

UP-DATE SU GENETICA ED ALLERGENI AMBIENTALI

Renato Ariano
A.S.L. n° 1 Imperia

In questi ultimi anni la genetica ha prodotto una fragorosa irruzione sulla scena delle ricerche allergologiche e questo è dimostrato dal vertiginoso aumento del numero di lavori scientifici che si occupano d'associazioni genetiche e studi di linkage. Questo crescente successo è dovuto alle nuove tecniche disponibili e dalla speranza che la genetica possa contribuire a fornire le risposte ai quesiti sui fattori di rischio, sulla patogenesi e sulla formazione del fenotipo dei pazienti allergici. La familiarità delle malattie allergiche è ben conosciuta da tempo. Gli studi di genetica formale sui gemelli ci avevano già confermato che le malattie allergiche sono determinate geneticamente con una percentuale d'ereditarietà intorno al 60% (1). Sappiamo oggi che le diverse malattie allergiche e i fenotipi atopici derivano dagli effetti combinati di numerosi loci genici e numerosi fattori ambientali. Gli studi più recenti hanno evidenziato che le malattie allergiche rappresentano un esempio di disordini genetici complessi, ovvero sono patologie che dipendono da numerosi geni, ciascuno con gradi variabili di coinvolgimento individuale. In effetti, il meccanismo di formazione del fenotipo è molto più complesso in quanto esiste un'interazione tra questi numerosi geni tra loro e i fattori d'esposizione ambientale. In aggiunta alla genetica esposizioni ambientali come agli allergeni, al fumo di sigaretta, fattori inquinanti e numerosi altri possono contribuire allo sviluppo di allergie ed asma attraverso la loro capacità di indurre l'espressione del gene. L'ereditarietà delle malattie allergiche è complessa, in altre parole non Mendeliana, in quanto caratterizzata da un tipo d'ereditarietà poligenica, in altre parole un effetto sommativo di due o più geni che determinano un unico carattere fenotipico. Esiste, in queste malattie anche un'eterogeneità per cui geni diversi sono responsabili di fenotipi simili. Bisogna poi considerare che ogni carattere fenotipico è influenzato da un certo numero di fattori di rischio. Individualmente ciascun fattore di rischio ha un effetto moderato. La piena manifestazione del carattere è la risultante dell'azione combinata dei vari fattori di rischio.

L'identificazione di un "gene malattia", vale a dire di un gene responsabile di una malattia genetica monogenica, risulta molto utile per comprendere le cause della patologia e gli eventuali interventi terapeutici.

Gli studi di genetica umana, nel campo delle malattie allergiche, come in altri settori della medicina, possono essere suddivisi in tre differenti fasi:

- 1) Studi di genetica formale: indagini di tipo popolazionistico in cui si accerta il peso relativo della componente ereditaria;
- 2) Studi d'immunogenetica e d'associazione con antigeni del sistema HLA (cromosoma 6, asma da Dermatophagoides);
- 3) Studi di mappatura diretta dei geni.

L'avvento della tecnologia del DNA ricombinante negli anni '80 ha permesso di identificare i geni sulla base della loro posizione. Si può costruire così una cosiddetta mappa genica. Esistono due tipi di mappe: una mappa fisica ed una mappa genetica. Il mappaggio fisico localizza i geni sui cromosomi dando una posizione espressa con misure fisiche reali, in altre parole il numero di paia di basi (bp). Il mappaggio genetico usa, invece, un metodo detto analisi di linkage che fornisce informazioni sulla distanza genetica basata sulla misura della frequenza con cui avviene la ricombinazione tra due geni durante la meiosi. L'analisi di linkage utilizza statisticamente i dati familiari per stimare la probabilità che due loci ereditati da un genitore possano essere trasmessi al figlio. Entrambi questi metodi fanno uso di marcatori genetici, ossia di particolari caratteri fisici biochimici che variano tra gli individui. Questi sono rappresentati dai cosiddetti microsattelliti e dai polimorfismi. I Microsattelliti sono segmenti di DNA composti da più unità elementari nucleotidiche che, grazie alla loro lunghezza variabile, permettono di distinguere i singoli individui appartenenti

