

# Istituto Lombardo

ACCADEMIA DI SCIENZE E LETTERE

20121 MILANO - Via Borgonuovo, 25

## *Le nuove frontiere della Genetica*

INCONTRI  
CON L'ACCADEMIA



*Incontri con l'Accademia*

*Le nuove frontiere della Genetica*

Abstracts





# Presentazione

L'Istituto Lombardo Accademia di Scienze e Lettere presenta, per il 2007, un ciclo di conferenze, dedicato al tema:

## LE NUOVE FRONTIERE DELLA GENETICA

La genetica ha realizzato sorprendenti progressi negli ultimi decenni: a partire dalla scoperta della struttura del DNA, poco più di cinquanta anni fa, l'accelerazione nella conoscenza del suo funzionamento è stata straordinaria. Siamo ora in grado di leggere le informazioni contenute nel DNA, comprese quelle del genoma umano. Possiamo decifrare gli elementi che compongono le cellule e sappiamo come il DNA si duplica con precisione per riprodurre le varie forme di vita. I campi di sviluppo sono moltissimi e riguardano la migliore conoscenza della funzione svolta dai diversi geni, del ruolo svolto dai geni nella comparsa di alcune malattie, della possibilità di creare farmaci intelligenti e personalizzati.

Possiamo introdurre singoli geni o combinazioni di geni in piante di interesse agronomico per migliorarne le caratteristiche ed aumentarne la produttività, mentre nuove prospettive sono aperte dal miglioramento genetico di microrganismi da utilizzare per la lotta all'inquinamento e per il risanamento ambientale.

L'Istituto Lombardo, con questo ciclo di conferenze al quale hanno dato adesione alcuni tra i più noti ricercatori italiani, intende offrire una panoramica sui risultati recenti della ricerca genetica e sulle possibili applicazioni nei prossimi anni.

**15 marzo 2007**

GIANPIERO SIRONI

Istituto Lombardo Accademia di Scienze e Lettere

Università degli Studi di Milano

*La rivoluzione genetica*

ROBERTO MANTOVANI

Università degli Studi di Milano

*Genomica: passato recente, futuro prossimo*

**29 marzo 2007**

ORSETTA ZUFFARDI

Istituto Lombardo Accademia di Scienze e Lettere

Università degli Studi di Pavia

*Citogenetica molecolare: nuove prospettive  
diagnostiche e di ricerca*

ANTONINO NERI

Università degli Studi di Milano

*Applicazione della genomica clinica all'oncologia*

**12 aprile 2007**

ENRICA GALLI

Istituto Lombardo Accademia di Scienze e Lettere

Università degli Studi di Milano

*Genetica ed evoluzione di microorganismi*

*per la tutela dell'ambiente*

CHIARA TONELLI

Università degli Studi di Milano

*Le piante del futuro*

**17 maggio 2007**

PIER FRANCO PIGNATTI

Università degli Studi di Verona

*Le basi genetiche della risposta ai farmaci*

STEFANO GOVONI

Università degli Studi di Pavia

*Farmacogenetica e individualizzazione della terapia*

**31 maggio 2007**

LUIGI DE CARLI

Istituto Lombardo Accademia di Scienze e Lettere

Università degli Studi di Pavia

*Ricerca genetica e bioetica*

GEROLAMO LANFRANCHI

Università degli Studi di Padova

*Il genoma umano in azione*

**28 giugno 2007**

ELENA CATTANEO - ANGELO POLETTI

Università degli Studi di Milano

*La genetica delle malattie neurodegenerative:*

*dal nervo periferico al cervello*

# GIANPIERO SIRONI

(Istituto Lombardo Accademia di Scienze e Lettere - Università degli Studi di Milano)

## La rivoluzione genetica

Questo primo intervento del ciclo ha un significato introduttivo e si propone di ripercorre alcune tappe dello sviluppo della genetica, anche per fornire un riferimento ai molti temi che saranno trattati, a partire da oggi, negli incontri successivi di questa serie.

La genetica è nata con Mendel, poco dopo la metà dell'800, senza reali connessioni con il resto della ricerca biologica e sostanzialmente incompresa; ha inizialmente riguardato l'analisi del modo in cui i caratteri sono ereditati, sono cioè trasmessi nelle generazioni che si susseguono: infatti la genetica è stata conosciuta per lungo tempo come la scienza dell'eredità. Solo in un secondo momento la genetica ha iniziato ad occuparsi di come i caratteri sono determinati, cioè in sostanza della funzione dei geni e di come questa funzione venga esplicitata.

Un passo fondamentale in questa direzione è naturalmente consistito nella individuazione del DNA come la molecola nella quale è contenuta l'informazione genetica e nella determinazione della struttura a doppia elica del DNA.

La decifrazione del codice genetico, compiuta negli anni '60 del secolo scorso, ha rivelato il modo in cui l'informazione genetica è contenuta nel DNA. Il riscontro della universalità (con eccezioni molto limitate) del codice genetico ha rappresentato un elemento decisivo in favore della comune origine della vita sulla Terra.

La scoperta degli enzimi di restrizione, realizzata negli stessi anni '60, ha reso possibile, nel decennio successivo, ottenere molecole di "DNA ricombinante", unendo insieme tratti di DNA anche di diversa origine ed avviando così un settore di grande rilevanza: le biotecnologie basate sulla utilizzazione del DNA. Per questa via è stata ottenuta, in modo del tutto innovativo, la produzione di un numero crescente di sostanze utili, in particolare in ambito sanitario. Microrganismi geneticamente ingegnerizzati sono altresì utilizzati per fini diversi, quali il disinquinamento o il biorisanamento.

Tecnologie analoghe, applicate a cellule animali e vegetali, hanno consentito di ottenere organismi geneticamente modificati, proseguendo in modo innovativo l'azione di miglioramento delle specie animali e soprattutto vegetali che l'uomo aveva già realizzato nel corso del tempo.

Un ulteriore impulso si è avuto negli anni '80, quando sono stati messi a punto metodi per determinare la sequenza delle basi in molecole di DNA. Si è così avviato il periodo nel quale è stata determinata la sequenza del genoma inizialmente di virus e batteri, poi di microrganismi eucarioti quali il lievito (1996), di piante, animali e, in particolare, dell'uomo.

L'acquisizione di conoscenze relative al mondo degli organismi viventi ha avuto in questi anni una decisa accelerazione, alimentata da un circolo virtuoso in cui nuove tecnologie producevano nuova conoscenza e questa a sua volta consentiva di innovare sul piano delle tecnologie.

Grande rilievo hanno avuto ed hanno le acquisizioni relative alla salute dell'uomo, dalla comprensione e diagnosi, a livello del DNA, di malattie genetiche, alla terapia genica relativa ad alcune di queste malattie, alla individuazione della componente genetica nella determinazione di molte malattie, fino alla relativamente recente ridefinizione dei tumori come alterazioni delle cellule somatiche, determinate geneticamente. E' questa nuova visione che rende fiduciosi circa la possibilità di poter intervenire a breve in maniera causale per la prevenzione e/o terapia dei tumori.

