

# Potenzialità della medicina molecolare

Eloisa Arbustini

Centro per le Malattie Genetiche Cardiovascolari, IRCCS Fondazione Policlinico San Matteo, Pavia

(G Ital Cardiol 2006; 7 (Suppl 2-12): 31S-34S)

© 2006 CEPI Srl

Per la corrispondenza:

Dr.ssa Eloisa Arbustini

Centro per le Malattie  
Genetiche Cardiovascolari  
IRCCS Fondazione  
Policlinico  
San Matteo  
Via Forlanini, 16  
27100 Pavia  
E-mail:  
e.arbustini@smatteo.pv.it

Quando si esaminano le possibilità offerte dalla medicina molecolare applicata alla cardiopatia ischemica, è fondamentale che l'attenzione sia rivolta alla clinica e al paziente, in modo da non trasformare l'analisi genetica in un'operazione sterile priva di ricadute concrete o, peggio, in una procedura che finisce per uniformare alle leggi della genetica mendeliana tutto ciò che diviene oggetto di indagine. Nell'ambito della cardiopatia ischemica, il contesto primario in cui dovrebbe muoversi il cardiologo è quello della genetica clinica delle malattie multifattoriali. La malattia coronarica è caratterizzata infatti da due tipi di eventi: un evento raro, cioè l'infarto miocardico o comunque l'episodio ischemico acuto, e un evento estremamente frequente che ne rappresenta il substrato, cioè l'aterosclerosi. Entrambi questi eventi sono di natura multifattoriale e i fattori di rischio ai quali si associano sono in parte condivisi e in parte diversi.

Per l'analisi degli alberi genealogici delle famiglie con cardiopatia ischemica si utilizza la stessa rappresentazione grafica impiegata per le patologie ereditarie; dunque si potrebbe cadere nell'errore di cercare di ricondurre la malattia ai soli principi che governano la trasmissione genetica dei caratteri. Tuttavia, la verità non coincide necessariamente con una delle sue possibili rappresentazioni. La familiarità è certamente uno dei principali fattori di rischio per le sindromi coronariche acute, ma bisogna tenere ben distinti i fattori familiari propriamente detti – cioè quelli legati al patrimonio genetico che l'individuo ha ereditato dai propri genitori – da tutto l'insieme dei fattori familiari di tipo ambientale, legati al fatto che per lunghi anni la persona ha condiviso con la propria famiglia di origine lo stesso ambiente e, verosimilmente, le medesime abitudini di vita. Per esempio,

la gastrite da *Helicobacter pylori* ha una prevalenza elevatissima nei figli delle donne che presentano a loro volta la malattia, ma ciò non significa che si tratti di una patologia ereditaria. Oppure, per rimanere in ambito cardiovascolare, il rischio di aterosclerosi di un individuo allevato da genitori che prediligevano le attività più sedentarie è verosimilmente diverso da quello di un soggetto che è stato educato fin dall'infanzia a praticare regolarmente un'attività fisica appropriata. Lo stesso può dirsi riguardo all'esposizione ai fattori di rischio alimentari, così importanti per la patogenesi della malattia aterosclerotica. In altre parole, i membri della stessa famiglia non condividono soltanto lo stesso retroterra ereditario, ma anche un eterogeneo complesso di fattori di rischio che attengono alla sfera ambientale, comportamentale, educativa, alimentare, ecc., fattori che non devono essere confusi con eventuali tratti genetici. D'altra parte, è vero anche che i singoli componenti di ogni famiglia sono esposti individualmente a condizioni che non coinvolgono, o coinvolgono solo in parte, i loro congiunti più vicini. Per esempio, una persona può essere affetta da ipertensione o da diabete mellito, o può aver cambiato radicalmente le proprie abitudini di vita dopo aver lasciato la casa paterna, o può essere stata esposta al fumo di sigaretta per periodi più lunghi o più brevi rispetto ai suoi fratelli, e così via. In definitiva, all'interno di ogni famiglia, esiste una considerevole quantità di fattori di rischio ai quali i singoli membri sono esposti sia collettivamente sia individualmente, ed è questa combinazione di condizioni diverse, unita al patrimonio genetico che ciascuno porta dentro di sé, a configurare la familiarità per le malattie cardiovascolari. Tra l'altro, è sorprendente rilevare che anche nelle cartelle cliniche dei pazienti (o, ciò che è più grave, nel-

le pubblicazioni che descrivono gli studi clinici) non venga mai indicato se la familiarità parentale per una determinata patologia sia di origine materna o di origine paterna. Studi recenti dimostrano, per esempio, che alcune forme di diabete hanno un notevole imprinting materno<sup>1</sup>. Ciò nonostante, queste informazioni – che in termini genetici sono importantissime – purtroppo vengono trascurate.

