

Gianluca M. Sampietro

Biologia cellulare e molecolare

GENOMA UMANO

Struttura dei geni e del DNA
Replicazione e riparazione del DNA
RNA e sintesi delle proteine
Regolazione dell'espressione genica

TECNOLOGIA DEL DNA RICOMBINANTE

Nucleasi di restrizione
Polymerase chain reaction
Mappatura delle sequenze di DNA
Clonazione del DNA
Manipolazione del DNA
Animali transgenici

TRASDUZIONE CELLULARE DEL SEGNALE

Ligandi e recettori
Recettori accoppiati a proteina G
Recettori accoppiati a enzimi

CICLO DI DIVISIONE CELLULARE

Ciclo di divisione cellulare
regolato da: ciclina, Cdk e CKI
Punti di controllo del ciclo cellulare
Oncogeni e geni oncosoppressori

APOPTOSI

Caratteristiche biochimiche e morfologiche dell'apoptosi
Stimoli apoptotici
Cisteina aspartato proteasi

PROGETTO GENOMA UMANO

Trapianti
Oncologia
Chirurgia pediatrica e fetale

NUOVE STRATEGIE TERAPEUTICHE

Terapia genica
Studio di nuovi farmaci
Manipolazione genetica degli anticorpi

IMPLICAZIONI ETICHE, PSICOLOGICHE E LEGALI

A partire dagli anni '80 si è verificata una vera e propria esplosione di conoscenza riguardo la biologia cellulare e molecolare. Questi progressi trasformeranno la pratica chirurgica che potrà avvalersi delle tecniche molecolari per la prevenzione, la diagnosi e il trattamento di molte patologie di interesse chirurgico. Questo sarà reso possibile dalle conquiste del Progetto Genoma Umano, che mira a conoscere l'intero patrimonio genetico dell'uomo. Il significato essenziale della biologia cellulare e molecolare è trattato in dettaglio in molti libri di testo^{3,34}. Qui di seguito è presentata una panoramica dell'argomento, con particolare enfasi sui concetti e le tecniche di base.

GENOMA UMANO

Mendel per primo definì i geni come elementi contenenti informazioni che vengono distribuite dai genitori alla prole. I geni contengono il progetto essenziale per lo sviluppo di ciascun essere umano. Il campo della biologia molecolare ebbe inizio nel 1944 quando Avery dimostrò che il DNA era il materiale ereditario costituente i geni. Questa informazione genetica è tradotta prima in RNA e quindi in proteine, dando luogo alla manifestazione specifica di caratteristiche biologiche, altrimenti detti fenotipi. I maggiori sviluppi realizzati nel campo della biologia molecolare sono elencati in Tabella 2-1. Nei paragrafi seguenti, verranno esaminati la struttura dei geni e del DNA, così come i processi attraverso i quali le informazioni genetiche sono tradotte in caratteristiche biologiche.

Struttura dei geni e del DNA

Il DNA è composto da due catene antiparallele di polimeri non ramificati avvolte tra loro a formare una doppia elica destrorsa³² (Fig. 2-1). Ogni catena è composta da quattro tipi di desossiribonucleotidi contenenti le basi adenina (A), citosina (C), guanina (G) e timina (T). I nucleotidi sono uniti l'uno all'altro da ponti fosfodiesterici che uniscono il carbonio 5' di una molecola di desossiribosio al carbonio 3' della successiva. Mentre la struttura portante di zuccheri fosfati rimane costante, le basi a loro attaccate

possono variare per codificare differenti informazioni genetiche. Le sequenze di nucleotidi delle catene contrapposte di DNA sono complementari l'una all'altra, permettendo la formazione di legami idrogeno che stabilizzano la struttura a doppia elica. Le coppie di basi complementari richiedono che A sia sempre accoppiata con T e che C sia sempre accoppiata con G. Per esempio, se il senso della catena del DNA (in direzione 5'-3') possiede la sequenza nucleotidica GAATTC, allora la catena complementare in senso opposto (direzione 3'-5') avrà la sequenza CTTAAG.

L'intera informazione genetica umana, o genoma umano, contiene 3×10^9 coppie di nucleotidi. Tuttavia, meno del 10% delle sequenze di DNA sono copiate sia in molecole di RNA messaggero (mRNA), che codifica proteine, che in RNA strutturali, quali le molecole di RNA transfer (tRNA) o le molecole di RNA ribosomiale (rRNA). Ogni sequenza di nucleotidi in una molecola di DNA che

TABELLA 2-1. I maggiori eventi in biologia molecolare

1941	Si scopre che i geni codificano le proteine
1944	Si scopre che il DNA trasporta l'informazione genetica
1953	Si determina la struttura del DNA
1962	Scoperte le endonucleasi di restrizione
1966	Decifrato il codice genetico
1973	Messa a punto la tecnica di clonazione del DNA
1976	Scoperto il primo oncogene
1977	Prodotto nei batteri l'ormone umano della crescita
1978	Clonato il gene umano dell'insulina
1981	Prodotto il primo animale transgenico
1985	Inventata la polimerasi chain reaction
1985	Scoperto il primo gene oncosoppressore
1990	Creato il Progetto Genoma Umano
1998	Clonato il primo mammifero

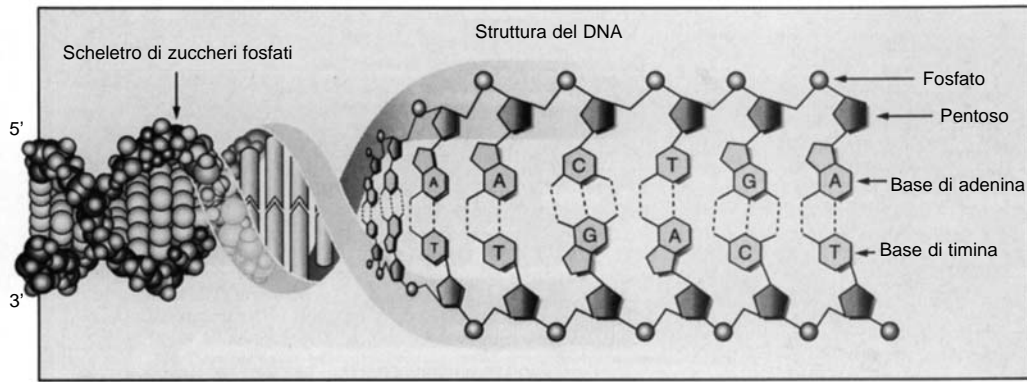


Figura 2-1. Struttura a doppia elica del DNA. Sequenza di quattro basi (guanina, adenina, timina e citosina) che determina la specificità dell'informazione genetica. Le basi si affacciano all'interno di una struttura portante di zuccheri fosfati e formano coppie (*linee tratteggiate*) con basi complementari sulla catena opposta. (Adattata da Rosenthal N.: DNA and the genetic code. N Engl J Med 331:39, 1994. Copyright © 1994 Massachusetts Medical Society. Tutti i diritti riservati).

codifica per la sintesi di una molecola funzionale di RNA è chiamata *gene* (Fig. 2-2). Quelle sequenze di DNA che non codificano informazioni genetiche possono avere una funzione strutturale o altre funzioni sconosciute. I geni umani normalmente contengono in lunghezza più di 100.000 coppie di nucleotidi, tuttavia, la maggior parte delle molecole di mRNA che codificano proteine sono costituite da solo 1.000 coppie di nucleotidi. La maggior parte dei nucleotidi in esubero è costituita da lunghi tratti di sequenze non codificanti chiamate *introni*, che intercalano i segmenti relativamente corti di sequenze codificanti chiamate *esoni*. Per esempio, il gene della tireoglobulina possiede 300.000 basi nucleotidiche e 36 introni, mentre il suo mRNA ha solo 8.700 basi nucleotidiche. I processi mediante i quali le informazioni genetiche codificate nel DNA sono trasferite a molecole di RNA e proteine verranno discussi in seguito.

Il genoma umano contiene 24 diverse molecole di DNA; ogni molecola di DNA possiede 10^8 basi ed è raggruppata in un singolo cromosoma. Quindi, il genoma umano è organizzato in 22 autosomi e 2 differenti cromosomi sessuali. Siccome gli esseri umani sono organismi diploidi, ogni cellula somatica contiene due copie di ciascun autosoma e due cromosomi sessuali per un totale di 46 cromosomi. Di ciascuna coppia di cromosomi uno è ereditato dalla madre, l'altro dal padre. Le cellule germinali contengono solo 22 autosomi e un cromosoma sessuale. Ogni cromosoma contiene tre tipi diversi di sequenze specializzate di DNA che sono importanti per la replicazione o la segregazione nel corso della divisione cellulare (Fig. 2-3). Per replicarsi, ogni cromosoma contiene molte sequenze di DNA corte e specifiche che agiscono come inizio della replicazione¹⁷. Un secondo elemento della sequenza, chiamato *centromero*, aggancia il DNA al fuso mitotico durante la divisione cellulare¹⁵. Il terzo elemento della sequenza è un *telomero*, che contiene ripetizioni ricche di G localizzate a ciascuna delle due estremità del cromosoma⁶⁶. Durante la replicazione del DNA una catena di DNA diviene più corta di poche basi al suo terminale 3' a causa di una limitazione nel meccanismo della replicazione. Se non vi fosse posto rimedio, ad ogni divisione cellulare le molecole di DNA diverrebbero progressivamente più corte nel loro segmento telomerico. Questa pro-

gressione è, tuttavia, arrestata da un enzima chiamato *telomerasi* che periodicamente allunga la sequenza telomerica di numerose basi.

Ogni cromosoma, una volta allungato, potrebbe avvolgere il nucleo cellulare migliaia di volte. Per facilitare la replicazione e la separazione del DNA, ogni cromosoma è raggruppato in una struttura compatta con l'aiuto di proteine speciali tra cui gli istoni⁹. Il DNA e gli istoni formano una serie ripetitiva di particelle chiamate nucleosomi; ciascuna di queste è costituita da una parte centrale ottomerica formata dalle proteine dell'istone attorno alla quale il DNA è avvolto per due volte. Il complesso condensato di DNA e di proteine è noto come *cromatina*. Il raggruppamento dei cromosomi oltre a facilitare la replicazione e separazione del DNA influenza l'attività dei geni, che è discussa più avanti.

Replicazione e riparazione del DNA

Prima della divisione cellulare il DNA deve essere duplicato rapidamente e con grande precisione così che un corredo completo di cromosomi possa essere trasmesso alla progenie³⁶. Nell'uomo il DNA è duplicato ad una velocità approssimativa di 50 nucleotidi al secondo, con un tasso di errore di 1 ogni 10^9 coppie di basi replicate. Questa efficiente replicazione di materiale genetico richiede un elaborato meccanismo di replicazione costituito da numerosi enzimi. Siccome ogni catena di DNA a doppia elica codifica sequenze di nucleotidi complementari alla catena associata, entrambe le catene contengono informazioni genetiche identiche e servono come stampo per la formazione di un'intera nuova catena. La replicazione del DNA avviene nella direzione da 5' a 3', lungo ciascuna catena, attraverso l'aggiunta sequenziale di desossiribonucleotidi trifosfati complementari. Alla fine vengono formate due doppie eliche complete di DNA contenenti informazioni genetiche identiche. L'esattezza nella replicazione del DNA è di importanza cruciale perché ogni errore, definito *mutazione*, causa la copiatura di sequenze di DNA errate nelle cellule figlie. Il cambiamento di una singola coppia di basi viene definito *mutazione puntiforme*, che può risultare in uno dei due tipi di mutazione riportati in Figura 2-4.

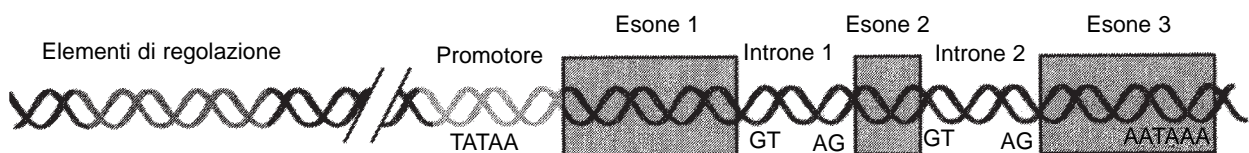


Figura 2-2. Struttura del gene. Le sequenze di DNA che sono trascritte in RNA sono complessivamente chiamate *gene* e includono gli esoni (sequenze espresse) e gli introni (sequenze interposte). Gli introni iniziano invariabilmente con la sequenza nucleotidica GT e finiscono con AG. Una sequenza ricca di AT nell'ultimo esone costituisce un segnale di fine dell'elaborazione dell'RNA trascritto. Le sequenze regolatrici che costituiscono il promotore, tra cui la TATA-box, si trovano vicino alla regione in cui ha inizio la trascrizione. Elementi aggiuntivi di regolazione sono localizzati a distanze variabili dal gene. (Adattato da Rosenthal N.: Regulation of gene expression. N Engl J Med 331:932, 1994. Copyright © 1994 Massachusetts Medical Society. Tutti i diritti riservati).