La determinazione della sequenza del genoma dell'uomo e gli studi ad essa correlati, oggetto del successivo intervento di Roberto Mantovani, stanno producendo un deciso balzo in avanti nella conoscenza dell'uomo e della sua evoluzione, destinata verosimilmente ad influire sulla percezione che l'uomo ha di sé, anche nel contesto della natura in cui vive. Si tratta di un evento confrontabile con alcuni altri pochi avvenuti nella storia, quali, ad esempio, l'acquisizione della conoscenza dell'anatomia del corpo umano, che ha visto una sua tappa fondamentale con la pubblicazione dell'opera di Andrea Vesalio, *De umani corporis fabrica*, nel 1543.

# ROBERTO MANTOVANI

(Università degli Studi di Milano)

## Genomica: passato recente, futuro prossimo

Il completamento della sequenza del genoma umano costituisce un punto d'arrivo, una pietra miliare della genetica umana e, contemporaneamente, un punto di partenza scientifica formidabile. In particolare l'integrazione dei dati strutturali con quelli funzionali di espressione dei vari "trascrittomi", possibile grazie a tecniche di "annotazione "bioinformatica", ci permettono di avere un quadro più preciso della struttura e della "strategia" del nostro genoma.

Analizzeremo alcuni dati strutturali emersi, con particolare riferimento a:

- Il numero dei geni. E' inferiore al previsto, ma considerando le notevoli possibilità combinatorie, determinate dalla presenza in molti, forse nella maggioranza, di splicing alternativi, e di promotori multipli per molti geni, questo potenziale può generare una serie di prodotti straordinariamente più complesso.
- La distribuzione dei geni sul DNA, con la presenza di sorprendenti regioni desertiche e di altre densamente popolate.
- La presenza di regioni trascritte, ma non facenti parti delle definizioni classiche di gene, con particolare riferimento agli RNA non codificanti e ai MicroRNA. L'esteso livello di trascrizione dentro e fuori dai geni ci costringe a rivedere alcune definizioni classiche di gene e a includere forse tutti questi nuovi RNA in modelli regolativi ancora poco comprensibili.
- La funzione del genoma, con particolare riferimento agli elementi regolativi della trascrizione. A questo riguardo, sono ora possibili nuovi approcci genomici nello studio sistematico di queste regioni e dell'interazione con le proteine attivatrici -e repressorie- e del loro status cromatinico, come definito dal codice di modificazioni istoniche.
- Accenneremo infine gli elementi di conservazione con altre specie, compresi i primati che rappresentano un'interessante e, in qualche modo, sorprendente livello di omologia.

## ORSETTA ZUFFARDI

Istituto Lombardo Accademia di Scienze e Lettere – Università degli Studi di Pavia

### Le nuove frontiere della citogenetica

E' esperienza frequente del pediatra e, in seconda istanza del genetista clinico di trovarsi di fronte a pazienti con ritardo mentale e facies particolare e non avere idea delle cause della patologia. Quando il fenotipo non è evocativo di una particolare sindrome monogenica il percorso diagnostico impone la richiesta dell'analisi del cariotipo. Se questa risulta negativa il medico pone una serie di ipotesi che comprendono la sindrome autosomica recessiva o la sindrome dominante de novo o, se il paziente è maschio, la sindrome legata all'X. All'atto pratico, i genitori, privi di diagnosi, non solo rimarranno con le angosce di una situazione irrisolta (che cosa ha generato questa patologia? Quale sarà il follow-up di mio figlio?) ma non avranno dati su quale sia il rischio che la patologia si ripresenti nei successivi figli. L'unica possibilità per l'identificazione prenatale della patologia nelle successive gravidanze rimarrà l'ecografia limitata a quei casi in cui il probando presenta malformazioni evidenziabili ecograficamente in epoca prenatale. La conseguenza è spesso un'odissea diagnostica con test ripetuti in diversi laboratori e nuovi test effettuati per escludere le condizioni più disparate. Un'idea di quanto frequente e drammatica sia la situazione sopra menzionata si ottiene considerando che il ritardo mentale ha una frequenza nella popolazione intorno al 2-3% (circa 1% ritardo medio-grave) e che la diagnosi laboratoristica viene effettuata in meno del 50% dei casi. Almeno il 10% dei ritardi medio-gravi è dovuto a uno sbilancio cromosomico per un'anomalia di numero o di struttura. Tuttavia da circa 10 anni è emerso sempre

più chiaramente che l'analisi citogenetica convenzionale è del tutto insufficiente a rilevare anomalie cromosomiche inferiori alle 5-10 Mb che, seppur di dimensioni submicroscopiche, possono associarsi a ritardo mentale e anomalie fenotipiche. Che peraltro questi riarrangiamenti "criptici" esistessero e fossero causa di sindromi malformative risultava ovvio dall'identificazioni di delezioni o duplicazioni ricorrenti in sindromi clinicamente ben definite quali ad es. la sindrome di Williams, Prader/Willi, Angelman, Smith-Magenis, diGeorge/velocardiofacciale, Charcot-Marie Tooth 1A. In questi casi il sospetto clinico viene confermato da un'analisi FISH specifica per il locus deletato o duplicato nelle rispettive sindromi. Ovviamente non è possibile effettuare un'indagine di questo genere se non si conosce il locus associato alla patologia. La dimostrazione, essenzialmente tramite FISH, che sbilanci cromosomici criptici a carico delle regioni distali dei cromosomi sono presenti in circa il 6% dei soggetti con fenotipo "cromosomico" non riconducibile a sindromi note ha ulteriormente evidenziato la necessità di travalicare i limiti della citogenetica classica e di trovare metodiche atte a evidenziare sbilanci lungo tutto il cromosoma. L'introduzione dei microarray genomici ha supplito a questa limitazione: nell'array-CGH in particolare il DNA di controllo miscelato a quello del soggetto con un possibile sbilancio cromosomico viene utilizzato come sonda su vetrini che contengono cloni BAC o PAC o, più recentemente, oligonucleotidi che ricoprono l'intero genoma. In un unico esperimento si possono così rilevare delezioni e duplicazioni tanto piccole quanto è il limite di risoluzione dell'array (definito dalla distanza fra due cloni o oligomeri consecutivi sullo stesso cromosoma) e di definirne con ottima approssimazione i punti di rottura. Questa tecnica peraltro non è in grado di evidenziare riarrangiamenti cromosomici bilanciati quali traslocazioni o inversioni poiché in questi casi non si ha un'alterazione nel numero di copie di una certa porzione di DNA ma solo il suo spostamento dalla regione di origine ad una nuova. Il maggior problema nell'interpretazione degli array genomici è dato dalle cosiddette varianti submicroscopiche strutturali cioè delezioni e duplicazioni che possono avere le stesse dimensioni delle delezioni e duplicazioni criptiche patogenetiche (da circa 1 kb a circa 3 Mb) ma che vengono ereditate in maniera mendeliana senza ovvie conseguenze fenotipiche. E' verosimile che alcune di tali variazioni presenti nella popolazione considerata normale possano predisporre a malattia sia direttamente che in combinazione con altre varianti e fattori "di rischio". Per quel che concerne i pazienti con fenotipo cromosomico e cariotipo normale, l'interpretazione dell'array-CGH deve poter distinguere fra varianti e alterazioni patogenetiche. La consultazione di database dedicati può chiarire se l'alterazione nel numero di copie sia una variante nota ma non è sempre dirimente. Dati sulla frequenza di sbilanci genomici criptici in soggetti con cariotipo normale e fenotipo cromosomico indicano valori intorno al 15%. L'uso di array-CGH a risoluzione sempre maggiore probabilmente aumenterà queste percentuali.



