

Sei uno studente e stai svolgendo uno stage presso un importante istituto di diagnosi e ricerca sulle malattie neurodegenerative. Al centro si rivolgono anche le persone che intendono sottoporsi al test genetico predittivo per Corea di Huntington (Malattia di Huntington, MH), una malattia neurodegenerativa ereditaria che si manifesta in genere a partire dai 35-40 anni di età con la presenza di movimenti involontari, modificazioni della personalità e danni psichici progressivi.

Il gene responsabile della malattia si trova sul cromosoma 4 e contiene le informazioni per la produzione della proteina huntingtina. Nel gene normale è presente una sequenza di triplette CAG ripetute fino a circa 30 volte. Nelle persone affette dalla malattia le ripetizioni sono più numerose: da 35-40 fino a 100 o più. Queste ripetizioni (espansioni) eccessive della tripletta producono una proteina anomala che causa la degenerazione dei neuroni. La Corea di Huntington è una malattia autosomica dominante (è sufficiente la presenza di una sola copia alterata del gene perché si manifesti) ed insorge più precocemente e con sintomi più gravi quanto più numerose sono le ripetizioni CAG. L'introduzione del test genetico, con cui si può quantificare la lunghezza delle ripetizioni di triplette, permette di fare previsioni sulla possibilità di sviluppare la MH. A richiedere l'esame sono i figli o i fratelli sani o ancora asintomatici di persone affette che vogliono sapere se hanno ereditato o meno l'anomalia genetica. Il test si effettua a partire da un semplice prelievo di sangue.

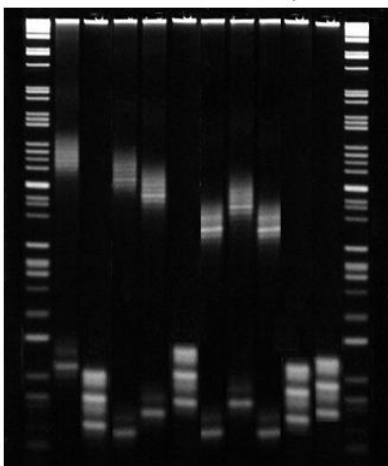
Olimpia è una giovane donna con una storia familiare di malattia di Huntington: la nonna paterna è morta per tale malattia. Il padre di Olimpia è deceduto molto giovane (30 anni), prima che si manifestassero i sintomi della MH. Per scoprire se abbia ereditato il gene mutato dalla nonna e quindi possa sviluppare i sintomi della MH più tardi nella vita, si rivolge al centro per una consulenza.

1. Dai dati a disposizione dall'anamnesi pensi che ci sia la probabilità di rischio per Olimpia di avere ereditato il gene per la Malattia di Huntington?

E' comunque opportuno effettuare il test genetico e siccome è previsto dalla normativa che i soggetti che richiedono tali esami vengano informati in maniera completa su tutti gli aspetti tecnici dell'analisi che viene fatta sul loro DNA, il tuo tutor ti ha incaricato di realizzare un opuscolo informativo per coloro che richiedono il test, prendendo spunto dalle domande più frequenti che vengono rivolte dai pazienti. Per ogni domanda devi preparare una risposta scritta, che sia chiara per una persona che è in grado di comprendere il linguaggio scientifico e che sia corredata anche dei dettagli tecnici, nel caso la persona li volesse approfondire.

2. Devi in particolare descrivere i passaggi essenziali della procedura per verificare la presenza dell'anomalia genetica, spiegando perché questo processo assicura di non errare nella diagnosi.
3. La figura mostra il risultato dell'elettroforesi relativo a 10 pazienti sottoposti al test genetico. Puoi usarlo per spiegare a coloro che si rivolgono al centro diagnostico come vengono ottenuti e interpretati i risultati del test. Indica quali sono i pazienti portatori dell'allele mutato e argomenta la tua scelta. Olimpia è il paziente n.2. Ha ereditato il gene mutato dalla nonna?

