

La Medicina Molecolare e la Medicina di Laboratorio

P. Cappelletti

Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera "S. Maria degli Angeli", Pordenone

L'attenzione della Società Italiana di Medicina di Laboratorio si è rivolta durante il 2003 ai temi della Medicina Molecolare, dedicando i principali incontri societari alla Proteomica (Convegno Interregionale *Biochimica Clinica delle Proteine*, Vicenza 29-30 maggio 2003) e alla Genomica (17° Congresso Nazionale *La Medicina Molecolare: dal Laboratorio al Paziente*, Lamezia Terme 3-5 ottobre 2003).

Le motivazioni di tale scelta sono molteplici e si riferiscono agli aspetti scientifici della rivoluzione molecolare e al suo impatto sulla medicina, alle ricadute in termini di diagnostica e di coinvolgimento della medicina di laboratorio, alle implicazioni etiche, sociali e teoretiche che ad essa conseguono.

Cercherò di seguito, seppur in modo non sistematico, di illustrare alcuni aspetti delle motivazioni alla ricerca dei rapporti tra medicina molecolare e medicina di laboratorio.

La rivoluzione molecolare

Secondo Thomas Kuhn, le rivoluzioni scientifiche consistono in mutamenti della concezione del mondo (1).

Il 2003 è un anno ricco di ricorrenze storiche per la rivoluzione molecolare. Ma due sono quelle fondamentali.

Tutto il mondo ha celebrato il 50° della proposta della struttura a doppia elica del DNA da parte di Jim D Watson e Francis C Crick, pubblicata su *Nature* del 25 aprile 1953 (Watson JD, Crick FHC. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 1953;171:737-8), in grado di spiegare la funzione di codifica, conservazione e replicazione dell'informazione genetica. E sono passati 20 anni dall'invenzione della Polymerase Chain Reaction, tecnica che aprì la strada del sequenziamento rapido del DNA per il suo studio e per l'utilizzo a fini diagnostici, da parte di Kary B Mullis, al quale un venerdì notte dell'aprile 1983 mentre guidava tra le montagne

della California venne l'idea che gli sarebbe valsa il premio Nobel nel 1993 (Mullis KB. The unusual origin of the Polymerase Chain Reaction. *Scientific American* 1990;262:36-43). D'altra parte, l'aprile del 2003 sarà ricordato come il tempo della proclamazione della definitiva mappatura del genoma umano da parte di Robert Waterstone e Francis Collins del *Human Genome Project (HGP)* del *National Human Genome Research Institute (NHGRI)* di Bethesda (2).

Queste scoperte consentono anche di illustrare la storia della biologia molecolare, una disciplina sintesi di un'anima strutturale biochimica e di un'anima genetica, ma debitrice di altre scienze come la fisica e l'informatica, non descrittiva dell'essere vivente in termini molecolari ma costituita dall'insieme delle tecniche e delle scoperte che consentono l'analisi molecolare dell'essere vivente come riserva e trasmettitore d'informazioni (3).

The double helix

La scoperta di Watson e Crick ebbe un impatto enorme sui biologi e sul pubblico. Fu la scoperta della doppia elica e non gli esperimenti di Avery del 1944 o di Hershey e Chase del 1952 a convincere gli scienziati che il DNA è veramente l'elemento strutturale dei geni e la base dell'ereditarietà. Gli storici della scienza si sono chiesti molte volte perché la doppia elica si impose così velocemente, a discapito dei punti oscuri, relativi allo svolgimento dell'elica per la replicazione e al meccanismo stesso della replicazione - l'RNA fu scoperto solo nel 1960 da Jacques Monod e Francis Jacob - e delle numerose incertezze. "Watson e Crick non erano sicuri né della struttura delle basi, né del numero delle catene di polinucleotidi, né dell'interpretazione delle immagini di diffrazione e neppure del ruolo rivestito dal DNA nei fenomeni ereditari"(3). Infatti reagirono negativamente alla immediata lettera di George Gamow sull'importanza della struttura per la definizione di un codice genetico e solo in un secondo articolo nel giugno dello stesso anno (Watson JD,

Crick FHC. Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature* 1953;171:946-7) ripresero il concetto di codice, di corrispondenza tra nucleotidi ed amminoacidi. Alcuni storici scorgono nella immediata accettazione della doppia elica l'influenza del "gruppo del fago" di Max Delbruck e di Salvatore Luria; altri sottolineano che l'assemblaggio di concetti e metodi già conosciuti (l'apporto della fisica quantistica mutuato da Schroedinger, le similitudini logiche e le contestualità storiche dello sviluppo dell'informatica e della biologia molecolare, gli esperimenti di Avery sul principio trasformante e le sue caratteristiche biochimiche e di Hershey sulla genetica batterica, le conoscenze strutturali cristallografiche della scuola britannica) in una struttura nuova, che risolveva molte delle aporie ben presenti nel mondo scientifico, garantiva la riconoscibilità e nel contempo la novità della scoperta; altri ancora puntano sulla bellezza intrinseca della proposta - frutto non di un gruppo di ricerca ma dell'incontro di due personalità straordinarie, dai percorsi scientifici e competenze complementari - avvicinando artista e scienziato (Stent GS. Prematurity and uniqueness in scientific discovery. *Scientific American* 1972;227:84-93).

Anche se la nozione di codice genetico, nel senso che solo l'informazione data dalle molecole di acido nucleico e non la struttura è fondamentale, non era presente negli scopritori, i quali anzi pensavano che la struttura fosse la sola a far comprendere la funzione, la doppia elica sta come pietra angolare nella storia della biologia molecolare, punto di sintesi del lavoro precedente (4), iniziato una dozzina di anni prima con i lavori di G Beadle e E Tatum sulla teoria "un gene - un enzima", e punto di partenza per le successive messe a punto e scoperte della decifrazione del codice genetico, dell'ingegneria genetica, del sequenziamento automatizzato ed infine del *Human Genome Project (HGP)*.

Secondo le teorie di Thomas Kuhn (1), con il codice decifrato e i meccanismi regolativi compresi, la biologia molecolare entra in un periodo di "scienza normale", cioè dove non si discutono i grandi modelli, ma si risolvono rompicapi nel quadro delle teorie già esistenti.

La scoperta della PCR può essere presa a simbolo di questa seconda fase della biologia molecolare. Essa è il frutto di una decina d'anni di ingegneria genetica (insieme di tecniche per lo studio, isolamento, caratterizzazione, modifica, trasferimento di geni a fini di conoscenza di base o applicativi). La ricombinazione genetica è figlia del lavoro integrato dei laboratori di ricerca americani, che aveva da un lato risvegliato i primi impatti morali e sociali (la moratoria di Asilomar) e dall'altro minato il dogma centrale di Watson e Crick. La scoperta di Mullis è considerata una tipica scoperta post-matura - che avrebbe cioè dovuto essere fatta molto tempo prima considerando le conoscenze teoriche e tecniche presenti

(Zuckerman H, Lederberg J. Postmature scientific discovery? *Nature* 1986;324:629-31) - alla luce delle ricerche sulla DNA-polimerasi di Arthur Kornberg del 1955 e le tecniche di sequenziamento messe a punto da Frederik Sanger nel 1977. L'idea sembrò in effetti troppo semplice anche a Mullis, perché nessuno ci avesse pensato prima. Tuttavia, anche se la PCR diventò semplice ed efficace solo con l'uso della Taq polimerasi (polimerasi di *Thermos aquaticus*, batterio termofilo), che non è inibita dal calore utilizzato per separare le catene di DNA dopo la fase di allungamento, questa scoperta riassume le caratteristiche della biologia molecolare: è una tecnica semplice che si serve delle proprietà del vivente - enzimi di replicazione - come strumenti di ricerca; evoca le reazioni nucleari a catena, segnando il rapporto con la fisica e l'informatica: il protocollo consiste in una serie di operazioni ripetitive ed è analogo ai procedimenti della programmazione informatica; anche se da sola non ha aperto nuove possibilità sperimentali, nella pratica ha reso possibili esperimenti fino ad allora inattuabili prodromici degli studi odierni.

Nel momento del trionfo la biologia molecolare riapriva la strada alla medicina molecolare, frutto ancora agli inizi secolo degli studi di Archibald Garrod sull'alcaptonuria e l'errore enzimatico per l'apertura dell'anello tirosinico che ne stava alla base (5). Mentre guidava al chiaro di luna lungo le tortuose strade di montagna della California per raggiungere lo chalet del fine settimana, Mullis, biochimico della Cetus liberato dal compito di produrre oligonucleotidi da utilizzare come sonde dall'avvento dei sintetizzatori automatici, aveva come obiettivo una tecnica diagnostica per determinare l'identità del singolo nucleotide interessato nella malattia genetica monogenica, partendo da un campione minimo di materiale biologico, un obiettivo cioè di diagnostica medica di malattia genetica.

