

Laboratori Campisi

&



PROTEOGEN

VOLUME 1, NUMERO 2

NEWS

OTTOBRE 2008

SOMMARIO:

LA GENETICA DEI TRATTI COMPLESSI 1

TROMBOFILIE 2

SEQUENZIAMENTO DNA 3

SERVIZI 4

La genetica dei tratti complessi: i polimorfismi genetici

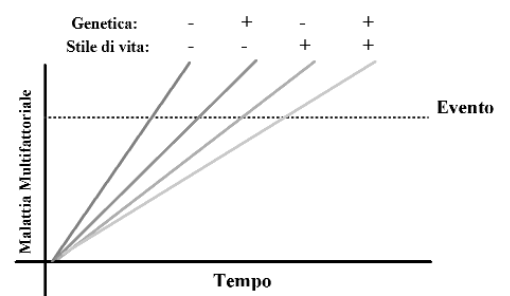
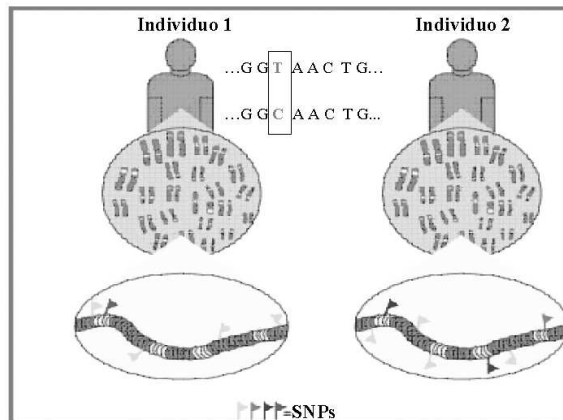
Quando si parla di malattie complesse, da un punto di vista genetico si passa dal concetto di mutazione a quello di polimorfismo genico. La mutazione è un evento raro che causa la malattia anche se con possibili variazioni nell'espressione del fenotipo, con frequenze nelle popolazioni inferiori allo 0,05%. Si definisce polimorfismo genico, invece, una variazione genetica con una frequenza superiore all'1% nella popolazione. I polimorfismi genetici possono essere presenti all'interno di regioni codificanti (esoni) o non codificanti (introni) e possono essere determinati da sostituzioni, delezioni o inserzioni di singole basi o di sequenze di DNA. Viene stimato che ogni 300 nucleotidi si manifesti un polimorfismo, il più comune dei quali è associato alla mutazione di un singolo nucleotide (SNP) e circa l'1% di questi non sia silente, ma si traduca in variazioni fenotipiche. In particolare, gli SNPs possono essere responsabili di una modificazione (qualitativa o quantitativa) di proteine con una funzione nota che, se alterata, può spiegare la suscettibilità individuale verso lo sviluppo di una data patologia. Nel corso degli ultimi anni, la conoscenza del genoma umano ha ampliato enormemente le informazioni sul corredo genetico individuale. Abbiamo appreso come ogni persona dimostri il 99.9% di identità genetica rispetto ad una qualsiasi altra. Il restante 0.1% del nostro DNA rappresenta la variabilità individuale, che è sostanzialmente dovuta alla presenza dei polimorfismi genetici (Fig. 1). Ad oggi, sono stati identificati circa 3 milioni di SNPs, ma si calcola che ve ne siano almeno 10 milioni. E' ormai riconosciuto che gruppi di queste piccole variazioni conferiscono una predisposizione o suscettibilità allo sviluppo della patologia, che, soprattutto, può manifestarsi in età precoce quando profili genetici a rischio "elevato" interagiscono con fattori ambientali o stili di vita considerati ad alto rischio.

Comunque, ancora oggi non sono completamente conosciuti i geni che determinano un aumentato rischio di malattia cardiaca ed è ancora indispensabile acquisire ulteriori informazioni prima di ottenere strumenti utilizzabili nella prassi clinica¹¹. Tuttavia, alcuni test genetici di rischio cardiovascolare sono già disponibile in molti laboratori di analisi. In questo campo, di particolare interesse sono le recenti conoscenze acquisite relative alle mutazioni pro trombotiche del Fattore V, del fattore II della coagulazione o protrombina, del gene della metilene tetraidrofolato reductasi (MTHFR), ACE, PAI I, APO E, APO B, fattore XIII, HPA 1 e Beta Fibrinogeno.