alla stessa specie. I polimorfismi sono invece varianti di 1 tratto di DNA presenti nella popolazione con frequenze non trascurabili (>1%). In genere non sono patogeniche. Per la ricerca dei geni, uno dei metodi tradizionali è lo studio di famiglie dove c'è una malattia ereditaria. In questa famiglia, generalmente, ci sono delle persone che sono affette dalla malattia ed altre che non lo sono. In queste famiglie si cerca di identificare qualche particolarità del DNA con la presenza o meno della malattia. In questa maniera si cerca di realizzare l'analisi dell'intero genoma ed oramai sono state individuate numerose regioni con geni correlati ad asma e malattie allergiche in generale (2).

L'entusiasmo e le speranze indotte dallo sviluppo della genetica hanno fatto sorgere, negli anni '90, il Progetto Genoma (1990-2003) che, utilizzando queste metodiche, ha portato alla mappatura del genoma Umano. La comprensione della funzione dei geni e di quali malattie possono derivare dalle loro alterazioni costituiva l'obiettivo finale del progetto. Rispetto alle aspettative, i risultati del Progetto Genoma, pur avendo un'eco mediatico formidabile, non hanno poi confermato le certezze della biologia molecolare e gli obiettivi originari della ricerca. Si pensava, infatti, che la specie umana avesse centinaia di migliaia di geni. Ne sono stati invece contati circa 30.000, da confrontarsi con i circa 28.000 di una pianta e i 18.000 di un verme. Per alcuni questa differenza non è abbastanza marcata da spiegare, unicamente attraverso i geni, la complessità dell'organismo umano rispetto a forme di vita più semplici. Inoltre nel genoma mappato sono stati rilevati, oltre ai geni che costituiscono solo il 3% del totale, una quantità di materiale di cui non conosciamo ancora funzionamento e scopo (junk DNA).

Queste considerazioni e le recenti ricerche sembrano, secondo alcuni, poter mettere in profonda crisi la classica concezione del gene come di una molecola stabile soggetta ad errori casuali e la correttezza stessa della teoria darwiniana intesa come un processo che agisce a posteriori sulle mutazioni grazie alla selezione naturale. Tra gli entusiasti sostenitori della possibilità di risolvere tutti e per sempre i problemi della salute umana, grazie alla correzione dei guasti dei geni o alla sostituzione dei pezzi di genoma difettoso con pezzi ben funzionanti, secondo una visione della medicina neo-meccanicistica, si leggono autorevoli inviti alla prudenza. Negli anni passati si era diffuso il mito del determinismo genetico, ipotesi scientifica che sosteneva il concetto che gli organismi sono determinati solo dalla loro costituzione genetica.

Tuttavia in seguito ci si è resi conto che il determinismo genetico ha fallito la prova dei fatti, secondo i suoi stessi principi scientifici. Difatti si è constatato che i diversi genomi umani differiscono tra loro soprattutto per i polimorfismi, che si sono rivelati numerosissimi. Inoltre, non solo ogni gene esiste in molteplici varianti, ma una delle principali funzioni dei geni è quella di codificare le migliaia d'enzimi necessari alle funzioni dell'organismo. Nessun enzima e nessun gene lavora da solo. Questo significa che lo stesso gene avrà effetti diversi da individuo ad individuo e che il corredo genetico delle cellule adulte non rimane sempre inalterato.

Oltre a questo, stanno sorgendo nuovi problemi metodologici.

Recentemente sono stati pubblicati articoli su Nature (3) e su Genome Research (4) che sottolineano la scarsa riproducibilità dei risultati dalle ricerche genetiche a causa di studi non sempre ben architettati. Questo per la complessità dei meccanismi genetici che non vedono più in gioco una serie di geni indipendenti, ma una rete complessa in cui gli stessi geni, insieme a elementi regolatori e ad altri tipi di sequenze di Dna che non codificano proteine, interagiscono in diversi modi che in parte ancora ci sfuggono.

