

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



**DOTTORATO DI RICERCA IN
MEDICINA CLINICA E SPERIMENTALE**

CURRICULUM IN SCIENZE CARDIOVASCOLARI E GERONTOLOGICHE

XXXI Ciclo
(Anni 2015-2018)

Coordinatore

Prof. Francesco Beguinot

TESI DI DOTTORATO

L'identificazione della variante polimorfica Trp64Arg del recettore β_3 adrenergico, nei pazienti affetti da Fibrosi Cistica, correla con la riduzione dei livelli linfomonocitari di sfingosina chinasi 1.

TUTOR/RELATORE

**Chiar.mo
Prof. Nicola Ferrara**

CANDIDATA

Dott.ssa Paola Iacotucci

Indice

Introduzione	pag. 3
Scopo dello studio	pag. 14
Materiali e metodi	pag. 15
Risultati	pag. 28
Discussione e Conclusioni	pag. 32
Figure e Tabelle	pag. 35
Bibliografia	pag. 41

Introduzione

La Fibrosi Cistica (FC) è la malattia genetica più frequente nella popolazione caucasica, con un'incidenza globale di 1:2500 nati vivi - nell'area mediterranea di circa 1:3500 - e di un portatore ogni 26-27 individui. È una malattia sistemica cronica ed evolutiva che interessa pancreas, intestino, fegato, tratto respiratorio, ghiandole sudoripare e apparato riproduttivo.^{1,2} È un tipico esempio di malattia monogenica, trasmessa con meccanismo autosomico recessivo, determinata da mutazioni del gene CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator*), identificato nel 1989 e localizzato sul braccio lungo del cromosoma 7, che codifica per una proteina di membrana ubiquitaria coinvolta nello scambio di sodio e cloro, quindi di acqua, tra l'ambiente intracellulare e l'ambiente extracellulare.³

CFTR è una glicoproteina appartenente alla super famiglia degli ABC, ATP Binding Cassette Transporter, cui appartiene anche la glicoproteina P (Pgp) con la quale presenta un'omologia del 70%.⁴

La proteina codificata dal CFTR è costituita da 1480 aminoacidi e la sua struttura è stata suddivisa in diverse regioni: due domini transmembrana, TMD1 e TMD2, anche denominati MSDs (Membrane Spanning Domains), che formano il canale attraverso il quale passa il cloro; due domini intracellulari capaci di legare e idrolizzare l'ATP, chiamati NBDs (Nucleotide Binding Domains); una regione intracellulare regolatrice (R)

che separa i due domini proteici e che comprende alcuni siti di fosforilazione per le proteine chinasi A e C, indispensabili per il controllo dell'attività del canale in cooperazione con l'ATP (*Fig. 1*).⁵

Nel normale epitelio, CFTR si localizza nella membrana plasmatica apicale delle cellule epiteliali; si attiva in presenza di un agonista, ad esempio l'acetilcolina, che induce un aumento della concentrazione di AMP ciclico ad attivare la Proteina chinasi A (PKA), la quale fosforila in specifici residui amminoacidici di serina le regioni R e NBF. L'AMPc, quindi, funziona come regolatore nell'apertura e nella chiusura del canale ionico.

La proteina CFTR interviene anche nella regolazione di altri canali ionici, inibendo l'attività del canale per il sodio EnaC (Endothelial Natrium Channel) e attivando un altro canale al trasporto del cloro detto ORCC (Outwardly Rectified Chloride Channels); la CFTR è coinvolta, inoltre, in numerosi metabolismi cellulari come il processamento di altre glicoproteine, la regolazione del pH degli organuli intracellulari e sembra svolgere un ruolo nell'aumentata suscettibilità all'infezione bronchiale batterica e nell'esagerata e persistente risposta infiammatoria dell'ospite.^{6,7}

L'alterazione della proteina, causata dalle mutazioni (ad oggi sono state identificate 2027 mutazioni), determina un'alterazione della secrezione delle ghiandole esocrine, con diversi quadri di espressione clinica. La mutazione più diffusa nella popolazione caucasica è la $\Delta F508$ che corrisponde ad una delezione di tre paia di basi codificanti per

l'amminoacido fenilalanina, posto in posizione 508 nella struttura primaria della proteina CFTR codificata.