La pubblicazione completa del genoma umano, per sequenziamento di 3.3 bilioni di basi di DNA ad eccezione dei centromeri e di alcune rari segmenti non clonabili, nella primavera del 2003, già preannunciata nei due anni precedenti, da parte del Consorzio Pubblico, può essere vissuto come il momento formale dell'instaurazione di un nuovo paradigma nella medicina, il paradigma genetico - termine che, secondo la concezione di Thomas Kuhn (1) indica quelle conquiste scientifiche universalmente riconosciute che per un certo periodo forniscono un modello di problemi e soluzioni accettabili a coloro che praticano quel campo di ricerca. Ma è anche l'occasione per fare il punto sul reale ruolo dell'informazione genetica nella pratica clinica e del dibattito internazionale sulla validità stessa del paradigma genetico.

L'avvento della medicina genomica

Se per genetica intendiamo lo studio di singoli geni

e dei loro effetti, genomica, un termine coniato 15 anni fa, è lo studio delle funzioni e delle interazioni di tutti i geni nel complesso delle loro interrelazioni. L'obiettivo della genomica è dunque più ambizioso di quello della genetica, perché rivolto alla comprensione globale delle attività geniche implicate nelle malattie comuni, ove interagiscono multipli geni e fattori ambientali e pertanto definite multifattoriali (6). Molto è noto ma molto rimane misterioso. E' definitivamente tramontato il dogma O-GOD (one gene – one protein). Più del 98% del genoma non sappiamo a cosa serve e per la maggior parte è costituito da sequenze ripetitive di vario tipo, che costituiscono molto probabilmente archivi storici di biologia evuzionistica e fonte di controllo delle regioni codificanti. Meno del 2% del genoma umano codifica per proteine e i geni che lo fanno producono mediamente 3 proteine diverse grazie al meccanismo dello *splicing* e ad una serie di fenomeni epigenetici dalla metilazione alle interazioni istoniche, dato che i geni individuati non sono più di 30-35.000 – un numero consistentemente inferiore ad ogni previsione – e le proteine conosciute più di 100.000. Soltanto la metà circa dei geni individuati possiede motivi riconoscibili o pattern di sequenze DNA che ne suggeriscano la possibile funzione. Una complessa congerie di segnali molecolari accendendo/spengono l'attività dei geni nei diversi tessuti a tempi diversi. I geni non sono omogeneamente distribuiti nel genoma: alcuni cromosomi come 17, 19, 22 sono relativamente più densi in geni che altri come 4, 8, 13, 18 e Y. Appartengono ai cromosomi autosomici meno densi quelli per i quali la trisomia è compatibile con la vita. Anche all'interno dei geni vi sono differenze di densità con aree più ricche in C e G piuttosto che in A e T. Come da tempo noto, non tutti i geni sono nucleari: molti geni coinvolti nel metabolismo sono mitocondriali e sono ereditati per via matrilineare. L'identità individuale risiede in circa lo 0.1% del genoma: due umani non imparentati differiscono per circa 3 milioni di basi. Questa variabilità dipende da piccole variazioni di sequenza, in pratica e per lo più sostituzioni di singoli nucleotidi chiamate SNPs (*single-nucleotide polymorphisms*), che si calcola assommino a circa 10 milioni. Non c'è, dunque, il genoma umano, ma esistono una quantità di genotipi e di fenotipi che esprimono la diversità umana; tutti, in ambienti diversi, competono per trasferire copie di se stessi alla generazione successiva.

Si fa strada il concetto che la doppia elica sia una struttura dinamica e che l'assunzione di forme diverse, come il Z-DNA che ruota in senso opposto a quello della classica elica destrorsa o le forme "propeller-like" a livello dei telomeri così simili ai G-quadruplexes prossimi al gene *c-myc*, o la modificazione nel tempo dei rapporti con le proteine nucleari siano legate alla attivazione/spengimento delle attività replicative per esposizione ai fattori di tra-

scrizione o ad altre azioni sui geni regolatori (Pearson H. DNA: beyond the double helix. Nature 2003;421:310-2). Anche la posizione dei cromosomi nel nucleo sarebbe funzionale, con quelli meno densi in geni in posizione periferica "protettiva" e comunque in movimento con attracco nell'eterocromatina nei periodi di non attività. I rapporti spaziali tra cromosomi diversi potrebbero interferire nella attivazione di geni, come suggerisce la particolare prossimità dei cromosomi 12, 14, 15 nelle cellule del linfoma murino (Parada LA, McQueen PG, Munson PJ, Misteli T. Conservation of relative chromosome positioning in normal and cancer cells. Current Biol 2002;12:1692-7).

Mutazioni che causano malattie sono state identificate in circa 1000 geni. Vi sono molti modi di categorizzare le mutazioni, sulla base del meccanismo causale oppure in termini funzionali. Le mutazioni puntiformi, che sono le più comuni, possono essere *missense* (il cambio di una base porta alla codifica di un aminoacido diverso), *nonsense* (la mutazione determina un codone di stop), *frameshift* (la mutazione puntiforme determina uno scivolamento della lettura delle triplette). Funzionalmente le mutazioni possono essere *silenti* (il cambio di base origina lo stesso aminoacido), *conservative* (l'aminoacido originato è diverso, ma la proteina coinvolta non ne è alterata), *non conservative* (la mutazione cambia il fenotipo) vuoi per perdita di funzione (G6PD) che per acquisizione di funzioni tossiche (corea di Huntington). Anche il 98.5% di DNA che non codifica per proteine può essere affetto da mutazioni, che perlopiù non hanno conseguenze sul fenotipo ma che se colpiscono le aree con funzioni regolatorie (mutazioni *regolatorie*) determinano patologie genetiche per perdita di funzione del prodotto finale oppure per inattesa espressione genica in tessuti in cui è normalmente silente o in tempi cellulari non adeguati oppure per la produzione di caratteri nuovi come la resistenza al tipo 1 di HIV per una mutazione frameshift del gene del recettore di una chemochina CCR5.

Nel corso del XX secolo la medicina molecolare ha chiarito le basi teoriche e sperimentali dei cd disordini mendeliani o monogenici, determinata dalla eredità di alterazioni di un singolo gene secondo le leggi di Mendel. L'attuale elenco delle malattie monogeniche e dei test correlati (14.729 entry nell'agosto 2003; erano 12.651 due anni fa) è consultabile nell'OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) al sito <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>. Accanto ai classici meccanismi di trasmissione mendeliana (dominante, recessivo, legato al sesso), ne sono stati scoperti altri quali la ereditarietà mitocondriale, *imprinting*, la disomia uniparentale, *expanding trinucleotide repeats*. Anche se le malattie mendeliane sono rare - le più comuni come l'emocromatosi ereditaria hanno un'incidenza approssimativa di 1/300 ed il carico popolazioneistico è inferiore al 1% -, esse sono state uno strumento irrinunciabile per la com-

preensione della fisiopatologia delle malattie genetiche e delle malattie in senso lato, come può esemplificare lo studio dell'ipercolesterolemia familiare per la fisiopatologia dell'aterosclerosi e per il trattamento con statine.

La transizione in un periodo in cui le conoscenze genetiche divengono critiche per l'effettiva cura della salute dei singoli individui passa per la comprensione del contributo genetico nel determinare le malattie più comuni e complesse come l'ipertensione, il diabete, l'asma e il cancro. Ormai molti geni coinvolti nelle malattie multifattoriali sono stati individuati grazie alla loro alta penetranza, la probabilità cioè di determinare la malattia nel portatore, che può essere correttamente definita. Le mutazioni BRCA1 e 2 per il cancro della mammella e ovario, HNPCC per il cancro del colon, MODY 1, 2, 3 per il diabete tipo II sono gli esempi più noti. Queste mutazioni giustificano peraltro una piccola quota (5%) di casi delle malattie coinvolte. Un effetto molto maggiore hanno le mutazioni genetiche poco penetranti ma molto più prevalenti, anche se la probabilità di malattia nel singolo paziente diviene molto più difficilmente prevedibile, dato il complesso gioco di interazioni tra effetti di geni multipli e fattori ambientali. Gli esempi più discussi sono il rapporto tra fattore V Leiden e rischio trombotico e il rapporto della malattia di Alzheimer con rari ma penetranti difetti genetici delle preseniline 1, 2, 3 e il precursore della β amiloide da un lato e con il poco penetrante ma diffuso allele $\epsilon 4$ dell'apolipoproteina E. Molto ci si attende dalla mappatura dei SNPs che possono avere effetti diretti sull'espressione di patologie ma che più spesso ci si attende siano dei marcatori biologici correlati per "prossimità" ai fattori genetici effettivamente causali. Nelle ricombinazione evolutive si è mantenuto il rapporto fisico tra determinati geni e determinati SNPs che si rapportano secondo il principio del *linkage disequilibrium*. Una estensione dello sforzo di mappatura dei SNPs e della loro correlazione con i fenotipi è la mappatura degli aplotipi, sequenze nucleotidiche lunghe circa 25.000 basi che vengono ereditate in blocco. SNPs e aplotipi saranno la chiave per gli studi associazionistici necessari per identificare i fattori genetici nelle malattie multifattoriali, così come gli studi familiari furono importanti nella identificazione dei geni coinvolti nelle malattie monogeniche.