Per quanto riguarda le malattie potenzialmente esplorabili con le metodiche di medicina molecolare, un aspetto da tenere in considerazione è che negli ultimi anni il panorama della cardiopatia ischemica acuta si è arricchito di alcune entità patologiche che prima non erano conosciute, e alle quali oggi viene attribuita un'importanza crescente. Una di esse è la cosiddetta *obstructive intramural coronary amyloidosis*, caratterizzata dalla deposizione di proteina amiloide esclusivamente a livello delle ramificazioni coronariche di calibro più piccolo. L'accumulo di amiloide non coinvolge l'interstizio, pertanto non determina una cardiomiopatia restrittiva o una disfunzione diastolica, ma la microvasculopatia che ne deriva è in grado di provocare un'ischemia e una necrosi progressive che decorrono con andamento rapidamente ingravescente, poiché i pazienti giungono all'exitus in media dopo 2 o 3 mesi dall'esordio della sintomatologia. La diagnosi si pone mediante la biopsia miocardica, ma la reale incidenza di questa condizione, che sul piano clinico può essere confusa con una miocardite, non è nota<sup>2</sup>. Un'altra di queste patologie è la sindrome del *ballooning* ventricolare sinistro, che sta cominciando a diventare un modello patogenetico di carattere più generale<sup>3</sup>. Vi è poi la microvasculopatia associata all'ipertensione e al diabete, che contrariamente a ciò che si pensa può produrre anch'essa un'ischemia acuta<sup>4</sup>. Infine, esistono numerose endoteliopatie – il cui esempio paradigmatico è rappresentato dalla malattia di Fabry – che non solo possono provocare microinfarti miocardici in pazienti di 30-40 anni senza altri fattori di rischio per cardiopatia ischemica, ma sono state anche riconosciute come una causa importante di ictus cerebrale nei soggetti della stessa fascia di età, particolarmente nel sesso maschile<sup>5</sup>.

Le popolazioni con cardiopatia ischemica che vengono esaminate mediante le indagini genetiche possono essere di diverso tipo. Innanzitutto vi sono le grandi casistiche familiari seguite progressivamente nel tempo, con o senza la presenza di fattori di rischio associati. Le analisi compiute su queste famiglie sono molto attraenti, ma hanno il limite di fornire informazioni che difficilmente possono essere applicate alla popolazione generale dei pazienti con malattia coronarica. Si tratta, infatti, di gruppi familiari che in qualche modo costituiscono un'eccezione, e come tali non permettono di identificare fattori o elementi che possano essere considerati indicatori di rischio nella globalità della popolazione affetta: i risultati così ottenuti possono servire come riferimento o come modello, ma non sono certamente generalizzabili. In secondo luogo, si possono

esaminare popolazioni omogenee di soggetti affetti, che abitualmente vengono confrontate con gruppi di controllo non affetti. Questa metodologia viene utilizzata nella grandissima maggioranza degli studi genetici sulla cardiopatia ischemica, la massima parte dei quali si riferisce all'analisi di un unico allele di rischio. I risultati degli studi così condotti, tuttavia, vanno interpretati con estrema cautela, perché il riscontro di un'associazione significativa tra un determinato genotipo e la malattia coronarica non può certo spiegare *in toto* il livello di rischio complessivo che si osserva nei confronti di patologie multifattoriali come l'aterosclerosi e le sue complicanze. Un esempio emblematico in questo senso è rappresentato dal caso del gene *MEF2A*, che negli ultimi due anni è stato oggetto di dibattito su autorevoli riviste scientifiche internazionali. Alla fine del 2003, uno studio con analisi di *linkage* aveva dimostrato una correlazione significativa tra una mutazione di questo gene e una forma autosomica dominante di cardiopatia ischemica (adCAD1), inducendo gli autori ad affermare che il *MEF2A* era il gene causale della adCAD1 e ad ipotizzare il suo coinvolgimento anche nella patogenesi della malattia coronarica classica<sup>6</sup>. Poco più di un anno dopo, un altro gruppo di ricercatori ha eseguito lo stesso tipo di analisi su circa 300 pazienti, osservando non solo che il gene *MEF2A* non aveva alcun legame causale con la cardiopatia ischemica, ma che con ogni probabilità esso non era coinvolto neppure nell'insorgenza della adCAD1<sup>7</sup>. È dunque chiaro che, analizzando le famiglie o le popolazioni come se si fosse in presenza di un tratto ereditario monogenico, si corre seriamente il rischio di fraintendere il ruolo dell'espressione di singoli geni nell'insorgenza di malattie la cui origine è chiaramente multifattoriale. Considerazioni analoghe si possono fare anche nei riguardi delle ricerche eseguite con la metodica del *genome-wide screening*: fino a oggi sono stati pubblicati sette studi in cui è stato mappato l'intero genoma per localizzare i geni potenzialmente coinvolti nella cardiopatia ischemica<sup>8-12</sup>, e in base ai loro risultati tali geni sarebbero localizzati ora sul cromosoma 1, ora sul 2, ora sul 3, oppure sul 13, sul 14 (due loci, ma in regioni molto distanti tra loro) o sul 16. Ebbene, è evidente che questi loci non sarebbero così dispersi ed eterogenei, se uno o più dei loro alleli fossero seriamente implicati nella patogenesi dell'infarto. Un tipo di popolazione che dimostra invece grandi potenzialità per la ricerca in ambito genetico è quella rappresentata dagli isolati geografici, cioè dalle collettività che per ragioni geografiche sono rimaste lungamente isolate dalle popolazioni circostanti. In virtù degli elevati tassi di endogamia, dell'attendibilità e ampiezza degli alberi genealogici, della condivisione di un ambiente comune e dell'uniformità dello stile di vita, queste popolazioni peculiari sono estremamente utili per la ricerca dei geni di suscettibilità alle malattie. Uno studio italiano condotto sull'isolato geografico di Talana, in Sardegna, ha consentito per esempio di identificare un nuovo gene correlato con l'iper-