Tutte le variazioni nucleotidiche riscontrate sono state classificate in 6 classi di mutazioni (*Fig. 2*), in base ai meccanismi biomolecolari determinanti il deficit funzionale della proteina.⁸⁻¹⁰

- Classe I (difetto di sintesi): costituiscono più del 50% delle mutazioni; causano la totale assenza della proteina, dovuta ad alterazioni dello splicing, mutazioni frameshift e nonsense che portano rispettivamente a instabilità dell'mRNA, della proteina stessa e interruzione prematura della catena polipeptidica nascente;
- Classe II (difetto di maturazione): la proteina CFTR mutata viene sintetizzata, ma non raggiunge la membrana cellulare perché la mutazione determina un anomalo posizionamento o processamento e la successiva degradazione. A questa classe appartiene la mutazione più nota, la $\Delta F508$, che non permette la corretta glicosilazione della proteina causandone la prematura degradazione nell'apparato del Golgi, prima di raggiungere la membrana plasmatica;
- Classe III (difetto di attivazione e disattivazione): il canale CFTR viene sintetizzato e giustamente posizionato, ma non viene attivato o regolato perché la mutazione cade nei domini di regolazione (R) o di legame dei nucleotidi (NBF);

- Classe IV (difetto di conduttanza): la mutazione “missenso”, che comporta la sostituzione di un amminoacido, cade nelle regioni transmembrana, essenziali per il trasporto dello ione cloro, causando quindi una diminuita conduttanza;
- Classe V (rallentata sintesi): le mutazioni a carico del promotore possono rallentare la trascrizione genica o possono creare siti di “splicing alternativo”; in entrambi i casi avviene la sintesi di una proteina normale, ma in quantità fortemente ridotta.
- Classe VI (instabilità metabolica): l’alterazione, che può essere una delezione di 70-80 amminoacidi o il troncamento della regione carbossi terminale, porta a instabilità della proteina matura.

L’elevato numero di mutazioni del gene CFTR comporta una notevole eterogeneità fenotipica, determinata dal diverso danno funzionale della proteina. Tuttavia, la relazione tra mutazione e fenotipo clinico non è così stretta, tanto che la predittività del genotipo, rispetto alla sua manifestazione clinica, rimane ancora oggi prevalentemente confinata alla condizione pancreatica, ma non a quella respiratoria. Gli alleli associati con uno stato d’insufficienza pancreatica sono classificati come ‘*severe*’ (gravi), quelli con sufficienza pancreatica come ‘*mild*’ (lievi). I primi, a volte in omozigosi altre volte in eterozigosi composta, sono generalmente associati ad un quadro clinico pienamente espresso; i secondi, in eterozigosi composta con un allele ‘*severo*’, consentono il mantenimento di una residua sufficienza pancreatica esocrina. Quindi, anche se i malati con

pancreas sufficiente presentano condizioni cliniche più favorevoli e in generale una migliore aspettativa di vita, la condizione respiratoria può variare del tutto, indipendentemente dallo stato pancreatico.

Studi recenti, sulla correlazione genotipo-fenotipo, hanno dimostrato che fattori genetici ‘modulatori’, differenti dalla CFTR, potrebbero condizionare il destino del prodotto proteico o della sua funzione, dunque in ultima analisi la malattia. Fino ad alcuni anni fa, la diagnosi di FC era legata esclusivamente alla positività del test del sudore, in presenza di almeno una delle seguenti condizioni: broncopneumopatia cronica, insufficienza pancreatica esocrina, ileo da meconio, familiarità per la FC; oggi la diagnosi deve essere sospettata anche di fronte ad alcune situazioni atipiche in cui le manifestazioni dominanti o di presentazione possono essere quelle non classiche.¹¹ Tra queste si annoverano la sindrome acuta da perdita di sali o l’alcalosi metabolica cronica nel bambino piccolo, la cirrosi epatica colestatica isolata, la pancreatite ricorrente o cronica isolata, la poliposi nasale con sinusite cronica, gli equivalenti meconiali come manifestazione d’esordio, le bronchiectasie diffuse, l’infertilità maschile secondaria ad azoospermia ostruttiva nell’adolescente e nell’adulto. In questi casi, il test del sudore, che rimane a tutt’oggi il criterio più sensibile e più specifico per la diagnosi di conferma o di esclusione di FC, può risultare borderline o normale. Il test genetico, con sistemi di scanning o di sequenziamento del gene, permette altresì di identificare anche mutazioni rare, associate alle forme atipiche della malattia.

La sopravvivenza dei pazienti affetti da FC è aumentata progressivamente grazie alla precocità della diagnosi, al migliorato apporto nutrizionale, basato sulla disponibilità di nuove formulazioni di estratti pancreatici e di tecniche di nutrizione clinica, al trattamento sistematico ed aggressivo delle infezioni broncopolmonari, dovuto all'ottimizzazione delle tecniche di fisioterapia respiratoria e all'introduzione di nuovi e più potenti antibiotici, nonché all'istituzione di Centri di Riferimento per la cura ed il follow-up dei pazienti.^{12,13}