Sono poi stati individuati numerosi esempi d'interazione gene-ambiente e numerosi fattori ambientali che influenzano cambiamenti nella prevalenza, incidenza e severità delle patologie allergiche. Questi sono rappresentati dai cambiamenti climatici globali, dal declino delle infezioni e l'Hygiene Hypothesis, dall'inquinamento ambientale, dai cambiamenti degli stili di vita (dieta, esercizio, etc.)

Per studiare le interazioni gene-ambiente bisogna prendere in considerazione dei modelli che considerino la possibilità che specifici genotipi possano produrre fenotipi solo in certe situazione di esposizione ambientale oppure che specifici genotipi possano fornire diversi fenotipi a seconda dell'esposizione ambientale.

La complessità delle interazioni genetiche è messa in rilievo dallo studio di Maier e coll. (5).

Il punto di partenza di questo studio era costituito dalle conclusioni di diversi studi, tra cui una meta-analisi di Cardwel del 2003 (6), che riferivano una relazione inversa tra malattie atopiche e diabete mellito 1 per cui si verificherebbe una riduzione della frequenza dell'asma in bimbi con diabete 1.

Una possibile spiegazione è che i geni suscettibili per una delle due malattie forniscano una protezione per l'altra e che comunque questa particolare situazione epidemiologica sia supportata da una condivisione genetica. Era suggestiva l'ipotesi che la suscettibilità verso la flogosi TH1 potesse proteggere contro la patologia Th2 e viceversa. Lo studio era molto ampio utilizzando ben 4.570 soggetti che provenivano da diverse zone della Gran Bretagna. I geni associati a malattia erano per l'atopia i seguenti: IL13 , IL4 , IL4RA, FCER1B, IL12B , TBET . I geni associati al diabete 1 erano: CTLA4, PTPN22. I risultati furono invece un poco deludenti. Solo il gene IL13 (già bene conosciuto) era associato con i livelli ige, ma non era riscontrata nessuna associazione positiva o negativa tra gli altri geni studiati le malattie complementari.

Questo studio ha fatto molto discutere la comunità scientifica, sullo stesso numero di JACI, in cui è stato pubblicato un editoriale che ne sottolineava i pregi e i difetti traendo spunto per valutazioni più generali sui problemi della genetica in allergologia. Pur utilizzando una popolazione assai vasta (forse troppo) questa era costituita da abitanti di diverse zone della Gran Bretagna rendendo più difficile una valutazione delle diversità dei fattori ambientali.

Un altro esempio di quanto i fattori ambientali possano interferire su quelli genetici è dato anche dal comportamento di un polimorfismo del CD 14. Questo è un gene che codifica il recettore per le endotossine. L'associazione tra i polimorfismi del CD 14 e malattie atopiche si diversifica a secondo dei livelli di esposizione alle endotossine.

E' stato recentemente dimostrato che il medesimo polimorfismo può essere associato con stato di malattia oppure con protezione da malattia a seconda dell'ambiente a cui i soggetti sono esposti. La capacità del CD14 /-260>T di influenzare i livelli sierici di IgE in varia maniera è stata difatti dimostrata, indipendentemente, dai due lavori distinti. Eder e coll. (7), in una popolazione di bambini europei ha dimostrato che l'allele C del CD 14/ - 260 risulta associato con alti livelli IgE nei bimbi a contatto con cani e gatti. Si associava invece a bassi livelli IgE nei bimbi a contatto con animali da stalla ed infine si associava a bassi livelli IgE in ambienti con alti livelli di endotossina. Non si verificava nessuna associazione in bimbi che non avevano contatto con animali.

Nel lavoro di Zambelli-Weiner e coll. (8), invece, che considerava la malattia asmatica si dimostrava le che il medesimo polimorfismo CD14/-260 proteggeva dall'asma negli individui che vivevano in ambienti con bassi livelli di concentrazione d'endotossina nella polvere di casa, mentre costituiva

un fattore di rischio per asma negli individui che abitavano in ambienti con livelli elevati di endotossina. Quindi la conclusione a cui giungono questi due studi, indipendentemente, è che lo stesso polimorfismo può essere associato con altre malattie o protezioni, e questo dipende dall'ambiente a cui i soggetti sono esposti.