tensione arteriosa<sup>13</sup>, a dimostrazione delle notevoli possibilità offerte da questo tipo di approccio sperimentale.

Dal punto di vista metodologico, la medicina molecolare comprende diverse branche, genomica, trascrittomico, proteomica e metabolomica. La genomica si occupa di tutto ciò che riguarda il DNA, dal *genome-wide screening* alle analisi di *linkage*, agli studi di sequenziamento, ecc. L'interesse della trascrittomica è incentrato invece sull'acido ribonucleico (RNA), cioè sul trascritto dei geni. Questa branca consente di tracciare i cosiddetti profili di espressione, ossia di identificare tutto il complesso dei geni che vengono trascritti in una determinata circostanza, per esempio prima o dopo l'insorgenza di una malattia o la somministrazione di un farmaco o di uno stimolo. La trascrittomica, in altri termini, permette di ottenere una sorta di "impronta digitale" dell'espressione genica, basata sulla caratterizzazione di ogni singolo gene che si trova in fase di trascrizione nel momento considerato. La proteomica e la metabolomica, infine, si occupano rispettivamente delle proteine e di come esse agiscono all'interno delle vie metaboliche alle quali prendono parte. Il sistema più semplice per esaminare i geni consiste nello studio dei cosiddetti polimorfismi di singolo nucleotide (*single nucleotide polymorphism*), cioè delle varianti alleliche che si possono osservare a livello di un determinato locus. Essi sono definiti dalla presenza di una frequenza allelica > 1% per l'allele minore, e generalmente sono biallelici. I metodi per analizzarli sono numerosi: tra i più sensibili vi sono le tecniche automatizzate e la cromatografia liquida ad alte prestazioni in condizioni denaturanti (*denaturing high-performance liquid chromatography*). La tecnologia attualmente disponibile consente di effettuare una scansione completa dell'intero corredo genetico, sia a livello di DNA sia a livello di RNA. Lo studio trascrizionale, per esempio, attraverso l'estrazione dell'RNA permette di identificare in maniera molto rapida tutti i geni che vengono espressi in un determinato momento, fornendo inoltre una misurazione quantitativa estremamente precisa dell'mRNA corrispondente a ciascun singolo gene. Con la reazione polimerasica a catena quantitativa si può eseguire la discriminazione allelica in maniera automatica, identificando i singoli alleli – sia in omozigosi sia in eterozigosi – mediante la coniugazione con fluorocromi differenti. Nell'ambito della malattia coronarica, le tecniche di trascrittomica sono state applicate in diversi contesti. Ad esempio, è stata studiata l'espressione del gene che codifica per l'*hypoxia-inducible factor*, un fattore di trascrizione che media le risposte omeostatiche all'ipossia e che aumenta pochissimi minuti dopo lo sviluppo di un'ischemia acuta. Oppure, è stata osservata l'attivazione del sistema adrenergico e di quello infiammatorio in donne in età postmenopausale che presentavano un *ballooning* ventricolare sinistro. Le metodiche, dunque, sono molteplici. Tuttavia, ancora una volta è necessario sottolineare che, per rendere realmente utili queste indagini ai fini della determinazione

del rischio di cardiopatia ischemica o di infarto, sarebbe necessario esaminare contemporaneamente centinaia di loci potenzialmente correlati al rischio stesso, non uno solo per volta. In altre parole, si dovrebbe ottenere più propriamente un aplotipo, invece del genotipo di un singolo gene, e tutti gli eventuali rischi addizionali legati alle diverse varianti alleliche dovrebbero essere valutati esclusivamente dal punto di vista della loro combinazione complessiva.

