

Metabolomica: biochimica e genetica si incontrano

Martina Collotta

Candiolo Cancer Institute - FPO, Torino

In questa ultima puntata del nostro viaggio alla scoperta delle scienze omiche guarderemo all'omica che sembra abbracciare tutte le altre: la metabolomica. I contributi di genomica, epigenomica, trascrittomica e proteomica, insieme allo studio globale dei metaboliti cellulari, portano nuovi frutti alla ricerca se interconnessi tra loro. Andiamo verso l'interattomica, lo studio della totalità delle interazioni molecolari che avvengono in un organismo e le premesse sono le singole omiche fino a ora affrontate, insieme con la metabolomica che andremo ora ad approfondire.

Una rete di interazioni metaboliche per descrivere la cellula

Genoma, trascritti e infine proteine. Nella cellula tutto è ora pronto per dare il via ai processi metabolici, dai più semplici ai più complessi, da quelli comuni a tutte le cellule a quelli specifici per ciascun tipo cellulare. Sono proprio i metaboliti prodotti, sia quelli finali, sia quelli che costituiscono le tappe intermedie dei *pathway* metabolici, a dare alle cellule un'impronta biochimica unica, traccia eloquente dei processi in esse avvenuti.

La **metabolomica** si occupa proprio dello studio di queste tracce, attraverso lo studio sistematico delle “impronte biochimiche” lasciate dai processi metabolici intracellulari e costituiti dai metaboliti stessi.

L'insieme dei metaboliti, le piccole molecole presenti in una cellula (o per esteso, in un tessuto, organo od organismo), è chiamato **metaboloma**. Per piccole molecole, intendiamo quelle inferiori a 1 kDa (o 1,5 kDa, a seconda della tecnica di analisi utilizzata), ovvero si escludono, ad esempio, le catene amminoacidiche e i polisaccaridi, mentre si analizzano approfonditamente secondi messaggeri e molecole di segnalazione intercellulare. In genere, quando si parla di metaboloma, ci si riferisce ai prodotti finali di un processo biochimico, ma la presenza dei metaboliti cosiddetti intermedi, è di fondamentale importanza per riconoscere le tappe che costituiscono il *pathway* metabolico stesso.

Abbiamo parlato di impronte e di tracce, ma possiamo paragonare la metabolomica anche a un'istantanea della cellula che ci dice cosa essa sta facendo, in quale fase del ciclo cellulare si trova, se sta affrontando una situazione di stress o se sta svolgendo il suo ruolo fisiologico indisturbata.

Integrare genomica, trascrittomica, proteomica e metabolomica, è l'ambiziosa via che la biologia dei sistemi si propone di percorrere per dare un nuovo volto alla biologia molecolare. Proprio per questo ambizioso scopo, si parla già di **interattomica**, ovvero dello studio delle interazioni molecolari di una cellula, tessuto od organismo, a livello sistemico. Descrivere la cellula (o il tessuto o l'organismo) come una rete, un *network*, di complesse interazioni biochimiche, rappresenterebbe il risultato finale delle conquiste di una nuova biologia capace di descrivere, dettagliare e comprendere, la dinamica metabolica delle cellule.

Una scienza più vecchia di quanto si pensi

Non lasciamoci ingannare dal suffisso *-omica*: la metabolomica è una scienza vecchia quanto quella medica! Fin dai tempi di Ippocrate e della sua medicina degli umori, l'analisi, per quanto intuitiva, della composizione dei fluidi corporei veniva utilizzata come strumento di diagnosi; lo stesso avveniva in epoca medievale, quando l'antenata della moderna analisi delle urine, permetteva di comprendere molto dello stato di

salute del paziente (assaggiare le urine per sapere se erano dolci, altro non era che una primitiva diagnosi di diabete!).

Sembra dunque che la medicina abbia trovato nei metaboliti organici un'utile risorsa per la diagnosi delle più diverse malattie, ben prima dello studio analitico degli stessi. Ora sembra quasi di dover fare lo sforzo contrario, cercare di capire come ricavare un utile clinico da un'apparentemente sterile analisi biochimica, ma questo rapido sguardo al passato può aiutarci a comprendere che il maggiore dettaglio ottenuto ora dalla biologia molecolare, non è altro che una ricchezza in più che si aggiunge a un millenario patrimonio di conoscenze di metabolomica.