Ulteriori dati ci provengono dagli studi sulle endotossine. L'endotossina ed il LPS (Liposaccaride) sono componenti della parete cellulare dei batteri Gram negativi. L'endotossina è considerata un marker della esposizione ambientale a microbi.

Il contenuto d'endotossina nella polvere di casa è più elevato nelle case di campagna (9). L'ipotesi che l'endotossina ed altri agenti induttori l'atteggiamento Th1 riducano lo sviluppo delle malattie atopiche rientra nel filone di studi sulla Hygiene Hypothesis .

A basse concentrazioni l'endotossina risulta immunostimolante in quanto è un potente induttore di produzione di IL 12 e di IFN gamma che inducono a loro volta lo sviluppo Th1 e inibiscono lo sviluppo Th2. Come riconciliare il paradosso dell'endotossina ? Amica o nemica nei confronti degli asmatici ? Sono i parametri chiave costituiti dal tempo d'esposizione, dal dosaggio, dai cofattori ambientali e dalla genetica che condizionano l'effetto dell'endotossina in positivo o in negativo. Nell'asma atopica la precoce esposizione previene la malattia, quella tardiva la incrementa. Le alte dosi potrebbero invece essere tollerogeniche.

Esistono infine numerose evidenze epidemiologiche dell'hygiene hypotesis che elenchiamo nella tabella seguente:

Prevalenza correlata a stato socioeconomico ed al livello di istruzione scolastica	Strachan, 1989 (10)
Prevalenza inversamente correlata al numero di fratelli ed ordine di nascita	Strachan, 1989 (10) von Mutius, 1992 (11)
Studi di confronto Germania Est ed Ovest	Von Mutius, 1994 (12)
Minore prevalenza nei Paesi in via di sviluppo	ISAAC, 1998 (13)
Studi su popolazioni rurali	ALEX study, 2001 (14)
Associazione inversa con malattie infettive	Matricardi, 1997 (15)
Minor prevalenza stile di vita antroposofico	Alm JS , Lancet 1997; (16) Floistrup E, JACI, 2006 (17)

Un'ulteriore dimostrazione dell'interazione tra genetica e ambiente è costituita dagli studi sulle popolazioni che si spostano da un paese all'altro (immigrati albanesi in Italia e immigrati algerini in Francia). In un lavoro del 2003 Ventura e coll. (18) documentarono che la prevalenza d'asma e allergia era bassa in Albania rispetto all'Italia (1.3 vs 19.4%). I soggetti albanesi immigrati in Italia (61/61 positivi per IgG Ab to HAV!) mostrano una aumentata prevalenza di sensibilizzazione e di allergia respiratoria, correlata con la durata della permanenza. La conclusione di questi autori è che i cambiamenti ambientali e di stile di vita connessi con l'immigrazione in Italia aumentano la prevalenza di sensibilizzazione e d'allergia respiratoria negli immigrati albanesi, senza nessuna protezione dalla precedente alta esposizione all'HAV.

Analoghi risultati aveva molti anni prima già dimostrato Panzani in Francia con i suoi studi sugli immigrati algerini (19). Questi dati erano stati ripresentati e commentati in seguito in un lavoro di più ampio respiro (20). Le positività agli Artropodi presentate dai pazienti algerini residenti nel loro paese d'origine (intorno al 50%) calavano nettamente nella stessa popolazione dopo alcuni anni che si sono trasferiti in Francia. Viceversa le positività cutanee agli Artropodi dei soggetti francesi (che erano nell'ordine del 30%) aumentavano notevolmente dopo che questi soggetti si sono trasferiti in Africa settentrionale per almeno 10 anni. Gli autori concludevano che il background genetico ed etnico non rivestisse, in questo caso, alcuna influenza, mentre risultava determinante il ruolo dell'ambiente.