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 M



1-10 Pazienti

M Marcatore (frammenti di DNA di grandezza nota)

NB Poiché il numero di ripetizioni è somaticamente instabile nei campioni 1-10 si osservano bande multiple invece di bande nette

Proposta di soluzione

Dal testo lo studente può ricavare che la mutazione associata alla Malattia di Huntington, l'espansione delle triplette CAG, comporta un gene più lungo del normale. In sintesi, la tecnica da utilizzare comporterà quindi un piccolo prelievo di materiale biologico dal soggetto richiedente, una amplificazione del gene tramite la PCR ed una successiva elettroforesi che, nel caso sia presente la mutazione, separerà due distinte bande di DNA: una normale che migra più velocemente attraverso il gel e una alterata che si sposterà più lentamente e il cui peso molecolare potrà essere ricavato dal confronto con opportuni marcatori, che indicheranno approssimativamente il numero delle ripetizioni presenti.

Lo studente dovrebbe realizzare un opuscolo informativo, partendo da domande o da concetti chiave : a titolo di esempio:

Che tipo di prelievo si deve fare? Può bastare un piccolo prelievo di sangue o altro materiale biologico perchè comunque il DNA di interesse viene amplificato con una PCR. (Qui potrebbe descrivere la tecnica in sintesi.)

Come si fa ad individuare esattamente il gene responsabile della malattia? Conoscendo le sequenze di basi poste a monte e a valle del tratto genetico che interessa, si "disegnano i primer" complementari a tali sequenze. I primer devono avere combinazioni di nucleotidi con sequenze di basi che siano complementari esclusivamente a quella regione genetica e non ad altre: per questo dovrebbero avere una lunghezza adeguata.

Una volta amplificato il gene, da cosa si capisce che porta la mutazione? L'elettroforesi sfrutta un campo elettrico per far migrare attraverso un gel , di solito agarosio, macromolecole biologiche dotate di cariche elettriche, come le proteine o il DNA. Il DNA che è carico negativamente e si trova in soluzione assieme a glicerolo e un colorante , viene caricato in pozzetti situati vicino al polo negativo della cella; la velocità della migrazione verso l'anodo dipende sia dalle cariche presenti sulla molecola che dal peso molecolare: in questo caso è proprio la maggior lunghezza del DNA recante la mutazione a farlo migrare più lentamente.

Il DNA è reso fluorescente attraverso il trattamento con un agente intercalante come l'etidio bromuro, che sviluppa fluorescenza quando è illuminato da luce ultravioletta. Nei soggetti che potranno sviluppare la malattia, si noteranno due bande ben distinte, mentre nei soggetti normali si avrà una sola banda di DNA . L'immagine aiuta ad esemplificare i risultati possibili: Il caso n°1 è un individuo che presenta numerose espansioni di triplette, dal momento che una delle due bande di DNA è situata molto in alto; il caso N°2 , Olimpia , presenta una banda multipla, tutta di DNA "leggero" quindi si può concludere che non ha ereditato il gene mutato della nonna e non potrà sviluppare la malattia, lo stesso si può dire dei casi N°5,9 e 10 per i quali il test risulta negativo. Come si può vedere dall'immagine, il test distingue nettamente le due situazioni; la diagnosi potrebbe essere incerta solo nel caso il numero di ripetizioni CAG fosse di poco superiore al normale.

A chi viene consigliato il test? (Questa parte, meno tecnica e più coinvolgente temi bioetici potrebbe essere sviluppata o meno, in rapporto agli interessi dello studente.) Chi ha una storia familiare di MH come Olivia ha comunque una probabilità (per lei pari a 1/4) di aver ereditato l'espansione: fare questo tipo di test potrebbe essere importante nel caso la donna volesse avere dei figli; l'informazione, in caso di test positivo, dovrebbe essere data con grande attenzione e cautela, assicurando un adeguato supporto psicologico.