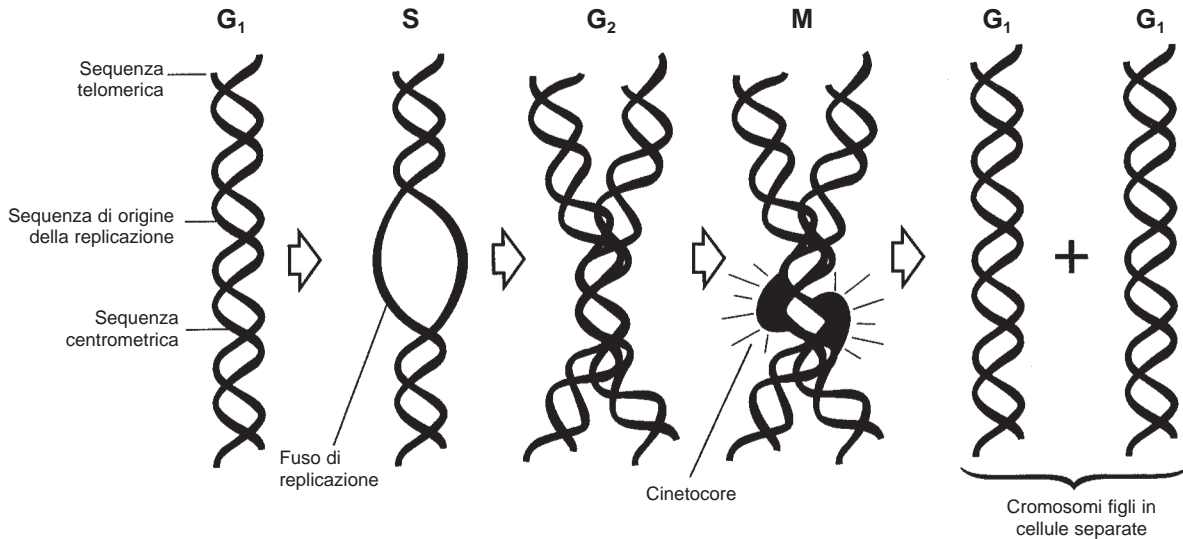


Figura 2-3. Struttura del cromosoma. Ogni cromosoma possiede tre tipi di sequenze specifiche che facilitano la sua replicazione durante il ciclo cellulare. Gli inizi della replicazione sono localizzati lungo ciascun cromosoma per facilitare la sintesi del DNA. Il centromero mantiene insieme il cromosoma duplicato ed è agganciato al fuso mitotico attraverso una proteina complessa chiamata cinetocore. Le sequenze telomeriche sono localizzate a ciascun margine del cromosoma e vengono replicate in un modo particolare per preservarne l'integrità.

Un singolo cambiamento di aminoacido, conseguente ad una mutazione puntiforme, è detto *mutazione missenso*. Le mutazioni missenso possono causare dei cambiamenti nella struttura di una proteina, provocandone un'attività biologica alterata. Se la mutazione puntiforme dovesse causare la sostituzione di un codone aminoacidico con un codone di arresto verrebbe definita una *mutazione nonsense*.

Le mutazioni nonsense portano ad un'interruzione prematura della traduzione e spesso causano la perdita della proteina codificata. L'aggiunta o la perdita di poche coppie di basi che causa l'introduzione di aminoacidi non correlati o di un codone di arresto è definita *mutazione di sfasamento del registro di lettura* o *mutazione frameshift* (vedi Fig. 2-4). Alcune mutazioni sono silenti e non colpiscono la funzionalità degli organismi. Diversi meccanismi di correzione vengono usati per correggere gli errori nel corso della replicazione del DNA.

Sequenza originaria

Amino acidi	N-Phe	Arg	Trp	Ile	Ala	Asn-C
mRNA	5'-UUU	CGA	UGG	AUA	GCC	AAU-3'
DNA	3'-AAA	GCT	ACC	TAT	CGG	TTA-5'
	5'-TTT	CGA	TGG	ATA	GCC	AAT-3'

Missenso

3'-AAU	GCT	ACC	TAT	CGG	TTA-5'
5'-TTA	CGA	TGG	ATA	GCC	AAT-3'
N-Leu	Arg	Trp	Ile	Ala	Asn-C

Nonsense

3'-AAA	GCT	ATC	TAT	CGG	TTA-5'
5'-TTT	CGA	TAG	ATA	GCC	AAT-3'
N-Phe	Arg	Stop			

Sfasamento del registro di lettura per aggiunta

3'-AAA	GCT	ACC	ATA	TCG	GTT	A-5'
5'-TTT	CGA	TGG	TAT	AGC	CAA	T-3'
N-Phe	Arg	Trp	Tyr	Ser	Gln	

Sfasamento del registro di lettura per delezione

GCTA						
CGAT						
3'-AAA	CCT	ATC	GGT	TA-5'		
5'-TTT	GGA	TAG	CCA	AT-3'		
N-Phe	Gly	Stop				

Figura 2-4. Diversi tipi di mutazione. Le mutazioni puntiformi riguardano l'alterazione di una singola coppia di basi. Piccole aggiunte o perdite di più coppie di basi riguardano direttamente la sequenza di un solo gene. In alto è rappresentata la sequenza peptidica originaria e l'mRNA e il DNA che la codificano. I nucleotidi alterati e i residui di aminoacidi sono racchiusi nelle cornici. Le mutazioni missenso causano il cambiamento di un singolo aminoacido nella proteina codificata. In una mutazione nonsense, il cambiamento in una base nucleotidica causa la formazione di un codone di arresto (stop). Ciò provoca un arresto prematuro della traduzione, generando quindi una proteina trunca. Le mutazioni di sfasamento del registro di lettura riguardano l'aggiunta o la perdita di un numero qualsiasi di nucleotidi che non sia un multiplo di tre, causando un cambiamento nella sequenza di lettura. (Da Lodish HF, Baltimore D, Berk A et al. (eds): Molecular Cell Biology, 3rd ed. New York, Scientific American, 1998, p. 267, per gentile concessione).

RNA e sintesi delle proteine

Nei primi anni '40 i genetisti dimostrarono che i geni contengono le informazioni per la struttura delle singole proteine. Il trasferimento dell'informazione dal DNA alle proteine avviene attraverso la sintesi di una molecola intermedia nota come RNA. L'RNA, come il DNA, è costituito da una sequenza lineare di nucleotidi composta da quattro basi complementari e differisce dal DNA per due aspetti: primo, la sua struttura portante di zuccheri fosfati contiene ribosio al posto del desossiribosio e, secondo, la timina (T) è sostituita dall'uracile (U), una base ad essa molto simile che si lega all'adenina (A). Le molecole di RNA sono sintetizzate dal DNA attraverso il processo di *trascrizione* che usa una catena di DNA come stampo. La trascrizione differisce dalla replicazione del DNA in quanto l'RNA viene sintetizzato come una molecola a singola catena ed è relativamente corto rispetto al DNA. Numerose classi di RNA vengono trascritte, tra cui mRNA, tRNA e rRNA. Anche se tutte queste molecole di RNA sono coinvolte nella traduzione di informazioni da RNA in proteine, solo l'mRNA serve come stampo. La sintesi dell'RNA è un processo altamente selettivo, di cui solo l'1% circa dell'intera sequenza nucleotidica del DNA umano viene trascritto in sequenze funzionali di RNA.

Gli esoni sono sequenze nucleotidiche di DNA che codificano per le proteine; gli esoni sono separati gli uni dagli altri dagli introni, le sequenze non codificanti (vedi Fig. 2-2). Dopo la trascrizione dell'RNA, le sequenze degli introni vengono rimosse da enzimi che elaborano l'RNA (Fig. 2-5). Questo processo di elaborazione dell'RNA, chiamato *splicing*, avviene nel nucleo. Sebbene ogni cellula contenga lo stesso materiale genetico, solo specifici geni sono trascritti. La trascrizione dell'RNA è controllata da proteine di regolazione che si legano a siti specifici sul DNA nelle vicinanze della sequenza che codifica per un gene. La complessa regolazione della trascrizione di un gene avviene durante lo sviluppo e la differenziazione di un tessuto, permettendo differenti esempi di espressione genica.

Una volta nel citoplasma, l'RNA codifica la sintesi di una particolare proteina attraverso un processo chiamato *traduzione* dell'RNA, per mezzo del quale i nucleotidi nell'mRNA vengono tradotti nelle sequen-

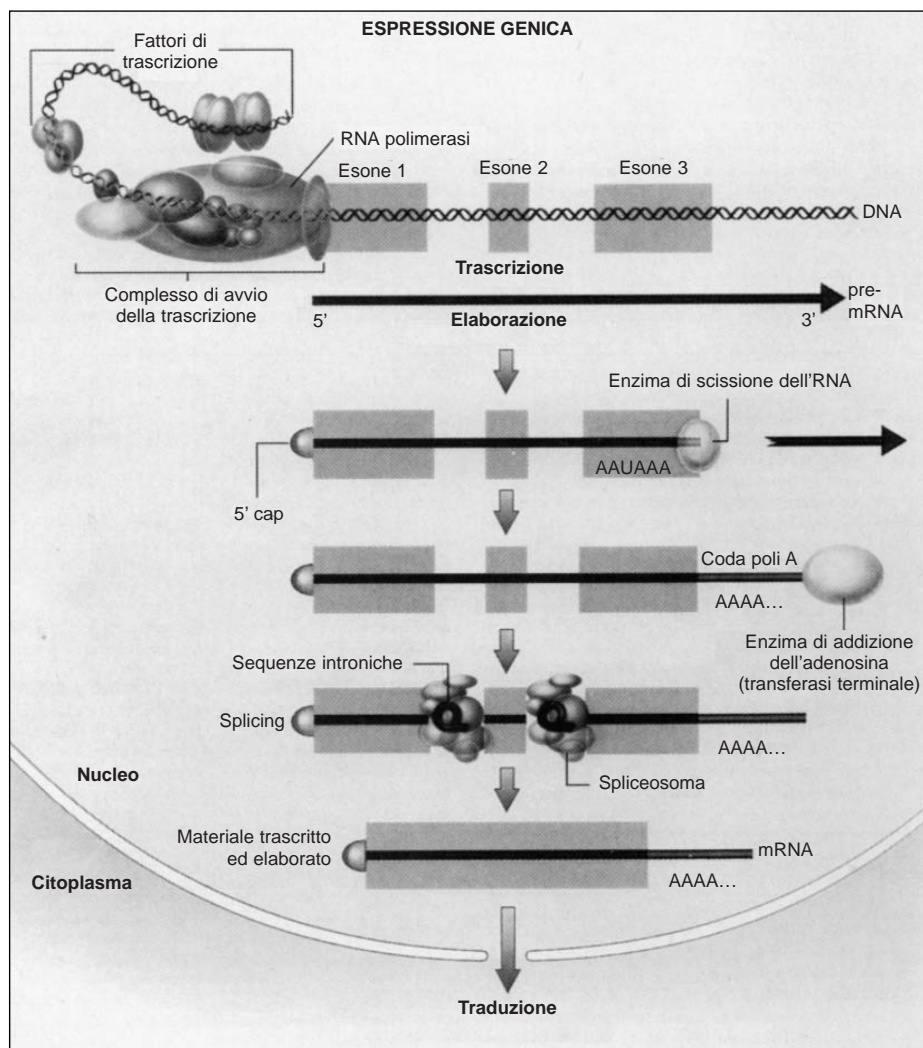


Figura 2-5. Processo di trascrizione di un gene. L'espressione di un gene comincia con il legame di numerosi fattori proteici a sequenze promotrici (promoter) e intensificatrici (enhancer). Questi fattori contribuiscono alla formazione del complesso di avvio della trascrizione, che comprende l'enzima RNA polimerasi e numerose proteine polimerasi associate. Il trascritto primario (pre-mRNA) contiene sia sequenze esoniche che introniche. L'elaborazione post-trascrizionale inizia con la modificazione di entrambe le estremità dell'RNA trascritto. All'estremità 5', gli enzimi aggiungono uno speciale cappuccio nucleotidico e all'estremità 3' un enzima taglia il pre-mRNA approssimativamente 30 coppie di basi dopo la sequenza AAUAAA nell'ultimo esone. Un altro enzima aggiunge una coda poli A che consiste di ben 200 nucleotidi di adenina. Quindi, gli spliceosomi rimuovono gli introni tagliando l'RNA ai confini tra esoni ed introni. Il processo di escissione determina l'allontanamento delle sequenze introniche. L'mRNA che ha terminato il processo di splicing è dunque maturo e può lasciare il nucleo per la traduzione delle proteine che avviene nel citoplasma. (Adattata per gentile concessione da Rosenthal N. Regulation of gene expression. N Engl J Med 331:932, 1994 Copyright © 1994 Massachusetts Medical Society. Tutti i diritti riservati).

ze aminoacidiche di una proteina. Ogni tripletta di nucleotidi forma un codone che indica un aminoacido. Siccome l'RNA è costituito da quattro tipi di nucleotidi, esistono 64 possibili triplette di codoni ($4 \times 4 \times 4$). Tuttavia, soltanto 20 aminoacidi sono comunemente presenti nelle proteine, così la maggior parte degli aminoacidi sono indicati da più di un codone. Il codice genetico non è altro che la regola secondo la quale i differenti codoni sono tradotti in aminoacidi (Tab. 2-2).

La traduzione delle proteine necessita dei ribosomi, che sono costituiti da più di 50 diverse proteine e da numerosi rRNA. I ribosomi si legano con le molecole di mRNA nel punto del codone di avvio (AUG) e iniziano la traduzione nella direzione 5'-3'. La sintesi delle proteine cessa nel momento in cui viene incontrato uno dei tre codoni di terminazione. La velocità di sintesi delle proteine è controllata da fattori di avvio che reagiscono all'ambiente esterno, come i fattori di crescita e i nutrienti. Questi fattori di regolazione aiutano a coordinare la crescita e la proliferazione cellulare.