# ANTONINO NERI

(Fondazione IRCCS Policlinico - Università degli Studi di Milano)

## Applicazioni della Genomica Clinica all'Oncologia

La possibilità che il cancro potesse avere una base genetica era già stata postulata nei primi anni del secolo scorso. Nello sviluppo delle nostre conoscenze, accanto all'evidenza dell'origine clonale del tumore è emersa sempre di più quella che esso rappresenti un processo caratterizzato da diverse fasi (multistep process) associate all'accumulo e selezione di alterazioni molecolari a carico di geni che svolgono ruoli importanti nel controllo della crescita, proliferazione e differenziazione cellulare. È stato suggerito che un aspetto importante nella fase iniziale di un tumore sia la presenza di un ambiente cellulare caratterizzato da instabilità genomica per l'alterazione di geni che controllano gli errori di replicazione o di riparo del DNA. In questi ultimi trenta anni, la ricerca di base e la sua traslazione allo studio dei pazienti neoplastici ha permesso di identificare e caratterizzare nei meccanismi molecolari del cancro il ruolo importante degli oncogeni, dei geni tumore soppressori, e dei geni che regolano la morte cellulare programmata (apoptosi), la senescenza cellulare ed i meccanismi coinvolti nei fenomeni di invasione e metastasi. Fino a pochi anni fa, le tecniche di indagine molecolare e funzionale a disposizione per lo studio delle alterazioni genetiche nel cancro erano in grado di analizzare solo un singolo gene o pochi geni alla volta. Nonostante tali limiti, questi approcci hanno comunque permesso di caratterizzare e classificare i diversi tipi di tumore sulla base delle loro caratteristiche biologiche e cliniche ed hanno offerto importanti contributi per una sempre migliore stratificazione prognostica dei pazienti e lo sviluppo di terapie innovative mirate. In questo senso è importante sottolineare la disponibilità già da diversi anni di farmaci che sono in grado di aggredire in modo specifico la cellula maligna. Un esempio per tutti è lo sviluppo di un inibitore specifico (Imatinib mesylate) della proteina aberrante p210 codificata dal gene di fusione BCR-ABL che si ha come conseguenza della traslocazione cromosomica t(9;22) presente nella quasi totalità dei pazienti affetti da Leucemia Mieloide Cronica. La proteina p210 ha un'alterata attività tirosino-chinasica che compromette la normale proliferazione e differenziazione dei precursori ematopoietici. Questo farmaco è in grado di inibire il sito attivo della p210 ed avere un'efficacia terapeutica elevatissima senza particolari effetti collaterali nella cura di questi pazienti per i quali la prognosi era particolarmente infausta. Più recentemente è stato riportato che questo farmaco è in grado di trattare anche pazienti affetti da tumori solidi caratterizzati dall'attivazione di

proteine con attività tirosino-chinasica, aprendo la strada ad altre possibilità terapeutiche. Per questo e per altri farmaci simili sviluppati in questi anni (in particolare quelli contro alcuni sottotipi del cancro della mammella o del polmone) è stata osservata resistenza al trattamento in una certa frazione di pazienti. La futura comprensione dei meccanismi molecolari di resistenza sarà importante per lo sviluppo di nuovi farmaci, alcuni dei quali già utilizzati in protocolli clinici sperimentali. Queste osservazioni ci portano a considerare che la nuova era di trattamenti molecolari specifici verso la lesione neoplastica (molecular-targeted therapy) rappresenti un punto di svolta nella nostra battaglia contro il cancro.

Un ulteriore passo in avanti nella nostra comprensione dei meccanismi molecolari coinvolti nella trasformazione e progressione neoplastica e quindi nell'approccio diagnostico e terapeutico, deriva dai recenti progressi nella caratterizzazione del genoma umano e dallo sviluppo delle nanotecnologie e dei sistemi bioinformatici ad esse collegate. Infatti, oggi è possibile affrontare questi studi attraverso una visione globale del profilo genomico, trascrizionale e proteomico di una popolazione neoplastica con la possibilità sempre più concreta di integrare questi diversi aspetti al fine di comprendere i sistemi biologici nella loro funzionalità reciproca.

Il primo aspetto ad essere particolarmente sviluppato è stato quello del profilo di espressione genica a livello di RNA. Oggi disponiamo di microchips commerciali in cui sono localizzate sonde specifiche per analizzare contemporaneamente circa 50.000 sequenze trascritte e che quindi comprendono la quasi totalità dei geni codificati dal nostro genoma. La tecnica comunque rimane ancora una prerogativa di laboratori di base specialistici ed ha un costo relativamente alto. La prima evidenza che l'analisi globale dell'espressione genica potesse distinguere diversi tipi di tumore nell'ambito di uno stesso tessuto è stata riportata da Golub e colleghi nel 1999 con sistemi ancora limitati nel numero di geni analizzati. Questi autori hanno dimostrato la presenza di geni capaci di predire il tipo di tumore, "class prediction", tra pazienti affetti da leucemia acuta mieloide e linfoblastica. Oltre a discriminare i due tipi di leucemia, questo metodo era in grado di identificare gruppi di geni importanti per predire la risposta dei pazienti alla terapia. Successivamente altri autori hanno dimostrato con approcci simili la marcata eterogeneità di espressione genica in pazienti affetti da linfomi diffusi a grandi cellule B (DLBCL), uno dei più diffusi ed aggressivi linfomi non-Hodgkin, descrivendo due distinte forme di DLBCL che correlavano con la risposta della neoplasia al trattamento. Sempre nell'ambito dei tumori ematologici, un esempio più recente nel quale l'espressione genica globale ha dato un importante contributo è quello del mieloma multiplo, una malattia ancora fatale ed estremamente eterogenea dal punto di vista biologico e clinico. Diversi studi hanno dimostrato la presenza di patterns diversi di espressione genica che correlano con alcune delle alterazioni molecolari più frequenti nella neoplasia. Inoltre questi studi hanno identificato dei sottogruppi di pazienti che anche in assenza di marcatori convenzionali noti, sono associati a un distinto andamento clinico.

