

## Novità dalla biologia molecolare

**Valentina Fainardi**

Fisiopatologia Respiratoria Infantile, U.O. Fibrosi Cistica, Clinica Pediatrica, Dipartimento di Medicina e Chirurgia, Università di Parma

**E-mail:** valentina.fainardi@unipr.it

La medicina molecolare è definita come quella disciplina che studia la patogenesi cellulare delle malattie e le sue mutazioni genetiche. La medicina molecolare è anche sinonimo di medicina personalizzata o traslazionale, dal termine inglese *translational medicine*, in quanto mira al raggiungimento di una diagnosi e di una terapia per il singolo paziente trasferendo i risultati della ricerca “*from bench to bedside*”, dal banco di laboratorio al letto del paziente.

Se un tempo si credeva che ogni paziente con asma fosse uguale e che la terapia potesse essere la stessa per tutti (“*one size fits all*”), ora è noto che la patologia è molto eterogenea e che racchiude numerosi endotipi e fenotipi. È proprio con la comprensione dei meccanismi molecolari alla base dell’endotipo che la medicina molecolare mira ad individuare una terapia personalizzata per le caratteristiche proprie di ogni paziente. Per un approccio personalizzato alla patologia ed una medicina di precisione sono quindi necessari dei *biomarkers* specifici per ogni endotipo di asma. Il biomarker è un indicatore biologico come una sequenza di DNA o RNA o una proteina correlato ad una malattia o ad una risposta ad un trattamento; questo deve essere misurabile con precisione e in poco tempo e deve avere un alto valore prognostico predittivo. La medicina di precisione include le cosiddette scienze omiche. Gli studi omici investigano i meccanismi molecolari cellulari con il fine di riconoscere endotipi e di associarli ai fenotipi osservati (Ivanova O., *et al.* Allergy. 2019;74(11):2129-2145).

Gli studi omici includono:

- genomica, che si avvale dei *genomewide association studies* (GWAS), studi che ricercano associazioni tra singoli polimorfismi dei nucleotidi (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs) e specifici fenotipi. In questo ambito la scoperta più significativa nel mondo dell’asma pediatrica è stata l’individuazione di diversi markers genetici (come, *sphingolipid biosynthesis regulator 3*, ORM-DL3) sul locus 17q12-21 che sono associati allo sviluppo di asma (Moffatt M.F., *et al.* Nature. 2007; 448(7152):470-3).
- epigenomica, che studia le modificazioni genetiche (metilazione di DNA, *non-coding RNA*) generate dall’ambiente. Questa dipende dall’esposoma e cioè da tutte le esposizioni interne ed esterne a cui l’individuo è sottoposto nel corso della vita. L’epigenetica può essere considerata come la risposta adattativa cellulare all’ambiente che cambia.
- trascrittomica, che studia tutti gli RNA messaggeri (mRNA) trascritti e presenti in una cellula in un determinato momento. Questi studi sono solitamente eseguiti su cellule del sangue (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs), cellule epiteliali bronchiali o sull’espettorato.
- proteomica, che studia tutte le proteine presenti in una cellula in un determinato momento.
- metabolomica, che studia i composti di basso peso molecolare (<1500 Da) che originano dal metabolismo.