Regolazione dell'espressione genica

Il corpo umano è composto da milioni di cellule specializzate, ognuna con una propria funzione, cosa che caratterizza tutti gli organismi multicellulari. Generalmente tipi diversi di cellule umane contengono lo stesso materiale genetico (i.e. DNA), eppure esse sintetizzano e accumulano differenti gruppi di RNA e di molecole proteiche. Questa differenza nell'espressione dei geni determina se una cellula è un epatocita o un colangiocita. L'espressione genica può essere controllata in sei passaggi principali del meccanismo di sintesi che dal DNA porta all'RNA e alla proteina⁵³. Il primo e più importante passaggio

nel controllo dell'espressione genica avviene a livello della trascrizione, che determina quando e quanto un determinato gene è trascritto in molecole di RNA. Il secondo passaggio è il controllo nell'elaborazione dell'RNA, che regola quante molecole di mRNA mature vengono prodotte all'interno del nucleo. Il terzo passaggio è il controllo del trasporto dell'RNA, che determina quali mRNA maturi vengono esportati nel citoplasma dove avviene la sintesi proteica. Il quarto riguarda il controllo della stabilità degli mRNA, che determina il loro tasso di degradazione. Il quinto riguarda il controllo della traduzione che stabilisce quanto spesso un mRNA è tradotto in proteine dai ribosomi. Il sesto e ultimo passaggio è il controllo dell'attività proteica, che regola la funzionalità delle proteine.

Il controllo della trascrizione genica è il passaggio più importante nella regolazione della maggior parte dei geni. La sintesi dell'RNA inizia con l'assemblaggio ed il legame del complesso generale di trascrizione alla regione promotrice del gene (vedi Fig. 2-5). Il promotore è localizzato a monte della regione di avvio della trascrizione all'estremità 5' del gene ed è costituito da una sequenza di DNA composta principalmente di nucleotidi T e A (i.e. il TATA-box; vedi Fig. 2-2). Il complesso generale della trascrizione è costituito da numerose proteine, incluse le proteine generali di trascrizione e la RNA polimerasi II. Questi fattori generali di trascrizione sono abbondantemente espressi in ogni cellula e sono necessari per la trascrizione dei geni della maggior parte dei mammiferi. La velocità di assemblaggio del complesso generale di trascrizione al promotore determina la velocità di trascrizione, che è controllata da proteine di regolazione del gene. In contrapposizione con il piccolo numero di proteine generali di trascrizione ci sono migliaia di diverse proteine che regolano il gene. La maggior

TABELLA 2-2. Il codice genetico

Prima posizione (estremità 5')	Seconda posizione				Terza posizione (estremità 3')
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	Stop	Stop	A
	Leu	Ser	Stop	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

parte di queste si legano a specifiche sequenze di DNA, chiamate elementi di regolazione, sia per attivare che per reprimere la trascrizione.

Le proteine che regolano il gene sono espresse in piccola quantità in ciascuna cellula e diversi gruppi di proteine sono espressi in differenti tipi di cellule. Analogamente, diverse combinazioni di elementi regolatori sono presenti in ciascun gene per permettere un controllo differenziale della trascrizione del gene. Molti geni nell'uomo hanno più di 20 elementi regolatori, di cui alcuni si legano ad attivatori della trascrizione, mentre altri si legano a repressori della trascrizione. Infine, il bilanciamento tra attivatori e repressori della trascrizione determina la velocità di trascrizione, la quale può differire di un fattore superiore a 10^6 tra quei geni che sono espressi e quelli che vengono repressi. La maggior parte degli elementi di regolazione è localizzata ad una certa distanza dal promotore (i.e. fino ad alcune migliaia di basi nucleotidiche). Questi elementi distanti di regolazione vengono avvicinati al promotore attraverso il ripiegamento del DNA, permettendone così il controllo dell'attività. In sintesi, la combinazione degli elementi di regolazione con le proteine di regolazione del gene che vengono espresse, determina dove e quando un gene viene trascritto.

Sebbene la forma predominante della regolazione dell'espressione genica sia il controllo della trascrizione, anche i controlli post-trascrizionali svolgono per molti geni un ruolo cruciale.

TECNOLOGIA DEL DNA RICOMBINANTE

I progressi nella tecnologia del DNA ricombinante che hanno avuto inizio negli anni '70, hanno ampiamente facilitato lo studio del genoma umano. Nei laboratori di biologia molecolare è diventata una pratica routinaria l'asportazione di specifiche regioni del DNA per produrre copie illimitate e per determinarne la sequenza nucleotidica. Inoltre, geni isolati possono essere alterati (manipolati) e ritrasferiti all'interno di cellule in coltura o all'interno di cellule germinali di un animale o di una pianta, cosicché il gene alterato possa essere trasmesso come una parte del genoma dell'organismo. Gli aspetti più importanti della tecnologia del DNA ricombinante riguardano la capacità di tagliare il DNA in un punto specifico tramite nucleasi di restrizione, di amplificarne e determinarne rapidamente le sequenze nucleotidiche, di clonarne un frammento e di crearne una nuova sequenza⁵⁴.

Nucleasi di restrizione

Le nucleasi di restrizione sono enzimi di origine batterica che tagliano la doppia elica di DNA nel punto di una sequenza specifica lunga da quattro a otto nucleotidi. Sono state isolate da diverse specie batteriche più di 400 nucleasi di restrizione e sono state individuate più di 100 diverse sequenze specifiche. Gli enzimi di restrizione proteggono la cellula batterica da DNA estranei, poiché il DNA nativo è protetto dal clivaggio attraverso la metilazione di nucleotidi vulnerabili.

Gli enzimi di restrizione più comunemente usati riconoscono una sequenza palindromica di sei basi appaiate, quale ad esempio GAATTC. Ogni nucleasi di restrizione taglia la molecola di DNA in una serie di frammenti specifici. Questi frammenti hanno sia un terminale di coesione che un terminale smusso, a seconda della nucleasi di restrizione, e possono quindi essere riattaccati ad altri frammenti di DNA che abbiano lo stesso terminale di coesione (Fig. 2-6, *in alto*). Attraverso l'utilizzo di una combinazione di diversi enzimi di restrizione si può creare una mappatura delle zone di restrizione di ogni DNA, facilitando l'isolamento di singoli geni. Le nucleasi di restrizione sono state anche usate nella manipolazione di singoli geni.

Polymerase chain reaction

Una tecnica ingegnosa per amplificare rapidamente il segmento di una sequenza di DNA in vitro è stato messo a punto nel 1985 da Saiki e collaboratori⁵⁵. Questo metodo, chiamato *polymerase chain reaction* (PCR), è in grado di amplificare enzimaticamente un segmento di DNA un bilione di volte⁶². La tecnica di PCR è resa possibile dalla disponibilità di DNA polimerasi batteriche purificate termostabili e dalla possibilità di sintetizzare piccoli segmenti di DNA (oligonucleotidi). Il principio della tecnica di PCR è illustrato nel *pannello in basso* della Figura 2-6. Per amplificare un segmento di DNA devono essere sintetizzati due oligonucleotidi a singola catena, o *primer*, ciascuno progettato per essere complementare ad una catena della doppia elica di DNA e per disporsi sul lato opposto della regione che deve essere amplificata. La miscela reattiva della PCR è costituita da una sequenza a doppia catena di DNA (lo stampo), da due oligonucleotidi di DNA primer, da una DNA polimerasi termostabile e da quattro tipi di desossinucleotidi trifosfati.

Ogni ciclo di amplificazione è organizzato in tre passaggi controllati dalla temperatura. Inizialmente, la miscela reattiva è brevemente riscaldata a 94°C al fine di separare in due catene singole la struttura a doppia elica dello stampo di DNA. Successivamente, la miscela reattiva è raffreddata a meno di 55°C , così che si ibridizzano i due primer di DNA con le loro sequenze complementari su ciascuna delle due catene di DNA stampo. Infine la reazione è nuovamente riscaldata a 72°C per permettere la sintesi del DNA a valle di ciascun primer. Ogni ciclo di reazioni di PCR richiede appena 5 minuti e dà luogo ad una duplicazione delle molecole a doppia elica di DNA, che servono da stampo alle successive reazioni. Dopo appena 32 cicli vengono prodotte più di un bilione di copie del segmento di DNA desiderato. La tecnica di PCR non è solo estremamente potente, ma è anche la tecnica più sensibile per individuare una singola molecola di DNA o RNA in un campione. Le molecole di RNA per essere individuate devono prima essere trascritte nella loro sequenza complementare di DNA usando l'enzima *trascrittasi inversa*. Il numero delle ricerche e delle applicazioni cliniche che utilizzano la PCR sono in continua crescita⁵⁰. Nei laboratori di biologia molecolare la PCR è stata usata per la clonazione diretta del DNA, per la mutagenesi in vitro, per la manipolazione del DNA, per l'analisi delle variazioni delle sequenze alleliche e per lo studio delle sequenze del DNA. Le tecniche di PCR hanno anche molte applicazioni cliniche, inclusa la diagnosi di malattie genetiche, la ricerca di agenti infettivi e le mappature genetiche a scopo forense.

Mappatura delle sequenze di DNA

Il DNA codifica informazioni per la sintesi delle proteine e in ultima analisi per il fenotipo di un essere umano. Ogni singolo gene può essere costituito da più di 3.000 basi nucleotidiche. L'identificazione di sequenze nucleotidiche di un frammento di DNA è stata resa possibile grazie allo sviluppo di tecniche rapide che si giovano della capacità di separare le molecole di DNA di diverse lunghezze, persino quelle che differiscono solo di un singolo nucleotide. Attualmente il metodo standard per mappare le sequenze di DNA è basato su un sistema enzimatico che ne richiede la sintesi *in vitro*. Questo metodo è veloce e può essere automatizzato per permettere la mappatura delle sequenze di ampi segmenti di DNA. Usando queste tecniche è possibile determinare i confini di un gene e la sequenza aminoacidica della proteina che esso codifica. Le tecniche di mappatura hanno permesso l'identificazione e la sintesi *in vitro* di importanti proteine, quali ad esempio l'insulina, l'interferone, l'emoglobina e gli ormoni della crescita.

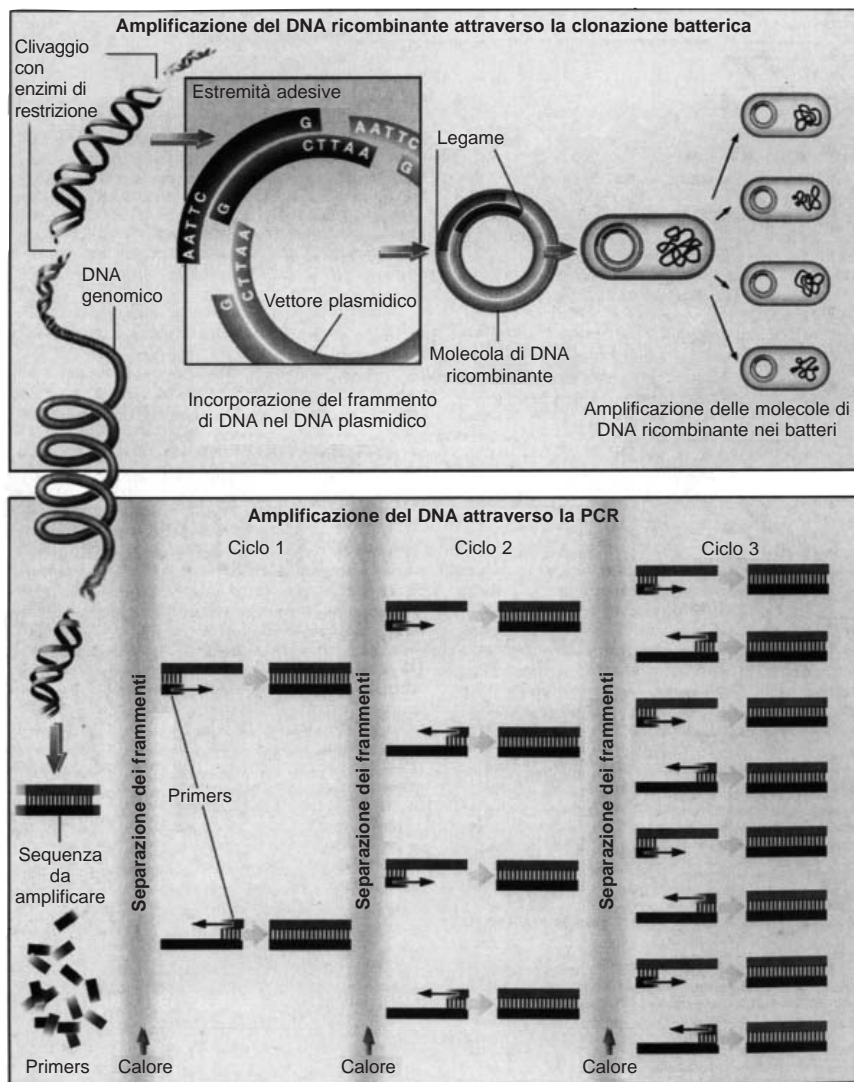


Figura 2-6. Amplificazione del DNA ricombinante e amplificazione per mezzo della polymerase chain reaction. In alto, il segmento di DNA che deve essere amplificato è separato dal DNA che lo circonda attraverso il clivaggio con un enzima di restrizione. I tagli enzimatici producono spesso estremità sfalsate o adesive. Nell'esempio mostrato, l'enzima di restrizione *EcoRI* riconosce la sequenza GAATTC e taglia ogni sequenza tra la G (guanina) e la A (adenina); le due catene di DNA genomico sono mostrate in nero (C indica la citosina e T la timina). Lo stesso enzima di restrizione taglia il plasmide circolare di DNA (grigio) da un lato solo, generando estremità adesive che sono complementari alle estremità adesive del frammento di DNA genomico. Il DNA genomico tagliato e ciò che resta del plasmide, quando vengono mischiati in presenza di un enzima ligasi, formano giunture lisce su ciascun lato della giunzione tra il plasmide e il DNA genomico. Questa nuova molecola – il DNA ricombinante – è inoculata in batteri che replicano il plasmide crescendo in coltura. In basso, la sequenza di DNA che deve essere amplificata è selezionata attraverso le sequenze di innescio (primers), che sono corti oligonucleotidi sintetici che corrispondono alle sequenze adiacenti del DNA da amplificare. Dopo che un eccesso di primers è stato aggiunto al DNA, insieme a DNA polimerasi termostabili, le catene del DNA genomico e dei primers vengono separate con il calore e lasciate raffreddare. Una polimerasi termostabile allunga i primers su ciascuna sequenza, generando quindi due nuove molecole di DNA a doppia catena identiche e raddoppiando il numero di frammenti di DNA. Ogni ciclo richiede soltanto pochi minuti e raddoppia il numero di copie del frammento di DNA originario. (Da Rosenthal N. Tools of the trade-recombinant DNA. N Engl J Med 331:316, 1994. Copyright © 1994 Massachusetts Medical Society. Tutti i diritti riservati).