Will Genetics revolutionize Medicine?

Alla domanda "*The Human Genome Project: what it means for you*" (7), la risposta è "*Genetic information is likely to transform the practice of clinical medicine*" (8). Innanzitutto la nuova genetica consente di costruire una nuova tassonomia delle malattie su base causale e biochimica piuttosto che fenotipica e sintomatologica, per la possibilità di identificare i meccanismi molecolari unici e non ambigui coinvolti nella patogenesi. Tutte le malattie hanno

una componente genetica ed anche le malattie multifattoriali potranno essere suddivise in sottogruppi diversi per motivazione genetica, fisiopatologia, decorso clinico e trattamento. Sarà pertanto possibile una stratificazione su base genomica dei pazienti. Questo è il primo grande effetto pratico: diagnosticare e predire la malattia e la suscettibilità di ammalare. Si tratta di individuare in diagnosi precoce o in valutazione di probabilità incidenza e decorso delle malattie. La variabilità genetica è uno dei "fattori di rischio" insieme a quelli convenzionali che identificano le persone per le quali è opportuno intervenire sui fattori ambientali, anche quando questi appaiono negli ambiti di normalità. La medicina è personalizzata, rivolta programmaticamente non al malato ma all'individuo prima che ammalare: "*moving from a paradigm of diagnosis and treatment to one of prediction and prevention*" (9). Ne consegue una nuova possibilità di intervento sulla malattia che si esplica da un lato nella terapia genica, per ora dai limitati risvolti pratici ma che ha destato molto interesse di ricerca, e dall'altro sul fronte della farmaceutica e della farmacogenomica. Su base genetica saranno prodotti una nuova generazione di farmaci; a fronte di meno di 500 oggi, se ne calcolano diverse migliaia nei prossimi 10 anni. La conoscenza della variabilità genetica individuale potrà predire la risposta individualizzata alle terapie, sulla base delle differenze genetiche di metabolismo, con un drammatico abbattimento degli effetti tossici iatrogeni (oggi in circa il 7% dei pazienti) da un lato e con la preventiva individuazione dei responder/non-responder dall'altro, così importante per i farmaci con pesanti effetti collaterali come nelle terapie antiipertensive, antidepressive o contro l'infezione da HCV, o per la modulazione della posologia come nell'uso della chemioterapia nel cancro.

Ma benché la letteratura scientifica sia pervasa dall'ondata della rivoluzione genomica, le promesse e l'ottimismo non sono universalmente condivisi (10). Se non vi è dubbio che la genetica sia decisiva per le poche malattie mendeliane, forti perplessità vi sono per le comuni malattie multifattoriali, relativamente alla incompleta penetranza dei genotipi in esse coinvolti, alla limitata possibilità di tagliare il trattamento su misura genotipica, alla bassa grandezza del rischio conferito dai genotipi coinvolti nella popolazione in generale. La maggior parte dei genotipi coinvolti nelle malattie multifattoriali comuni sono incompletamente penetranti e la correlazione genotipo-fenotipo è debole, talora casuale o spuria. I genotipi ad alta penetranza rendono conto di meno del 3% dei casi. Per il resto la reale probabilità di ammalare è frutto della eterogeneità allelica e di locus, delle interrelazioni con altri geni non di per sé fattori di rischio, dell'ambiente. I genotipi e i polimorfismi frequenti (almeno 1% nella popolazione) hanno bassa penetranza in età riproduttiva, perché sono stati selezionati per qualche vantaggio appunto di natura

riproduttiva. La scoperta di farmaci adeguati su base genetica è legata alla complessità del contributo genetico alla malattia specifica e si è dimostrata non facile. Dopo 40 anni di conoscenza delle basi molecolari dell'anemia falciforme non è stato individuato un trattamento radicale. La grandezza del rischio di ammalare di una determinata malattia è molto diverso se lo si intende in senso assoluto - incidenza della malattia nella popolazione - o relativo - prodotto della frequenza e della penetranza dei genotipi che conferiscono suscettibilità. Il valore predittivo positivo (VPP) è approssimativamente pari alla penetranza e quindi basso: solo con frequenze dell'1% o inferiori e un rischio relativo elevato (20 o più) il VPP supera il 50%, quando il rischio assoluto nella popolazione è almeno del 5%. Il rischio attribuibile - il numero dei casi di malattie multifattoriali attribuiti ai genotipi conferenti suscettibilità - è piccolo nelle circostanze più comuni: solo se il genotipo ha una frequenza del 10-30% e il rischio relativo è consistente (> 5%), il rischio attribuibile è apprezzabile. In altre parole il sequenziamento del genoma è solo un primo passo di molti necessari per la comprensione della complessità del processo patologico, legato a fattori che conosciamo del tutto imperfettamente: sequenze non codificanti, meccanismi di replicazione, controllo dell'espressione genica, ruolo dei centromeri e telomeri e così via. A ciò va aggiunta la variabilità dei fattori ambientali condizionanti grado, tempo ed espressione del processo patologico. Infine anche le tecniche di identificazione delle mutazioni hanno molte difficoltà, con bassi livelli di specificità e di sensibilità. "Il mantello genetico di cui si veste oggi la medicina non è di seta e di ermellino..."(10).

Il futuro della ricerca genomica

Nell'aprile del 2003, Francis S Collins e i collaboratori del NHGRI hanno pubblicato un importante documento (11), considerando il completamento di HGP una opportunità di guardare avanti e di offrire una *blueprint* per il futuro della ricerca genomica.

La visione è formulata in 3 maggiori temi - i rapporti delle genomica verso la biologia, la salute e la società - e 6 elementi intersecanti: risorse, sviluppo tecnologico, biologia computazionale, addestramento, implicazioni etiche legali e sociali, educazione. Ciascun tema maggiore è articolato in grandi sfide da affrontare. Il primo tema è quello del rapporto genomica-biologia, sintetizzabile nello sforzo di decifrare completamente la struttura e la funzione del genoma. Le principali sfide da affrontare sono: I) identificare e comprendere i componenti strutturali e funzionali codificati dal genoma umano, in relazione alla gran parte di sequenze non codificanti, ai passaggi che connettono struttura e funzione, alla comparazione delle sequenze genomiche di specie diverse lungo la catena evolutiva, alla ridefinizione dei metodi computazionali di predizione strutturale e

funzionale, alla necessità di nuove tecnologie per l'identificazione degli elementi funzionali; II) chiarire l'organizzazione del network genetico e il percorso di formazione delle proteine e il loro contributo nella definizione dei fenotipi cellulari e degli organismi, in riferimento alla complessità delle interrelazioni molecolari strutturali e funzionali che partecipano alla determinazione del prodotto biologico, alla necessità di informazioni a diversi livelli che fotografino in vivo e simultaneamente l'attività dei fattori coinvolti (monitoraggio dei geni espressi e silenti e della loro modulazione; determinazione in tempo reale dell'espressione, localizzazione, modifiche, attività e cinetica delle proteine cellulari), per comprendere l'architettura delle interrelazioni regolatorie a livello genico e i pattern di espressione e di funzione delle singole proteine a livello del prodotto genetico. Ciò consentirà di trasformare la conoscenza di un cumulo di molecole in un sistema biologico funzionale. III) mappatura e comprensione della variabilità ereditaria del genoma umano, sia per SNPs, in parte già identificati, sia per gli aplotipi (*International HapMap Project*), in riferimento alla loro importanza per la comprensione fisiopatologica e i grandi studi di associazioni genetiche; IV) comprendere le variazioni genomiche lungo il processo evolutivo e il meccanismo sottostante; V) promuovere modi di accesso alle informazioni genomiche ad una vasta platea di potenziali utilizzatori sia sul versante della ricerca che su quello clinico. Il secondo tema è quello del rapporto genomica-salute, sintetizzabile nello sforzo di tradurre le conoscenze genomiche in concreti benefici di salute. Le principali sfide sono: I) sviluppare adeguate strategie per identificare il contributo genetico alle malattie e alla risposta terapeutica, in riferimento alla complessità delle interrelazioni di fattori genetici e non, alle difficoltà di studio sia biologico che popolazionistico, alla definizione della mappa aplotipica, allo studio di alleli rari, in quanto l'ipotesi che gli alleli coinvolti nelle malattie multifattoriali siano comuni si è dimostrata non sempre vera; II) identificare le varianti genetiche che contribuiscono alla buona salute e alla resistenza alle malattie, sia nella popolazione generale che nei soggetti a rischio che non sviluppano malattia, dato che l'attenzione è finora stata posta piuttosto sui geni favorevoli o determinanti malattia; III) sviluppare approcci genomici per predire la suscettibilità alle malattie e la risposta ai farmaci, la diagnosi precoce e una tassonomia molecolare delle malattie, in rapporto ad una medicina preventiva individualizzata che peraltro necessita di corrette determinazioni del rischio associato alle varianti genetiche, spesso sovrastimato negli studi iniziali, ridotti costi di genotipizzazione, dimostrazione che le informazioni genetiche personalizzate modifichino realmente i comportamenti di salute, controllo nell'implementazione dei test genetici per assicurarsi che solo quelli con dimostrata validità abbiano ap-