Esempi importanti di come l'analisi di espressione genica possa predire meglio il decorso clinico di una neoplasia ci vengono anche dai tumori solidi ed in particolare dal carcinoma della mammella. Infatti, van't Veer e colleghi hanno dimostrato che specifici patterns di espressione (geni coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare, invasione, metastasi ed angiogenesi) possono predire con buona probabilità ed in assenza di altri indicatori, lo sviluppo della metastasi e quindi una prognosi sfavorevole. Su queste basi sperimentali si stanno sviluppando protocolli diagnostici basati sull'espressione genica. In questa prospettiva di traslationalità è evidente la necessità di rendere più semplici e mirati i dati derivati dalle analisi globali con la tecnologia dei microarray. Lo sviluppo di tecnologie che permettono l'analisi contemporanea di ampi pannelli di geni risponde all'esigenza di rendere queste metodologie disponibili ed facilmente accessibili anche ai laboratori diagnostici. Esempi del genere sono i tissue-macro array nei quali è possibile valutare l'espressione proteica con immuno-istochimica su un ampio numero di casi o tecniche di PCR quantitativa per l'analisi anche di centinaia di trascritti genici (mRNA) nello stesso paziente.

Accanto allo sviluppo ed applicazione dell'analisi globale di espressione genica si stanno sviluppando sistemi in grado di analizzare nella sua totalità il DNA genomico, grazie alla presenza di variazioni di singoli nucleotidi denominati single nucleotide polymorphism (SNP) e presenti circa ogni 300 basi del DNA (quindi circa 10 milioni su 3 miliardi di nucleotidi del nostro genoma). Microchips commerciali che contengono sequenze di circa 500.000 SNPs sono già disponibili e, cosa molto importante, la loro analisi è possibile con gli stessi strumenti utilizzati per i microchips di espressione. I microarray SNPs permettono sia lo studio del numero di copie di DNA di una regione genomica o del singolo gene sia la valutazione della perdita di eterozigotità (LOH) che comporta l'assenza di uno dei due alleli presenti normalmente in ogni copia di genoma umano. Queste informazioni, oltre che utilissime nell'ambito delle malattie genetiche, sono importanti per lo studio dei tumori sia da un punto di vista classificativo sia per la identificazione di nuovi potenziali geni critici per lo sviluppo e progressione neoplastica. Al momento sono ancora necessari degli sforzi soprattutto di natura bioinformatica per meglio sfruttare le informazioni ottenute dai microarray SNPs. Infatti, sebbene si disponga di algoritmi per l'analisi in un singolo paziente, non abbiamo ancora a disposizione dei sistemi consolidati per l'analisi globale su intere casistiche di pazienti come invece è ormai acquisito per l'analisi di espressione.

Un altro aspetto importante che si sta imponendo nella ricerca sul cancro per le sue implicazioni nei meccanismi della malattia è quello che riguarda i microRNAs (miRNAs). Si tratta di piccole molecole di RNA a singola elica non codificanti e molto conservati nell'evoluzione, in grado di regolare l'espressione genica sia livello trascrizionale che, in particolare nell'uomo, a livello post-trascrizionale. Il numero degli miRNA conosciuti è in continuo aumento grazie anche alla nostra conoscenza dell'intera sequenza del genoma umano ed a sistemi bioinformatici che sono in grado di predire la loro presenza sulla base delle strutture già conosciute. E' opinione sempre più diffusa che

queste molecole siano in grado di controllare l'espressione della quasi totalità dei geni umani. L'importanza del loro ruolo nella dinamica del cancro è fortemente suggerita dal fatto che molti miRNA sono localizzati in regioni genomiche che vengono perse o amplificate nei tumori. Diversi sono già gli esempi di coinvolgimento dei miRNA in tumori umani; uno dei primi quello relativo alla leucemia linfatica cronica studiato dal gruppo del Professore Carlo Croce. Purtroppo non sono ancora disponibili dei microarray commerciali per lo studio del profilo di espressione dei miRNA; la loro disponibilità nel prossimo futuro permetterà di disporre di un altro importante strumento per la comprensione dei meccanismi tumorali.

Da quanto detto sopra, emerge già la possibilità di avere una visione integrata (profili di espressione genica, espressione di miRNA e profilo genomico tramite SNPs) di alcuni importanti meccanismi molecolari del cancro. Lo sviluppo di sistemi di analisi proteomica, ancora in fase molto sperimentale, permetterà insieme a quanto già oggi disponibile di ottenere importanti progressi nell'applicazione della genomica clinica all'oncologia.

ENRICA GALLI

(Istituto Lombardo Accademia di Scienze e Lettere – Università degli Studi di Milano)

Genetica ed evoluzione di microrganismi  
per la tutela dell'ambiente

I microrganismi sono le forme viventi più versatili ed adattabili presenti sulla terra da circa tre miliardi e mezzo di anni. Per i primi due miliardi di anni della loro esistenza hanno governato la biosfera, colonizzando qualsiasi nicchia ecologica, anche la più estrema. In questo lunghissimo arco di tempo essi hanno evoluto una serie di funzioni, tra le quali lo sviluppo delle principali vie metaboliche caratteristiche di tutti gli attuali organismi viventi, l'adattamento ad ogni cambiamento ambientale attraverso la selezione di nuove attività metaboliche, la creazione di un ambiente favorevole alle più complesse ed evolute forme di vita.

I microrganismi sono caratterizzati da un'ampia diffusione nell'ambiente, in particolare nel suolo e nelle acque, anche in associazione con piante ed animali. Grazie alla loro abbondanza, ubiquità, biodiversità e versatilità essi giocano un ruolo primario e essenziale nel ciclo della materia, attraverso la trasformazione di materiale organico di origine vegetale e animale, ma anche di composti responsabili della contaminazione ambientale.

La biodiversità del mondo microbico è altrettanto importante di quella del mondo vegetale ed animale e va tutelata perché "it is essential for a healthy Earth".

Negli ultimi 50 anni si è verificata una continua e crescente immissione nell'ambiente di composti derivanti da processi industriali e destinati a varie attività industriali, agricole ed umane; ciò ha determinato rilevanti problemi ecotossicologici con gravi conseguenze per la salute dell'uomo e più in generale di tutti gli organismi viventi.

Proprio per la loro enorme capacità di adattamento e per la loro versatilità metabolica, frutto dell'evoluzione continua di nuove vie metaboliche, i microrganismi rappresentano da sempre una risorsa fondamentale per la tutela e la protezione dell'ambiente.

In particolare le ricerche sempre più avanzate a livello biochimico e genetico molecolare sui microrganismi, fino alle più recenti conoscenze sul genoma di numerose specie microbiche, hanno consentito non solo di conoscere meglio il ruolo dei microrganismi in natura, ma anche di sviluppare processi biotecnologici per rispondere ad alcune sfide legate alla contaminazione da sostanze xenobiotiche e all'uso di pesticidi chimici. Tra questi meritano particolare attenzione i processi di biorisanamento di aree contaminate, i processi di biocatalisi a ridotto impatto ambientale, la prevenzione della contaminazione ambientale mediante l'uso di biopesticidi ecocompatibili e biofertilizzanti.

Diversi meccanismi genetici, tra cui sicuramente l'organizzazione modulare dei geni coinvolti nei processi metabolici e la loro prevalente localizzazione su elementi genetici mobili, quali plasmidi e trasposoni, ha consentito e facilitato la rapida evoluzione e diffusione di microrganismi in grado di sviluppare nuove capacità degradative in risposta alle modificazioni ambientali. L'esempio più significativo è quello degli operoni catabolici che controllano la degradazione degli idrocarburi aromatici; mettendo a confronto gli operoni di diverse vie cataboliche si possono evidenziare le

funzioni altamente conservate e quelle che hanno portato all'evoluzione di nuovi percorsi metabolici.