Clonazione del DNA

Le tecniche di clonazione del DNA permettono l'identificazione all'interno del genoma umano di un particolare gene. Per prima cosa i frammenti di DNA sono ottenuti attraverso la digestione dell'intero contenuto di DNA di una cellula per mezzo di una nucleasi di restrizione. I frammenti di DNA vengono uniti ad un elemento genetico autoreplicante (un virus o un *plasmide*), che viene anch'esso digerito con la stessa nucleasi di restrizione. I virus o i plasmidi sono piccole molecole circolari di DNA presenti in natura e che possono replicarsi rapidamente se vengono introdotti in una cellula batterica, divenendo così dei vettori estremamente utili per la propagazione di un segmento di DNA. Una volta inseriti in un virus o in un plasmide, i frammenti di DNA vengono introdotti in cellule batteriche che sono state rese temporaneamente permeabili al DNA stesso. Queste cellule, che vengono così *transfettate*, sono in grado di produrre numerose copie di virus o plasmidi contenenti il frammento di DNA. Usando questo metodo può essere creata una serie di plasmidi batterici contenenti l'intero genoma umano e questa biblioteca di DNA può essere utilizzata per identificare geni di particolare interesse.

Manipolazione del DNA

Una delle più importanti conseguenze della tecnologia del DNA ricombinante è la capacità di generare attraverso la manipolazione del DNA nuove molecole di una sequenza qualsiasi. Nuove molecole di DNA possono essere sintetizzate sia attraverso il metodo della PCR

che utilizzando sintetizzatori automatici di oligonucleotidi. La PCR può essere usata per amplificare qualsiasi segmento noto del genoma umano e per modificare le sue due estremità. I sintetizzatori automatici di oligonucleotidi consentono la rapida produzione di molecole di DNA fino ad un massimo di circa 100 nucleotidi di lunghezza. La sequenza delle molecole sintetiche di DNA così ottenute è interamente determinata dallo sperimentatore. Molecole di DNA più grandi possono essere generate attraverso la combinazione di due o più molecole di DNA che abbiano estremità complementari coesive ottenute per digestione con gli enzimi di restrizione.

Un'importante applicazione della manipolazione del DNA è costituita dalla sintesi di grandi quantità di proteine cellulari per applicazioni mediche. Molte proteine cellulari vengono prodotte in piccoli quantitativi dalle cellule umane, rendendone difficile la purificazione e lo studio. Tuttavia, con la manipolazione del DNA è possibile inserire un gene umano in un vettore di espressione, manipolato al fine di contenere un promotore altamente attivo. Quando il vettore trasfetta cellule di batteri, lieviti, insetti o mammiferi dà inizio alla produzione di grossi quantitativi del mRNA del gene umano, con la conseguente produzione di grandi quantità della proteina. Usando questi vettori di espressione è possibile produrre una singola proteina che incida dall'1 al 10% sulla produzione proteica della cellula. La proteina può così essere facilmente purificata e utilizzata per studi scientifici o applicazioni cliniche. Le proteine utili in campo medico, quali l'insulina umana, l'ormone della crescita, l'interferone e gli antigeni virali per i vaccini, sono state ottenute attraverso vettori di espressione manipolati per contenere questi particolari geni.

Le tecniche di manipolazione del DNA sono anche importanti per risolvere problemi di biologia cellulare. Una delle sfide fondamentali della biologia cellulare è quella di identificare le funzioni biologiche di una proteina prodotta da un gene. Usando tecniche di ingegneria genetica è possibile alterare la sequenza codificante di un gene con il risultato di alterare le proprietà funzionali della proteina da lui prodotta. Anche la regione di regolazione di un gene può essere alterata, portando ad un comportamento alterato della sua espressione in una cellula. La sequenza codificante di un gene può essere modificata in modo così fine che la proteina codificata abbia soltanto poche alterazioni nella sua sequenza aminoacidica. Il gene così modificato viene quindi inserito in un vettore di espressione e trasferito in un tipo di cellula adatto per poter esaminare la funzione della proteina ridisegnata. Usando questa strategia si può analizzare quali porzioni della proteina sono importanti per i processi fondamentali quali la conformazione tridimensionale, l'attività enzimatica e l'interazione di legame tra proteine.

Animali transgenici

Il test definitivo per comprendere la funzione di un gene è sia (1) sovraesprimere il gene in un organismo per vedere quale effetto esso abbia, sia (2) eliminarlo dal genoma e valutarne le conseguenze, ma è molto più semplice sovraesprimere un particolare gene che non eliminarlo dal genoma di un organismo⁷¹. Per sovraesprimere un gene, il frammento di DNA che codifica per quel gene, o il *transgene*, deve essere costruito usando tecniche di DNA ricombinante^{24,62}. Il frammento di DNA deve contenere tutte le componenti necessarie per un'espressione efficiente del gene, inclusi un promotore e una regione di regolazione che ne guidi la trascrizione. Il tipo di promotore utilizzato è in grado di determinare se il transgene viene espresso in vari tessuti oppure in un tessuto specifico dell'animale transgenico. Per esempio, un'espressione selettiva degli acini pancreatici può essere ottenuta inserendo il promotore 5' dell'amilasi a monte della sequenza che codifica il transgene. I frammenti di DNA del transgene vengono quindi introdotti nel pronucleo maschile di un uovo fertilizzato, usando tecniche di micro-iniezione. Tipicamente dal 2 al 6% degli embrioni così iniettati avranno il transgene integrato nel loro DNA germinale. Gli animali sono poi selezionati per la presenza del transgene. L'analisi degli animali transgenici ha portato ad importanti intuizioni sulla funzione di molti geni umani ed ha fornito modelli animali per le malattie umane. Ad esempio, animali transgenici manipolati per sovraesprimere una forma mutante del gene per il precursore della proteina beta-amiloide (il gene *APP*) sviluppano modificazioni neuropatologiche simili a quelle dei pazienti con malattia di Alzheimer. Questo modello transgenico non solo conferma il ruolo del gene *APP* nello sviluppo della malattia di Alzheimer, ma è anche un modello per la sperimentazione di metodi di prevenzione o trattamento di questa malattia.

Uno dei maggiori vantaggi nell'uso degli animali transgenici è che essi mostrano soltanto gli effetti principali del transgene in quanto conservano due copie normali del gene nel loro genoma. Perciò è estremamente utile produrre animali che non esprimano entrambe le copie di un particolare gene³⁵. Questi animali *knock-out* sono molto più difficili da sviluppare rispetto agli animali transgenici e richiedono tecniche di gene-targeting. Per asportare un gene è importante modificare quel gene particolare manipolando il DNA per creare un gene non funzionante. Il gene così alterato è inserito in un vettore e quindi in linee di cellule germinali. Anche se la maggior parte dei geni mutati è inserita a caso in uno dei cromosomi, raramente un gene mutato rimpiazza una delle due copie di gene normale attraverso una *ricombinazione omologa*. Le cellule germinali con una copia di gene normale ed una copia di gene mutato danno origine ad animali eterozigoti. Una volta generati, i maschi e le femmine eterozigoti possono essere allevati per produrre animali che siano omozigoti per il gene mutato. Gli animali *knock-out* così ottenuti possono essere studiati per determinare quale funzione cellulare sia alterata rispetto agli animali normali, identificando quindi la funzione biologica di un particolare gene. La capacità di produrre animali *knock-out* che manchino di un dato gene ha grandemente facilitato gli studi sulle funzioni di specifici geni di mammifero.

TRASDUZIONE CELLULARE DEL SEGNALE

Il corpo umano è composto da bilioni di cellule che devono essere coordinate per formare specifici tessuti. Sia le cellule vicine che quelle distanti influenzano il comportamento delle altre cellule attraverso meccanismi di segnalazione intercellulari. Se una trasduzione del segnale cellulare normale assicura la salute all'essere umano, una trasduzione anormale può causare malattie, quali il cancro. Attraverso efficaci tecniche molecolari, i sofisticati meccanismi di trasduzione usati dalle cellule di mammifero vengono compresi sempre meglio. Questa sezione tratta i principi generali della trasduzione del segnale ed esamina i meccanismi di trasduzione delle due principali famiglie di recettori proteici della superficie cellulare⁴⁴.

Ligandi e recettori

Le cellule comunicano le une con le altre attraverso la secrezione di numerose molecole, incluse proteine, piccoli peptidi, aminoacidi, nucleotidi, steroidi, derivati degli acidi grassi e persino gas disciolti, quali l'ossido di azoto e il monossido di carbonio. Una volta che queste molecole di trasduzione vengono sintetizzate e rilasciate da una cellula, possono agire sulla cellula che produce il segnale (*trasduzione autocrina*), colpire cellule adiacenti (*trasduzione paracrina*), o entrare nella circolazione sistemica e agire a distanza su cellule bersaglio (*trasduzione endocrina*). Queste molecole per la trasmissione del segnale, chiamate anche *ligandi*, si legano a specifiche proteine, chiamate *recettori*, espressi sia sulla membrana cellulare che nel citoplasma delle cellule bersaglio. Nel momento in cui il ligando si lega, il recettore si attiva e dà origine ad una cascata di segnali intracellulari che alterano il comportamento della cellula. Ogni cellula umana è esposta a centinaia di diversi segnali che le giungono dall'ambiente circostante, ma è geneticamente programmata per rispondere solo a specifici tipi di segnali. Le cellule possono rispondere a un tipo di segnale replicandosi, ad un altro tipo di segnale differenziandosi, e ad un altro ancora con la morte della cellula. Inoltre, diverse cellule possono rispondere allo stesso tipo di segnale con diverse attività biologiche.

La maggior parte dei segnali extracellulari è mediata da molecole idrofile che si legano ai recettori presenti sulla superficie delle cellule bersaglio. I recettori cellulari di superficie sono suddivisi in tre classi in base al meccanismo di trasduzione usato per propagare i segnali a livello intracellulare. I recettori accoppiati a canali ionici sono coinvolti nella trasmissione rapida dei segnali sinaptici tra cellule eccitabili elettricamente. Questi recettori formano canali ionici con un cancello che si apre o si chiude rapidamente in risposta ai neurotrasmettitori. I recettori accoppiati a proteina G regolano l'attività di altre proteine di membrana attraverso una proteina di regolazione che lega la guanosina trifosfato, chiamata appunto proteina G⁴⁹. I recettori accoppiati ad enzimi possono agire sia direttamente come enzimi o essere associati a degli enzimi^{21,46}. La maggior parte di questi recettori è costituita da proteinchinasi o accoppiata a proteinchinasi che fosforilano specifiche proteine nella cellula.

Alcuni segnali extracellulari sono costituiti da piccole molecole idrofobiche, quali ad esempio gli ormoni steroidei, gli ormoni tiroidei, i retinoidi e le vitamine. Essi comunicano con le cellule bersaglio diffondendo attraverso la membrana plasmatica e legandosi a proteine intracellulari che fungono da recettore. Questi recettori citoplasmatici sono simili nella struttura e costituiscono la super-famiglia dei recettori intracellulari. Quando vengono attivati dal ligando, i recettori intracellulari penetrano nel nucleo, si legano a specifiche sequenze del DNA e regolano la trascrizione di un gene adiacente.

Alcuni gas disciolti, quali l'ossido di azoto e il monossido di carbonio fungono da segnali locali diffondendo attraverso la membrana plasmatica e attivando enzimi intracellulari all'interno delle cellule bersaglio. In particolare l'ossido di azoto si lega e attiva l'enzima guanilato ciclasi, portando alla produzione di un mediatore intracellulare noto come guanosin-monofosfato ciclico.

Recettori accoppiati a proteina G

I recettori accoppiati alla proteina G sono la famiglia più numerosa di recettori cellulari di superficie e mediano le risposte cellulari ad un ampio spettro di molecole di segnale, inclusi gli ormoni, i neurotra-

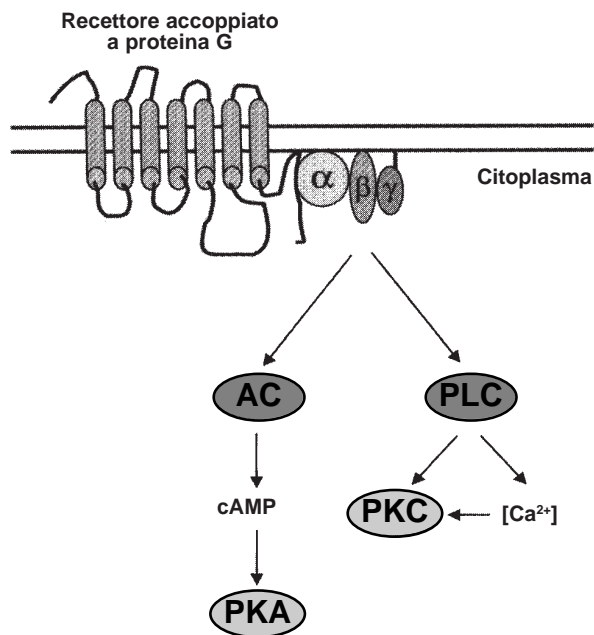


Figura 2-7. Sequenza di trasmissione del segnale dei recettori accoppiati a proteina G. I recettori accoppiati alla proteina G sono proteine con sette domini transmembrana che vengono attivati dal legame con un ligando. I recettori attivati iniziano una cascata di eventi che conducono all'amplificazione del segnale originale. Il recettore attiva una proteina G trimerica costituita da sub unità α , β , e γ . La proteina G può attivare l'adenilato ciclasi (AC) per farle formare l'adenosin-monofosfato ciclico (cAMP) oppure la fosfolipasi C (PLC) per farle rilasciare calcio intracellulare. Il cAMP può attivare la proteinchinasi A (PKA), mentre la PLC o il calcio intracellulare possono attivare la proteinchinasi C (PKC).

smettitori e i mediatori locali^{26,49}. Questi recettori includono i recettori β -adrenergici, i recettori α_2 -adrenergici e i recettori per il glucagone. Hanno tutti una struttura simile, con un dominio intracellulare che si lega a una specifica proteina G trimerica⁵⁹. Ci sono almeno sei diversi tipi di proteine G trimeriche in base al loro meccanismo di segnalazione intracellulare; ciascuna è composta da tre diverse catene polipeptidiche, chiamate α , β e γ ^{10,22}. Al momento del contatto con il ligando, il recettore accoppiato a proteina G attiva la propria proteina G trimerica (Fig. 2-7) che una volta attivata altera le concentrazioni di una o più molecole di trasmissione del segnale a livello intracellulare, note come *secondi messaggeri*.