plicazione clinica, adeguata educazione dei professionisti e del pubblico ai contenuti della nuova medicina preventiva; IV) applicare nuovi approcci terapeutici sulla base delle conoscenze genetiche, in rapporto alla produzione sintetica di prodotti genici, alla comprensione dei meccanismi funzionali come per l'attività di imatinib mesilato inibitore della tirosinchinasi di BCR-ABL nella leucemia mieloide cronica, alla produzione di "chemical genomics" individuando nelle librerie delle piccole molecole e delle caratteristiche dei prodotti genici i composti con attività regolatorie nel complesso network genomico; V) investigare sul trasferimento delle informazioni sul rischio genetico nella pratica clinica e sul suo effetto sui comportamenti individuali e sull'organizzazione in termini di outcome e costi, dato che il molto citato obiettivo della genomica di modificare i fattori di salute si riferisce per ora a pochi esemplificazioni. Sono necessarie ricerche per verificare la concretezza del circolo virtuoso "conoscenza individualizzata del rischio – comportamenti individuali e organizzativi conseguenti – miglioramento della salute collettiva – riduzione dei costi globali", ricerche che non possono che essere interdisciplinari e valutare criticamente i nuovi test genetici e gli interventi conseguenti; VI) sviluppare strumenti derivati dalla genomica per migliorare la salute di tutti. Le disparità di salute dipendono grandemente da fattori sociali ed ambientali, ma differenze di frequenza in alleli associati a malattia possono contribuire e la loro conoscenza può essere utile per le strategie della medicina preventiva o pubblica; ciò riveste un'importanza particolare nelle realtà in via di sviluppo. E' peraltro critico il modo di accesso e di utilizzo delle informazioni genetiche. Il terzo tema è quello del rapporto genomica-società, sintetizzabile nello slogan "promuovere l'uso della genomica per massimizzare i benefici e minimizzare i danni". Le principali sfide sono: I) sviluppare una politica per l'uso della genomica in ambiente medico e non, in relazione al grande interesse del pubblico per la genetica ma anche per le sue profonde preoccupazioni per il suo cattivo uso, soprattutto per la potenziale capacità di discriminazione nel lavoro e verso le assicurazioni ma anche in rapporto ai sistemi giudiziario militare educativo e familiare (adozioni). Anche nel mondo medico lo sforzo di definire esattamente la validità clinica dei test genetici si scontra con il proliferare di offerte spesso via web di test non valicati e di trattamenti relativi di valore indefinito. D'altra parte permane una notevole confusione anche negli addetti ai lavori sulle linee guida appropriate, le tecniche da seguire, il rapporto con gli individui e i familiari. E' necessario un grande impegno educativo degli utilizzatori medici e non della genomica e del pubblico per far comprendere la natura e i limiti dell'informazione genetica. II) comprendere la relazione tra genomica, razza ed eticità, in rapporto alla lunga storia di fraintendimenti e

pregiudizi ad esse legata e alla necessità di chiarire il gioco dei fattori storici e geografici che hanno selezionata la frequenza di certi alleli in una determinata popolazione e i limiti dell'identificazione di gruppi su questa base; III) comprendere le conseguenze della scoperta del contributo della genomica ai comportamenti umani, campo di ricerca ancora da dissodare ma con implicazioni di fraintendimenti e discriminazioni assolutamente da evitare; IV) stabilire come definire i limiti etici dell'uso della genomica, in rapporto alla fondamentale controversia tra la libertà della ricerca scientifica e la necessità della società di definire l'uso appropriato e non della genomica. Il NHGRI intende sviluppare le ricerche del suo gruppo *ELSI (Ethical, legal and social implications)*, conscio del differente impatto legato alle differenze individuali, culturali e religiose.

In conclusione, Collins e colleghi (11) sottolineano di aver tentato una sintesi del futuro della ricerca genomica ad ampio spettro, consapevoli della necessità di grandi sforzi di *partnership* e delle implicazioni non solo scientifiche dello sviluppo genomico. I tradizionali confini delle discipline scientifiche sono saltati e la ricerca genomica ha insegnato ad aspettarsi l'inaspettato in ambito scientifico, medico e sociale.

La diagnostica molecolare

Per test genetico si intende "l'analisi di DNA, RNA, cromosomi, proteine e determinati metaboliti umani atti a rivelare genotipi, mutazioni, fenotipi o cariotipi legati a malattie ereditarie per scopi clinici" (12). Molte sono le tecniche disponibili, da quelle ematologiche e biochimiche a quelle cromosomiche e quelle molecolari.

Il termine pertanto comprende tecniche confinate in laboratori ad indirizzo specialistico genetico, come quelle cromosomiche, le nuove tecniche molecolari di riconoscimento di sequenze specifiche di DNA direttamente o per scansione molecolare, di misurazione della quantità di RNA messaggero in una cellula ad un particolare tempo (trascrittomica) e di analisi quantitativa e funzionale del proteoma. Alla proteomica è dedicato un intero numero della Rivista di Medicina di Laboratorio (Riv Med Lab-JLM 2003;1:1-52), che raccoglie gli atti dell'omonimo Convegno tenutosi a Vicenza nel maggio di quest'anno. Le tecniche molecolari per il DNA ben conosciute dal Laboratorio, che le utilizza per lo più nella diagnostica delle malattie oncologiche e in microbiologia per la identificazione degli agenti infettivi e per la prognosi ed il monitoraggio della terapia con i suoi saggi quantitativi, possono essere categorizzare come test di ibridizzazione che si basano sul legame complementare di una sonda oligonucleotidica di sequenza conosciuta con il DNA del paziente e includono le tecniche di *blotting* e i *microarray* e

test di amplificazione che si basano o sull'amplificazione esponenziale del DNA target, come nella originale PCR e nei metodi alternativi o complementari successivamente sviluppati LCR, TMA, NASBA, SDA, Nested PCR oppure sull'amplificazione del segnale, come nella *branched chain DNA* e più recentemente nella *PCR real time* (Nadder TS, Langley MR. The new millenium laboratory: molecular diagnostics goes clinical. Clin Lab Sci 2001;14:252-9). Due intere sessioni del Congresso sono dedicate a questi aspetti (Tecniche Molecolari e Diagnostica Molecolare: Metodologie, Appropriatazza ed Organizzazione).

Particolare interesse destano i *microarray* che rappresentano un concreto esempio della ibridizzazione tecnologica tra biologia ed informatica ed una possibilità di studio su vasta scala dell'espressione simultanea di prodotti genetici, particolarmente utile per la comprensione della base genetica delle malattie complesse. Il potenziale dei *gene chip* risiede nella comparazione del complesso di espressione genetica nei malati verso il normale e nella documentazione delle sue variazioni nel tempo, correlate alla storia naturale della malattia a alla risposta ai trattamenti. Tuttavia molti sono i possibili errori che limitano questa rivoluzionaria tecnologia (13). In primo luogo vi è la definizione di normale, che coinvolge sia la variabilità di sesso, età, etnia, background genetico e stato di malattia del paziente, sia la variabilità del campione relativamente alla distanza dai tessuti malati primariamente o reattivamente (infiammazione), alla localizzazione anatomica all'interno di un particolare organo ed infine allo stato di sviluppo cellulare del tessuto esaminato, dato che il tessuto "normale" rappresenta una situazione dinamica. Ovviamente anche il profilo dell'espressione genetica nella malattia varia con la stessa eterogeneità del normale, cui si aggiungono gli effetti dei sottotipi, gradi e attività della malattia stessa e dei trattamenti. Tuttavia i *microarray* consentono strumenti di identificazione dell'eterogeneità. Un secondo problema è dato dalla eterogeneità della composizione cellulare del tessuto, insieme di cellule a vario grado di maturazione e di attivazione con differenti funzioni e risposte agli stimoli patologici e terapeutici. Nell'infarto del miocardio, i trascritti identificati (Stanton LW, Garrand LJ, Damm D et al. Altered patterns of gene expression in response to myocardial infarction. Circ Res 2000;24:227-35) riferiscono ai miociti in apoptosi e necrosi e a quelli in ipertrofia rigenerativa ma anche alle cellule immunitarie responsabili della risposta infiammatoria e ai fibroblasti produttori il tessuto cicatriziale. Sono state messe a punto tecniche che paiono adeguate a risolvere il problema come l'ibridizzazione in situ di mRNA o la *Laser Capture Microdissection*, ma sono particolarmente delicate. In terzo luogo si pone il problema della comparabilità dei *microarray*. La difficoltà irrisolta per la comparabilità risiede da un la-