Il concetto di **profilo metabolico** risale agli anni '40 e fa riferimento al pattern di metaboliti caratteristico di ciascun individuo, presente nei fluidi corporei facilmente analizzabili come urina e saliva. Roger Williams introdusse tale concetto nel corso dei suoi studi sulla schizofrenia, condotti attraverso cromatografia. Erano gli albori della metabolomica e, ancora, non esistevano mezzi per un'analisi quantitativa dei metaboliti. Il passaggio dal qualitativo al quantitativo, avvenne negli anni '70 grazie alla combinazione di gas cromatografia e spettrometria di massa, a opera di Horning, Pauling e Robinson. Negli stessi anni, l'utilizzo della risonanza magnetica nucleare (RMN) per analisi spettroscopiche, introdotto già negli anni '40, venne applicato anche allo studio dei metaboliti presenti nei campioni biologici.

Le analisi metabolomiche che sfruttano tecniche spettroscopiche e RMN si susseguono, grazie agli avanzamenti tecnologici che hanno raffinato e potenziato le tecnologie note dall'inizio del secolo. I dati raccolti si moltiplicano e, nel 2005, nasce un primo database online per la raccolta di dati di metabolomica umana, METLIN. Nel giro di dieci anni, da 10.000 metaboliti descritti, si passa a 240.000. Nel 2007 lo **Human Metabolome Project**, guidato da un'équipe canadese, completa una prima bozza del metaboloma umano che, nelle interazioni, include anche farmaci e alimenti. Anche per diverse specie animali e vegetali nascono analoghi progetti. Lo *Human Metabolome Database* (www.hmdb.ca) contiene dati circa più di 40.000 metaboliti, analizzati tramite procedure standardizzate; i dati sono raccolti attraverso una periodica revisione della letteratura scientifica e in costante aggiornamento. È facile intuire che tale database è ben lungi dall'essere completo, data la complessità biochimica dell'organismo umano.

Metabolomica e metabonomica

La metabolomica si intreccia con la metabonomica, sottile gioco di parole per indicare due aspetti complementari di un medesimo studio. La **metabonomica** si occupa degli aspetti quantitativi dell'analisi dei metaboliti, in particolare cerca di individuare delle leggi (dal greco *nomos*) che possano descrivere i cambiamenti dinamici che avvengono a livello del metaboloma studiato che, come abbiamo detto, varia continuamente nel tempo.

Non tutti sono unanimi nel definire così la metabonomica. Alcuni studiosi intendono con tale termine la disciplina che si occupa della caratterizzazione del profilo metabolico includendo anche perturbazioni esterne (come dieta, farmaci, sostanze tossiche), lasciando alla metabolomica lo studio del metabolismo endogeno, senza interventi dall'esterno. L'influenza della stessa microflora intestinale sarebbe, secondo chi condivide tale distinzione, ambito di studio della metabonomica.

Quello che possiamo dire è che, comunque, quando si studiano la fisiologia e la patologia umane, la distinzione tra le due omiche

sfuma. È importante descrivere in qualitativa, così come è importante quantificare e cercare norme parametriche; è importante descrivere la fisiologia dell'organismo, non turbato da nulla, per conoscere le condizioni di partenza, così come è importante conoscere gli effetti di quello che dall'esterno può influire su di esso.

Metodi di analisi in metabolomica

Senza entrare in dettagli troppo tecnici, andiamo ora a vedere quali sono le principali tecniche per l'analisi del metaboloma, al fine di comprendere le difficoltà tecniche che impediscono il rapido sviluppo di questa nuova scienza.

Lo scopo di ognuno dei metodi analitici usati in metabolomica, è riconoscere i metaboliti presenti in una miscela molto complessa che può essere, almeno in parte, depurata da alcuni metaboliti noti, al fine di semplificarne l'analisi. Dopo questo step, peraltro non sempre effettuato, è necessario passare alla separazione dei differenti metaboliti al fine di una loro successiva identificazione.

Come descritto in precedenza, le tecniche di **cromatografia**, singolarmente e, soprattutto, in combinazione con la spettrometria di massa, sono le più utilizzate. L'**elettroforesi capillare** è, infine, un'altra delle tecniche di separazione utilizzate.

L'ultima fase è quella dell'identificazione dei singoli metaboliti e avviene principalmente attraverso l'ausilio della **spettrometria di massa**, capace di risalire al metabolita a partire dal suo caratteristico spettro. La **spettroscopia RMN**, invece, non necessita della fase di separazione precedentemente descritta, e ha il vantaggio di identificare i vari metaboliti in modo relativamente semplice e riproducibile, lamentando, tuttavia, una sensibilità inferiore rispetto alla spettrometria di massa.

I dati raccolti, infine, sono sottoposti ad analisi statistiche e bioinformatiche (Fig. 1).

