

LA DIAGNOSTICA MOLECOLARE IN LABORATORIO: IL MIRACOLO DELLA PCR

Redazionale

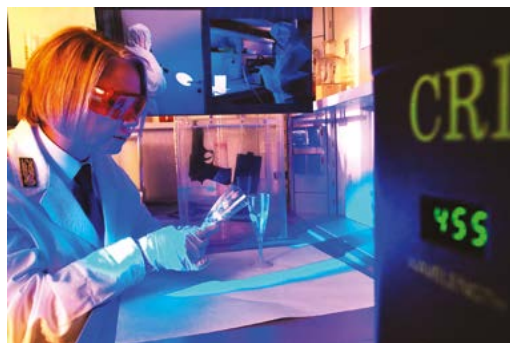


Kary Banks Mullis (Lenoir, 28 dicembre 1944) è un biochimico statunitense, vincitore del Premio Nobel per la Chimica nel 1993 assieme a Michael Smith. Personalità eclettica e brillante ha raccontato nel suo libro “Ballando nudi nel campo della mente” (nel 1998) la sua visione del mondo, fornendo immagini e riflessioni sui vari temi che vanno dalla ricerca biomedica alla parapsicologia.

Perché è così importante Kary B. Mullis? Perché in qualche modo ha cambiato il mondo della ricerca biologica consentendo progressi in ambito medico e in numerosi settori della biologia. A lui si deve lo sviluppo della tecnica della reazione a catena della polimerasi (*Polymerase Chain Reaction* o PCR), un processo già descritto da Kjell Kleppe e da Har Gobind Khorana, Nobel nel 1968 ma da Mullis perfezionato in modo sostanziale.

La PCR permette di amplificare in vitro

frammenti di DNA. Questa amplificazione “ingrandisce” l’informazione presente in piccoli frammenti e ne consente la lettura e il riconoscimento, fornendo materiale genetico necessario per le varie applicazioni desiderate. La PCR è oggi applicata in moltissime discipline e se ne sente parlare quotidianamente, soprattutto nel corso di talk show nei quali sono illustrati i vari delitti da prima pagina.



Ma quale è l'essenza di questa intelligente procedura. Come dice l'autore nel libro citato: *“All'improvviso, capii come fare. Se con un breve tratto di DNA potevo trovare un migliaio di sequenze su tre miliardi, potevo utilizzarne un altro tratto più breve per restringere la ricerca. Questo sarebbe andato poi ad unirsi ad un segmento della prima sequenza trovata, avrebbe passato in rassegna il migliaio di possibilità emerse dalla prima ricerca, fino a trovare proprio quello che stavo cercando. Quindi, utilizzando la naturale propensione del DNA a duplicarsi in precise condizioni, ricostruibili in laboratorio, avrei potuto far sì che la parte di DNA collocata tra le sequenze collegate alle due brevi stringhe utilizzate per la ricerca si riproducesse a tutto andare”*. Raccontata in un libro di divulgazione la procedura sembra semplice e, in prima approssimazione concettualmente lo è, ma molti elementi sono necessari affinché il prodotto cercato sia leggibile e attendibile.

In pratica la PCR consente di effettuare in vitro la ricostruzione di uno specifico passaggio della duplicazione cellulare. Il nocciolo sta nella sintesi di DNA a doppia elica partendo da un filamento a singola elica. Utilizzando nucleotidi nell'apposita provetta di reazione (i componenti “elementari” del DNA) il tratto mancante viene ricostruito seguendo la corretta sequenza cercata, proprio quella complementare alla frazione di DNA che interessa per lo studio. Questo processo viene svolto in Natura grazie ad enzimi chiamati DNA-polimerasi.

Per dare avvio alla reazione della polimerasi è necessario inizialmente separare i filamenti di DNA. Questa fase è però critica perché la DNA polimerasi umana non riesce a resistere alle alte temperature che la procedura impone (la temperatura di questa “denaturazione” arriva ai 96-99°). Ma la Natura ci viene incontro ancora grazie ad alcuni batteri così detti termofili (per es. il *Thermus aquaticus*, batterio isolato per la prima volta nelle pozze di acqua calda del parco nazionale di *Yellowstone*, negli Stati Uniti). Questi batteri hanno polimerasi (Taq polimerasi) che non si inattivano ad alte temperature e il

loro impiego permette di realizzare cicli di PCR con una sorta di reazione a catena che si realizza in modo rapido, fornendo quindi in uno spazio temporale accettabile il materiale genetico che si va a cercare e che interessa per lo scopo specifico.

