

ARTICOLI ORIGINALI

# Il futuro della ricerca biologica nelle malattie renali croniche: la ricerca di sistema per la "System Nephrology"



**Rosanna Coppo**

*Nefrologia, Dialisi e Trapianto, AO Città della Salute e della Scienza di Torino*

## Introduzione

Le malattie renali vedono in un futuro non molto lontano l'applicazione della medicina di sistema, che adotta alla ricerca clinica ed alla medicina pratica l'approccio identificato ed applicato recentemente dagli scienziati ai sistemi biologici. Le malattie renali sono entità complesse, dove fattori genetici ed ambientali giocano un ruolo con molteplici attivatori e silenziatori variamente modulabili. La ricerca nefrologica di sistema ha lo scopo di integrare dati biologici e medici usando modelli matematici computerizzati, ponendo come punto iniziale le discipline emergenti (medicina molecolare, genomica, proteomica, bioinformatica, nanotecnologie), per trasferire le conoscenze scientifiche della ricerca di base alla pratica medica.

L'insufficienza renale cronica è un ottimo campo di lavoro per esercitare la ricerca della medicina di sistema, poiché nell'arco degli ultimi mezzo secolo sono stati compiuti avanzamenti conoscitivi formidabili, con una accelerazione ulteriore negli ultimi anni, che ora attendono di essere sistematizzati in nuove chiavi di lettura per ritornare al beneficio finale della cura del malato.

La perdita di funzione cronica dei reni ha trovato il corrispettivo anatomo-patologico con l'ampio utilizzo della biopsia renale, partendo dalle indagini morfologiche e permettendo l'identificazione di una vasta gamma di differenti danni renali prevalenti nelle diverse strutture renali, glomerulari, tubulo-interstiziali, vascolari. I meccanismi patogenetici individuati sulla base di modelli animali e di biomarkers hanno condotto ad una definizione specifica di ognuna di queste forme con presentazione ed evolutività differente. Ma quello che è emerso è la monotonia della progressione del danno cronico verso l'end stage renal disease, dove prevale la sclerosi glomerulare e la fibrosi interstiziale renale. Questi processi, stimolati da diversi fattori iniziali, proseguono su vie comuni e verso l'esito finale di perdita della funzione renale con necessità di trattamento sostitutivo dialitico o trapianto d'organo per avere la sopravvivenza del soggetto ammalato. Un intervento in fase tardiva è certamente povero di aspettative di successo. Dopo il successo degli inibitori del sistema renina-angiotensina, che tuttavia non impedisce la perdita di funzione renale nel lungo tempo, l'interesse della ricerca e della terapia si è spostato verso le fasi più precoci del danno renale, dove le possibilità di successo possono essere maggiori.

Molte domande rimangono senza risposta, quali le interazioni fra danno a podociti, cellule mesangiali o endoteliali, o il rapporto temporale fra danno glomerulare e tubulo-interstiziale. Uno dei biomarker più utilizzato è la proteinuria, ma è chiaramente non generalizzabile ad ogni condizione e troppo poco sensibile. Nuovi biomarkers hanno applicazione limitata e valore clinico non provato su larga scale. Per cercare una risposta a questi quesiti la ricerca non può prescindere dal considerare non un parametro o pochi biomarkers alla volta, ma tentare un approccio alla comprensione del network di interazione fra vari compartimenti in cross-talk. La biologia di sistema (System Biology) [1] (full text) [2] [3] (full text) cerca di arrivare ad una analisi di questi network regolatori in modo temporale e spaziale. Solo a completamento di queste conoscenze si potrà arrivare a biomarkers affidabili per diagnosi e trattamento, personalizzati al paziente come entità individuale. Questa è la sfida della ricerca nefrologica del prossimo futuro.

Con l'avvento delle tecnologie di ultima generazione per il sequenziamento genico e il genome-wide analysis (GWAS), è possibile identificare dei percorsi (pathways) principali che conducono a fenotipi differenti di una stessa entità nosologica. Questo approccio permette anche di valutare la variante genomica nell'ambito di situazioni ambientali particolari.

La forza di impatto della ricerca nefrologica di sistema che si sta sviluppando è la capacità di misurare contemporaneamente multiple entità, geni, fattori trascrizionali, proteine trascritte, prodotti di metabolismo, che determinano cambiamenti in un grande numero di componenti e interazioni tali da consentire una visione complessiva di una condizione di malattia nei confronti di soggetti sani o di una stessa malattia in fasi cliniche differenti. Per permettere questa visione d'insieme è necessario disporre di grandi data-base che organizzano i risultati a vari livelli di regolazione, classificati come "omics": genomica, epigenomica, trascrittomica, proteomica, kinomica, metabolomica.

