

Lo studio

In uno studio intitolato “**Reduced cyclin D3 expression in erythroid cells protects against malaria**”, pubblicato oggi online su Nature, Marini et al. riportano la scoperta di un nuovo fattore genetico che conferisce resistenza alla malaria. Gli autori forniscono evidenze sperimentali che una particolare variante della sequenza del DNA, rs112233623-T, sia associata alla ridotta produzione della proteina ciclina D3, e che questa protegga dalla malaria grave e influenzi alcune caratteristiche chiave dei globuli rossi, detti anche eritrociti. I meccanismi coinvolti in questa protezione sono stati identificati nello studio e i ricercatori ipotizzano che questo possa essere utile per lo sviluppo di un nuovo approccio terapeutico per il trattamento della malaria e la prevenzione della sua trasmissione.

Più specificamente, gli autori hanno dimostrato che la presenza della variante rs112233623-T, determina una modifica della sequenza del DNA che interrompe il sito di legame del fattore di trascrizione SMAD3. I fattori di trascrizione sono proteine specializzate che regolano l'espressione genica legandosi a specifiche sequenze regolatorie nel DNA, come quelle presenti in potenziatori dell'espressione genica chiamati “*enhancer*”, attivando o disattivando così i geni. L'incapacità di SMAD3 di legarsi al suo sito in un *enhancer* specifico dei precursori degli eritrociti, noti come eritroblasti, a causa della variante rs112233623-T indebolisce l'attività di quell'*enhancer*. Ciò, in base alle evidenze sperimentali fornite da Marini et al, riduce l'espressione del gene *CCND3* e, di conseguenza, la produzione della proteina ciclina D3 in queste cellule. La ciclina D3 è una proteina fondamentale per la regolazione del ciclo cellulare, il processo che consente alle cellule di dividersi e moltiplicarsi.

La sua riduzione associata alla presenza della variante rs112233623-T si traduce nell'inibizione del ciclo cellulare che diminuisce il numero di divisioni cellulari

durante lo sviluppo degli eritroblasti, spiegando così perché la variante rs112233623-T sia associata a eritrociti meno numerosi e più grandi e ad un aumento di particolari emoglobine come la HbA2 e la HbF.

La variante rs112233623-T è molto più comune in Sardegna che altrove. Per comprendere le ragioni di questa elevata frequenza, gli autori hanno quindi utilizzato particolari metodi di genetica di popolazione per stabilire se la maggiore frequenza della variante in Sardegna fosse dovuta ad una forza evolutiva nota come selezione positiva - per cui una variante genetica vantaggiosa aumenta di frequenza all'interno di una popolazione nel corso delle generazioni grazie al vantaggio riproduttivo che offre - o se per converso l'alta frequenza di rs112233623-T in Sardegna potesse essere meglio spiegata da meccanismi demografici legati al caso nelle fasi iniziali del popolamento della Sardegna. La loro analisi con diversi test specifici ha fornito prove convergenti che ci sia stata una selezione positiva della variante rs112233623-T nella storia genetica della popolazione sarda, portando gli autori a ipotizzare che la malaria, un tempo molto diffusa in Sardegna, sia stata una plausibile pressione selettiva per l'incremento in frequenza di rs112233623 in questa popolazione.

Per verificare sperimentalmente un possibile effetto protettivo di rs112233623-T contro la malaria grave, gli autori hanno quindi infettato con *Plasmodium falciparum*, il principale agente patogeno della malaria, colture di eritrociti provenienti da volontari selezionati per avere questa variante genetica o la sequenza genica di base, detta anche “wild type”, nonché altre varianti genetiche di interesse, che sono state confrontate tra di loro valutando *in vitro* i livelli di parassitemia. Ciò è stato reso possibile grazie all'alta frequenza di rs112233623-T in Sardegna e dalla disponibilità di una biorisorsa di migliaia di individui con profilo genetico noto che fanno parte dello studio di popolazione SardiNIA. Tale studio di popolazione, diretto dal prof. Cucca si svolge da 25 anni in 4 paesi dell'Ogliastra e ha generato oltre 200 lavori scientifici molti dei

quali sulle principali riviste internazionali. Grazie agli esperimenti effettuati a partire dai volontari dello studio SardiNIA, gli autori hanno quindi scoperto che nei globuli rossi degli individui portatori della variante CCND3 rs112233623-T si verificava una marcata inibizione dello sviluppo del *Plasmodium*, che alla fine portava alla morte del parassita.

Hanno anche riscontrato che la compromissione della crescita dei parassiti era correlata in maniera molto significativa con un aumento sostanziale dei livelli di specie reattive dell'ossigeno (ROS) in queste cellule (molecole che inducono stess ossidativo nelle cellule).

Hanno anche osservato che un'inibizione simile della crescita dei parassiti, anch'essa correlata all'aumento dei livelli di ROS, si vedeva nei globuli rossi di individui con deficit di G6PD, una condizione associata da tempo alla protezione contro la malaria

Questi risultati suggeriscono l'esistenza di un meccanismo comune di resistenza alla malaria basato sull'aumento dei ROS nei globuli rossi.