I due secondi messaggeri regolati dai recettori accoppiati a proteina G più importanti sono: l'adenosin-monofosfato ciclico (cAMP) e il calcio. Il cAMP è sintetizzato dall'enzima adenilato ciclasi e può essere rapidamente degradato dalla cAMP-fosfodiesterasi⁶¹. Il calcio intracellulare è stivato nel reticolo endoplasmatico e rilasciato nel citoplasma sotto un preciso stimolo. Alcune proteine G trimeriche possono attivare l'adenilato ciclasi, mentre altre ne inibiscono l'attività e possono anche attivare l'enzima fosfolipasi C, che produce le necessarie molecole segnale per attivare il rilascio del calcio dal reticolo endoplasmatico. L'attivazione della fosfolipasi C può essere seguita dall'attivazione della proteinchinasi C che dà inizio ad una cascata di chinasi. I cambiamenti nelle concentrazioni di cAMP o di calcio nella cellula influenzano direttamente l'attività di specifiche chinasi che fosforilano proteine bersaglio. Il risultato finale è l'alterazione dell'attività biologica di queste proteine bersaglio, intesa come risposta biologica specifica alla molecola che inizialmente aveva portato il segnale. Nonostante le differenze nei dettagli della trasmissione del segnale, tutti i recettori accoppiati a proteina G utilizzano una complessa cascata di mediatori intracellulari al fine di amplificare la risposta biologica che segue i segnali extracellulari iniziali.

Recettori accoppiati a enzimi

I recettori accoppiati ad enzimi sono una diversa famiglia di proteine transmembrana con una struttura simile. Ogni recettore possiede un dominio extracellulare per ricevere il ligando e un dominio cito-

plasmatico che può possedere un'attività enzimatica intrinseca oppure essere direttamente associato ad un enzima. I recettori accoppiati ad enzimi vengono classificati sulla base del tipo di attività enzimatica utilizzata per la loro trasduzione intracellulare del segnale. Alcuni recettori fungono da guanilato ciclici e generano guanosin-monofosfato ciclico come mediatore intracellulare. Altri fungono da tirosina chinasi o sono associati a proteine che ne hanno la funzione, questi fosforilano specifici residui di tirosina su proteine intracellulari per propagare i segnali. Infine, alcuni recettori associati ad enzimi hanno attività di serina o treonina chinasi e possono fosforilare specifici residui di serina o treonina per trasdurre i segnali.

I recettori per i più noti fattori di crescita appartengono alla famiglia dei recettori con tirosina chinasi^{21,46}. Questi includono i recettori per il fattore della crescita dell'epidermide, il fattore della crescita derivato dalle piastrine, il fattore della crescita dei fibroblasti, degli epatociti, dell'insulina, il fattore della crescita insulino simile di tipo-1, il fattore di crescita dell'endotelio vascolare e il fattore di stimolazione delle colonie macrofagiche. Questi recettori per il fattore della crescita svolgono un ruolo fondamentale durante il normale sviluppo e il mantenimento dell'omeostasi dei tessuti. Inoltre, molti dei geni che codificano per le proteine coinvolte nella cascata del segnale intracellulare e che sono attivate da recettori tirosina chinasi sono stati identificati per la prima volta come oncogeni nelle cellule di cancro. La loro attivazione inappropriata causa la proliferazione eccessiva di una cellula. In modo simile ai recettori accoppiati a proteina G, i recettori tirosina chinasi usano una complessa cascata di mediatori intracellulari per propagare e amplificare i segnali iniziali (Fig. 2-8).

Quando si forma il legame con il ligando, il recettore con tirosina chinasi forma un dimero che attiva la chinasi. La chinasi attivata del recettore dà inizio ad un sistema intracellulare di trasmissione, attraverso la fosforilazione dei residui di tirosina posti sul dominio citoplasmatico del recettore. Successivamente, piccole proteine di segnalazione intracellulare si legano ai residui di fosfotirosina sul recettore, formando un complesso multiproteico di segnalazione dal quale il segnale si propaga fino al nucleo. Le proteine Ras svolgono un ruolo di collegamento cruciale nella cascata del segnale¹². Alla loro attivazione, le proteine Ras iniziano una cascata di fosforilazioni a carico della serina e della treonina che convergono su proteinchinasi mitogene attivate. Le proteinchinasi mitogene attivate ritrasmettono i segnali a valle, attraverso la fosforilazione di fattori di trascrizione, portando infine alla regolazione dell'espressione genica.

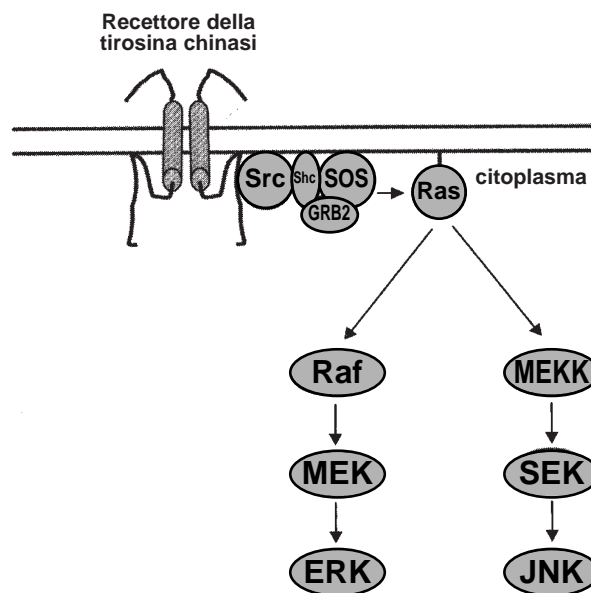


Figura 2-8. Sequenza di trasmissione del segnale dei recettori tirosina chinasi. I recettori tirosina chinasi sono singole proteine transmembrana che formano un dimero al legame con il ligando. I recettori attivati si legano a numerose proteine (Src, Shc, SOS, GRB2) per formare un complesso multiproteico di segnale. Questo complesso proteico può attivare RAS, che può iniziare numerose cascate di chinasi. Una cascata di chinasi include il Raf, MEK e i membri dell'ERK, mentre un'altra include il MEKK, il SEK e le proteine JNK.

Come precedentemente detto, le cellule umane sono in grado di integrare diversi segnali extracellulari e rispondono con comportamenti biologici quali la proliferazione, la differenziazione e la morte cellulare programmata. Le sezioni seguenti trattano dei meccanismi che governano questi importanti processi biologici.

CICLO DI DIVISIONE CELLULARE

Il ciclo di divisione cellulare è lo strumento fondamentale attraverso il quale gli organismi si riproducono e la normale omeostasi tissutale viene mantenuta. Il ciclo di divisione cellulare è una sequenza strutturata di complessi processi biologici che viene tradizionalmente suddivisa in quattro fasi distinte (Fig. 2-9).

La replicazione del DNA avviene nella fase S (*S*= synthesis), mentre la divisione nucleare e la fissione cellulare avvengono nella fase mitotica, o fase M. Gli intervalli tra queste due fasi sono chiamati fase G1 e G2 (*G*= gap). Dopo la divisione, le cellule che entrano nella fase G sono in grado di ricevere segnali extracellulari e di determinare se procedere alla replicazione del DNA oppure uscire dal ciclo. Questa sezione esamina le proteine che regolano la progressione attraverso ciascuna fase del ciclo cellulare e di come esse agiscano su specifici punti di controllo di tale ciclo. In seguito, sono trattate quelle proteine del ciclo cellulare che sono mutate o mancanti nei tumori umani.

Ciclo di divisione cellulare regolato da: ciclina, Cdk e CKI

La progressione del ciclo cellulare dei mammiferi attraverso queste specifiche fasi è regolata in modo sequenziale dall'attivazione e inattivazione di una famiglia di proteine di regolazione altamente costanti: le chinasi ciclina dipendenti (Cdk)^{39, 43, 47}. L'attivazione di una Cdk richiede il legame di una proteina di regolazione (la ciclina) ed è controllata da fosforilazioni sia positive che negative^{33, 40, 72}. Le attività delle Cdk sono inibite da specifiche proteine inibitorie (CKI)^{18, 57, 58}. Il complesso attivato ciclina-Cdk è coinvolto nella fosforilazione di altre proteine di regolazione del ciclo cellulare. Le cicline sono classificate in base alle loro somiglianze strutturali. Ogni ciclina mostra uno specifico comportamento di espressione per ciascuna fase del ciclo cellulare. Al contrario le proteine Cdk sono espresse lungo tutto il ciclo cellulare. Le cicline, le Cdk e le CKI costituiscono le unità fondamentali di regolazione del ciclo cellulare.

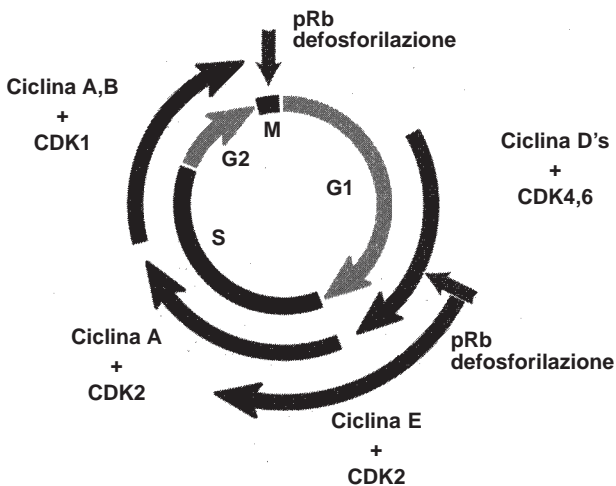


Figura 2-9. Meccanismi che regolano la progressione del ciclo cellulare dei mammiferi. Il ciclo cellulare è costituito da quattro fasi: fase G1 (primo intervallo), fase S (sintesi del DNA), fase G2 (secondo intervallo) e fase M (mitosi). La progressione attraverso il ciclo cellulare è regolata da famiglie di proteine altamente costanti di serina/treonina proteinchinasi che sono costituite da una subunità di regolazione (le cicline) e da una subunità catalitica (le chinasi ciclina dipendenti [CDKs]). La progressione del ciclo cellulare può essere inibita da una classe di regolatori chiamati inibitori della ciclina chinasi e dalla fosforilazione della proteina del retinoblastoma (pRb).

Punti di controllo del ciclo cellulare

Nelle cellule in proliferazione, la progressione del ciclo cellulare è regolata in due punti chiave di controllo, le transizioni G/S e G2/M. La progressione dalla fase precoce a quella media di G1 dipende dalla Cdk4 e dalla Cdk6, che sono attivate dall'associazione con una delle cicline di tipo D: D1, D2, D3. La progressione attraverso la fase tardiva di G1 e nella fase S, richiedono l'attivazione della Cdk2 che è regolata in modo sequenziale dalle cicline E ed A. La conseguente attivazione della Cdk1 (cdc2) da parte della ciclina B è essenziale per la transizione da G2 alla fase M. Ci sono due famiglie di proteine Cdk inibitorie: la famiglia CIP/KIP e la famiglia INK. Le quattro proteine INK conosciute (p15^{INK4B}, p16^{INK4A}, p18^{INK4C} e p19^{INK4D}) si legano selettivamente e inibiscono le Cdk4 e Cdk6 e sono espresse con un comportamento tessuto-specifico. I tre membri della famiglia CIP/KIP (p21^{CIP1}, p27^{KIP1} e p57^{KIP2}) condividono un dominio terminale aminoacidico costante che è sufficiente sia per legarsi ai complessi ciclina-Cdk che per inibire l'attività delle chinasi Cdk associate. Ogni proteina CIP/KIP è in grado di inibire tutte le Cdk conosciute. Uno dei bersagli chiave delle Cdk nella fase G1 è la proteina di soppressione del retinoblastoma (pRb), che appartiene alla famiglia delle proteine RB (pRb, p107, p130)⁶⁰. Nella loro forma ipofosforilata queste proteine possono sequestrare fattori di trascrizione che regolano il ciclo cellulare, inclusi gli eterodimeri delle famiglie E2F e DP¹⁹. La fosforilazione della pRb, prima attraverso chinasi ciclina D dipendenti, quindi attraverso la ciclina E/Cdk2 nel corso della tarda fase G1, causa il rilascio di E2F/DP e la conseguente attivazione dei geni che partecipano all'ingresso nella fase S⁴⁸.