Da queste analisi genetiche e funzionali si sono potuti individuare geni codificanti per sistemi enzimatici di particolare interesse per lo sviluppo di processi biocatalitici; il clonaggio di tali geni in ospiti adeguati ha portato allo sviluppo di biocatalizzatori per la produzione di intermedi per la sintesi di molecole di interesse industriale.

Nel frattempo si sono messi a punto nuovi approcci allo studio delle popolazioni microbiche naturali e della loro biodiversità funzionale; tra questi oltre al numero crescente di genomi sequenziati, ha assunto particolare importanza la metagenomica, ovvero l'analisi genomica, coltura indipendente, di una popolazione microbica naturale, che consente di scoprire nuove classi di geni che codificano per funzioni utili di interesse ambientale.

Infine, l'analisi funzionale di genomi di microrganismi decontaminanti fornisce le basi essenziali per disegnare, sviluppare e ottimizzare strategie di intervento atte a ridurre i danni ambientali causati dall'inquinamento.

# CHIARA TONELLI

(Università degli Studi di Milano)

## Le piante del futuro

Gli OGM rappresentano una silenziosa rivoluzione storica che sta cambiando il nostro futuro. I prodotti OGM che attualmente è permesso coltivare in pieno campo e che forniscono un prodotto che finisce sui mercati sono circa venti (le più diffuse sono soia, mais cotone, colza, patata, zucchine, papaia). I Paesi produttori sono 21: i primi sono gli Stati Uniti, seguono Argentina, Brasile, Canada, Cina, Paraguay e India. In Europa il primo posto è occupato dalla Spagna e dalla Romania seguita da Germania, Francia e Repubblica Ceca. L'Italia è completamente esclusa.

Un tema scottante, quello degli OGM. Mai come in questo caso, infatti la non-conoscenza si è trasformata in automatica condanna dell'applicazione delle biotecnologie al settore dell'agricoltura.

L'idea che introdurre e modificare un gene in un organismo rappresenti in qualche modo un "oltraggio" alla natura ha generato ostilità e paura. Eppure, senza esserne consapevoli, noi mangiamo alimenti modificati geneticamente da sempre. Tutte le piante che oggi coltiviamo sono state geneticamente modificate dall'uomo da quando è iniziata l'agricoltura. Infatti, a partire da 10.000 anni fa l'uomo attraverso la selezione ha lentamente trasformato le piante selvatiche nelle piante che oggi noi coltiviamo, ad esempio la banana e la mela erano frutti piccolissimi fatti di molti semi e poca polpa.

Per ottenere maggior qualità e produttività i contadini prima e i genetisti agrari poi hanno selezionato mutazioni spontanee, oppure incrociato piante diverse; il processo era lentissimo e non sempre si riusciva a raggiungere l'obiettivo. Oggi invece la tecnica del DNA ricombinante permette di studiare, isolare e trasferire il gene responsabile di un certo carattere, il tutto in modo mirato. La differenza è solo la modalità di intervento che è straordinariamente più precisa, ma lo scopo è sempre lo stesso: conferire nuovi caratteri ereditari che migliorino le piante.

Molti hanno confuso il concetto di qualità dei prodotti imputando agli OGM rischi potenziali sulla nostra salute o sull'ambiente che invece sono risultati assenti. Recentemente la Commissione Europea ha presentato i risultati di 15 anni di ricerche, che dimostrano che i prodotti delle colture OGM sviluppate fino a oggi non hanno mostrato alcun nuovo rischio per la salute umana o per l'ambiente. È importante sottolineare il fatto che, per la prima volta nella storia dell'agricoltura, nuove varietà vegetali se (e solo se) prodotte con metodologie di ingegneria genetica, devono essere analizzate con i più moderni approcci scientifici per verificarne l'accettabilità per la salute umana, per l'ambiente ed anche per l'economia agricola. I controlli hanno dunque reso le piante OGM oggi coltivate più sicure di quelle tradizionali.

Gli OGM contribuiscono a un'agricoltura sostenibile e ad una migliore produzione alimentare, è possibile ottenere piante resistenti alle malattie e che quindi richiedono meno pesticidi, piante che necessitano di meno fertilizzanti e piante tolleranti la siccità e la salinità dei suoli. Queste tecniche permettono anche di ottenere cibo di maggior qualità, perché più ricco di vitamine, antiossidanti, minerali importanti per il benessere dell'uomo. Qualche esempio: in Cina è in avanzata sperimentazione il Supergreen Rice, un riso resistente a 5 malattie diverse e più ricco in vitamina A e ferro; in Giappone si sta sviluppando una pianta di caffè che produce caffè decaffeinato senza bisogno quindi di processi chimici per estrarre la caffeina che ne alterano il sapore; anche in Italia, pur tra mille difficoltà, le ricerche proseguono. Ad esempio nel mio laboratorio presso il Dipartimento di Scienze Biomolecolari e Biotecnologie dell'Università degli Studi di Milano, è stato modificato un gene che permette alle piante di crescere utilizzando poca acqua. La disponibilità d'acqua sta diventando una vera emergenza sul pianeta terra. Oggi l'agricoltura è la massima consumatrice di acqua: 70% di quella utilizzata. Per dare un'idea: per produrre un chilo di riso sono necessari circa 2000 litri d'acqua. Una pianta modificata geneticamente per crescere anche in carenza d'acqua è dunque una risorsa impagabile. Stiamo inoltre sviluppando piante che sono in grado di crescere in terreni salini e piante che hanno un maggior contenuto di antociani, antiossidanti che aiutano a prevenire malattie cardiovascolari e tumori.

Va inoltre ricordato il ruolo delle piante OGM come amiche dell'ambiente: possono produrre energia più pulita, decontaminare il suolo dalla presenza di metalli pesanti e addirittura trovare le mine nascoste nel terreno. In Danimarca è stata ottenuta una pianta di *Arabidopsis thaliana* modificata geneticamente, in grado di individuare mine antiuomo. Questa pianta è capace di cambiare colore da verde a rosso intenso quando le radici prendono contatto con il gas di biossido di azoto (NO<sub>2</sub>) che disperdono le mine. Si calcola che al giorno d'oggi, esistono ancora più di 100 milioni di mine antiuomo inesplose ripartite in più di 75 paesi, alcune delle quali sotterrate in zone abitate o in zone agricole. Le prime prove sono state fatte dall'esercito danese e presto coltivazioni sperimentali si realizzeranno in Bosnia, Sri Lanka ed in alcune zone Africane.