to nella fisiologica variabilità dell'espressione genetica che anche per i geni strettamente regolati pare del 20-30% e per quelli meno strettamente regolati, i cd *housekeeping*, di anche di 4 volte, dall'altro nella variabilità analitica (vetrini, volumi, procedure, segnali) e nella mancanza di standard. Emblematico è l'aneddoto sulla incapacità di riprodurre i risultati da parte dello stesso gruppo di ricerca, perché un tecnico trattava i campioni con una centrifuga refrigerata ed un altro con centrifuga a temperatura ambiente (Vastag B. Gene Chips Inc toward the clinic. JAMA 2003;289:2) La normalizzazione dei dati non è codificata e spesso i risultati sono il frutto di un esperimento condotto una volta sola. Il quarto problema è il modo comprensibile e condiviso di comunicare l'immenso volume di dati, che comprende i metodi di analisi dei risultati e la loro organizzazione, presentazione, archiviazione e disponibilità. Infine vi è la necessità di confermare i risultati, data la sensibilità e specificità del metodo: la sensibilità è di circa 10 copie di mRNA per cellula, leggermente inferiore al Northern blot, e gli studi di specificità mostrano una cross-ibridizzazione per trascritti non-target con omologie sequenziali superiori al 75%. I metodi di conferma proposti agiscono a livello RNA, la *real time quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)* e l'analisi Northern blot, o a livello proteico, i tradizionali metodi immunologici con bassa sensibilità e i nuovi metodi proteomici con le loro limitazioni legate al numero immenso e al diverso grado di espressione delle proteine cellulari, alla bassa concentrazione di alcuni target e alla impossibilità di riconoscere le proteine insolubili. Infine possono essere usati studi funzionali in animali transgenici o knockout. Il tema è ben presente ai ricercatori del campo che, nel Phoenix Project, si sono dedicati agli standard di raccolta e preparazione del campione e con il MGED (*Microarray Gene Expression Data group*) hanno definito degli standard di analisi ed interpretazione MIAME (*Minimal Information About a Microarray Experiment*)(14) e un linguaggio informatico comune per conservare e reperire l'immensa quantità di dati (MAGE-ML). In un recente articolo (15), si sottolinea la limitata disponibilità di valutazioni esterne di qualità NEQAS e EMQN per test sul DNA, il livello delle performance rilevate da EMQN - "...overall ...high diagnostic standard...Nevertheless, serious genotyping errors...in some schemes...The error rate (for some tests)...between 18 and 24%." - e le particolari difficoltà associate ai test del DNA per le malattie multifattoriali. Vi sono un elevato numero di variabili coinvolte ma soprattutto non è ben stabilito il rischio allele-specifico e le interazioni gene-gene e gene-ambiente e spesso è arbitraria la definizione della malattia. Nessuno dei test genetici proposti è stato pienamente valutato per la sua utilità clinica e non siamo oggi in grado di condensare linee guida interpretative per i clinici.

La gran parte dei problemi descritti sono ben noti al Laboratorio clinico, che vi si confronta da sempre, così come dal tempo degli analizzatori multicanale si confronta con l'eccitante concetto del *multiple-xing*, "trasmissione simultanea di molti messaggi in un singolo canale di comunicazione" secondo l'Oxford English Dictionary, recentemente riproposto per analisi immunologiche delle isoforme del PSA e della IL-6 (Wiese R, Belosludtsev Y, Powdrill T, Thompson P, Hogan M. Simultaneous multianalyte ELISA performed on a microarray platform. Clin Chem 2001;47:1451-7). Al di là dei problemi tecnici irrisolti, non si può non concordare con Christopher Price: "However, the appropriate choice of analytes, based on careful clinical and economic analyses, will be the most important determinant of the success of this technology" (16).

Hunting the genes for common disorders

La scelta della tecnica da applicare dipende dal problema clinico e dal valore predittivo dei test disponibili. Molto diversi anche gli obiettivi della ricerca, dalla diagnosi genetica nell'adulto o prenatale alla identificazione del rischio personale o familiare. La validità clinica di un test genetico, definita come l'accuratezza con la quale un test predice l'esito clinico, dipende dalla sensibilità del test - numero di persone affette con test positivo - e dalla penetranza della mutazione identificata - proporzione della popolazione affetta che manifesta la malattia correlata. La sensibilità dei test per le malattie genetiche rare migliora continuamente mano a mano che si identificano tutte le mutazioni causali una malattia. Le maggior parte delle malattie genetiche ben definite sono causate da mutazioni ad alta penetranza e quindi i test hanno elevato valore predittivo positivo. Questo dato induce a credere che i test genetici siano altamente predittivi. Viceversa anche in presenza di mutazioni penetranti, il valore predittivo negativo può essere basso se il test non identifica tutte le mutazioni interessate. Sul fronte delle malattie multifattoriali, la nuova frontiera (17), da un lato il più ampio contributo è dovuto a fattori genetici che, seppur comuni, per la loro bassa penetranza conferiscono piccole variazioni di rischio e dall'altro i fattori genetici, anche quando ad alta penetranza, predicono un rischio elevato non una certezza. Ciò pone la questione della specificità dell'intervento e della reale misura del suo effetto, a fronte della sovrastima derivante dai gruppi familiari in cui avviene l'iniziale valutazione. In assenza di possibilità di intervento sul genotipo, la conoscenza della suscettibilità genetica potrebbe portare a discriminazioni sociali senza benefici di salute. I clinici dovrebbero peccare per cautela e seguire una regola di consenso informato accuratamente spiegato. (12)

Il caso dell'emocromatosi, condizione in cui l'eccessivo accumulo di ferro può condurre a complicazioni quali la cirrosi, il diabete, la cardiomiopatia e l'ar-

trite, può essere illustrativo. Due mutazioni del gene HFE, C282Y e H63D promuovono l'accumulo di ferro. C282Y è la mutazione più grave e il genotipo omozigote è presente nella maggioranza dei casi clinicamente penetranti, ma la clinica si manifesta in una piccola quota di portatori. Anche i genotipi C282Y/H63D e H63D/H63D aumentano il rischio di sovraccarico di ferro ma la malattia si sviluppa in meno dell'1% dei portatori. I test del DNA per l'identificazione delle mutazioni del gene HFE rivelano un rischio genetico e solo una serie di fattori ambientali, dalla dieta, all'alcol, ad altre epatotossine, a mutazioni degli altri geni coinvolti nel metabolismo del ferro, determinano il manifestarsi della malattia. Pertanto la condizione clinica di sovraccarico di ferro è molto meglio diagnosticata dai test biochimici. E' ancora oggetto di dibattito se sia utile lo screening di popolazione per individuare il generico rischio genetico di emocromatosi.

L'impatto delle tecniche genetiche molecolari sulla medicina determina una rivisitazione culturale ed organizzativa della diagnostica. Negli Stati Uniti e particolarmente in Inghilterra il dibattito è stato articolato e trasparente, in relazione al ruolo del genetista clinico (Laloo F. Clinical genetics. BMJ 2001;323:S2-7320), ai riflessi economici della diagnostica genomica (Fears R, Roberts D, Poste G. Rational or rationed medicine? The promise of genetics for improved clinical practice. BMJ 2000;320:933-5. - Morgan S, Hurley J, Miller F, Giacomini M. Predictive genetic tests and health system costs. CMAJ 2003;168:989-91.) ed alle implicazioni organizzative generali soprattutto rivolte alla medicina di base (Kinmonth AL, Reinhard J, Bobrow M, Pauker S. Implications for clinical services in Britain and the United States. BMJ 1998;316:767-70). La descrizione dei servizi genetici inglesi (18), organizzati in centri regionali multidisciplinari che servono tra i 2 e i 6 milioni di persone, integrati in una rete nazionale, centrati sull'attività dei genetisti clinici e collegati ai diversi tipi di laboratorio, molecolare citogenetico e biochimico, comprende le competenze rivolte al rapporto con la ricerca scientifica avanzata, alla diagnosi clinica delle malattie genetiche rare, alla diagnosi di laboratorio su DNA e cromosomi, all'interpretazione ed integrazione delle informazioni genetiche complesse, al counselling genetico e alle relazioni a lungo termine con le famiglie con malattie genetiche, ai compiti informativi e di indirizzo delle vie di accesso e dei gruppi coinvolti (portatori e famiglie di malattie monogeniche, cancro familiari, disabilità di apprendimento) ed, infine, alle integrazioni con la medicina di base e specialistica. Per quanto riguarda il futuro, "date le risorse, i centri regionali sono posti a coordinare servizi ed educazione, utilizzando la rete nazionale per particolari consulenze e per lo sviluppo di linee guida. I laboratori di genetica potrebbero continuare ad offrire analisi per le malattie monoge-

niche e, per i disordini rari, contribuire alla rete nazionale e internazionale per i test relativi. Potrebbero prestare la propria consulenza a partnership locali con altri servizi interessati a sistemi ad alta portata per test di farmacogenetica e di screening di popolazione". Questo modello è accettato e supportato dal *Joint Committee on Medical Genetics*, forum a cui partecipano il Department of Health, i maggiori collegi nazionali compreso il Royal College of Pathologists, e la British Society for Human Genetics. A commento dell'articolo, David Ravine e Julian Sampson, genetisti dell'University of Wales, (Ravine D, Sampson J. Commentary: The future development of regional genetic services will rely on partnerships. *BMJ* 2001;322:1952) esprimono il concetto che il modello dei laboratori citogenetici e molecolari regionali, ben funzionante per i disordini facilmente testabili, non è sostenibile per le migliaia di geni coinvolti nelle malattie più rare e perciò è necessario sviluppare e validare l'attuale informale rete nazionale. D'altra parte il diffondersi della richiesta di farmacogenomica e di test per le malattie poligeniche multifattoriali necessita lo sviluppo di partnership rivolte da un lato verso la medicina di base e pubblica e dall'altro verso gli ospedali specialistici e i servizi di patologia. L'aumento dell'accessibilità alle tecniche molecolari forzerà a riesaminare la tradizionale distinzione tra analisi delle mutazioni somatiche e germinali.

