

CHIMICA E MEDICINA: LA PCR.

Mario Pezzella



Nelle acque caldissime del parco americano di Yellowstone nel 1969, è stato trovato un batterio, chiamato *Thermus aquaticus* (Taq) dotato di un enzima proteico di replicazione capace di sopravvivere alla temperatura prossima ai 100°C in cui le proteine solitamente denaturano e perdono la loro attività. A un ricercatore americano, il biochimico Kary B. Mullis, venne l'idea di usare le particolari proprietà dell'enzima per risolvere un problema nella esecuzione dei test genetici in cui generalmente il materiale di partenza è in minima quantità come un capello, una goccia di sangue, un frammento di pelle.

Mullis ha ricevuto il premio Nobel nel 1993 e il Japan Prize per la messa a punto e lo sviluppo della tecnica della reazione della polimerasi a catena, chiamata *Polymerase Chain Reaction* (PCR) che consente l'amplificazione *in vitro* di

frammenti di DNA utilizzando l'enzima Taq definito nel 1989 dalla rivista *Science Magazine* "molecola dell'anno". La tecnica consiste in una moltiplicazione esponenziale di un tratto di DNA ottenuto per taglio da un intero DNA con enzimi di restrizione. Una sequenziale duplicazione per 2, 4, 8, 16 fino a migliaia di volte viene ottenuta attraverso diversi passaggi di successivi cicli di riscaldamento e raffreddamento. L'amplificazione è possibile in quanto i prodotti di estensione dei primer (brevi catene di nucleotidi) sintetizzati funzionano da stampo per un'altra coppia di primer del ciclo seguente

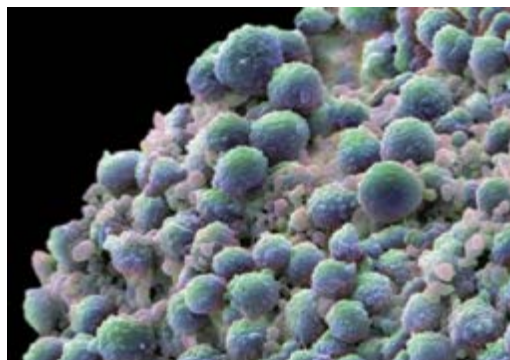
La metodologia messa a punto da Mullis ha perfezionato la metodologia di base che era stata già in precedenza descritta dai due ricercatori: Kjell Kleppe, biochimico norvegese e Har Gobind Khorana, biochimico americano di origine

indiana. Infatti i primi tentativi di replicazione *in vitro* di DNA, in modo piuttosto laborioso, utilizzavano il cosiddetto frammento di Klenow, una proteina con attività polimerasica 5' - 3' derivante da *Escherichia coli* non termostabile, che doveva essere reintegrato a ogni ciclo e produceva un numero di artefatti tale da rendere il metodo poco affidabile.



I perfezionamenti apportati da Mullis hanno reso la PCR una tecnica fondamentale in biochimica e biologia molecolare, con innumerevoli applicazioni in campo medico, agricolo, e investigativo. Infatti nella scienza forense i laboratori di polizia utilizzano la PCR per identificare tracce di sangue e altre forme di prove. Successivi sviluppi hanno consentito l'introduzione di sistemi diagnostici realizzati con il determinante contributo dell'elettronica e dell'ingegneria per la costruzione di specifica strumentazione.

In particolare la PCR ha reso agevole la possibilità di amplificare anche sequenze di RNA inutilizzabile come target per la DNA polimerasi, essendo a catena singola. È stato introdotto un enzima derivante da una famiglia di retrovirus RNA che include il virus della leucemia murina. Questo enzima, chiamato trascrittasi inversa, trascrive *in vitro* l'RNA in DNA prima dell'amplificazione, consentendo studi di espressione genica, analisi di sequenze di RNA e la diagnosi di malattie genetiche e infettive.



In questi ultimi anni l'evoluzione della tradizionale PCR ha portato alla introduzione della PCR *real time* (PCR RT) per dosare quantitativamente il DNA.

La tecnologia PCR *real time*, che utilizza particolari fluorocromi, rende realizzabile la misurazione diretta e la quantificazione della reazione durante il processo di amplificazione. La curva di amplificazione, dopo una prima fase esponenziale, tende ad assumere un andamento di tipo lineare a plateau. Poiché repliche di reazioni identiche presentano efficienze di reazione diverse, la misurazione della reazione in fase finale non risulta direttamente connessa con la quantità di DNA iniziale da quantificare. Il nuovo sistema di rilevamento e dosaggio della PCR RT presenta la caratteristica di essere dal punto di vista esecutivo relativamente semplice consentendo la verifica dell'andamento della reazione in qualsiasi momento della esecuzione. Per questi motivi la metodica PCR *real time* ha trovato applicazione in numerosi campi della medicina diagnostica quali il dosaggio quantitativo virale, come il dosaggio del genoma del virus dell'epatite C (HCV), del virus dell'epatite B (HBV) e dell'AIDS (HIV) oltre ad altri agenti patogeni. Rende possibile la genotipizzazione e il controllo dell'efficacia della terapia antivirale.