Oncogeni e geni oncosoppressori

Questi geni che codificano per proteine di regolazione del ciclo cellulare sono spesso bersagli di mutazioni durante le trasformazioni neoplastiche. Se il gene mutato causa il cancro, viene definito un *oncogene* e la sua controparte normale è chiamato *proto-oncogene*. Sono stati identificati molti proto-oncogeni che sono tipicamente coinvolti nella ritrasmissione di segnali stimolatori dai recettori dei fattori di crescita al nucleo. Essi includono la proteina di trasduzione intracellulare Ras, come anche la proteina di regolazione del ciclo cellulare ciclina D1. La mutazione di una singola copia di un proto-oncogene è sufficiente per provocare un aumento della proliferazione cellulare, una delle caratteristiche del cancro. Numerosi geni che codificano proteine antiproliferative come la pRb, la p15 e la p16 controllano negativamente il ciclo di divisione cellulare. Questi geni sono spesso definiti come *geni oncosoppressori* poiché essi prevengono una proliferazione cellulare eccessiva e incontrollata. Questi geni sono inattivati in alcune forme di tumore causando la perdita del controllo proliferativo. Tuttavia, al contrario dei proto-oncogeni entrambe le copie di un gene oncosoppressore devono essere mancanti o inattivate perché avvenga una trasformazione maligna.

APOPTOSI

La proliferazione cellulare deve essere bilanciata da un processo appropriato di morte cellulare affinché sia mantenuta l'omeostasi dei tessuti. La morte cellulare fisiologica è un percorso genetico programmato e viene definito *apoptosi*. L'apoptosi è stata associata a numerose funzioni fisiologiche incluso il rimodellamento dei tessuti nel corso dello sviluppo, la rimozione di cellule senescenti e di cellule con un danno genetico impossibile da riparare e il mantenimento dell'omeostasi tissutale. Questa sezione tratta le caratteristiche biologiche e morfologiche dell'apoptosi e il meccanismo molecolare che la controlla.

Caratteristiche biochimiche e morfologiche dell'apoptosi

L'apoptosi è un processo fisiologico di eliminazione cellulare in contrasto con un'altra forma di morte cellulare, chiamata *necrosi*. La necrosi è un tipo di morte cellulare passiva adenosina trifosfato indipendente, che richiede un danno acuto non fisiologico (i.e. l'ischemia, il danno meccanico e le tossine) e che causa la distruzione delle membrane citoplasmatiche e degli organelli con il conseguente rigonfiamento della cel-

nosciute come il prodotto del gene *ced-3* del nematode *Caenorhabditis elegans*^{11,65}. La sequenza di Ced-3 mostra un'omologia con l'enzima che converte l'interleuchina 1 β (IL-1 β) dei mammiferi, che è comunemente nota come caspasi 1. Sono note nei mammiferi 10 caspasi, ognuna delle quali è intimamente coinvolta nel processo biochimico che media la morte apoptotica della cellula. Gli enzimi proteolitici sono sintetizzati come proenzimi inattivi che necessitano di un clivaggio per la loro attivazione. Ogni caspasi attivata svolge funzioni specifiche che possono sovrapporsi con quelle di altre caspasi. Questa ridondanza nella funzione dimostra il significato evolutivo dell'apoptosi. I substrati proteici clivati dalle caspasi attivate svolgono un compito funzionale nelle caratteristiche morfologiche e biochimiche viste nelle cellule apoptotiche.

Come indicato nella Figura 2-10 le caspasi attivate distruggono le proteine strutturali e del citoscheletro (α -fodrina e actina), i componenti della struttura nucleare (NuMA e lamine) e i fattori di adesione cellulare (FAK). Questi inducono l'arresto del ciclo cellulare attraverso il clivaggio di Rb, il rilascio citoplasmatico di p53, attraverso il clivaggio della proteina di regolazione *double minute 2* (MDM2), con la conseguente traslocazione nucleare e l'attivazione di PKC δ . Gli enzimi che riparano il DNA come la polimerasi (ADP-ribosio) e il componente da 140-kD del complesso C di replicazione del DNA, vengono inattivati dalla proteolisi eseguita dalla caspasi.

Infine, la frammentazione del DNA è indotta dall'attivazione e dalla traslocazione nucleare di una proteina citoplasmatica di 45-kD nota come fattore di frammentazione del DNA (DFF). Anche se non sono note caspasi coinvolte nella redistribuzione dei residui di fosfatidilserina sulla membrana plasmatica, gli inibitori della caspasi hanno dimostrato di bloccare questo evento. Soprattutto, il risultato finale dell'attivazione delle caspasi è di bloccare la progressione del ciclo cellulare, disabilitare i meccanismi omeostatici e riparativi, iniziare il distacco della cellula dalle strutture dei tessuti circostanti, lo smembramento dei componenti strutturali e segnare la cellula morente per la digestione da parte delle cellule circostanti e dei macrofagi.

La famiglia Bcl-2

Il processo di apoptosi è regolato dall'espressione di alcune proteine intracellulari che appartengono alla famiglia dei geni *Bcl-2* (vedi Fig. 2-10)^{2,4,13}. Bcl-2 è un potente inibitore dell'apoptosi e viene principalmente espresso nei colangiociti, nelle cellule dell'epitelio colico e nelle cellule dei dotti pancreatici. Il preciso meccanismo dell'inibizione apoptotica da parte di Bcl-2 non è noto, ma questa proteina viene ritrovata sulle membrane degli organelli e può funzionare come antiossidante, inibitore delle proteasi, o come chiavistello per prevenire l'ingresso del meccanismo apoptotico nell'organello bersaglio. Altre proteine di questa famiglia includono Bcl-xL, Bcl-xs, Bax, Bak e Bad. Bcl-xL è un altro inibitore dell'apoptosi. Bcl-Xs, Bax, Bak e Bad fungono da regolatori proapoptotici attraverso la dimerizzazione con Bcl-2 e Bcl-xL per mezzo della quale ne inibiscono la funzione. Inoltre, la proteina proapoptotica Bax mostra un'attività tesa a formare canali nelle membrane lipidiche, che viene bloccata da Bcl-2. Sempre più prove suggeriscono che il bilanciamento del rapporto di queste proteine pro- e anti-apoptotiche è importante per segnalare alla cellula se iniziare o inibire l'apoptosi.

Il complesso meccanismo molecolare dell'apoptosi, che riguarda la trasmissione del segnale e l'attivazione, la regolazione dello stimolo o dell'inibizione, e in ultimo, l'esecuzione, è un processo con una coreografia molto accurata. Perturbazioni di questo processo in una qualsiasi di queste tre fasi possono causare l'esclusione della cellula dalla sequenza apoptotica. Poiché l'apoptosi è una chiave di regolazione del numero di cellule e, quindi, dell'omeostasi del tessuto è facile capire come una disregolazione dell'apoptosi possa causare malattie.

PROGETTO GENOMA UMANO

Una delle sfide scientifiche più eccitanti attualmente in corso riguarda l'identificazione e la mappatura delle sequenze dell'intero genoma umano. Si ritiene che il Progetto Genoma Umano avrà un grande impatto nel campo della medicina, fornendo ai clinici un arsenale senza precedenti di informazioni genetiche che consentirà una migliore comprensione e trattamento di numerose malattie genetiche¹⁴. Ad esempio, il Progetto Genoma Umano ha fornito nuove informazioni circa le variazioni genetiche nella popolazione umana identificando varianti di DNA come singoli polimorfismi nucleotidici, che si verificano una volta ogni

circa 300-500 basi all'interno dei tre bilioni di basi del genoma umano⁶⁹.

Si pensa che i singoli polimorfismi nucleotidici servano come marker genetici per identificare geni malati attraverso studi di *linkage* familiare o grazie alla scoperta di geni coinvolti nelle malattie umane. Questi riscontri possono condurre ad un miglior *screening* e favorire l'aumento di terapie mediche preventive nella speranza di ridurre lo sviluppo di certe malattie in pazienti nei quali siano state riscontrate condizioni predisponenti. Conoscere le sequenze del DNA umano permetterà agli scienziati di meglio conoscere molte malattie. Con nuove informazioni e nuove tecniche per rivelare i misteri della biologia umana, questa conoscenza accelererà in modo drammatico lo sviluppo di nuove strategie per la diagnosi, la prevenzione, e il trattamento della malattia, non soltanto per i disturbi causati da un singolo gene, ma per le più comuni malattie complesse, quali il diabete, le malattie cardiache e il cancro, per le quali le differenze genetiche possono contribuire al rischio di contrarre la malattia e alla risposta a particolari terapie.

Il passaggio dalla genetica alla genomica segna l'evoluzione da una comprensione dei singoli geni e delle loro funzioni individuali ad una comprensione più globale delle azioni di molti geni e del loro controllo sui sistemi biologici. La tecnologia derivata dal lavoro sul Progetto Genoma Umano è disponibile per valutare un gruppo di geni che può cambiare nel tempo o dopo un trattamento (aumentando o diminuendo). Questa tecnologia usa frammenti di DNA noti come "chips" e fornisce uno degli approcci più promettenti per studiare su larga scala le variazioni genetiche, l'espressione genica e per identificare mutazioni. I chips di DNA, detti anche *microarrays*, consistono normalmente in una sottile lastra di vetro o silicene della dimensione circa di un francobollo sulla quale vengono disposte strisce di acidi nucleici sintetici^{28,63}. Migliaia di geni possono essere esaminati su un singolo chip di DNA. Esempi clinici dell'uso dei microarrays sono l'identificazione delle variazioni della sequenza dell'HIV, delle mutazioni del gene p53 nel tessuto mammario e dell'espressione dei geni del citocromo P-450. Inoltre, la tecnologia dei microarray è stata utilizzata per paragonare i genomi di specie diverse, per la ricombinazione genetica, per analisi su larga scala del numero e dell'espressione di copie di geni e per l'espressione delle proteine nei tumori.

Dato che la tecnologia genomica si sta spostando dai laboratori al campo clinico, nuovi metodi renderanno possibile la lettura delle istruzioni contenute nel DNA di una singola persona. Questa conoscenza potrebbe predire future malattie e mettere in allerta i pazienti e i loro curanti per iniziare strategie di prevenzione. Il Progetto Genoma Umano avrà un impatto importante in tutti i campi della medicina clinica. Tutte le discipline chirurgiche saranno direttamente interessate dalle informazioni acquisite da questo progetto. Questa discussione si focalizza sugli esempi dai quali ci si attende gli sviluppi che influenzeranno maggiormente la pratica clinica.

Trapianti

Nonostante i notevoli progressi fatti nei trapianti, nel reperimento degli organi e nell'immunosoppressione, la disponibilità di organi utilizzabili resta un ostacolo significativo. Il livello della domanda di organi e di tessuti non può essere soddisfatto soltanto dalla donazione. Lo xenotrapianto è stato proposto come una possibile soluzione del problema della disponibilità e dell'adeguatezza di organi per i trapianti e numerosi ricercatori hanno valutato la possibilità di usare organi xenotrapiantati. Tuttavia, anche se sono stati riportati successi a breve termine, non ci sono state sopravvivenze a lungo termine usando queste tecniche. I dati ottenuti dal Progetto Genoma Umano potrebbero consentire ai ricercatori nel campo dei trapianti di modificare geneticamente animali per ottenere combinazioni di antigeni umani potenzialmente più specifiche. È stato anticipato che, nel futuro, potrebbero essere sviluppati animali il cui sistema immunitario sia stato modificato per assomigliare in modo più stretto a quello umano, eliminando così la dipendenza dai donatori di organi.

Un'altra possibilità per affrontare il problema della donazione di organi è la loro potenziale clonazione. Con la recente clonazione di ovini e bovini, questo punto ha ricevuto una considerevole attenzione. Anche se il tema della clonazione di un intero animale è affascinante, l'area che offre le maggiori speranze ai pazienti che necessitano di trapianto è il campo in crescente sviluppo della biologia delle cellule staminali. Attraverso l'identificazione di cellule staminali di

interesse, l'informazione ottenuta dal Progetto Genoma Umano potrebbe permettere agli scienziati di sviluppare tecniche di clonazione d'organo che rivoluzioneranno il campo dei trapianti. Queste cellule pluripotenti hanno la capacità di replicarsi senza limite e di dare origine a molti tipi di tessuti differenziati e specializzati. L'identificazione delle cellule staminali e la loro possibile modificazione con una terapia genica potrebbe permettere ai ricercatori di modificare geneticamente i tessuti di loro interesse.

Oncologia

I risultati del Progetto Genoma Umano avranno effetti a lunga scadenza sugli studi diagnostici, sul trattamento e sulla informazione dei pazienti tumorali e dei loro familiari²⁸. Test genetici sono attualmente disponibili per molte patologie, inclusa la malattia di Tay-Sachs e la fibrosi cistica. Sono stati sviluppati nuovi test per scoprire le predisposizioni alla malattia di Alzheimer, al tumore del colon, al tumore della mammella e altre condizioni patologiche. L'identificazione dell'intero genoma umano fornirà un potente strumento senza precedenti per lo screening di gruppi ad alto rischio e della popolazione in generale.

Con l'identificazione di determinati gruppi ad alto rischio per lo sviluppo di tumori, i chirurghi giocheranno un ruolo sempre più importante sia nella valutazione genetica che nella terapia. La chirurgia profilattica potrebbe presto diventare più presente come trattamento di prima linea nella lotta contro il cancro. Ad esempio, la scoperta dell'associazione tra le mutazioni del proto-oncogene *ret* e il carcinoma midollare della tiroide di tipo ereditario, ha permesso ai chirurghi di identificare quei pazienti in cui il tumore midollare della tiroide potrà eventualmente svilupparsi. Lo screening genetico per le mutazioni del proto-oncogene *ret* nei pazienti con la sindrome delle neoplasie endocrine multiple di tipo II permette di effettuare la tiroidectomia profilattica ad uno stadio più precoce della malattia di quanto non permetta lo screening biochimico tradizionale. Altre aree di interesse includono il controllo di pazienti con la poliposi adenomatosa familiare nei quali la tempistica e l'estensione della terapia può essere basata sull'esatta localizzazione delle mutazioni APC. Inoltre, ulteriori esami consentiranno ai ricercatori di meglio determinare altri geni che possono contribuire a questa sindrome. Un altro settore di controversie è quello del trattamento delle pazienti con mutazioni dei geni di suscettibilità per il tumore mammario: BRCA-1 e BRCA-2. Man mano che si renderanno disponibili maggiori informazioni sulle mutazioni di questi geni e sulle implicazioni cliniche di queste mutazioni, verranno modificati di conseguenza i protocolli per la terapia tumorale.