Le biotecnologie offrono la possibilità di utilizzare le piante come fabbriche, versatili, economiche e rinnovabili, di praticamente qualsiasi cosa: oli, biocarburanti, resine, detergenti, plastiche biodegradabili, enzimi, farmaci, vaccini, ormoni, ecc. Alcuni esempi già in sperimentazione riguardano piante in grado di produrre vaccini (contro l'enterocolite, l'epatite B, la carie dentaria, ecc.). Ad esempio il vaccino contro l'enterocolite è stato prodotto in banana in modo da essere somministrato attraverso un omogeneizzato che si mantiene a temperatura ambiente, è quindi più economico trasportarlo soprattutto nei paesi in via di sviluppo, inoltre la banana è triploide quindi produce polline sterile, un modo molto semplice per evitare la dispersione del polline. Nel caso della carie invece si sta sperimentando un dentifricio addizionato da estratti di pianta che contiene anticorpi contro la carie. Come produttrici di farmaci le piante offrono due grandi vantaggi: sono disponibili in quantità illimitata e costano poco: ad esempio una dose di vaccino prodotto in colture cellulari di mammifero costa circa 47 euro, mentre si stima possa costare al massimo 20 centesimi se prodotto in una pianta.

Questa è dunque una delle aree in cui la ricerca scientifica ha dimostrato di poter migliorare la nostra vita. E' un altro dei tanti strumenti offerti dalle straordinarie conoscenze che abbiamo acquisito sul DNA con il quale possiamo combattere le grandi piaghe del nostro pianeta: la fame, tanto per cominciare, o le malattie più gravi.

Nel 2003 l'allora segretario dell'ONU Kofi Annan parlando dell'impatto delle biotecnologie, con particolare attenzione allo sviluppo sostenibile, alla sicurezza alimentare e alla salute disse: "Le biotecnologie riguardano molte aree dell'attività umana, tra cui l'agricoltura, la salute, l'ambiente, l'energia, ed i loro benefici, sia economici che sociali, sono già divenuti una realtà. Le biotecnologie diventeranno parte della lotta globale contro la povertà, la fame, le malattie ed il sottosviluppo che hanno un effetto diretto sulla scolarizzazione, la mortalità infantile, la salute delle madri e sulla libertà associata ad un decente livello di vita. Non è in discussione se

le biotecnologie manterranno le loro promesse ma solo come le promesse delle biotecnologie verranno condivise”.

Non c'è ragione quindi di fermare tutto questo per motivi ideologici o per paure o pregiudizi che nascono per tornare al tema iniziale proprio dalla non-conoscenza. Solo la conoscenza ci permette di scegliere e ci dà il diritto di condannare.

# PIER FRANCO PIGNATTI

(Università degli Studi di Verona)

## Le basi genetiche della risposta ai farmaci

Sarà introdotto il concetto di variabilità individuale nella risposta ai farmaci, sia per la efficacia del trattamento che per la tossicità.

Fra le diverse possibili cause di variabilità individuale nella risposta ai farmaci vi sono le differenze ereditarie.

Saranno dati esempi delle prime differenze ereditarie descritte negli effetti dei farmaci, come il deficit di colinesterasi plasmatica causa di arresto respiratorio prolungato dopo anestesia con succinilcolina, ed il deficit di acetilazione causa di neuropatia periferica da terapia antitubercolare con isoniazide.

Si indicheranno alcuni importanti geni coinvolti nella farmacocinetica, come il citocromo 2D6, coinvolto nel metabolismo di molti farmaci e per l'analisi del quale è disponibile un chip di DNA, e la tiopurina metil trasferasi, il cui test è ricordato nel foglietto illustrativo del farmaco usato per una leucemia.

Si ricorderanno inoltre alcuni biomarcatori farmacogenetici considerati validi dall'FDA.

Sarà poi indicato un gene esemplificativo per la farmacodinamica, un recettore importante nella azione di farmaci antiasmatici, e si cercherà di illustrare la possibile azione contemporanea di più varianti genetiche in uno stesso individuo, scegliendo appunto un gene del metabolismo dei farmaci ed un gene per un recettore del farmaco.

Si ricorderanno infine le possibilità di studio farmacogenetico offerte dalle moderne analisi genetiche, incluse le determinazioni degli aplotipi, costituiti da una serie di marcatori vicini uno all'altro sulla stessa molecola di DNA, che hanno già permesso lo studio di farmaci come un importante antiretrovirale, e che saranno utili nello studio farmacogenomico generale in futuro.



# STEFANO GOVONI

(Università degli Studi di Pavia)

## Farmacogenetica e individualizzazione della terapia

“Una dose per un uomo, due per un cavallo, mezza per un bambino”. Nel passato, l'uso dei farmaci è spesso stato guidato da regole semplici quali quelle qui sopra proposte in modo scherzoso. In realtà il problema è molto più complesso. La risposta è individuale e dipende da molti fattori come il sesso, l'età, il peso, lo stato di salute e il corredo genetico.

Perché insistere tanto sulla importanza di scegliere bene dosi e tipo di farmaco adatti ad ogni singolo paziente? Dati della letteratura scientifica riportati sul sito web della Food and Drug Administration (FDA, l'ente regolatorio statunitense; *Institute of medicine, National Academy Press, 2000*; Lazarou J et al. *JAMA* 1998;279(15):1200–1205; Gurwitz JH et al. *Am J Med* 2000;109(2):87–94; <http://www.fda.gov/cder/drug/drugreactions/>) indicano che il numero delle reazioni avverse ai farmaci è elevato e le morti correlate sono numerose. A questo quadro allarmante contribuiscono diversi fattori tra cui la maggiore diffusione delle terapie farmacologiche e l'uso di più farmaci contemporaneamente, soprattutto nei pazienti anziani.

Premetto che da farmacologo difendo a spada tratta il valore dei farmaci e delle terapie farmacologiche, ma l'uso dei farmaci richiede cultura, preparazione ed attenzione non solo da parte del personale sanitario, ma anche da parte della società civile, del pubblico. Molte delle morti sono dovute, oltre ad un uso disattento, alla variabilità individuale nelle risposte avverse ai farmaci, una caratteristica troppo spesso dimenticata, il cui aspetto speculare è la mancata efficacia di un determinato trattamento farmacologico con esposizione del paziente ai soli effetti collaterali o tossici del trattamento senza alcun beneficio terapeutico.

Occorre quindi porre molta attenzione a tutti i fattori che controllano la variabilità di risposta, tra cui quelli genetici. Per capirne bene l'importanza dobbiamo pensare al percorso di un farmaco nell'organismo ed ai suoi bersagli biologici. Il destino del farmaco nell'organismo è molto complesso. Si consideri la via di somministrazione più comune, l'assunzione per bocca. Anche i farmaci come gli alimenti vengono “demoliti” dai sistemi dell'organismo ed assorbiti. Quindi, quanto farmaco arriva al bersaglio biologico dipende da quanto ne viene assorbito ed eliminato. A questi processi partecipano trasportatori ed enzimi che portano dentro e fuori delle cellule le

molecole di farmaco e/o lo metabolizzano. Trasportatori ed enzimi sono proteine. Le proteine sono codificate da geni che non sono uguali per tutti. Il bersaglio dei farmaci è costituito da altre proteine, anch'esse codificate da geni. Quindi i geni che determinano tutte queste strutture biologiche che servono ad assorbire, metabolizzare, eliminare e rispondere ad un farmaco sono determinate dal nostro personale corredo genetico. Nei diversi individui questi tratti sono simili ma non identici. Tutti hanno occhi e capelli, ma di colore e aspetto differente. Definito questo contesto, la farmacogenetica è la disciplina che studia le basi genetiche della risposta individuale ai farmaci. I geni che influenzano la risposta ad un determinato trattamento farmacologico possono essere distinti in due grandi classi: 1) geni codificanti per proteine coinvolte nell'assorbimento, nel metabolismo e nell'escrezione del farmaco; 2) geni codificanti per il bersaglio terapeutico primario, come per esempio recettori o enzimi. La conoscenza di tali genotipi può permettere di meglio individualizzare le terapie e quindi di ottenere i massimi benefici con i minori effetti collaterali.