Che cosa possiamo attenderci, quindi, dalle informazioni ottenibili con la medicina molecolare? Quali benefici ne possono derivare per la pratica clinica? Sul piano della previsione di malattia, ipotizzare che le conoscenze genetiche e molecolari potranno consentire un giorno di stabilire se una persona con familiarità per cardiopatia ischemica andrà incontro o meno alla stessa patologia è, con ogni probabilità, del tutto irrealistico. La genomica può permetterci verosimilmente di identificare alcuni geni che aumentano la suscettibilità individuale alla malattia coronarica, o anche alcuni geni che contribuiscono al fenotipo globale. Ma ad essa deve essere attribuito un ruolo ben preciso nell'ambito dei numerosi determinanti che caratterizzano le malattie multifattoriali, la cui natura non è soltanto ereditaria, ma anche e soprattutto "ambientale" nel senso più ampio della parola. Un campo che meriterebbe certamente di essere approfondito, e che avrebbe una ricaduta immediata e concreta sulla gestione clinica dei pazienti, è quello della farmacogenetica, cioè dello studio dei geni che influiscono sulla risposta ai farmaci. In futuro, è immaginabile che le informazioni derivanti da queste ricerche ci permetteranno di sviluppare strategie terapeutiche più appropriate alle esigenze specifiche dei singoli individui. Questa maggiore personalizzazione consentirebbe non solo di incrementare l'efficacia del trattamento riducendo nel contempo gli effetti collaterali, ma anche di evitare la somministrazione di terapie inutili e di migliorare l'allocazione delle risorse umane ed economiche, il cui impiego razionale rappresenta una priorità anche nell'ambito della sperimentazione genetica.

## Bibliografia

1. McCann JA, Xu YQ, Frechette R, Guazzarotti L, Polychronakos C. The insulin-like growth factor-II receptor gene is associated with type 1 diabetes: evidence of a maternal effect. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 5700-6.
2. Pasotti M, Agozzino M, Concardi M, Merlini G, Rapezzi C, Arbustini E. Obstructive intramural coronary amyloidosis: a distinct phenotype of cardiac amyloidosis that can cause acute heart failure. *Eur Heart J* 2006, in press.
3. Bybee KA, Kara T, Prasad A, Lerman A, Barsness GW, Wright RS. Systematic review: transient left ventricular apical ballooning: a syndrome that mimics ST-segment elevation myocardial infarction. *Ann Intern Med* 2004; 141: 858-65.
4. Marwick TH. Diabetic heart disease. *Heart* 2006; 92: 296-300.
5. Hughes DA, Mehta AB. Vascular complications of Fabry

- disease: enzyme replacement and other therapies. *Acta Paediatr Suppl* 2005; 94: 28-33.
6. Wang L, Fan C, Topol SE, et al. Mutation of MEF2A in an inherited disorder with features of coronary artery disease. *Science* 2003; 302: 1578-81.
  7. Weng L, Kavaslar N, Ustaszewska A, et al. Lack of MEF2A mutations in coronary artery disease. *J Clin Invest* 2005; 115: 1016-20.
  8. Broeckel U, Hengstenberg C, Mayer B, et al. A comprehensive linkage analysis for myocardial infarction and its related risk factors. *Nat Genet* 2002; 30: 210-4.
  9. Harrap SB, Zammit KS, Wong ZY, et al. Genome-wide linkage analysis of the acute coronary syndrome suggests a locus on chromosome 2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 874-8.
  10. Ozaki K, Tanaka T. Genome-wide association study to identify SNPs conferring risk of myocardial infarction and their functional analyses. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 1804-13.
  11. Lusis AJ, Fogelman AM, Fonarow GC. Genetic basis of atherosclerosis: part I: new genes and pathways. *Circulation* 2004; 110: 1868-73.
  12. Pastinen T, Perola M, Niini P, et al. Array-based multiplex analysis of candidate genes reveals two independent and additive genetic risk factors for myocardial infarction in the Finnish population. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 1453-62.
  13. Angius A, Petretto E, Maestrale GB, et al. A new essential hypertension susceptibility locus on chromosome 2p24-p25, detected by genomewide search. *Am J Hum Genet* 2002; 71: 893-905.