In Diagnostica Medica la PCR ha trovato le più immediate applicazioni, per esempio consentendo di individuare mutazione geniche che causano tumori o sono alla base di malattie ereditarie. Un esempio può essere la mutazione nella Distrofia di Duchenne, nella quale il gene mutato presenta ampie delezioni nucleotidiche.

In questo caso, grazie alla PCR si può dimostrare che il frammento di DNA “patologico” amplificato risulta più corto se confrontato con quello ottenuto dall'amplificazione di un gene normale. Nel monitoraggio di alcuni tumori la PCR può fornire utili informazioni per decidere il comportamento terapeutico. Per esempio in caso di linfomi derivati da traslocazioni cromosomiche e sottoposti a terapia, la PCR consente di evidenziare l'eventuale comparsa di recidive.

Una serie di progressi, per esempio, si sono avuti nel settore della Microbiologia. In generale la rilevazione dei microrganismi patogeni si basa su tecniche tradizionali (esame colturale, osservazione diretta al microscopio, saggi biochimici, tecniche di immunologia e sierologia), ma l'utilità di metodiche di amplificazione molecolare ha assunto un significato determinante nella diagnostica microbiologica. Oggi la diagnostica molecolare in Microbiologia clinica, per esempio, consente di identificare un patogeno in base a sequenze geniche specifiche. Questo approccio è spesso più sensibile ed è anche più specifico se rapportato con i metodi tradizionali.

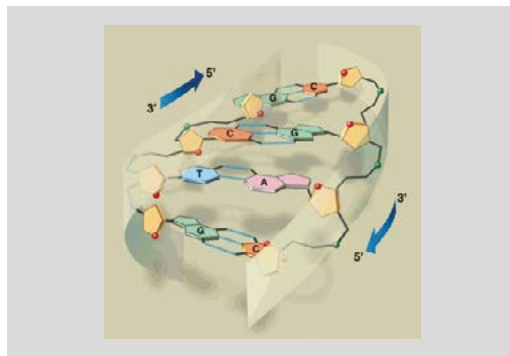
I vantaggi sono maggiori se si sta cercando un microrganismo non facilmente coltivabile sui terreni usualmente disponibili, se la crescita del microrganismo in vitro è troppo lenta, se esistono condizioni di pericolosità biologica e, ai nostri giorni problema non certo secondario, quando il costo di una procedura tradizionale è più elevato rispetto a quello determinato da una

diagnosi molecolare. Le metodiche che si basano sulla *Nucleic Acid Amplification Technology* comprendono alla base il meccanismo PCR e a seconda degli sviluppi tecnologici hanno assunto vari nomi (Nested-PCR, Real-time PCR, Multiplex PCR-immunoassay ect.).

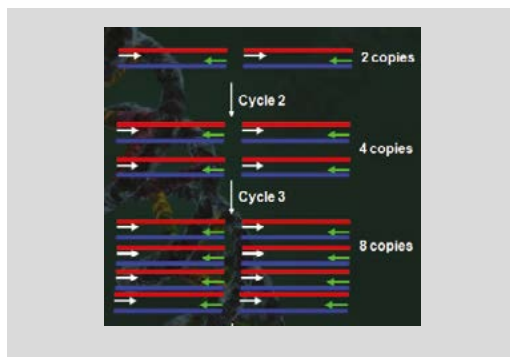
Un esempio, tra i tanti, riguarda la sorveglianza delle meningiti meningococciche, con la necessità di individuare il ceppo specificamente coinvolto nella ricerca.

Utilizzando una delle tecniche basate sulla PCR possiamo effettuare l'analisi delle sequenze nucleotidiche. In questo modo siamo in grado di effettuare sia studi epidemiologici (anche a lungo termine) sia indagini per l'analisi di isolati focolai epidemici (consentendo una migliore capacità diagnostica e una sorveglianza accurata dei casi di meningite).

Le coppie di nucleotidi (AT/CG) si associano in sequenze che recano l'informazione da amplificare. Per ottimizzare l'amplificazione lo schema applicativo è di seguito rappresentato.



Proseguendo il numero di amplificazioni (cicli) si genera un prodotto quantitativamente "leggibile" sul quale effettuare le ricerche che interessano.



Presso i laboratori BIOS la metodica PCR è comunemente usata per le varie analisi richieste utilizzando apparecchi di avanguardia e accuratamente controllati.

Per informazioni e prenotazioni: CUP 06 809641