## Genomica

Gli studi di genome-wide association (GWAS) e le analisi di linkage correlate hanno fortemente contribuito al progresso della ricerca nefrologica negli ultimi anni e ne rappresentano il vicino futuro [4] (full text). Questi studi, analizzando la frequenza alleliche o la presenza di aplotipi, sono stati applicati con successo a malattie renali croniche quali la nefropatia diabetica [5] (full text), la nefrite a depositi IgA [6] (full text), la glomerulosclerosi focale e segmentaria [7], mostrando che alcuni loci hanno un effetto su molti tratti delle malattie renali, anche se solo pochi hanno rilevato, al momento attuale delle conoscenze, effetti importanti. Per la maggior parte delle malattie renali indagate la somma degli effetti genici identificati ricopre molto meno del 50% della ereditabilità globale.

Per migliorare i risultati di GWAS la via più promettente è quella di integrare questi risultati con le conoscenze di funzione biologica dei geni, utilizzando la biologia di sistema. Un approccio molto interessante è ricercare loci genomici le cui varianti geniche influenzano l'espressione di altri geni, definito come mappatura del locus regolatore del tratto genico (eQTL) [8]. Anche se il costo e la possibilità di applicazione clinica dello studio di tutto il genoma con metodiche di sequenziazione di seconda generazione sta rendendo possibili indagini di questo livello, tecniche limitate alla sequenza di esoni o trascrittomi possono essere più facilmente applicate dove sia stato identificato il gene causale o l'esone interessato, che rappresenta solo l'1% del genoma, con possibilità quindi di risultati più rapidi ed a minor costo.

## Trascrittomica

Si tratta dell'analisi dell'espressione di mRNA su scala genome-wide [9]. Le modificazioni dell'mRNA sono misurabili con tecnologie microarray, pian piano sostituite da attrezzature RNA-sequenziatrici. Analisi di espressione di mRNA con tecniche di micro chips in tessuti biotici di malati con insufficienza renale evolutiva ha rivelato un panorama molto complesso, con mRNA codificanti per proteine relative a infiammazione, attivazione del complemento e della coagulazione, riparazione del danno tissutale, apoptosi, che sono catalogate in aggregazioni ierarchiche in base alle funzioni biologiche e pathways canonici. Alcune vie erano attese, altre inattese ed in fase di approfondimento. Interessanti sono i tentativi di identificare il fingerprint trascrittomico differenziante fasi di attività o remissione delle malattie renali croniche. Studi nella nefropatia diabetica, nel lupus e nella glomerulosclerosi focale hanno aperto prospettive di diagnosi precoce, predizione di prognosi, e risposta alla terapia. Le limitazioni sono tuttavia grandi, soprattutto per la complessità del tessuto renale e per la variabilità genomica dei campioni testati. Si è tentato di dissezionare i componenti (podociti, cellule mesangiali, tubulari ecc) ma con scarsi risultati per la difficoltà di differenziare pattern specifici per ogni tipo cellulare. Inoltre esiste un limite cruciale: le modificazioni dei livelli di mRNA non riflettono sempre cambiamenti delle proteine o della funzione di queste proteine proprio per i vari livelli di regolazione fra trascrizione e sintesi proteica e per le modificazioni post-trascrizionali successive. I network trascrizionali possono essere alterati nelle malattie renali croniche. Un approccio interessante è costituito dall'utilizzo di immunoprecipitazione di cromatina (ChIP) [10] combinata con la trascrittomica, che identificano i siti di legame dei trascrittomi e li correlano con l'espressione genica, fornendo una identificazione dei network regolatori trascrizionali, con risultati interessanti ad esempio nella nefropatia diabetica.

## Epigenetica

Modificazioni covalenti della cromatina o delle proteine associate, quali acetilazioni di istoni o metilazione di DNA, alterano l'espressione finale genica [11]. Questi processi sono stati correlati alla attivazione dei fibroblasti renali ed alla progressione della fibrosi interstiziale. Modificazioni epigenetiche possono fare da ponte fra stimoli ambientali e espressione genica e la biologia di sistema applicata alla nefrologia integra la metilazione del DNA nel profilo genico [12].