Nuove prospettive terapeutiche, che hanno ulteriormente aumentato la sopravvivenza FC, includono farmaci che promuovono la funzione di CFTR mutato agendo come “protein repair therapy”. FDA ha approvato nel 2012 la molecola *ivacaftor* per pazienti di età superiore ai 6 anni con mutazione G551D¹⁴⁻¹⁶ e, nel 2015, un'associazione composta da *lumacaftor*+*ivacaftor* per pazienti omozigoti per $\Delta F508$. *Ivacaftor* è un potenziatore di CFTR, che favorisce l'aumento del trasporto di cloruro potenziando la probabilità di apertura del canale (o gating) della proteina CFTR sulla superficie della cellula. *Lumacaftor* è un correttore della proteina CFTR, che agisce direttamente su F508del-CFTR per migliorarne l'elaborazione e il trafficking cellulare, aumentando così la quantità di CFTR funzionale sulla superficie della cellula. L'effetto combinato di *lumacaftor* e *ivacaftor* determina un aumento della quantità e della funzione di CFTR sulla superficie della cellula, con conseguente aumento del trasporto di ioni cloruro. L'utilizzo di *ivacaftor* nelle mutazioni gating

come G551D, ha dimostrato prolungato beneficio su test del sudore, FEV1, BMI e frequenza di esacerbazioni. Meno costanti sono risultati i benefici nei pazienti omozigoti per $\Delta F508$ in seguito al trattamento con l'associazione *ivacaftor-lumacaftor*.¹⁷

La terapia genica e con cellule staminali è ancora in fase di studio preclinico, per valutarne le potenzialità terapeutiche.

Dato lo scenario descritto, è comprensibile come, con l'avanzare dell'età, emerga un numero sempre più elevato di aspetti clinici peculiari derivanti dalla progressione della malattia e dalla rilevanza “nuova” assunta da alcune complicanze tipiche dell'invecchiamento, in passato meno rilevanti per la ridotta sopravvivenza dei pazienti. Negli anni '70 si affermava, infatti, che la FC costituiva la sfida emergente per la Medicina Interna e che nei successivi 20 anni sarebbe diventata la sfida emergente per la Medicina Geriatrica.

La causa principale di morbilità e mortalità, nei pazienti adulti affetti da FC, è costituita dalla broncopneumopatia cronica bronchiectasica la cui evoluzione è causa di più del 90% degli eventi fatali. La colonizzazione cronica polmonare, che ha inizio dall'età infantile con lo *Staphylococcus Aureus* e l'*Haemophilus Influenzae*, prosegue alla fine della prima decade di vita con lo *Pseudomonas Aeruginosa*¹⁸ e, nella seconda e terza decade di vita, come emerso negli ultimi anni, con lo sviluppo di patogeni quali lo *Stenotrophomonas Maltophilia*, l'*Achromobacter Specie* e la *Burkholderia Cepacia*, il germe più aggressivo, che si accompagnano ad un rapido

declino della funzionalità respiratoria.¹⁹ La colonizzazione cronica è associata ad una intensa risposta infiammatoria che danneggia il polmone e rende inefficaci i meccanismi di clearance mucociliare innescando un circolo vizioso che porta alla formazione delle bronchiectasie ed infine all'insufficienza respiratoria. Le esacerbazioni infettive polmonari e le loro complicanze (emottisi, pneumotorace etc.), sono la causa principale di ospedalizzazione dei pazienti adulti affetti da FC.

Negli ultimi decenni sono stati compiuti numerosi passi avanti nel campo della ricerca scientifica per identificare i fattori coinvolti nello sviluppo e progressione della FC. Tuttavia, i meccanismi fisiopatologici molecolari di tale patologia rimangono ancora poco noti. Recenti studi hanno dimostrato che un ruolo rilevante nello sviluppo e nella progressione della FC è svolto dal lipide sfingosina 1-fosfato (S1P).²⁰⁻²³

Ruolo della Sfingosina 1-fosfato nello sviluppo e progressione della Fibrosi Cistica.

La Sfingosina-1-fosfato (S1P) è sintetizzata a partire dal precursore Sfingomieline. Diversi stimoli sono in grado di attivare l'enzima sfingomielinasi, che catalizza l'idrolisi della Sfingomieline in Ceramide, a sua volta metabolizzata dalla Ceramidasi con produzione di Sfingosina (*Fig. 3*).²⁴ La successiva fosforilazione, catalizzata dalla Sfingosina-chinasi (SphK), porta alla sintesi di S1P, che costituisce la forma biologicamente

attiva. La SphK esiste in due isoforme, che differiscono nella distribuzione tissutale e nelle proprietà catalitiche.²⁴

L'isoforma 1 ha una localizzazione citosolica e, in seguito a differenti stimoli (ormoni o citochine), viene fosforilata e traslocata a livello della membrana plasmatica. La traslocazione è necessaria per attivare le vie di segnalazione coinvolte nella crescita e sopravvivenza cellulare.²⁴

