvolti sono MLH1, MSH2, MSH6, coinvolti nel meccanismo di riparazione degli appaiamenti tra basi del DNA; la trasmissione è autosomica dominante con penetranza incompleta.

**PROFILASSI E TRATTAMENTO:** non c'è indicazione alla chirurgia in assenza di neoplasia (penetranza incompleta); pancolonscopia periodica dai 20-25 anni e talvolta colectomia subtotali preventiva.

#### **TEST CITOGENETICO:**

- Cariotipo
- FISH
- Array CGH

Il **cariotipo** è un'analisi della morfologia dei cromosomi, il limite è la bassa risoluzione. Con esso infatti non è possibile evidenziare anomalie strutturali inferiori a 5-10 megabasi (milioni di basi). Le **SINDROMI SUBMICROSCOPICHE** sono sindromi dovute a delezioni-duplicazioni che interessano meno di 5 milioni di basi, (es. Sindrome di DiGeorge – problematiche cardiache e dei grossi vasi, palatoschisi, anomalie facciali e ritardo intellettivo).

Con la **FISH** i cromosomi vengono ibridati con una sonda fluorescente che riconosce le regioni specifiche del genoma. È necessario tuttavia un orientamento diagnostico ben preciso.

**L'ARRAY CGH** ( comparative genomic hybridization) è una tecnica che invece ci consente di studiare mutazioni submicroscopiche. Sospettiamo la presenza di una sindrome submicroscopica in presenza di:

- Ritardo
- Malformazioni congenite
- Alterazioni scheletriche
- Fenomeni oncologici
- Perdita della capacità riproduttiva.

Andiamo ad effettuare una comparazione tra il genoma del paziente e un genoma di controllo. Il genoma di controllo nello specifico viene immobilizzato su un vetrino, viene poi ibridato con il DNA del soggetto e poi con una rilevazione laser si percepisce la combinazione dei colori ottenuti dalla marcatura dei cromosomi. Riduzione o innalzamento del segnale sono così facilmente evidenziabili. Questa tecnica è più sensibile del cariotipo e della FISH nella ricerca delle duplicazioni e delle delezioni; lo svantaggio è quello di non poter vedere inversioni o traslocazioni.

Talvolta invece è difficile dimostrare che l'anomalia riscontrata in un soggetto sia responsabile del suo quadro clinico, per questo motivo viene analizzato il genoma dei genitori.

Se i genitori presentano la stessa mutazione ma sono fenotipicamente sani -> non c'è associazione

Se i genitori non presentano la mutazione -> c'è un'associazione tra questa e l'espressione fenotipica responsabile del quadro clinico del soggetto.

#### TERAPIA GENICA

Bisogna distinguere il trattamento farmacologico-chirurgico da quello genetico vero e proprio. Si intende per **TERAPIA GENICA** il trattamento di malattie attraverso il trasferimento di materiale genetico (DNA o RNA). Le strategie terapeutiche sono sostanzialmente due :

Terapia genica su cellule somatiche ( sul target ) – non determinerà variazioni nella progenie

Terapia germinale – eradica la malattia anche nelle generazioni successive ( ancora non accettata ).

La terapia genica somatica può essere effettuata in vivo (iniettando il trattamento direttamente nel tessuto) ed ex vivo ( prendo le cellule del paziente, le metto in coltura, faccio avvenire il trasferimento di materiale e poi le reinietto nel paziente).

Per l'introduzione di acidi nucleici nelle cellule possono essere utilizzati vettori virali o non virali. Il vettore è un agente che permette l'ingresso del gene terapeutico, quelli virali sfruttano recettori già espressi dalle cellule mentre quelli non virali si affidano ad un passaggio per interazione fisica.

Per le malattie caratterizzate da mutazioni con *perdita di funzione* (generalmente recessive), la strategia terapeutica è quella della sostituzione genica. Somministro il gene mancante tramite vettori virali evitando che questi attivino la loro replicazione all'interno del paziente. I virus maggiormente utilizzati a questo scopo sono i retrovirus, gli adenovirus, gli adenoassociati e i lentivirus che sono meglio tollerati.

Le malattie trattate con questa strategia sono :

- ADA
- Immunodeficienze severe combinate
- Leucodistrofia metacromatica ( alterazione del SNC per disfunzione lisosomiale)
- Amaurosi congenita di Leber ( mutazione RPE65)

Nelle malattie che invece si caratterizzano per mutazioni con *guadagno di funzione* ( Corea di Huntington), bisogna andare a spegnere l'allele mutato o cancellare i suoi effetti tossici. Recentemente tale strategia è entrata con successo nel protocollo terapeutico di una patologia grave:

ATROFIA MUSCOLARE SPINALE -> si tratta di una patologia contrassegnata dalla degenerazione del II motoneurone per il quale compare una grave forma di atrofia muscolare a prognosi infausta.

La forma infantile è la più grave; si tratta di una malattia autosomica recessiva e il gene responsabile è l'SMN1.

Il gene SMN1, responsabile della sopravvivenza dei motoneuroni, si trova sul cromosoma 5, a poca distanza dal gene SMN2, del tutto uguale al precedente tranne che per una base (T al posto di C). Quest'unica differenza è alla base di uno splicing anomalo tra esone 6 ed esone 8 del gene SMN2 per il quale si realizza un codone di stop con mancata o minima produzione della proteina.

Il gene SMN1 è inoltre soggetto a polimorfismi -> qualora siano perse tutte le copie di SMN1 si realizzerà il quadro grave di atrofia muscolare spinale; in caso di perdita di una sola copia del gene, avremo il soggetto portatore.

Nei soggetti con perdita di tutte le copie del gene SMN1 è indispensabile andare a vedere le copie disponibili del gene SMN2 -> la gravità della malattia decresce all'aumentare del numero di copie di SMN2 (anche se la proteina viene prodotta in misura minore è comunque un minimo apporto utile).

APPROCCIO TERAPEUTICO: sostituzione dell'SMN1 oppure inibizione dello splicing anomalo di SMN2 con potenziamento della sua funzione. Proprio per andare ad aumentare la sintesi proteica dell'SMN2 vengono impiegati degli oligonucleotidi antisense che impediscono lo splicing anomalo. Questa tecnica prende il nome di NUSINERSEN e prevede un'iniezione intratecale mediante puntura lombare.

#### MEDICINA DI PRECISIONE

Nuova disciplina che deve tener conto della variabilità individuale e dei diversi genotipi. È resa possibile dalle nuove metodiche di sequenziamento genico. Viene applicata attualmente per il *carcinoma non a piccole cellule del polmone* per il quale è stato evidenziato come, a seconda del genotipo, ci sia una buona

risposta ad alcune specifiche terapie. Mutazioni di EGFR rispondono bene al trattamento con Erlatinib e Afatinib mentre mutazioni di ALK rispondono al Crizotinib.