Il Libro Bianco britannico sulla genetica

Il 24 giugno del 2003 è stato presentato al Parlamento inglese ed offerto alla pubblica discussione un Libro Bianco del Governo sul potenziamento e la futura organizzazione della genetica nel Regno Unito (19).

Il documento parte dalla orgogliosa riaffermazione del ruolo britannico nella genetica, dalla scoperta della doppia elica al concorso alla mappatura del genoma umano, un terzo del quale è stato sequenziato al *Wellcome Trust Sanger Institute* di Cambridge e alla aspirazione inglese di diventare la "Genome Valley" europea, e dalla valutazione delle prospettive dei prossimi 10 anni per quanto riguarda gli aspetti diagnostici e terapeutici della genomica per definire l'intervento del NHS lungo le linee a) del rafforzamento dei fulcri esistenti dell'organizzazione della genetica e di un programma di modernizzazione dei laboratori genetici, b) della diffusione della genetica in tutte le branche della medicina, c) dell'incentivazione all'educazione e al training, all'informazione e all'*evidence based care*, d) del sostegno alla ricerca, e) infine, della trasparente ed aperta discussione pubblica sui percorsi e sui controlli della genetica. Al di là dello sforzo economico promesso (50 milioni di sterline in 3 anni) e alla particolare attenzione alla modernizzazione delle strutture e all'ampliamento del personale (50 genetisti clinici in 5 anni e 90 *grade A trainee*), ciò che impressiona è

la consapevolezza dell'importanza della genetica e l'entusiasmo nella modernizzazione sviluppata per incontrare le necessità locali. Una radicale ridefinizione dei servizi è necessaria per fronteggiare l'espandersi della diagnostica con i benefici derivanti dalla centralizzazione, dai rapporti più stretti con la patologia clinica o dalla partnership con laboratori privati e per garantire tempi adeguati (3 giorni per l'urgenza, 2 settimane per il rischio in potenziali portatori, 8 settimane per mutazioni sconosciute). La riconfigurazione dei servizi diagnostici genetici parte dai risultati del *Pathology Modernisation Programme* relativi alla centralizzazione dei piccoli servizi o alla loro riorganizzazione più coerente nell'area geografica e al miglioramento della qualità ed efficacia nel supportare le decisioni cliniche e deve rispondere ai quesiti relativi al numero di laboratori genetici per una data popolazione, alla distribuzione del lavoro tra laboratori, al legame o alla fusione tra laboratori genetici e laboratori di patologia che usano diffusamente le tecniche molecolari, al ruolo del settore privato. La diffusione della pratica genetica nelle principali aree della Medicina è sostenuta dal lavoro delle sei reti geografiche per il cancro in connessione con il centro pilota *Macmillan Cancer Relief*, da un programma pilota per l'identificazione di ipercolesterolemia familiare, dalla messa a disposizione di fondi per le proposte di ricerche genetiche nelle aree specialistiche e della medicina di base, dal progetto di offrire diagnostica prenatale e counseling per la sindrome di Down a tutte le donne gravide entro il 2004/5 e dalla richiesta alla *Human Genetics Commission* di valutare, con risposta entro il 2004, la possibilità di screening a tutti i neonati per archiviare il loro profilo genetico ad uso futuro. La diffusione delle conoscenze genetiche è prevista con l'attività di un Centro NHS per l'Educazione e lo Sviluppo della Genetica, che dovrebbe agire da catalizzatore e la cui priorità sono i medici di base, con il sostegno finanziario a visiting fellows e all'arrivo di esperti internazionali, con l'apertura di un portale genetico della *National Electronic Library for Health*, lo sforzo diretto di colloquio con il pubblico attraverso lo strumento telefonico od online *NHS Direct*, lo sviluppo dell'informatica NHS, con il supporto della *evidence based care* tramite il *National Horizon Scanning Centre* e il *National Health Technology Assessment programme* e con gli investimenti per l'addestramento dei committenti in primo luogo i *Primary Care Trust* (PCTs). Il supporto alle nuove conoscenze e alla ricerca viene dallo sviluppo di sei parchi di conoscenze genetiche con obiettivi diversi ma dove esperienze multidisciplinari creino una rete di centri di eccellenza complementari ed in parte sovrapposti, dal sostegno a progetti di ricerca per la farmacogenetica e, quando la tecnologia sarà disponibile, per i *near patient genetic testing*, dallo stimolo alle ricerche per la terapia genica in particolare per la fibrosi cistica, dall'impegno

ad intervenire nella definizione dei diritti della proprietà intellettuale nel settore sanitario. Per rassicurare il pubblico relativamente ai problemi etici sollevati dalla genetica, il Libro Bianco impegna il governo a stabilire un quadro regolatorio robusto e proporzionato, con alcune precise salvaguardie (inaccettabilità dell'uso di test genetici per assicurazioni, bando della clonazione umana, regole per la medicina riproduttiva e trial clinici per la terapia genica) e a garantire una informazione aperta e trasparente riguardo alla politica genetica attraverso la promozione culturale del *Progress Educational Trust* e delle celebrazioni del 50° anniversario della scoperta della doppia elica, tramite la indipendente *Human Genetics Commission*, una legislazione che stabilisca come reato testare il DNA di una persona senza il suo consenso e discriminarla sulla base delle sue caratteristiche genetiche. Il Libro Bianco al punto 1.5 ricorda: *"The values of the NHS are particularly suited to capturing the benefits of genetic advances. The basis of the NHS – universal health care funded from taxation – protects people against discrimination on the basis of genetic information. As genetic testing becomes more widely available, people will not have to fear that they will lose cover for health care. Everyone regardless of their risk is "insured" by the NHS"*.

Medicina molecolare e società

L'impatto della genomica applicata alla pratica clinica si allarga come onda a tutta la società. Lo spazio dedicato a questa problematica dai documenti citati americano e britannico, pur nella diversità dei metodi e degli accenti, è istruttiva di come anche il mondo scientifico cominci ad essere consapevole della sua portata sociale. I temi della bioetica – lo studio dei problemi etici nel campo della biologia e della medicina, inclusi quelli della ricerca biologica e delle sue applicazioni nei trattamenti medici come il trapianto di organi o l'inseminazione artificiale, secondo la definizione del *White paper* – sono oggi largamente dibattuti soprattutto in rapporto alla medicina riproduttiva e alla terapia genetica, con il massimo focus sulla "clonazione". Non è certo qui il luogo per affrontare tale discussione. Tuttavia, anche restando al limitato tema della diagnostica genetica e molecolare molti sono i problemi etici, legali e sociali che da essa derivano. Una lettura del Convegno di Vicenza (Arslan P. Etica nella diagnostica genomica e proteomica. Riv Med Lab-JLM 2003;1:17-21) può servire da viatico. Il tema congressuale – La Medicina Molecolare - ed il suo sottotitolo – Dal Laboratorio al Paziente - si inseriscono perfettamente nella riflessione della SIMeL sul ruolo di Società Scientifica di medici, tradizionalmente votati al compito di consulenti dei propri pari (*doctor of the doctors*), che vede aumentare la necessità di un

compito sociale di informazione corretta dei cittadini, travolti dal sovraccarico di informazioni riguardanti le possibilità diagnostiche e istigati ad una visione soterica della medicina, in piena contraddizione con la storia della scienza e delle idee del ventesimo secolo che è stata la storia del passaggio dalla certezza positivista alla incertezza postmoderna.