Chirurgia pediatrica e fetale

L'identificazione del genoma umano sarà di aiuto nei test e nello screening diagnostico prenatale. Con l'identificazione di feti ad alto rischio di malattie genetiche il Progetto Genoma Umano aumenterà la ricerca e l'attività nel campo della chirurgia fetale espandendo la conoscenza attuale delle malattie genetiche e il numero di interventi chirurgici fetali, usando non solo le tecniche attuali, ma anche combinando o usando la terapia genica somatica. La manipolazione in utero di difetti genetici identificabili potrebbe in futuro diventare un intervento comune.

NUOVE STRATEGIE TERAPEUTICHE

Terapia genica

La capacità di modificare geni di interesse specifico rappresenta uno strumento potente e stimolante nel potenziale trattamento di un ampio spettro di malattie^{29, 37, 38}. Anziché fornire al paziente un farmaco per curare o controllare i sintomi di una patologia genetica, i medici potrebbero essere in grado di trattare il problema alla base, alterando la situazione genetica delle cellule del paziente. Numerosi metodi sono attualmente disponibili per introdurre nuovo materiale genetico nelle cellule di mammifero. Classicamente sono state considerate due strategie di terapia genica, una delle cellule germinali e una delle cellule somatiche. Nella strategia delle cellule germinali, DNA estraneo viene introdotto nello zigote o nell'embrione precoce con l'aspettativa che il nuovo materiale introdotto contribuisca alla linea

germinale del ricevente e, quindi, venga trasmesso alla generazione successiva. Al contrario, i modelli di terapia genica delle cellule somatiche si fondano sull'introduzione di materiale genetico in cellule che non lo trasmettono successivamente alle cellule germinali.

Un ampio spettro di protocolli di terapia genica per le cellule somatiche, creati per trattare ad esempio, malattie causate da un singolo gene, diverse forme tumorali, o l'infezione da HIV, sono attualmente in via di sviluppo ed alcuni sono già in fase di sperimentazione clinica. Gli obiettivi della terapia genica somatica nell'uomo sono in genere uno dei seguenti: (1) riparare o compensare un gene difettoso, (2) stimolare la risposta immunitaria diretta contro un tumore o un agente patogeno, (3) proteggere da trattamenti come la chemioterapia popolazioni di cellule vulnerabili, o (4) eliminare direttamente le cellule tumorali^{16, 32}.

Numerose patologie causate da un singolo gene sono candidate per la terapia genica e un certo numero di protocolli è stato approntato. Inoltre, il current thinking si è allargato dal trattamento delle patologie causate da un singolo gene fino ad includere il trattamento dell'AIDS e dell'arteriosclerosi usando tecniche di terapia genica. Anche molti protocolli per il trattamento dei tumori sono sottoposti a valutazioni, in particolare per condizioni altrimenti non trattabili. Le strategie includono l'alterazione delle cellule tumorali o di altre cellule dell'ospite al fine di produrre citochine o altre molecole in grado di alterare la risposta dell'ospite alla neoplasia, l'espressione di antigeni sulle cellule tumorali che inducono una risposta immune dell'ospite, l'inserimento di geni oncosoppressori o di sequenze che rallentino la crescita cellulare, e l'introduzione di geni farmaco-resistenti in cellule normali per favorire chemioterapie più aggressive.

Anche se una quantità di esperimenti *in vitro* ha lasciato intravedere grandi promesse, gli attuali *trials in vivo* non sono riusciti a eguagliare i risultati *in vitro*. È stato analizzato un ampio repertorio di vettori basati su virus, con ogni generazione che forniva nuove promesse rispetto a quella precedentemente modificata²⁷. Inizialmente, erano stati usati come vettori i retrovirus, tuttora usati in talune circostanze. Tuttavia, altri potenziali vettori sono costituiti dagli adenovirus, dagli herpes virus, virus vaccinali e altri virus. Sistemi non virali, quali i liposomi, il DNA coniugato a proteine e il DNA coniugato a proteine e a virus difettivi, appaiono anche promettenti³¹. La sicurezza, il miglioramento del rilascio dei geni *in vivo*, l'efficienza e la regolazione genica dopo la trasduzione cellulare sono gli aspetti più difficili che devono essere risolti nella progettazione di un vettore. Sebbene la prospettiva della terapia genica possa apparire eccitante ed attraente, questa tecnica è ancora ad uno stadio sperimentale.

Studio di nuovi farmaci

Una progettazione di farmaci razionale, basata sulle informazioni provenienti dai campi della genomica e della biologia strutturale, può essere ipotizzata per trattare una quantità di malattie⁶. Questa tecnica è stata utilizzata per produrre potenti farmaci, molti dei quali sono già in uso o in fase di studio. Ad esempio, una progettazione razionale fondata sui dati cristallografici ha permesso lo sviluppo di nuove classi di agenti anti HIV diretti contro le proteasi dell'HIV. Una volta che siano state identificate le proteine maggiormente responsabili di una malattia e sia stata compresa la loro funzione anormale, i farmaci possono essere progettati in modo da stimolare, inibire, o sostituire tale funzione.

L'identificazione delle variazioni del genoma umano potrà infine consentire ai clinici di sottoclassificare le malattie e di adattare le terapie in modo che siano più appropriate per ogni singolo paziente¹⁴. Ci potrebbero essere differenze nell'efficacia delle medicine da un paziente a quello successivo e si potrebbero verificare anche reazioni tossiche, che potrebbero essere la conseguenza di fattori dell'ospite geneticamente codificati. Queste osservazioni hanno ampliato il campo della farmacogenomica, che tenta di utilizzare le informazioni che riguardano le variazioni genetiche nei pazienti per prevedere le risposte alle terapie farmacologiche. Oltre ai test genetici, che potranno prevedere la risposta a terapie attualmente disponibili, questi approcci genetici alla prevenzione e alla terapia delle malattie dovrebbero fornire un repertorio sempre maggiore di prodotti genici che verranno usati nello sviluppo di future terapie farmacologiche.

Manipolazione genetica degli anticorpi

Anticorpi monoclonali, diretti contro specifici antigeni, sono stati creati utilizzando tecniche di ibridazione e sono ampiamente usati in diversi campi della medicina, inclusa l'oncologia e i trapianti. Tuttavia, il maggior aspetto negativo sta nel fatto che trattamenti ripetuti usando anticorpi murini causano una risposta immunitaria diretta contro questi anticorpi. Le tecniche di manipolazione genetica hanno permesso la modificazione degli anticorpi monoclonali di topo al fine di ridurre la risposta immune diretta contro di essi dai riceventi umani e di garantire una fonte diversa da quella umana di anticorpi con caratteristiche umane⁴⁵. Questa modificazione riguarda la clonazione dall'mRNA di un ibridoma sia di regioni variabili che di regioni ipervariabili di un anticorpo, e la fusione di queste ultime con una regione costante di provenienza umana, fornendo così dei cloni che possano essere espressi in linee cellulari umane per produrre grandi quantitativi dell'anticorpo modificato. Appare possibile che tecniche come questa in futuro diventeranno più comuni e garantiranno una pronta disponibilità di anticorpi diretti contro un'ampia varietà di antigeni.

IMPLICAZIONI ETICHE, PSICOLOGICHE E LEGALI

Le possibilità di una medicina basata sulla genetica sono infinite e si può predire che questi rapidi progressi modificheranno grandemente gli approcci clinici alle malattie^{14,23}. Varie implicazioni etiche, psicologiche e legali dovranno essere prese in considerazione e affrontate^{20,67}, tra le quali, vanno incluse la proprietà dell'informazione genetica e chi possa avere accesso a questa informazione²⁵, e come si possa correttamente informare sia il paziente che altri membri della sua famiglia sulla base delle informazioni ottenute attraverso i test genetici. Il chirurgo del futuro dovrà partecipare attivamente ed essere a conoscenza di queste tecnologie emergenti perché la gestione di problemi specifici verrà grandemente modificata dalle nuove conoscenze ottenute attraverso l'analisi del genoma umano^{23,41,68}. Sicuramente questi rapidi progressi continueranno a modificare le strategie terapeutiche in corso e a sfidare i dogmi esistenti. I chirurghi hanno l'opportunità di essere dei partecipanti attivi e delle guide in queste ricerche e in questi complessi processi decisionali. I chirurghi, come anche gli internisti, devono cogliere l'occasione o altrimenti essere relegati ad un ruolo marginale lasciando queste complesse decisioni cliniche e etiche ai non clinici.

GLOSSARIO

Aminoacidi: i costituenti delle proteine. Ci sono 20 differenti tipi di aminoacidi usati per l'assemblaggio delle proteine.

Cellula: un sacchettino di molecole in cui avvengono le reazioni chimiche basilari della vita. Tutti gli esseri viventi sono fatti di cellule. Il corpo umano di un adulto è fatto da circa 100 trilioni di cellule.

Centromero: zona addensata di un cromosoma mitotico che mantiene legate le cromatine affini; è anche la parte di DNA su cui si attacca il fuso mitotico.

cDNA: un DNA equivalente a un mRNA sottoposto a *splicing*, creato con una polimerasi chiamata trascrittasi inversa.

Clonazione: un processo di isolamento e preparazione di linee cellulari geneticamente pure. Nella biologia moderna questo termine è anche usato per indicare il processo di isolamento di cellule che contengono una determinata sequenza di DNA ricombinante.

Codice genetico: codice universale basato su triplette e utilizzato dai ribosomi per tradurre un mRNA in una catena peptidica.

Codone: tripletta presente sugli mRNA che viene riconosciuta dai ribosomi. Esistono tre codoni non-senso (che terminano la traduzione) più altri 61 tipi diversi di codone che codificano per ciascuno dei 20 aminoacidi.

Coppia di basi: vedi DNA.

Cromatografia: metodo di separazione delle molecole sulla base delle loro proprietà fisiche e chimiche quali la grandezza o la carica elettrica. Normalmente questo metodo viene usato per sepa-

rare una proteina da una soluzione, come ad esempio quelle ottenute dalle cellule. Colonne cilindriche fatte di vetro, plastica o metallo vengono stipate con una resina le cui proprietà chimiche le permettono di interagire diversamente con le varie proteine presenti in soluzione. Facendo passare nella colonna delle proteine alcune l'attraverseranno completamente mentre altre saranno trattenute dalla resina. Esistono centinaia di resine diverse, ciascuna con proprietà uniche e scegliendo quella appropriata si può isolare una certa proteina da una soluzione. Questo procedimento è altrimenti noto come purificazione delle proteine.

Cromosoma: un pezzo di DNA che può essere lineare o circolare, una cellula umana normale contiene 46 cromosomi.

DNA ricombinante: ibrido di DNA contenente frammenti provenienti da fonti diverse (e.g. umane e batteriche).

DNA: acido desossiribonucleico. È un composto chimico nastriforme presente nelle cellule, il cui compito è di contenere l'informazione genetica. Il DNA è composto da 4 diversi componenti fondamentali. Ciascun componente contiene una base (adenina, guanina, citosina o timina) legata ad uno scheletro composto da zuccheri fosfati, disposti in modo da formare lunghe catene. La sequenza As, Gs Cs, e Ts su un tratto di DNA ha un significato preciso come le lettere che compongono una frase. In natura, il DNA è presente sotto forma di due catene antiparallele legate una all'altra per formare un'elica (la così detta doppia elica). Le sequenze delle due catene sono complementari sulla base dell'accoppiamento tra A, che si lega sempre e solo con T, e C, che si lega sempre e solo a G. Una cellula umana contiene nel suo DNA oltre 3 milioni di coppie di basi.

Doppia elica: vedi DNA.

Enzima di restrizione (o endonucleasi): enzima in grado di tagliare lo scheletro del DNA a livello di una specifica sequenza bersaglio.

Esone: segmento di un gene eucariota costituito da una sequenza di DNA che codifica per un mRNA, che a sua volta viene tradotto in una sequenza aminoacidica. Ogni esone è normalmente adiacente ad un segmento di DNA non codificante chiamato introne.

Fattore di trascrizione: proteine, diverse dalla RNA polimerasi, che sono necessarie per iniziare o regolare la trascrizione.

Gene: segmento di DNA cromosomico che contiene il codice necessario per l'assemblaggio di una molecola (ad esempio una proteina).

Genoma umano: l'insieme dell'informazione genetica contenuta in una cellula umana.

Introne (o sequenza interposta): regione non codificante di un gene eucariota che viene inizialmente trascritto in una molecola di RNA, ma poi eliminato nel corso del processo di *splicing* col quale viene formato un mRNA.

Libreria: raccolta di cloni di DNA ricombinante, ciascuno contenente un ibrido di DNA costituito da un vettore genico associato al tratto di DNA prelevato da un particolare campione di interesse. La libreria raccoglie tutti i cloni contenenti frammenti di DNA presi dal campione in esame.

Ligasi del DNA: enzimi in grado di legare la struttura portante del DNA.

mRNA (RNA messaggero): vedi RNA.

Mutazione: cambiamento nella sequenza nucleotidica di un cromosoma trasmissibile per via ereditaria.

Nucleotide: vedi DNA.

PCR: polymerase Chain Reaction. Metodo per amplificare le sequenze di DNA.