## Micro RNA

MicroRNA (miRNA) sono una categoria di RNA piccoli e non codificanti che regolano molti processi biologici. Anche la rete di miRNA, applicazione recente della medicina di sistema, sta fornendo risultati di grande interesse in molte malattie renali croniche [13] (full text). Nella progressione del danno renale Dicer, un enzima che converte pre-mi RNA in piccoli RNA interferenti, sono stati identificati in topi che sviluppavano proteinuria e insufficienza renale progressiva [14] (full text) altri miRNA si esprimono in condizioni di ischemia-riperfusion [15] (full text) e regolano il TGF beta nello sviluppo di fibrosi renale [16] (full text). Un miRNA molto interessante è il miR-21 che pare avere un ruolo di protezione dell'epitelio tubulare dalla morte [17]. L'espressione del profilo di miRNA rappresenta un campo di studio futuro molto interessante, per la stabilità nei campioni biologici, comprese le urine, poiché sono protetti da RNAsi endogene. Inoltre la natura tessuto-specifica dei miRNA li rende potenziali ottimi candidati per essere bionarkers affidabili.

## Proteomica

La proteomica è cresciuta moltissimo nella ricerca delle malattie renali e ha identificato promettenti biomarkers per malattia renale acuta e cronica [18]. Nello stesso tempo si sono delineati problemi più importanti di quanto ipotizzato. Molti studi hanno tentato l'identificazione di un unico marcatore, ma il successo è stato scarso per la complessità della patofisiologia delle malattie renali. Lo sviluppo di sistemi classificativi basati su gruppi di biomarkers correlati sarà probabilmente più informativo. Molti problemi metodologici sono tuttavia ancora limitanti: la necessità tecnica di rimuovere i sali e concentrare le proteine possono alterare i risultati che spesso non sono confrontabili. E' indispensabile standardizzare la metodica che di per sé è sensibile a molti fattori esogeni.

## Metabolomica

Queste informazioni completano quelle della proteomica, perché selezionano i processi attivi di metabolismo e ne studiano i prodotti correlandoli ai pathways di attivazione [19]. È indispensabile un approccio integrato. Lo stadio di sviluppo è precoce, ma interessante soprattutto per il rigetto renale e la malattia acuta renale.

## Analisi di computerizzazione avanzata

La scienza di analisi statistica è fondamentale per la biologia di sistema, perché da un concetto di correlazione statistica si passa ad analisi di tipologie di network, modelli dinamici di funzioni biochimiche e fisiologiche, modelli multiscala dinamici con organizzazione dei risultati in differenti stratificazioni di regolazione [20] (full text). I cluster identificati sono correlati a funzioni biologiche e a geni regolatori. Si tratta di un'area nuova che deve trasformare le informazioni in conoscenza. Il primo gradino è integrare i network in processi meccanicistici di patogenesi. E' necessario usare un approccio sistemico per stabilire i rapporti fra i molteplici indicatori clinici e i dati omici, per costruire una mappa di interazione genotipo-fenotipo. I network possono essere analizzati con algoritmi di aggregazione, servire come biomarkers di malattia e soprattutto i componenti possono rappresentare un target terapeutico [21]

## Farmacologia di sistema

Nella pratica attuale nefrologica la diagnosi, il piano terapeutico e la predizione della progressione della malattia renale sono basate su un numero molto limitato di parametri clinici ed istologici. I dati non permettono di distinguere ulteriormente situazioni cliniche talora simili ma con prognosi molto differente. Le opzioni terapeutiche per le malattie renali sono al momento piuttosto limitate con steroidi ed immunosoppressori come farmaci di maggior utilizzo da decenni. La farmacologia di sistema può essere una via del futuro per malattie complesse come le nefropatie: essa parte dalla identificazione di target farmacologici come parte del network che controlla la risposta fisiologica. Questo approccio è molto utile non solo per identificare i possibili effetti terapeutici di un farmaco ma anche i possibili eventi avversi conseguenti all'uso. I farmaci possono essere sottoposti ad una validazione simulata al computer usando modelli dinamici per determinare i diversi effetti di un farmaco in condizioni genetiche o funzionali predefinite [22].

## Conclusioni

La ricerca del futuro in Nefrologia si sta orientando nella integrazione delle informazioni dei complessi network cellulari in scala genome-wide, sia per definire le potenzialità di progressione di casi individuali che gli approcci terapeutici personalizzati. Le analisi integrate degli "omics" derivati da genoma, trascrittoma, proteoma, e metaboloma sono il primo gradino per realizzare una visione sistemica dei processi cellulari. Questi dati devono poi essere integrati nei parametri clinici del paziente e nella farmacogenomica.

La finalità della ricerca di sistema in Nefrologia è identificare markers precoci affidabili per la diagnosi molecolare e la predizione della progressione della malattia renale nel caso individuale. La grande variabilità e complessità dei sistemi coinvolti rende indispensabile un salto di qualità della ricerca: sono necessari grandi numeri, con pazienti con nefropatie differenti e in fase diversa di malattia. E' indispensabile una collaborazione mondiale fra medici, epidemiologi, biologi molecolari, statistici e scienziati con basi di conoscenze matematiche e di computer.