NOTIZIE DI RILIEVO:

- Il prossimo Convegno in collaborazione con il Dipartimento di Biologia Molecolare dell'Università di Catania, diretta dalla prof.ssa Marcella Renis, tratterà l'argomento:

“Stress ossidativo, radicali liberi e antiossidanti. Dalla ricerca di base alla pratica clinica. Aspetti fisiopatologici e diagnostico-terapeutico”



La componente genetica della malattia cardiovascolare

La malattia cardiovascolare, che rimane tuttora la principale causa di morte nei paesi occidentali⁶, è considerata essere una patologia multifattoriale nella quale intervengono influenze ambientali, alcune delle quali ancora sconosciute, e la predisposizione genetica. Il problema della componente genetica del rischio cardiovascolare è particolarmente complesso in quanto modelli sperimentali animali hanno identificato più di 100 geni, che sembrano essere coinvolti nella progressione della malattia⁷. D'altra parte sia i fattori di rischio maggiori, quali l'ipercolesterolemia, l'ipertensione, il diabete mellito e l'obesità, che i nuovi fattori di rischio indipendenti, quale la proteina C reattiva, il fibrinogeno, l'omocisteina e la lipoproteina(a) hanno una forte componente genetica⁷. Vi è poi da considerare il fatto che i fattori di rischio genetico possono interagire tra loro, moltiplicando così il rischio globale e non semplicemente addizionandosi fra loro. Inoltre, la ricerca ha identificato alcuni sistemi enzimatici regolati geneticamente che possono interferire con il metabolismo dei farmaci⁸. Alcuni di questi interagiscono anche con le molecole utilizzate nel trattamento delle malattie cardiovascolari: i betabloccanti come il metoprololo, gli anticoagulanti come il warfarin, e gli antiipertensivi⁹.

I sistemi più studiati sono quelli classicamente considerati coinvolti nella patogenesi della cardiopatia ischemica: metabolismo lipidico, funzione endoteliale, sistema emostatico, metabolismo dell'omocisteina e sistema renina-angiotensina¹⁰.

Comunque, ancora oggi non sono completamente conosciuti i geni che determinano un aumentato rischio di malattia cardiaca ed è ancora indispensabile acquisire ulteriori informazioni prima di ottenere strumenti utilizzabili nella prassi clinica¹¹. Tuttavia, alcuni test genetici di rischio cardiovascolare sono già disponibili in molti laboratori di analisi. In questo campo, di particolare interesse sono le recenti conoscenze acquisite relative alle mutazioni pro trombotiche del Fattore V, del fattore II o protrombina, del gene della MTHFR, ACE, PAI 1, APO E, APO B, fattore VIII, HPA 1 e Beta Fibrinogeno.

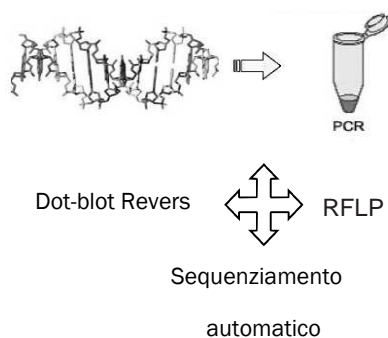
La valutazione del rischio trombotico

La patologia trombotica, sia arteriosa che venosa, è la più importante causa di malattia e di morte nei paesi occidentali attraverso le sue manifestazioni cliniche di trombosi venosa profonda, embolia polmonare, infarto, ictus e un strumento diagnostico utile per l'individuazione dei soggetti a rischio e per la prevenzione dei quadri clinici.

Trombosi venosa

La malattia tromboembolica è un processo con eziologia multifattoriale dalla patogenesi complessa che dimostra a tendenza a recidivare. La malattia comprende l'embolia polmonare e la trombosi venosa profonda e nella maggior parte dei casi i pazienti presentano difetti o alterazioni genetiche di uno o più fattori della coagulazione del sangue. Le prime cause di trombofilia ereditaria identificate sono rappresentate dal deficit congenito di antitrombina III, proteina C e proteina S, che sono i principali fattori anticoagulanti naturali. Comunque, i deficit congeniti di queste proteine anticoagulanti sono condizioni genetiche molto rare e notevolmente eterogenee.