CONCLUSIONI

Si può concludere che, sino ad oggi, nessun studio è riuscito ad identificare geni esclusivi per le diverse patologie allergiche. L'ipotesi del determinismo genetico è tramontata, soprattutto per le malattie atopiche. E' oramai evidente che determinanti genetici multipli e distinti interagiscono tra loro e con le esposizioni ambientali, in maniera complessa e assai variabile. La speranza è che la ricerca genetica possa trovare nuovi approcci più potenti, al fine di catturare la complessità di queste interazioni e i loro effetti sui fenotipi clinici.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Hopp R.J., Bewtra A.K., Watt G.D., Nair N.M., Rownley R.G. Genetic analysis of allergic disease in twins. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1984; 73: 265-70.
- 2) Ober C. Perspectives on the past decade of asthma genetics. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2005; 116: 274-278.
- 3) Anonymous . Framework for a fully powered risk engine. *Nat Genet.* 2005;37:1153.
- 4) Hall I. P., Blakey J.D. Genetic association studies . *Thorax* 2005; 60: 357-359.
- 5) Maier L e coll. Howson JMM, Walker N, Spickett GP, Jones RW, Ring SM, et al.. Association of *IL13* with total IgE: Evidence against an inverse association of atopy and diabetes. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;117:1306–1313.
- 6) Cardwell CR, Shields MD, Carson DJ, Patterson CC. A meta-analysis of the association between childhood type 1 diabetes and atopic disease. *Diabetes Care.* 2003;26:2568–2574.
- 7) Eder W, Klimecki W, Yu L, von Mutius E, Riedler J, Braun-Fahrländer C, et al.. Opposite effects of *CD14/-260* on serum IgE levels in children raised in different environments. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;116:601–607.
- 8) Zambelli-Weiner A *J Allergy Clin Immunol.* 2005;115(6):1203
Evaluation of the *CD14/-260* polymorphism and house dust endotoxin exposure in the Barbados Asthma Genetics Study.
- 9) Gereda JE, Leung DY, Liu AH. Levels of environmental endotoxin and prevalence of atopic disease. 2000 *JAMA.* 2000 : 4;284(13):1652-3.
- 10) Strachan D.P. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* 1989;18;299(6710):1259-60.
- 11) von Mutius E, Fritzsche C, Weiland SK, Röhl G, Magnussen H. Prevalence of asthma and allergic disorders among children in united Germany: a descriptive comparison.*BMJ* 1992; 5; 305(6866):1395-9.
- 12) von Mutius E, Martinez FD, Fritzsche C, Nicolai T, Roell G, Thiemann HH. Prevalence of asthma and atopy in two areas of West and East Germany. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994;149(2 Pt 1): 358-64.
- 13) Asher MI, Weiland SK on behalf of the ISAAC Steering Committee. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Clin Exp Allergy* 1998; 28 Suppl 5: 52-66.
- 14) Riedler J, Braun-Fahrländer C, Eder W, Schreuer M, Waser M, Maisch S, Carr D, Schierl R, Nowak D, von Mutius E. Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *Lancet* 2001;358(9288):1129-33.
- 15) Matricardi PM Infections preventing atopy ; facts and new questions . *Allergy* 1997; 52: 879-82

16) Alm JS, Lilja G, Pershagen G, Scheynius A. Early BCG vaccination and development of atopy. *Lancet*. 1997 Aug 9;350(9075):400-3.

17) Flöistrup H, Swartz J, Bergström A, Alm JS, Scheynius A, van Hage M, Waser M, Braun-Fahrlander C, Schram-Bijkerk D, Huber M, Zutavern A, von Mutius E, Ublagger E, Riedler J, Michaels KB, Pershagen G, The Parsifal Study Group . Allergic disease and sensitization in Steiner school children. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117(1):59-66.

18) Ventura MT, Munno G, Giannoccaro F, Accettura F, Chironna M, Lama R, Hoxha M, Panetta V, Ferrigno L, Rosmini F, Matricardi PM, Barbuti S, Priftanji A, Bonini S, Tursi A. Allergy, asthma and markers of infections among Albanian migrants to Southern Italy. *Allergy*. 2004 Jun;59(6):632-6.

19) Panzani R.C. : Epidemiologie de l'allergie respiratoire aux émanations d'arthropodes : influence de l'environnement. Séminaire d'immuno-allergologie franco-maghrébin. Tunis. 23-25 sept. 1987; 230.

20) Panzani R.C., Ariano R. : Arthropods and invertebrates allergy (with the exclusion of mites): the concept of panallergy. *Allergy*. 2001; 56 Suppl 69:1-22.