È una visione diversa della ricerca, dove data-base internazionali hanno il primo posto e dove solo l'integrazione e la collaborazione saranno vincenti. Questa è la sfida del futuro della ricerca Nefrologica. Come tutte le cose inimmaginabili un decennio or sono, si avvererà.

---

## Bibliografia

- [1] Echouffo-Tcheugui JB, Kengne AP Risk models to predict chronic kidney disease and its progression: a systematic review. *PLoS medicine* 2012;9(11):e1001344 (full text)
- [2] Garcia CD, Henry CS Direct detection of renal function markers using microchip CE with pulsed electrochemical detection. *The Analyst* 2004 Jul;129(7):579-84
- [3] Stranger BE, Stahl EA, Raj T et al. Progress and promise of genome-wide association studies for human complex trait genetics. *Genetics* 2011 Feb;187(2):367-83 (full text)
- [4] Witasp A, Nordfors L, Carrero JJ et al. Genetic studies in chronic kidney disease: interpretation and clinical applicability. *Journal of nephrology* 2012 Nov-Dec;25(6):851-64 (full text)
- [5] Pezzolesi MG, Poznik GD, Mychaleckyj JC et al. Genome-wide association scan for diabetic nephropathy susceptibility genes in type 1 diabetes. *Diabetes* 2009 Jun;58(6):1403-10 (full text)
- [6] Kiryluk K, Li Y, Sanna-Cherchi S et al. Geographic differences in genetic susceptibility to IgA nephropathy: GWAS replication study and geospatial risk analysis. *PLoS genetics* 2012;8(6):e1002765 (full text)
- [7] Kopp JB, Smith MW, Nelson GW et al. MYH9 is a major-effect risk gene for focal segmental glomerulosclerosis. *Nature genetics* 2008 Oct;40(10):1175-84
- [8] Papeta N, Chan KT, Prakash S et al. Susceptibility loci for murine HIV-associated nephropathy encode trans-regulators of podocyte gene expression. *The Journal of clinical investigation* 2009 May;119(5):1178-88
- [9] Martini S, Eichinger F, Nair V et al. Defining human diabetic nephropathy on the molecular level: integration of transcriptomic profiles with biological knowledge. *Reviews in endocrine & metabolic disorders* 2008 Dec;9(4):267-74
- [10] Wold B, Myers RM Sequence census methods for functional genomics. *Nature methods* 2008 Jan;5(1):19-21
- [11] Mohtat D, Susztak K Fine tuning gene expression: the epigenome. *Seminars in nephrology* 2010 Sep;30(5):468-76
- [12] Bechtel W, McGoohan S, Zeisberg EM et al. Methylation determines fibroblast activation and fibrogenesis in the kidney. *Nature medicine* 2010 May;16(5):544-50
- [13] Ho J, Ng KH, Rosen S et al. Podocyte-specific loss of functional microRNAs leads to rapid glomerular and tubular injury. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2008 Nov;19(11):2069-75 (full text)
- [14] Shi S, Yu L, Chiu C et al. Podocyte-selective deletion of *dicer* induces proteinuria and glomerulosclerosis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2008 Nov;19(11):2159-69 (full text)
- [15] Godwin JG, Ge X, Stephan K et al. Identification of a microRNA signature of renal ischemia reperfusion injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010 Aug 10;107(32):14339-44 (full text)
- [16] Wang B, Herman-Edelstein M, Koh P et al. E-cadherin expression is regulated by miR-192/215 by a mechanism that is independent of the profibrotic effects of transforming growth factor-beta. *Diabetes* 2010 Jul;59(7):1794-802 (full text)
- [17] Lorenzen JM, Haller H, Thum T et al. MicroRNAs as mediators and therapeutic targets in chronic kidney disease. *Nature reviews. Nephrology* 2011 May;7(5):286-94

[18] Hoorn EJ, Hoffert JD, Knepper MA et al. The application of DIGE-based proteomics to renal physiology. *Nephron. Physiology* 2006;104(1):p61-72

[19] Fiehn O Metabolomics--the link between genotypes and phenotypes. *Plant molecular biology* 2002 Jan;48(1-2):155-71

[20] Lachmann A, Ma'ayan A Lists2Networks: integrated analysis of gene/protein lists. *BMC bioinformatics* 2010 Feb 12;11:87 (full text)

[21] Perco P, Mühlberger I, Mayer G et al. Linking transcriptomic and proteomic data on the level of protein interaction networks. *Electrophoresis* 2010 Jun;31(11):1780-9

[22] Onuigbo MA CKD Express © - A New IT-Software Proposed for a Paradigm Change in CKD Care. *The open medical informatics journal* 2012;6:26-7