Questo tipo di nuove conoscenze conferisce base teorica a quegli aspetti di individualizzazione della terapia che da sempre costituiscono la buona pratica dei medici che conoscono molto bene e da molto tempo il paziente e adattano dosi e tipi di farmaci per meglio trattare la sua patologia senza perturbarne troppo l'equilibrio.

I dati che verranno dagli studi di farmacogenetica sulla risposta al farmaco potrebbero rendere disponibili per i medici test maneggevoli e veloci che consentano, prima della prescrizione, di eseguire screening preliminari atti a valutare l'adeguatezza del farmaco alle caratteristiche genético-metaboliche del singolo individuo.

Quanto siamo lontani da tutto questo? Nel giugno 2003 è stato presentato al parlamento inglese un documento dal titolo "*Our inheritance, our future*" nel quale viene presentato un programma per implementare i servizi di genetica per individuare i geni di rischio per le malattie e per la risposta ai farmaci all'interno del Sistema Sanitario Nazionale Inglese. Esistono però ancora numerosi problemi di tipo etico e normativo da risolvere per garantire in modo appropriato l'anonimato e la privacy e la sicurezza dei dati. Vi è il timore che l'uso inappropriato dell'informazione genetica possa produrre una nuova sottoclasse: quella dei geneticamente meno fortunati (*Jeffords & Daschle science 291, 1249, 2001*). L'uso della farmacogenetica porterà sicuramente ad una ottimizzazione delle terapie, ma, verosimilmente, anche ad un aumento dei costi, un problema da risolvere a livello politico per garantire sia la possibilità di sviluppare nuovi farmaci sia l'accesso ad essi.

## LUIGI DE CARLI

(Istituto Lombardo Accademia di Scienze e Lettere – Università degli Studi di Pavia)

### Ricerca genetica e bioetica

La Genetica ha sviluppato strumenti potenti per analizzare, modificare e ricostruire l'intero patrimonio genetico degli organismi più diversi dagli unicellulari più semplici ai pluricellulari più complessi, compreso l'Uomo. Con le tecniche molecolari e cellulari oggi a disposizione è possibile effettuare una analisi genetica a tutto campo seguendo una varietà di approcci che, dallo studio dei caratteri, attraverso l'analisi cromosomica e l'analisi biochimico molecolare, portano all'identificazione ed all'isolamento dei geni. Scambi di materiale genetico possono essere operati trasferendo DNA , cromosomi, nuclei e fondendo cellule intere. L'attività dei geni nello sviluppo e nel differenziamento può essere controllata in vitro in vari tipi di cellule di mammifero, sia somatiche che germinali, comprese quelle umane. Nell'uomo è possibile analizzare il genoma

durante l'intero ciclo vitale ed in alcuni casi intervenire con trattamenti di tipo preventivo e terapeutico. Nella genetica applicata, in campo microbiologico, vegetale, animale ed umano, gli interventi che possono costituire materia eticamente sensibile sono: le analisi genetiche effettuate a scopo di ricerca e diagnostico (animali, Uomo), modificazioni del genoma a scopi produttivi, di ricerca (ogni organismo) e terapeutici (Uomo); la clonazione riproduttiva (animali) e cosiddetta terapeutica (Uomo); la sintesi di nuovi organismi e la costruzione di cromosomi artificiali (ogni organismo). I problemi etici riguardano: nel caso degli animali, gli effetti sulla biodiversità e sugli equilibri biologici, gli stati di sofferenza e la soppressione; nel caso dell'uomo, gli effetti sulla salute e sulla sopravvivenza in tutte le fasi del ciclo vitale, compresa quella embrionale, la riservatezza e l'uso dei dati personali, la libertà di accesso ai test genetici, alterazioni dell'identità genetica e del patrimonio ereditario. Nella sintesi di nuovi genomi i problemi riguardano essenzialmente la salvaguardia dell'ambiente. Particolare attenzione viene rivolta all'embrione umano in diversi contesti: procreazione medicalmente assistita, diagnosi preimpianto e terapia genica, uso di cellule staminali embrionali nella medicina rigenerativa. La definizione dello statuto ontologico dell'embrione umano registra due principali posizioni, quella sostanzialista e quella gradualista, dalle quali dipende l'accettabilità etica dei vari tipi di intervento.

Un primo livello di valutazione bioetica è la determinazione del rapporto rischio/beneficio. Una riflessione più avanzata chiama in causa i principi fondamentali dell'autonomia e dell'equità, ai quali si aggiungono i principi della responsabilità professionale e del dovere dell'informazione, validi per il medico come per il biologo. All'etica prescrittiva o propositiva basata sui principi si affianca d'istante crescente interesse fra i bioeticisti, l'etica narrativa che considera la storia scritta o raccontata dei casi individuali momento essenziale del ragionamento e della riflessione etica.

**GEROLAMO LANFRANCHI**

(Università degli Studi di Padova)

**Il genoma umano in azione**

Il genoma umano “funziona” attraverso due processi estremamente complessi e regolati: la trascrizione di frammenti definiti del genoma (geni) in RNA messaggero e la traduzione in proteine di una parte degli RNA trascritti. L’informazione contenuta nei geni della cellula viene quindi messa in atto attraverso la trascrizione e la traduzione.

Prenderò in considerazione il primo processo illustrando le possibilità di studio che sono state aperte dall’avvento dell’era genomica ed in particolare dal sequenziamento completo del genoma umano.

Il corpo umano è costituito da cento trilioni di cellule che, pur contenendo la stessa sequenza di DNA e lo stesso numero di geni, svolgono compiti spesso diversissimi (ad es. neuroni, cellule muscolari, cellule del fegato). Questa diversità di funzione e di morfologia è dovuta in prima battuta a QUALI geni sono trascritti e QUANTO ciascuno di essi è trascritto in ciascuna cellula (trascrizione differenziale). La trascrizione dei geni è un meccanismo quindi fortemente regolato nella cellula e la regolazione della trascrizione dei geni avviene a molti livelli. A) singole cellule accendono o spengono geni diversi, B) l’espressione dei geni varia da tessuto a tessuto, C) l’espressione dei geni varia durante lo sviluppo dell’organismo, D) stimoli esterni (l’ambiente) possono influenzare la trascrizione, E) la disposizione spaziale del DNA nel nucleo della cellula influenza la trascrizione dei geni.