Negli ultimi anni, sono stati identificati alcuni specifici polimorfismi genetici che, invece, sono ben conservati, molto più frequenti nella popolazione generale e la cui analisi può essere utile nella definizione del rischio trombotico. I geni in considerazione sono quelli relativi al fattore V di Leiden, al fattore II della coagulazione o protrombina ed il gene della MTHFR.



Come e quando effettuare le analisi genetiche

L'analisi genetica può essere eseguita mediante l'impiego di nuovi test che permettono una rilevazione simultanea dei difetti genetici del fattore V Leiden, della protrombina, della MTHFR, del fattore II. I kit che consentono l'amplificazione multipla dei geni mediante PCR in una singola provetta ed un'ibridazione allele-specifica a sonde oligonucleotidiche legate su una membrana (*allele specific amplification PCR*, ASA-PCR) o tecniche molecolari standard che utilizzano l'analisi dei polimorfismi dei frammenti di restrizione (*restriction fragment length polymorphism*, RFLP) o le complesse tecniche di sequenziamento automatico del DNA.

L'analisi molecolare dovrebbe essere eseguita in soggetti potenzialmente a rischio di sviluppare eventi trombotici. Ad esempio, l'indagine di laboratorio può essere consigliata ai soggetti che hanno avuto un episodio di trombosi venosa in età giovanile (meno di 55 anni), in particolare se con familiarità positiva. L'analisi molecolare può anche essere eseguita in donne che hanno una storia personale o familiare di tromboembolismo e che intendono assumere contraccettivi orali o terapia sostitutiva ormonale. L'analisi genetica è, comunque, fortemente raccomandata nei familiari anche asintomatici di pazienti già diagnosticati, perché possono beneficiare di un approccio terapeutico di profilassi antitrombotica, particolarmente utile in occasione di esposizione a rischi contingenti di trombosi.

SEQUENZIAMENTO AUTOMATICO DEL DNA

Sequenziare un frammento di DNA significa proprio leggere la successione di basi che esso contiene. Individuato l'ordine con cui A, C, G e T si alternano, il biologo molecolare può confrontare la sequenza in esame con sequenze già catalogate e archiviate in corposi database, in genere tutti on line, e verificarne l'esattezza o, in alternativa, la presenza di mutazioni. E capire se la proteina risultante funzionerà correttamente.

Oggi l'operazione di sequenziamento non viene più svolta manualmente: sequenziatori automatici processano il campione preparato dall'operatore e lo fanno *correre* su particolari gel o in *elettroforesi capillare*. La procedura, completamente automatizzata, permette di ridurre considerevolmente i costi e di analizzare un gran numero di campioni simultaneamente.

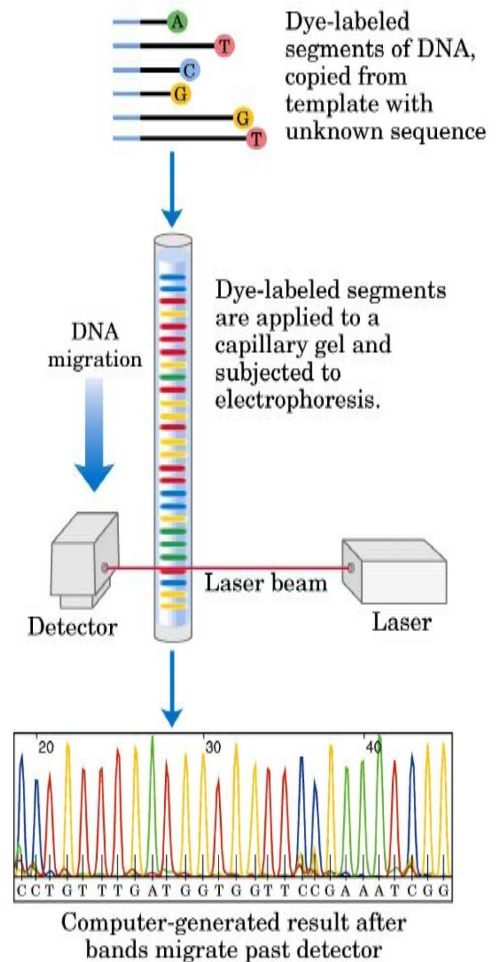
Elettroferogramma

La sequenza di DNA è determinata da un software in grado di interpretare le misure di fluorescenza registrate dal rilevatore e di elaborarle opportunamente.