The trouble helix

La reazione della gente verso la promessa genomificazione della medicina (e della società) è prevalentemente di preoccupazione e la comprensione della sensibilità popolare non è semplice. Negli Stati Uniti (20), il principale motivo di preoccupazione è il timore della discriminazione relativamente alle assicurazioni ed in particolare alle assicurazioni sanitarie, all'impiego, all'educazione e perfino ai prestiti. Le assicurazioni protestano di dover evitare il rischio che persone con probabilità genetica di morte o inabilità cerchi di ottenere remunerative assicurazioni a premi normali. Alcune imprese hanno già tentato di dimostrare, con esito giudiziario sfavorevole, che inabilità come il tunnel carpale siano dipendenti da una specifica neuropatia ereditaria (peraltro assai rara 3/100.000) piuttosto che dal lavoro. Ma i portatori di difetti ereditari dei canali del calcio affetti da aritmie lipotimiche ricorrenti ed intrattabili possono accedere a qualunque impiego, come guidare un TIR? Il problema è particolarmente difficile con il soggetto asintomatico portatore di una mutazione incompletamente penetrante per lo stesso disordine. Pesanti anche le ripercussioni sul rapporto medico-paziente. A fronte di un risultato positivo di un test genetico che evidenzia una predisposizione familiare, il medico è tenuto ad informare i familiari, con il consenso o meno dell'interessato? La deontologia e le prescrizioni per la confidenzialità direbbero di no, ma le sentenze depongono per il sì. Anche il rapporto con il governo della salute pubblica non è facilmente districabile sia rispetto a chi può chiedere i test genetici, al livello di privacy degli stessi (non è obbligatoria la denuncia di certe malattie infettive e dei possibili effetti di atti violenti?), alla libertà del singolo di sottrarsi a misure preventive o terapeutiche necessarie alla salute collettiva. La conclusione dell'autrice americana (20) è che il concetto di "informazione genetica" è molto diverso se riferito all'intero genoma, ad un disordine monogenico o al risultato di un test molecolare e che la differenza non è chiara alla gente che d'altra parte percepisce l'informazione genetica come assoluta e definitiva: "non è possibile cambiare i propri geni" e "i geni ci dicono tutto sul futuro". Il *White paper* britannico (19), a corollario dell'ampia sezione dedicata al rapporto con la società, cerca di fondare una nuova relazione morale, un "altruismo e solidarietà genetica": *"We all share the same basic human genome, although there are individual variations which distinguish us from other people. Most of our*

genetic characteristics will be present in others. This sharing of our genetic constitution not only gives rise to opportunities to help others but it also highlights our common interest in the fruits of medically-based genetic research" e un nuovo "rispetto della persona": "*Respect for person affirms the equal value, dignity and moral rights of each individual. Each individual is entitled to lead a life in which genetic characteristic will not be the basis of unjust discrimination or unfair or inhuman treatment.*". Da queste dichiarazioni discendono i principi della privacy, del consenso, della confidenzialità e della non-discriminazione. E l'impegno ad uno sforzo di informazione del personale sanitario e del pubblico senza precedenti. Nell'incontro preliminare con la Royal Society, Tony Blair ha dichiarato: "*we need better, stronger, clearer ways of science and people communicating. The danger are in ignorance of each others' point of view; the solution is in understanding them*". Ma probabilmente tutto questo non basta.

Benché vi sia lo sforzo di tradurre in positivo le preoccupazioni popolari rispetto ai problemi etici relativi alle implicazioni per la privacy, la confidenzialità delle informazioni e gli effetti sul lavoro e le assicurazioni individuali, esse emergono prepotentemente e si complicano e rafforzano con il generale atteggiamento popolare rispetto alla genetica, caratterizzato da una generale ambivalenza verso il metodo scientifico, dal sospetto verso lo sviluppo tecnologico, dal rifiuto di ciò che percepito come "non naturale", dall'antipatia per la ricerca con animali ed animali transgenici, dalla percezione della genetica come il luogo del potere farmaceutico e delle multinazionali, delle pratiche discriminatorie, dell'eredità del movimento eugenetico, della convinzione della genetica come icona del determinismo scientifico. Il paradigma genomico è attraversato da immani tensioni tra chi abbraccia la tecnologia e la scienza con fervente entusiasmo e quelli i cui sospetti e preoccupazioni etiche tradiscono una antipatia diretta verso i loro più eclatanti successi (9). In ciò esso è emblematico del rapporto odierno tra la scienza e la società (21).

L'ambivalenza popolare rispetto alla genetica riflette il determinismo e il riduzionismo che hanno caratterizzato la scienza positivista e la biomedicina. Da questo punto di vista la biologia molecolare incarna perfettamente queste convinzioni epistemiche. Essa deriva il suo determinismo dall'incontro con il fisico Erwin Schroedinger che nella conferenza di Dublino del 1943 diceva: "Dando il nome di codice alla fibra cromosomica, intendiamo dire che lo spirito onnisciente concepito un giorno da Laplace, per il quale ogni rapporto causale sarebbe immediatamente decifrabile, potrebbe dedurre all'istante da queste strutture se l'uovo messo in condizione di svilupparsi darà un gallo nero o una gallina pezzata, una mosca o una pianta di mais, un rododendro, uno scarabeo, un

topo o una donna", traduzione in termini di geni e cromosomi della visione meccanicista e deterministica di Cartesio: "Se si conoscessero bene tutte le parti del seme di una particolare specie animale, ad esempio dell'uomo, si potrebbe dedurne, mediante valutazioni interamente matematiche e certe, l'intero aspetto e la conformazione di ciascuno dei suoi membri" (3). Non meraviglia, quindi, che la previsione genetica venga vissuta come assoluta ed immutabile, con le conseguenze del rifiuto al test (solo il 20% dei soggetti che potrebbero essere portatori della mutazione della corea di Huntington si sottopone a test) o al trattamento, considerato inutile. D'altra parte la biologia molecolare è una disciplina percorsa dal riduzionismo ontologico e metodologico. Francisco Ayala (*Thermodynamics, Information and Evolution: the problem of reductionism. Hist Phil Life Sci 1989;11:115-20*) distingue, infatti, il riduzionismo in ontologico, convinzione filosofica che tutto è spiegabile dai livelli inferiori - le interazioni tra molecole; epistemologico, tentativo di unificare l'interpretazione di campi appartenenti a discipline e scienze diverse; e metodologico, convinzione che l'approccio molecolare è il più efficace nello studio dei fenomeni della vita. Nella percezione popolare ciò si tramuta nella semplificazione del complesso intersecarsi dei fattori genetici tra loro (epistasi) e con l'ambiente e nella incomprendenza dei concetti di penetranza e di rischio. Dieci anni fa Cassel (Cassel EJ. *The sorcerer's broom: medicine's rampant technology. Hastings Cent Rep 1993;23:32-9.*) suggeriva che l'infatuazione della medicina per la tecnologia risiede in 5 motivi: la meraviglia e il meraviglioso, la lusinga dell'immediato, valori non ambigui, il superamento dell'incertezza e l'umano desiderio del potere. La biologia molecolare interpreta ancora questi atteggiamenti, senza aver percorso la fase di critica della biomedicina che ha investito la fine del XX secolo. Queste concezioni vengono tramandate ed amplificate dagli annunci trionfali sui successi della genetica e dalla programmatica dichiarazione di curare il sano prima che ammalati.

L'incertezza della medicina molecolare

Sono già stati sottolineati i limiti delle tecniche molecolari relativamente ai canoni essenziali di ogni metodo diagnostico: problemi tecnici di campionamento, analitici, di analisi espressione e comparabilità dei dati; sensibilità e specificità; valore predittivo; controlli di qualità e metodi di conferma; criteri per considerare un test pronto per l'applicazione clinica. Sono state inoltre ricordate le ragioni dell'incertezza diagnostica dei test genetici in particolare per le malattie croniche. L'incertezza si stende intorno a chi svilupperà la malattia, per via della incompleta penetranza che caratterizza le mutazioni coinvolte nelle malattie multifattoriali, nonché alla valutazione corretta del rischio, data la sovrastima inerente alle prime segnalazioni che vengono dedotte

da soggetti selezionati e il bias nella stima dell'evoluzione in soggetti particolarmente sorvegliati dove il ritrovamento di più casi precoci tende a magnificare il rischio apparente. L'incertezza avvolge il tempo giusto per testare, per non causare inutili ansietà ma per avere adeguato spazio di intervento, e richiede la comunicazione della natura della scommessa e il ruolo dei rischi intercorrenti; e i benefici dell'intervento precoce che sono difficili da valutare correttamente anche con studi randomizzati (22). A fronte dell'incertezza della correlazione genotipo-fenotipo e alla possibilità solo in pochi casi di un intervento efficace, la domanda è: chi sottoporre al test, a che età, come definire un test positivo, che può creare pesanti problemi psicologici e sociali, e negativo, con conseguenti non motivate rassicurazioni. Ed infine come definire il confine tra la patologia e la normalità. L'aspirazione ad una reale prevenzione trascina il fenomeno di "abbassamento della soglia", così evidente nelle linee guida che si succedono relativamente al rischio colesterolico, iperglicemico, pressorio, troponinico, eccetera, con il conseguente aumento di falsi positivi – sani sottoposti a terapie – e del numero da trattare – numero di persone da sottoporre a trattamento per avere successo in almeno un caso. La tendenza si manifesta pesantemente per la genomica.

Per una decade il *Human Genome Project* si è dedicato alla definizione dell'intera mappa genetica dell'uomo. L'obiettivo clinico è stato il passaggio da una medicina sul malato, ad una medicina sull'uomo prima che si ammali, per impedirne la malattia. Peraltro la previsione avviene secondo un continuum di probabilità e cioè di incertezza diagnostica e terapeutica(23). I test genetici possono essere catalogati come "diagnostici" se l'analisi genetica conferma la causa di un processo patologico attivo, "prognostici" se in grado di prevedere l'emergere di un problema patologico con un alto grado di probabilità, "predittivi" se individuano una reale predisposizione genetica verso una specifica patologia, "profilattici" se descrivono la presenza di una genetica suscettibilità ad uno specifico stimolo ambientale, "probabilistici" se determinano un rischio generico verso una malattia, "di profilo genetico" se evidenziano una associazione empirica tra una mutazione genetica e una aumentata incidenza di una determinata alterazione patologica. La medicina, clinica e di laboratorio, è interpretazione e comunicazione, ermeneutica della probabilità e dell'incertezza.