Plasmide: molecola di DNA circolare in grado di replicarsi all'interno di una cellula ospite adatta. Spesso associata allo sviluppo di resistenze agli antibiotici.

Polimerasi: enzimi che assemblano catene di DNA (o di RNA) partendo da nucleotidi, utilizzando stampi preesistenti di DNA o RNA.

Poliptide: lunga catena di aminoacidi. Se ripiegati su se stessi in modo appropriato uno o più polipeptidi possono combinarsi per formare una proteina.

Promotore: sequenza di DNA situata a monte di un gene, che viene riconosciuta dalla RNA polimerasi come sito di inizio della trascrizione.

Proteina: molecola composta da aminoacidi. Le proteine sono i "cavalli da lavoro" dei sistemi viventi, eseguendo o mediando la maggior parte delle funzioni cellulari: catalizzazione delle reazioni chimiche, trasmissione di segnali tra le cellule, protezione verso intrusioni esterne, regolazione di varie funzioni come l'espressione genica, funzioni di impalcatura nell'assemblaggio di vari complessi quali i ribosomi.

Purificazione proteica: vedi Cromatografia.

RNA: acido ribonucleico. Come il DNA, questa lunga catena è costituita da 4 nucleotidi (adenina, guanina, citosina e uracile, ciascuno legato ad uno scheletro di zucchero fosfato) e il suo compito è sia di trasportare il messaggio del DNA ai ribosomi (mRNA), che di svolgere altri compiti strutturali (RNA ribosomiale) e enzimatici (tRNA). L'RNA differisce dal DNA per una delle basi azotate (uracile invece di timina), per lo zucchero che ne costituisce lo scheletro (ribosio invece di desossiribosio) ed è generalmente a catena singola, più corto e spesso con emivita breve.

Resina: vedi Cromatografia.

Ribosomi: una fabbrica di proteine all'interno della cellula: decodificano un mRNA assemblando sulla base delle sue informazioni un nuovo polipeptide.

Splicing: processo per il quale gli introni formano correttamente una nuova molecola di mRNA che viene poi tradotta in proteina.

Telomero: parte finale di un cromosoma, associato ad una caratteristica sequenza di DNA che viene replicata con un procedimento speciale. Contrasta la tendenza del cromosoma ad accorciarsi dopo ogni ciclo di replicazione.

Terminatore: sequenza di DNA che indica alla RNA polimerasi di porre fine alla trascrizione.

Traduzione: processo attraverso il quale i ribosomi decodificano una sequenza di mRNA (il codice genetico universale) in una catena di aminoacidi (i.e. un polipeptide).

Trascrittasi inversa: polimerasi virale in grado di sintetizzare una molecola di DNA usando come stampo una molecola di RNA.

Trascrizione: processo per il quale una molecola di DNA viene usata come stampo per la sintesi di una nuova molecola di RNA complementare.

Vettore: molecola di DNA (e.g. un plasmide o un virus) in grado di replicarsi all'interno di una cellula ospite. Quando viene legato ad un tratto di DNA estraneo (DNA "inserito") il vettore è in grado di riprodurlo indefinitamente.

BIBLIOGRAFIA SELEZIONATA

Alberts B, Bray D, Lewis J, et al (eds): Molecular Biology of the Cell, 3rd ed. New York, Garland 1994.

Questo manuale costituisce per il lettore un ottimo inizio per meglio comprendere i concetti fondamentali della biologia molecolare.

Collins FS: Shattuck Lecture—Medical and societal consequences of the Human Genome Project. N Engl J Med 341:28-37, 1999.

Questo documento, redatto dal leader del Progetto Genoma Umano, valuta i progressi fatti nel completamento di tale progetto e analizza le sue possibili implicazioni future nella prevenzione e nel trattamento delle malattie.

Papacostantinou HT, Ko TC: Cell cycle and apoptosis regulation in GI cancer. In Evers BM (ed): Molecular Mechanisms of Gastrointestinal Cancers. Austin, TX, Landes Bioscience, 1999, pp. 49-78.

Questo capitolo costituisce un'eccellente rassegna per capire meglio la regolazione del ciclo cellulare e dell'apoptosi.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (eds): Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. Plainview, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Questo manuale è un insieme di protocolli di laboratorio, e comprende delle discussioni dettagliate sulla tecnologia del DNA ricombinante.

The Chipping Forecast. Nat Genet 21: Supplement, 1999.

Questo intero supplemento rappresenta per il lettore un ottimo inizio per meglio capire ed apprezzare il potenziale scientifico e l'utilità della tecnologia dei microarrays. Tali tecniche vengono descritte e vengono discusse le loro possibili limitazioni.

BIBLIOGRAFIA

1. Abastado JP: Apoptosis: Function and regulation of cell death. Res Immunol 147:443-456, 1996.
2. Adams JM, Cory S: The Bcl-2 protein family: Arbiters of cell survival. Science 281:1322-1326, 1998.
3. Alberts B, Bray D, Lewis J, et al (eds): Molecular Biology of the Cell, 3rd ed. New York, Garland, 1994.
4. Antonsson B, Martinou JC: The Bcl-2 protein family. Exp Cell Res 256:50-57, 2000.
5. Ashkenazi A, Dixit VM: Death receptors: Signaling and modulation. Science 281:1305-1308, 1998.
6. Bailey DS, Bondar A, Furness LM: Pharmacogenomics—It's not just pharmacogenetics. Curr Opin Biotechnol 9:595-601, 1998.
7. Bazzoni F, Beutler B: The tumor necrosis factor ligand and receptor families. N Engl J Med 334:1717-1725, 1996.
8. Bellamy CO: p53 and apoptosis. Br Med Bull 53:522-538, 1997.
9. Benbow RM: Chromosome structures. Sci Prog 76:425-450, 1992.
10. Birnbaumer L: Receptor-to-effector signaling through G proteins: Roles for beta gamma dimers as well as alpha subunits. Cell 71:1069-1072, 1992.
11. Bratton SB, MacFarlane M, Cain K, Cohen GM: Protein complexes activate distinct caspase cascades in death receptor and stress-reduced apoptosis. Exp Cell Res 256:27-33, 2000.
12. Campbell SL, Khosravi-Far R, Rossman KL, et al: Increasing complexity of Ras signaling. Oncogene 17:1395-1413, 1998.
13. Chao DT, Korsmeyer SJ: BCL-2 family: Regulators of cell death. Annu Rev Immunol 16:395-419, 1998.
14. Collins FS: Shattuck Lecture—Medical and societal consequences of the Human Genome Project. N Engl J Med 341:28-37, 1999.
15. Craig JM, Earnshaw WC, Vagnarelli P: Mammalian centromeres: DNA sequence, protein composition, and role in cell cycle progression. Exp Cell Res 246:249-262, 1999.
16. Crystal RG: In vivo and ex vivo gene therapy strategies to treat tumors using adenovirus gene transfer vectors. Cancer Chemother Pharmacol 43:S90-S99, 1999.
17. Donaldson AD, Blow JJ: The regulation of replication origin activation. Curr Opin Genet Dev 9:62-68, 1999.
18. Elledge SJ, Harper JW: Cdk inhibitors: On the threshold of checkpoints and development. Curr Opin Cell Biol 6:847-852, 1994.
19. Farnham PJ, Slansky JE, Kollmar R: The role of E2F in the mammalian cell cycle. Biochim Biophys Acta 1155:125-131, 1993.
20. Grady C: Ethics and genetic testing. Adv Intern Med 44:389-411, 1999.
21. Heldin CH: Protein tyrosine kinase receptors. Cancer Surv 27:7-24, 1996.
22. Hepler JR, Gilman AG: G proteins. Trends Biochem Sci 17:383-387, 1992.
23. Hernandez A, Evers BM: Functional genomics: Clinical effect and the evolving role of the surgeon. Arch Surg 134:1209-1215, 1999.
24. Hofker MH, Breuer M: Generation of transgenic mice. Methods Mol Biol 110:63-78, 1998.
25. Hudson KL, Rothenberg KH, Andrews LB, et al: Genetic discrimination and health insurance: An urgent need for reform. Science 270:391-393, 1995.
26. Ji TH, Grossmann M, Ji L: G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. J Biol Chem 273:17299-17302, 1998.
27. Jolly D: Viral vector systems for gene therapy. Cancer Gene Ther 1:51-64, 1994.
28. Khan J, Bittner ML, Chen Y, et al: DNA microarray technology: The anticipated impact on the study of human disease. Biochim Biophys Acta 1423:M17-M28, 1999.
29. Kohn DB, Anderson WF, Blaese RM: Gene therapy for genetic diseases. Cancer Invest 7:179-192, 1989.
30. Konopleva M, Zhao S, Xie Z, et al: Apoptosis. Molecules and mechanisms. Adv Exp Med Biol 457:217-236, 1999.
31. Ledley FD: Nonviral gene therapy: The promise of genes as pharmaceutical products. Hum Gene Ther 6:1129-1144, 1995.
32. Lee JH, Klein HG: Cellular gene therapy. Hematol Oncol Clin North Am 9:91-113, 1995.
33. Lew DJ, Kornbluth S: Regulatory roles of cyclin dependent kinase phosphorylation in cell cycle control. Curr Opin Cell Biol 8:795-804, 1996.
34. Lodish HF, Baltimore D, Berk A, et al (eds): Molecular Cell Biology, 3rd ed. New York, Scientific American, 1998.

35. Majzoub JA, Muglia LJ: Knockout mice. *N Engl J Med* 334:904–907, 1996.
36. Malkas LH: DNA replication machinery of the mammalian cell. *J Cell Biochem Suppl* 30–31:18–29, 1998.
37. Meyerson SL, Schwartz LB: Gene therapy as a therapeutic intervention for vascular disease. *Cardiovasc Nurs* 13:91–109, 1999.
38. Moldawer LL, Edwards PD, Josephs M, et al: Application of gene therapy to acute inflammatory diseases. *Shock* 12:83–101, 1999.
39. Morgan DO: Cyclin-dependent kinases: Engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13:261–291, 1997.
40. Morgan DO: Principles of CDK regulation. *Nature* 374:131–134, 1995.
41. Moulton G: Surgeons have critical role in genetic testing decisions, medical, legal experts say. *Natl Cancer Inst* 90:804–805, 1998.
42. Nagata S, Golstein P: The Fas death factor. *Science* 267:1449–1456, 1995.
43. Nigg EA: Cyclin-dependent protein kinases: Key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays* 17:471–480, 1995.
44. Nishizuka Y: Signal transduction: Crosstalk. *Trends Biochem Sci* 17:367–443, 1992.
45. Owens RJ, Young RJ: The genetic engineering of monoclonal antibodies. *J Immunol Methods* 168:149–165, 1994.
46. Parsons JT, Parsons SJ: Src family protein tyrosine kinases: cooperating with growth factor and adhesion signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* 9:187–192, 1997.
47. Pavletich NP: Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: Structures of Cdk, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J Mol Biol* 287:821–828, 1999.
48. Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, et al: p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev* 8:9–22, 1994.
49. Post GR, Brown JH: G protein-coupled receptors and signaling pathways regulating growth responses. *FASEB J* 10:741–749, 1996.
50. Post JC, Ehrlich GD: The impact of the polymerase chain reaction in clinical medicine. *JAMA* 283:1544–1546, 2000.
51. Raff M: Cell suicide for beginners. *Nature* 396:119–122, 1998.
52. Rosenthal N: DNA and the genetic code. *N Engl J Med* 331:39–41, 1994.
53. Rosenthal N: Regulation of gene expression. *N Engl J Med* 331:931–933, 1994.
54. Rosenthal N: Tools of the trade—Recombinant DNA. *N Engl J Med* 331:315–317, 1994.
55. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, et al: Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350–1354, 1985.
56. Sheikh MS, Fornace AJ: Role of p53 family members in apoptosis. *J Cell Physiol* 182:171–181, 2000.
57. Sherr CJ, Roberts JM: CDK inhibitors: Positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13:1501–1512, 1999.
58. Sherr CJ, Roberts JM: Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 9:1149–1163, 1995.
59. Strader CD, Fong TM, Tota MR, et al: Structure and function of G protein-coupled receptors. *Annu Rev Biochem* 63:101–132, 1994.
60. Tamrakar S, Rubin E, Ludlow JW: Role of pRB dephosphorylation in cell cycle regulation. *Front Biosci* 5:D121–D137, 2000.
61. Tang WJ, Gilman AG: Adenylyl cyclases. *Cell* 70:869–872, 1992.
62. Templeton NS: The polymerase chain reaction. History, methods, and applications. *Diagn Mol Pathol* 1:58–72, 1992.
63. The Chipping Forecast. *Nat Genet* 21:Supplement, 1999.
64. Thompson CB: Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267:1456–1462, 1995.
65. Thornberry NA, Lazebnik Y: Caspases: Enemies within. *Science* 281:1312–1316, 1998.
66. Urquidí V, Tarín D, Goodison S: Telomerase in cancer: Clinical applications. *Ann Med* 30:419–430, 1998.
67. Vineis P: Ethical issues in genetic screening for cancer. *Ann Oncol* 8:945–949, 1997.
68. Vogelstein B: Genetic testings for cancer: The surgeon's critical role. *Familial colon cancer. J Am Coll Surg* 188:74–79, 1999.
69. Wang DG, Fan JB, Siao CJ, et al: Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science* 280:1077–1082, 1998.
70. Wang J, Han W, Zborowska E, et al: Reduced expression of transforming growth factor beta type I receptor contributes to the malignancy of human colon carcinoma cells. *J Biol Chem* 271:17366–17371, 1996.
71. Yamamura K: Overview of transgenic and gene knockout mice. *Prog Exp Tumor Res* 35:13–24, 1999.
72. Yang J, Kornbluth S: All aboard the cyclin train: Subcellular trafficking of cyclins and their CDK partners. *Trends Cell Biol* 9:207–210, 1999.