Gli studi sulla funzione dei geni a livello genomico ci ha fatto capire che qualsiasi caratteristica o funzione cellulare (normale o patologica) è determinata dall’attività coordinata di numerosi geni, ivi comprese le patologie genetiche dovute ad una mutazione primaria di un singolo gene.

Grazie allo sviluppo delle tecniche genomiche e alla decifrazione del genoma umano, ora possediamo delle tecnologie che permettono l’analisi della trascrizione di tutti i geni presenti in una cellula con test relativamente semplici (i *microarray* di DNA) e quindi capire le basi molecolari delle attività cellulari.

Si sono costruite delle collezioni di molecole di DNA sintetico, dette sonde, ciascuna delle quali è in grado di riconoscere in modo specifico il prodotto di un gene (RNA messaggero). Queste sonde sono depositate da robot sotto forme di piccole macchie su semplici vetrini da microscopio, raggiungendo densità altissime (*microarray*). Le sonde per i circa 25.000 geni umani possono essere tutte depositate in un singolo *microarray*. L’RNA messaggero prodotto dai geni espressi da una cellula può essere estratto, legato ad un colorante ed ibridato sul *microarray*. Ogni sonda catturerà il corrispondente RNA messaggero e il colore catturato dalla sonda darà una misura quantitativa dell’espressione dei geni in quella cellula. Si può quindi misurare con questo semplice test l’espressione di tutti i geni attivi in una cellula (profilo d’espressione). Si possono anche confrontare i profili d’espressione di cellule diverse o quella di cellule normali o patologiche, identificando tutti i geni che presentano una trascrizione differenziale.

Questa tecnica è ormai applicata in tantissimi campi: un ottimo esempio riguarda lo studio dei profili d'espressione nelle leucemie. Gli studi con i *microarray* hanno permesso una classificazione molto accurata dei sottotipi di diverse leucemie, permettendo progressi notevoli, rispetto alle indagini cliniche classiche, nella classificazione del tumore, nello studio delle sue basi molecolari, della sua evoluzione maligna e fornendo nuovi marcatori per una diagnosi più precisa.

Lo studio dell'espressione genica con queste tecniche genomiche quali sono i *microarray* si basa sull'idea di colinearità fra geni ed RNA e sul concetto, derivato dai classici studi di Jacob e Monod degli anni 60.

In realtà gli studi genomici sulla trascrizione del genoma umano e di altri organismi stanno dimostrando che la trascrizione del genoma è molto più complessa di quella prevista sul modello del gene di Monod. Infatti: A) gli esoni di un gene possono essere trascritti in RNA messaggero in modo variabile (splicing alternativo), B) i geni possono essere trascritti su un elica di DNA, ma anche su quella complementare, C) addirittura possono essere prodotti RNA messaggeri utilizzando esoni di geni diversi che distano centinaia di migliaia di basi nel genoma o che stanno su cromosomi diversi. Tutto questo altera l'idea di colinearità gene-RNA messaggero e fa capire che i *microarray* oggi in uso (una singola sonda per un gene) non misurano tutti gli RNA prodotti dal genoma (la complessità del trascrittoma). Inoltre mette in evidenza la complessità del trascrittoma.

Infine bisogna ricordare che si è scoperta una nuova categoria di RNA (il cui numero sta crescendo grandemente) trascritti dal genoma, che non vengono tradotti in proteine (RNA non codificanti). Questi RNA hanno delle importanti funzioni nella regolazione dell'espressione dei geni che codificano proteine (ad es. i micro RNA) ed altre funzioni regolative o strutturali (es. RNA Xist). Nuovi strumenti vengono ora approntati per poter studiare anche questa porzione che si sta rivelando sempre più complessa e più importante del trascrittoma delle cellule.

# ANGELO POLETTI ED ELENA CATTANEO

(Università degli Studi di Milano)

## La Genetica delle malattie neurodegenerative: dal nervo periferico al cervello

Negli ultimi anni è emerso chiaramente il legame tra alcune forme neurodegenerative che mostrano caratteristiche di familiarità ed alterazioni a carico del patrimonio genetico. Nell'ormai lontano 1991, è stato identificato il primo gene mutato responsabile di una malattia ereditaria dei motoneuroni, cioè delle cellule nervose che controllano il movimento dei muscoli e quindi le capacità motorie dell'uomo. La malattia che ne deriva è nota come malattia di Kennedy o atrofia muscolare spinale e bulbare (SBMA). Il gene mutato in questa malattia è responsabile della produzione di una proteina nota da moltissimo tempo, il recettore degli ormoni androgenici. Nella sua forma mutata questo gene presenta una espansione anomala di una piccola porzione ripetuta, una sequenza delle tre basi Citosina-Adenina-Guanina (CAG) che, da una lunghezza normale di 20-25 CAG si allunga ad oltre 35-50 CAG. Dato che la sequenza CAG del DNA/RNA introduce l'aminoacido glutammina nella proteina risultante, tale mutazione nel gene dà origine ad una proteina con un tratto poliglutamminico allungato, presumibilmente responsabile della neurotossicità della nuova proteina.

Successivamente, un secondo gene mutato, quello che controlla la produzione dell'enzima antiossidante SuperOssido Dismutasi (SOD1), è stato associato ad un'altra forma familiare di malattia del motoneurone: la Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA), nota in Italia, nella forma sporadica, come la malattia dei calciatori, in quanto l'insorgenza di questa patologia sembra essere relativamente più elevata tra coloro che professano lo sport del calcio a livello professionale.

Queste prime indicazioni hanno spinto molti ricercatori ad indagare il nesso tra altre forme mutate di geni e malattie neurodegenerative altamente invalidanti. Oggi sappiamo che un numero abbastanza elevato di geni mutati sono associati a malattie che comportano la perdita delle cellule nervose del cervello e del midollo spinale, creando una riduzione invalidante delle capacità motorie, di quelle cognitive o di entrambe. Solo per citare le mutazioni patologiche del tratto poliglutamminico, simili a quelle sopra descritte nel caso della SBMA, si possono ricordare altre otto malattie neurodegenerative ereditarie, quali alcune atassie spinocerebellari e la corea di Huntington. Insieme queste forme familiari rappresentano la classe più comune di malattie neurodegenerative ereditarie, dall'esito invariabilmente infausto. Grazie alla osservazione che i meccanismi alla base di queste patologie sono comuni ed associati al tratto poliglutamminico espanso, in questi anni sono stati fatti enormi progressi nella comprensione dei fattori patologici che sono alla base di queste malattie. Si sono anche ottenute indicazioni importanti per poter contrastare i processi neurotossici responsabili della morte neuronale, e per disegnare terapie efficaci per bloccare l'insorgenza e la progressione della neurodegenerazione.

Il Prof. Angelo Poletti presenterà i dati ottenuti nel suo ed in altri laboratori sui meccanismi alla base della SBMA e della SLA, nonché le possibilità terapeutiche.

La Prof.ssa Elena Cattaneo illustrerà i processi alla base della corea di Huntington e in particolare il ruolo fisiologico della proteina huntingtina che, quando mutata, causa la malattia.