Il coinvolgimento emotivo, la mistica della genetica è chiaramente espressa dalla metafora per la ricerca genomica: *the search of the Holy Grail*. La meta è la perfetta comprensione della sequenza di geni che ci determinano. Tutto cominciò nel 1909 quando Wilhelm Johnnsen propose il termine "gene" per definire scientificamente la sostanza di quelli che Mendel nel 1865 aveva chiamato "caratteri ereditari", anche se non aveva la minima idea di come fos-

se costituito. Ma cos'è un gene oggi? Il concetto non è omogeneo per ricercatori diversi: per un genetista classico è l'unità di autotrasferimento secondo le leggi mendeliane, per un'ingegnere genetico è la molecola che ricombina sperimentalmente e può essere inserita in altre cellule, per un biochimico è l'informazione che una cellula richiede per produrre una proteina, per un biologo molecolare è un pezzo di cromosoma che può essere trascritto, per un sociobiologo è la struttura che è esistita per un tempo sufficientemente lungo ed è sufficientemente complessa per servire da base dell'evoluzione, per un teorico è l'idea che ci assiste nel comprendere la vita nel suo svilupparsi. Non si tratta di predisporre un dizionario che consenta la traduzione del concetto da subspecialità a subspecialità. I geni sono un *continuum* informazionale, esistono quando producono e possono non essere localizzati fisicamente. Sotto questo profilo assomigliano agli elettroni nella "indeterminazione" heisenberghiana. Il gene non può più essere visto secondo la logica binaria del principio di non contraddizione e necessita di strumenti quali la *fuzzy logic* di Zadeh: "La nostra abilità di operare definizioni precise ed allo stesso tempo significanti intorno al comportamento di un sistema diminuiranno linearmente con l'aumentare della complessità di quel sistema. Ad una certa soglia, precisione e significatività (rilevanza) diventano spesso proprietà mutuamente escludenti".

L'incremento dell'accuratezza tecnica dell'analisi del materiale genetico ci nega, in apparente paradosso, un preciso concetto di gene. Per comprendere la complessità di un organismo la mappatura dei geni non basta e la intelligenza dei trascritti o il *pattern* dei prodotti (proteine) è molto più istruttiva. Di qui le nuove frontiere, le nuove steli di Rosetta: il trascrittoma, il proteoma, il chinoma... L'indeterminatezza del gene è tale che non si riesce nemmeno a contare esattamente il numero di quelli codificanti. Nel 1994 il numero stimato di geni variava, a seconda del metodo di calcolo utilizzato, dai 20.000 sulla base dei trascritti ai 300.000 sulla base della dimensione media in basi dei geni conosciuti. Nel 2002 i dati pubblicati variano da 27.462 a 153.478. Nel 2003, a sequenziamento completato, sono stimati tra 30 e 35 mila. "I meteorologi e i cartomanti hanno un rischio professionale in comune con chi si occupa di salute: la gente fa gran conto delle loro previsioni, anche se sono notoriamente inaccurate. La maggior parte della inaccuratezza riflette limiti delle tecniche...Ma anche segni certi possono condurre a false previsioni se il loro significato è mal interpretato. E poiché le false previsioni portano ad una apparenza di certezza, esse risultano pericolose per i professionisti e i loro clienti... La medicina è sempre stata diretta ad interpretare segni al fine di aiutare i pazienti per il loro futuro. Però, previsioni precise, affidabili e a lungo termine, relativamente a pazienti singoli, sono sempre state rare. Ci sono pochi processi biologici

così inesorabili da dare una tale certezza, e ancor meno tecniche per rivelare segni sicuri di quei processi nei pazienti”(23).

I successi terapeutici della medicina moderna sono incontestabili e l'elevata percentuale di malattie guarite o cronicizzate non è certo spiegabile unicamente con una migliore qualità materiale della vita o un assopirsi della virulenza di qualche agente patogeno. Odo Marquard sostiene che i vantaggi che la cultura concede all'uomo vengono dapprima accolti con favore, successivamente diventano ovvi, infine si scorge in loro il nemico. Quante più sono le malattie che la medicina vince, tanto più forte la tendenza a dichiarare malattia la medicina stessa. Vi è quasi una sorta di nostalgia del malessere da parte del mondo del benessere. Secondo Paolo Rossi (Rossi P. La nascita della scienza moderna in Europa. Roma-Bari: Gius. Laterza & Figli; 1997), l'ostilità latente o attiva verso la medicina deriva, almeno in parte, dal conflitto tra lo scetticismo sistematico integrante della medicina e quella fiducia incondizionata o quell'aura di sacro che molte istituzioni sociali esigono. I medici non sono certo immuni dall'adesione mitica ad un certo modo di essere della medicina: ai progressi tecnologici si è accompagnata una trionfante sensazione di onnipotenza e di certezza assoluta, la celebrazione della ricerca e delle novità terapeutiche, e la richiesta di fondi per esse, si è ammantata delle stimmate della grazia salvifica. Molti attacchi alla medicina derivano, però, dalla riluttanza ad imparare dalla scienza, riluttanza resa più forte dalla crescente tecnicizzazione e dalla oggettiva difficoltà delle teorie scientifiche ma anche reazione alle filosofie che hanno trasformato i risultati della scienza e della medicina in una vera e propria metafisica, cioè nelle depositarie delle definitive risposte ad ogni possibile problema, autorizzando aspettative eccessive e soteriche. Una riflessione più accorta sui fondamenti della medicina ed un atteggiamento mentale umile e solidale può portare tutti, medici e pazienti, ad accettare la medicina, e la medicina molecolare, come *una tecnica* dei rimedi, che può curare e forse talvolta guarire, non come *il rimedio* assoluto, certo e salvifico (24).

Bibliografia

1. Kuhn TS. The structure of scientific revolutions: Chicago: The University of Chicago. 1962.
2. Medicine and the New Genetics: Human Genome Project Information <http://www.ornl.gov/hgmis/medicine/medicine.html> (accesso 18.8.2003).
3. Morange M. Histoire de la Biologie Moléculaire. Paris: Ed. La Découverte; 1994.
4. Watson JD. The double helix. A personal account of the discovery of the structure of DNA. London: Weidenfeld and Nicolson; 1968.
5. Garrod A. The Inborn Errors of Metabolism. London: H. Harris ed; 1963.
6. Guttmacher AE, Collins FS. Genomic Medicine – A Primer. N Engl J Med 2002;347:1512-20.
7. Lupski JR. The Human Genome Project: what it means for you. http://www.thedoctorwillseeyou-now.com/articles/other/genome_4/index.shtml (accesso 18.8.2003).
8. Bell J. The new genetics in clinical practice. BMJ 1998;316:818-20.
9. Zimmern RL. The human genome project: a false dawn? BMJ 1999;319:1282.
10. Holtzman NA, Marteau TM. Will Genetics Revolutionize Medicine? BMJ 2000;343:141-4.
11. Collins FC, Green ED, Guttmacher AE, Guyer MS. A vision for the future of genomics research. Nature 2003;422:835-47.
12. Burke W. Genetic Testing: N Engl J Med 2002;347:1867-75.
13. King HC, Sinha AA. Gene expression profile analysis by DNA arrays. Promise and pitfalls. JAMA 2001;286:2280-8.
14. Ball CA, Sherlock G, Parkinson H. on behalf of Microarray Gene Expression Data(MGED). A guide to microarray experiments – an open letter to the scientific journals. Lancet 2002;360:1019.
15. Ferns GAA, O'Dowd D, Wark G, Collins N. Molecular diagnostic in routine practice: quality issues and application to complex disease. Ann Clin Biochem 2003;40:309-12.
16. Price CP. Microarrays: the reincarnation of multiple-plexing in Laboratory Medicine, but now more relevant? Clin Chem 2001;47:1345-6.
17. Mathew C. Postgenomic technologies: hunting the genes for common disorders. BMJ 2001;322:1031-4.
18. Donnai D, Elles R. Integrated regional genetic services: current and future provision. BMJ 2001;322:1048-52.
19. Department of Health. Our inheritance, our future – realising the potential of genetics in the NHS. www.doh.gov.uk/genetics/whitepaper.htm (accesso 18.8.2003).
20. Clayton EW. Ethical, legal, and social implications of genomic medicine. N Engl J Med 2003;349:562-9.
21. Marteau TM, Richards M eds. The trouble helix. Cambridge: Cambridge University Press; 1996.
22. Welch HG, Burke W. Uncertainties in genetic testing for chronic disease. JAMA 1998;280:1525-7.
23. Juengst ET. Genetic Diagnostic. In “The Human Genome” EP Fischer and S Klose Ed., Monaco: R Piper & Co; 1995. p. 195-219.
24. Cappelletti P. La certezza della medicina. L'Ippogrifo 2003; Primavera: 24-38.