Problemi e limiti delle analisi metabolomiche

Il metaboloma cellulare è dinamico, cambia istante per istante, con l'avanzare di un processo biochimico, l'interromper-

si di uno prima in corso, l'iniziare di uno nuovo. È proprio questa rapida evoluzione a rendere difficile l'analisi metabolomica. Attualmente, nonostante nel 2015 sia stata introdotta una tecnica di metabolomica *real-time*, non è ancora possibile analizzare l'intero *range* di metaboliti attraverso un singolo metodo analitico.

Per facilitare le analisi metabolomiche, si scelgono fluidi corporei accessibili in maniera non o poco invasiva (urine, saliva e sangue), in modo tale che la facilità e la rapidità di raccolta, possa migliorare i parametri di risoluzione temporale richiesti per descrivere processi che cambiano istantaneamente.

Il limite e il vantaggio, dipende dall'analisi che si intende condurre, dell'analisi dei fluidi corporei, sta nella loro descrizione dell'organismo come un tutto, rendendo impossibile la descrizione tessuto per tessuto, ma riflettendo in maniera fedele l'equilibrio dinamico del nostro corpo.

Applicazioni cliniche e non

Le applicazioni della metabolomica riguardano diversi campi, più o meno strettamente collegati con la pratica clinica (Fig. 2).

Partendo dalla ricerca di base, la **genomica funzionale** si avvale dei risultati della metabolomica per comprendere l'impatto di una mutazione genetica sul metabolismo cellulare. Ancor più interessante è la possibilità di comprendere la funzione di un gene sconosciuto, confrontandolo i diversi pattern metabolici che si hanno in caso di mutazioni di un gene noto. Questo, ovviamente, risulta più facile a livello di elementari organismi modello, ma non si esclude che, in futuro, sia possibile condurre efficienti analisi anche nell'uomo.

La **metabologenomica** si propone di integrare i dati della metabolomica e della genomica attraverso la correlazione tra *pathway* di sintesi simili (identificati attraverso analogie tra i geni codificanti enzimi) per identificare metaboliti ignoti.

La **nutrigenomica** abbraccia tutte le omiche, fino alla metabolomica inclusa, e guarda all'interazione tra fattori endogeni ed esogeni che differenziano il metabolismo alimentare nei diversi individui. Recentemente si è incominciato a parlare molto di microbioma intestinale: questo rappresenta solo una delle tante

variabili che la nutrigenomica studia per comprendere le variazioni di metaboloma organico, in seguito a un determinato schema nutrizionale.

Anche la **tossicologia** si avvale degli avanzamenti della metabolomica: identificare la presenza di un composto chimico o di un metabolita tossico (ad es. di un farmaco) nel sangue o nelle urine dell'individuo, è una delle applicazioni più comuni. Gli effetti di una funzionalità renale o epatica alterata sul metabolismo del composto stesso, possono essere ricavati dall'analisi dei metaboliti presenti nei fluidi biologici. L'analisi metabolomica, non solo permette di identificare i cambiamenti biochimici, anche precoci, associati con la nefrotossicità (da farmaci o da inquinanti), ma anche quelli che sono spia di situazioni patologiche ancora asintomatiche e questo riguarda ogni ambito della clinica.

L'insorgere di una patologia neoplastica, perfino nelle fasi iniziali di latenza clinica, si associa ad alterazioni del metaboloma che potrebbero essere utilizzate ai fini della diagnosi precoce. Lo stesso vale per le dislipidemie e le malattie cardiovascolari, negli stadi che precedono l'evidenza della sintomatologia, per non parlare delle malattie neurodegenerative come Alzheimer, Parkinson e SLA, in cui la diagnosi è molto spesso tardiva.

Bibliografia di riferimento

Bino RJ, Hall RD. *Potential of metabolomics as a functional genomics tool.* Trends in Plant Science 2004;9:418-25.
 Dunn WB, Ellis DI. *Metabolomics: current analytical platforms and methodologies.* Trends in Analytical Chemistry 2005;24:285-94.
 Kitano H. *Systems biology: a brief overview.* Science 2002;295:1662-4.
 Lodish H, Berk A. *Molecular cell biology.* 5th ed. New York: WH Freeman and Company 2004.

FIGURA 1.

La ricerca in metabolomica. Il primo passo è la raccolta del campione, solitamente un fluido biologico come sangue, urina o saliva. Successivamente i metaboliti vengono estratti a partire dal campione purificato e analizzati mediante tecniche di separazione e di identificazione degli stessi. La quantificazione dei metaboliti permette di eseguire analisi statistiche alla base della successiva elaborazione bioinformatica dei risultati e, infine, della correlazione biologica con il fenomeno studiato.



FIGURA 2.

Principali applicazioni della metabolomica. Nell'immagine alcune delle applicazioni della metabolomica, precliniche e cliniche.