Un campo di applicazione recente è quello dello studio delle mutazioni ereditarie e della biologia evolutiva della specie umana. Recentemente Google ha iniziato lo sviluppo di un progetto chiamato Gene2.0 che utilizza un esclusivo chip di genotipizzazione contenente circa 150.000 marcatori di DNA appositamente selezionati per fornire informazioni sugli antenati. In questo modo è possibile conoscere, tra l'altro, dal DNA estratto

da un tampone della guancia, la percentuale del genoma affiliata a una specifica regione geografica e scoprire la percentuale di ascendenza di origine dell'uomo di Neanderthal o Denisovan, risalente a 75 mila anni.

Genetica e rischio di patologia vascolare. In Italia tra le più importanti malattie causa di mortalità e invalidità, l'ictus, secondo i dati dell'Istituto Superiore di Sanità, conta circa 200.000 casi/anno di cui il 20% sono recidive e l'80% nuovi episodi. La storia naturale della malattia è caratterizzata da tre momenti fondamentali che costituiscono i principali aspetti sui quali la ricerca multidisciplinare si confronta, cioè i fattori di rischio, gli eventi vascolari e danno parenchimale e le manifestazioni cliniche.

Un'efficace prevenzione dell'aterosclerosi attuabile mediante individuazione dei fattori di rischio rappresenta la migliore strategia per ridurre l'incidenza delle malattie cardiovascolari e quindi è di fondamentale importanza condurre un appropriato stile di vita oltre che conoscere eventuali predisposizioni genetiche alla malattia.

Tra i fattori di rischio non modificabili sono recentemente emerse conoscenze relative alla predisposizione individuale dovute a mutazioni puntiformi, cioè a una variazione di sequenza del DNA che interessa un solo nucleotide che può avere un notevole impatto sul fenotipo.

È dimostrata un'associazione tra mutazioni genetiche puntiformi a carico di alcuni fattori dell'emostasi e aumentato rischio di sviluppo di eventi cerebrovascolari di origine ischemica. La omocistinuria è riconosciuta come la più frequente malattia genetica che colpisce i vasi cerebrali e porta ad aterosclerosi prematura e ictus. L'iperomocistinemia grave e l'omocistinuria sono malattie genetiche descritte per la prima volta nei bambini e conosciute per essere associate a ictus precoce e ritardo mentale.

La mutazione da citosina (C) a timina (T) in posizione 677 del gene **MTHFR** (MetileneTetraHydroFolatoReduttasi) causa una riduzione significativa della sua attività enzimatica provocando un aumento del livello plasmatico di omocisteina che favorisce la malattia vascolare.

Nel 1994 è stata individuata una mutazione puntiforme consistente in una sostituzione della adenina con la guanina nella posizione 1691 del gene codificante per il fattore V della coagulazione, associata alla degradazione della proteina C attivata. La mutazione avviene a livello della tripletta che codifica per l'arginina in posizione 506. La sostituzione puntiforme di una guanina con una adenina comporta la sostituzione dell'arginina con glutammina.

La sostituzione del singolo amminoacido fa sì che la proteina C attivata non sia più in grado di clivare il fattore V che così conserva le sue proprietà pro-coagulanti. La presenza di questa mutazione, chiamata fattore V di Leiden, dal nome della città olandese dove è stata trovata la prima volta, è accompagnata da un aumento da 3 a 5 volte della frequenza di tromboembolia venosa nelle estremità inferiori e un'aumentata frequenza di trombosi cerebrale venosa e del seno durale. I soggetti portatori della mutazione dovrebbero sottoporsi a profilassi anticoagulativa in corso di gravidanza o in funzione di interventi chirurgici ed evitare l'assunzione di contraccettivi orali.

La protrombina, glicoproteina prodotta dal fegato quale precursore della trombina nel processo di coagulazione, è codificata da un gene di 21 Kb localizzato sul cromosoma 11. La protrombina viene attivata in trombina che è l'enzima responsabile della conversione del fibrinogeno in fibrina. È stata individuata una variante, risultante in una sostituzione puntiforme di una guanina con un'adenina in posizione 20210 della regione non tradotta al 3'-UT. I portatori del gene mutato presentano un elevato rischio di trombosi venosa cerebrale e periferica. La ricerca, nel tentare di comprendere le ragioni per cui, a parità di stile di vita e in presenza di analoghi fattori di rischio modificabili, solo alcuni soggetti sviluppano ictus, ha evidenziato un'associazione tra mutazioni genetiche a carico di alcuni fattori dell'emostasi e un aumentato rischio di eventi cerebrovascolari di origine ischemica.

La diagnosi della presenza di mutazioni puntiformi può essere attualmente eseguita, nei casi necessari, in strutture laboratoristiche altamente qualificate. ■