Il forte effetto inibitorio della variante rs112233623-T sulla parassitemia *in vitro*, insieme alle prove di selezione positiva in popolazioni con una lunga storia di malaria endemica, suggerisce che la variante abbia un forte effetto protettivo contro la malaria grave, che è intrinsecamente associata ad alti livelli di parassitemia.

Inoltre, questo meccanismo di difesa previsto contro la malaria grave non solo converge sullo stesso percorso patogenetico del deficit di G6PD, ma è anche uno dei principali meccanismi d'azione proposti per i farmaci antimalarici più comunemente usati, tra cui le chinoline, l'atovaquone, l'artemisinina e i suoi derivati.

È stato dimostrato che tutti questi farmaci aumentano lo stress ossidativo a livelli che compromettono i parassiti della malaria, causando danni ai componenti cellulari, tra cui lipidi, proteine e DNA, e infine la morte cellulare.

Gli autori hanno anche ipotizzato un secondo meccanismo di protezione dall'anemia grave da malaria dovuto alla ridotta espressione di CCND3 nel midollo osseo correlata al rs112233623-T. Questo sito anatomico rappresenta la nicchia preferita per lo sviluppo dei gametociti di *P. falciparum*, e in precedenti studi è stato segnalato che il parassita, per consentire il completamento degli stadi necessari per la sua gametocitogenesi, rilascia sostanze in grado di determinare un ritardo nello sviluppo degli eritroblasti, causando un'eritropoiesi inefficiente e contribuendo all'anemia osservata nell'ospite durante l'infezione malaria.

Il numero inferiore di divisioni degli eritroblasti riportato quando l'espressione della ciclina D3 è ridotta potrebbe quindi contrastare questo ritardo nella differenziazione degli eritroblasti, migliorando l'eritropoiesi. Questo effetto legato alla ridotta espressione della ciclina D3 potrebbe anche impedire la maturazione sessuale del parassita, ostacolando così la trasmissione della malattia.

Sulla base di queste evidenze i risultati riportati da Marini et al. potrebbero avere importanti implicazioni terapeutiche, in quanto forniscono una giustificazione razionale per inibire la ciclina D3 il più presto possibile durante l'infezione parassitaria. L'inibizione della ciclina D3, inserite nelle terapie combinate a base di artemisinina potrebbe quindi aiutare a trattare l'anemia durante l'infezione da malaria, e ridurre la sua trasmissione e il carico di malattia nei paesi in cui questa malattia è ancora presente.

Il contesto

La malaria rappresenta ancora un grave problema sanitario in alcune aree dell'Africa, dell'Asia e del sud America, causando oltre 600.000 decessi ogni anno, la maggior parte dei quali sono bambini. La gravità clinica della malaria può variare notevolmente tra i soggetti infetti, ma i meccanismi alla base di queste differenze di severità rimangono poco chiari. E sebbene molti dei farmaci esistenti siano rivolti a inibire direttamente i parassiti malarici, questi presentano una serie di limitazioni, in particolare l'emergere di resistenza ai farmaci in uso. Migliorare la nostra comprensione dei meccanismi che proteggono dalla malaria e ne riducono la gravità in alcuni individui potrebbe aiutarci a identificare le molecole e i meccanismi dell'ospite che possono essere modulati terapeuticamente per riprodurre gli effetti antimalarici osservati in coloro che sono protetti e, integrare i farmaci diretti contro il parassita. La genetica, in particolare quella che influenza lo sviluppo dei globuli rossi (eritrociti), può svolgere un ruolo importante in questo senso. I globuli rossi sono fondamentali nella biologia della malaria, poiché sono le cellule ospiti dei parassiti *Plasmodium* che causano la malaria durante la fase sintomatica della malattia nel sangue. In questa fase, i parassiti invadono e rimodellano queste cellule, finendo per distruggerle e causando anemia. Diverse forme ereditarie della sequenza del DNA, note come varianti genetiche, associate allo sviluppo dei globuli rossi sono quindi potenziali punti di attacco per comprendere i meccanismi che proteggono dall'anemia grave, la principale causa di morte durante l'infezione da malaria. Una di queste varianti, l'allele T di rs112233623, è stata precedentemente associata grazie a studi genetici sull'intero genoma con un aumento dei livelli della emoglobina HbA2 e a con un numero minore di eritrociti e con un loro maggiore volume. Non sono mai stati segnalati effetti di questa variante o di altre nella stessa regione genica sulla gravità della malaria. La variante rs112233623-T si trova in una sequenza regolatoria del DNA nota come "enhancer" (un potenziatore genico che modula l'attività dei geni e quindi

la produzione delle loro proteine), in questo caso un “enhancer” eritroide specifico del gene CCND3 che regola la produzione della proteina ciclina D3 nei precursori dei globuli rossi. La ciclina D3 attiva la divisione cellulare e potenzia la via metabolica del pentoso fosfato (PPP), il cui scopo principale è produrre potere riducente per contrastare le specie reattive dell'ossigeno (ROS) nelle cellule. Non era noto se e in che modo rs112233623-T influenzasse direttamente l'attività dell'enhancer del gene CCND3 e perturbasse la funzione della proteina ciclina D3, né se e in che modo influenzasse la resistenza alla malaria.