Le informazioni vengono integrate e trasformate in picchi di colore diverso, con aree proporzionali all'intensità di emissione.

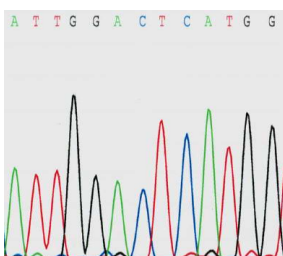
Principali applicazioni

- Diagnosi di malattie mendeliane
- Diagnosi di neoplasie
- Predizione del rischio genetico per patologie ad eziologia multifattoriale
- Predizione della risposta ad un farmaco (farmacogenetica)
- Identificazione di microrganismi

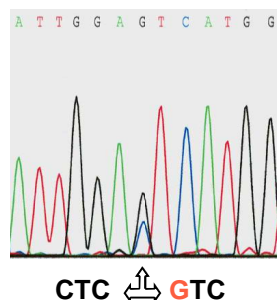


Questo tipo di conoscenze permette di identificare le eventuali differenze genetiche tra persone affette da patologie e persone sane, e in futuro l'individuazione di queste divergenze potrebbe essere utile non solo per diagnosticare una malattia prima dell'insorgenza, e pertanto prevenirla dove possibile, ma anche per ideare strategie per curare definitivamente questi soggetti correggendo l'alterazione direttamente a livello del genoma.

Sequenza Normale



Presenza di mutazione in eterozigosi



- **LABORATORIO GENERALE DI BASE**

- **CITOGENETICA**

- **BIOLOGIA MOLECOLARE**

- TIPIZZAZIONE HPV (31 GENOTIPI VIRALE)
- HCV QUALITATIVA + QUANTITATIVA
- HBV QUALITATIVA + QUANTITATIVA
- AZF (MICRODELEZIONI DEL CROMOSOMA Y)
- HFE
- FATTORI DI COAGULAZIONE (12 MUTAZIONI)
- TIPIZZAZIONE HLA I E II CLASSE
- CELIACHIA (DQ2-DR4)
- CFTR (36 MUTAZIONI)
- BETA TALASSEMIA
- B27
- K-RAS

- **TIPIZZAZIONE LINFOCITARIA**

- **TEST DI PATERNITA**

- **RILEVAZIONE DI OGM**

- **FISH**

I CAMPIONI POSSONO ESSERE INVIATI:

- MEDIANTE UN PROTOCOLLO CHE VERRA FORNITO AL MOMENTO DELLA RICHIESTA DEL SERVIZIO

- ATTRAVERSO IL NOSTRO SERVICE CHE PRELEVA I CAMPIONI BIOLOGICI DA STRUTTURE PUBBLICHE E PRIVATE

CONSEGNA REFFERTI :

- PRESSO LA VOSTRA SEDE

- ONLINE (ATTRAVERSO UNA PASSWORD PER GARANTIRE LA PRIVACY)

- **SERVIZIO DI SEQUENZIAMENTO AUTOMATICO DI DNA** (DIAGNOSI E RICERCA)

- **ALLERGIE** :DOSAGGIO DELLE Ig E TOTALI

DOSAGGIO DELLE Ig E SPECIFICHE PER CIRCA 200 ALLERGENI

- **INTOLLERANZE ALIMENTARI**: DOSAGGIO DELLE Ig G-4 PER CIRCA 100 ALIMENTI

- **GASTROPANEL** : DOSAGGIO DI PEPSINOGENO 1/2, GASTRINA 17 E ANTIGENI ANTI HP, INTERPRRETATO DA UN

SOFISTICATO PROGRAMMA ANALOGICO CHE FORNISCE INFORMAZIONI SULLA PATOLOGIA GASTRI.

**L.C. LABORATORI CAMPISI
&
PROTEOGEN**

Corso Vittorio Emanuele, 231/243
96012 Avola (SR)

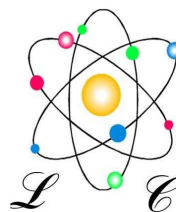
Tel.: 0931/832499

Fax: 0931/814068

E-mail: lccampisi@katamail.com

proteogen@katamail.com

Www.lccampisi.it



Laboratori Campisi



PROTEOGEN