Promettenti *biomarkers* studiati dalla trascrittomica sono i microRNA (miRNA), frammenti di RNA che non codificano per molecole specifiche, ma che giocano una importante funzione nella regolazione post-trascrizionale in risposta all’ambiente. Le varie sottopopolazioni di linfociti T (Th1, Th2, Th17) esprimono per esempio specifici miRNA. Ogni miRNA può silenziare specifici geni o stimolare risposte cellulari, sono trasportati da esosomi o microvescicole. Le microvescicole fanno parte della famiglia delle vescicole extracellulari, vescicole derivate dalla membrana cellulare rilasciate nello spazio extracellulare che sembrano avere un ruolo importantissimo nella omeostasi tissutale e nella comunicazione tra le cellule, essendo in grado di trasportare citochine, enzimi, fattori di crescita, miRNA o antigeni atti a stimolare la risposta immunitaria (Cheng L., *et al.* Nat. Rev. Drug. Discov. 2022;21(5):379-399). Un esempio di come il miRNA può diventare un biomarker di patologia lo descrive un recente studio effettuato su aspirato nasofaringeo di lattanti con infezione respiratoria virale. Se in vitro l’infezione virale stimola nella cellula epiteliale il rialzo del miRNA miR-146a-5p e la riduzione dell’infiammazione, nei lattanti con bronchiolite questo risulta ridotto e permane ridotto anche dopo la risoluzione dell’infezione, suggerendo una alterazione epigenetica nella risposta immunitaria del soggetto infettato (Rodrigo-Muñoz J.M. *et al.* Cells, 2022;11(17):2746).

Nonostante negli ultimi anni la medicina molecolare sia cresciuta esponenzialmente e gli studi omici si siano moltiplicati con moltissimi risultati, questi sono tuttavia raramente applicabili alla pratica clinica. Queste alcune delle limitazioni: i risultati sono variabili e difficilmente interpretabili su larga scala, gli studi coinvolgono spesso pochi pazienti, i criteri e le caratteristiche sono molto eterogenei, la definizione stessa di asma e di severità dell'asma possono variare. Prospettive future includono la definizione di protocolli di studio condivisi, la standardizzazione delle metodiche e la creazione di biobanche che possano raccogliere dati di popolazione su larga scala.

In ambito di fibrosi cistica (FC) la medicina di precisione ha ottenuto risultati portentosi con i farmaci modulatori CF *Transmembrane Conductance Regulator* CFTR, proteina di membrana addetta al trasporto degli ioni ed in particolare del cloruro. I farmaci modulatori agiscono aumentando la quantità della proteina CFTR sulle membrane cellulari (correttori come *tezacaftor* e *elzacaftor*) e la sua attività (potenziatori come *ivacaftor*) con benefici significativi in termini di funzionalità respiratoria, stato nutrizionale e qualità della vita. Tuttavia, se ad oggi le mutazioni note del gene CFTR sono più di 2000, le mutazioni per cui questi farmaci modulatori possono essere prescritte ne rappresentano circa il 60%. Ne deriva che molti pazienti con mutazioni rare non possano accedere alla cura. Il *theratyping* ha l'obiettivo di ricercare un modulatore che possa essere efficace per una specifica mutazione. Una metodica utilizzata in alcuni laboratori è la creazione dell'organoide da biopsie rettali del paziente. Gli organoidi sono strutture tridimensionali creati in vitro dopo stimolazione con matrice extracellulare, che offrono un modello molto accurato e personalizzato di malattia su cui testare i modulatori. La proteina CFTR è espressa sulla membrana apicale dell'organoide e l'incubazione con *forskolina*, aumentando la concentrazione di cAMP intracellulare, attiva nelle cellule sane (senza mutazione CFTR) il trasporto di cloro nel lume dell'organoide al quale si accompagna il trasporto dell'acqua, con conseguente rigonfiamento dell'organoide stesso (*swelling*). Il rigonfiamento è quantificato microscopicamente con l'immunofluorescenza. L'organoide che proviene dal paziente con FC non presenterà rigonfiamento nelle condizioni di coltura sopra descritte, ma potrà essere messo in incubazione con uno specifico farmaco modulatore, per poi quantificare la risposta della proteina CFTR in termini di rigonfiamento e in termini di trasporto di cloro nel modello bidimensionale delle camere di Ussing, che rappresentano una misura integrata del funzionamento dei vari trasportatori presenti sulla membrana epiteliale apicale e basolaterale, responsabili del trasporto transepiteliale di sostanze (van Mourik P., *et al.* Eur. Respir. J. 2019; 54(1):1802379). I risultati di questi esperimenti permettono di dimostrare l'efficacia di un modulatore su una particolare mutazione e di giustificarne il rilascio al paziente con mutazione rara come terapia continuativa.