L'isoforma 2 è localizzata a livello delle membrane interne ed ha la funzione di reprimere la crescita e promuovere l'apoptosi cellulare.²⁴

Una volta formata, la S1P può essere nuovamente defosforilata a sfingosina da due specifiche fosfatasi (SPP1 e SPP2). Inoltre, può essere degradata in modo irreversibile in fosfoetanalammina e palmitaldeide ad opera della sfingosina-1-fosfato-liasi, un enzima intracellulare situato nel reticolo endoplasmatico.²⁴

La S1P circola a livello plasmatico come costituente delle HDL ed è stato dimostrato che contribuisce agli effetti benefici da queste esercitato.²⁴

Da un punto di vista funzionale, S1P può agire sia mediante una via di signaling intracellulare agendo da secondo messaggero, sia attraverso un meccanismo extracellulare. Nel primo caso è in grado di mobilizzare il calcio intracellulare attraverso una via indipendente dall'inositolo trifosfato (IP3)²⁴ e di attivare vie di segnalazione come ERK/MAPK che proteggono le cellule dall'apoptosi. L'attività extracellulare si esplica, invece, attraverso l'interazione con GPCRs della famiglia S1PR.²⁴

Sono stati finora identificati 5 membri di tale famiglia (S1PR1, S1PR2,

S1PR3, S1PR4, S1PR5), con differenti effetti e livelli di espressione tissutale.²⁴

S1PR1, isoforma maggiormente espressa a livello cardiovascolare e linfocitario, è un recettore accoppiato esclusivamente a proteina Gi/0, la cui attivazione, oltre a determinare l'inibizione dell'adenilato ciclastasi e l'attivazione di Ras, stimola la fosfolipasi C, promuovendo la mobilizzazione del Ca²⁺.²⁴ Il recettore S1PR1 in seguito al legame con la S1P, che è coinvolto nella regolazione della proliferazione e della sopravvivenza cellulare e che sembra avere un ruolo stimolatorio nella risposta infiammatoria.^{24,25} A tal riguardo, numerosi studi scientifici hanno dimostrato che tale recettore rappresenta un target terapeutico nel trattamento della sclerosi multipla.²⁵

In maniera interessante, recenti studi hanno dimostrato che i livelli di S1P si riducono nei pazienti affetti da FC. In particolare, tale effetto sembrerebbe essere correlato ad una minore secrezione della S1P da parte delle cellule epiteliali nasali e respiratorie.²⁶ A tal riguardo, Xu et al. hanno dimostrato che la riduzione dei livelli di S1P è responsabile di un minore reclutamento di cellule dendritiche (DC) a livello polmonare (esponendo così il polmone ad una maggiore suscettibilità alle infezioni batteriche)²³, di un' aumentata infiammazione bronchiale con conseguente broncoostruzione funzionale ed di aumentata secrezione di muco e, quindi, di ostruzione bronchiale.^{20-23,26} Pertanto, in base a tale premessa, l'identificazione di fattori coinvolti nell'alterazione del signaling della S1P

è necessaria per lo sviluppo di nuove terapie per il trattamento della FC. A tal riguardo, il nostro gruppo di ricerca ha recentemente dimostrato che a livello cardiaco il recettore β_3 -adrenergico (β_3 AR) è capace di attivare la SphK1 e di incrementare i livelli di S1P circolanti.²⁴ Il recettore β_3 AR appartiene alla famiglia dei recettori β AR e recenti studi hanno dimostrato che a livello delle vie respiratorie il β_3 AR aumenta la frequenza dei battiti ciliari delle cellule epiteliali bronchiali, con conseguente incremento della clearance muco-ciliare bronchiale.²⁷ Inoltre, sembrerebbe che sia la S1P che il β_3 AR siano capaci di regolare la funzionalità della CFTR.^{21,27} È possibile ipotizzare, pertanto, che le alterazioni dell'asse β_3 AR/S1P agiscano riducendo la clearance muco-ciliare nelle vie aeree aumentando le infezioni batteriche con conseguente effetto negativo sulla broncoostruzione funzionale/anatomica.

Scopo dello studio

Diversi studi, condotti in modelli murini di FC, hanno documentato l'importanza della S1P nella risposta infiammatoria e nell'evoluzione fibrotica del parenchima polmonare nelle patologie ostruttive.^{21-23,26}

A tutt'oggi, non ci sono sufficienti prove nell'uomo per affermare che la S1P sia direttamente correlata allo sviluppo e/o progressione di tali manifestazioni cliniche nei pazienti affetti da FC. Pertanto, la nostra ipotesi principale è che la S1P rappresenti un marcatore predittivo di severità della malattia respiratoria ostruttiva nei pazienti affetti da FC. Inoltre, siccome il nostro gruppo di ricerca ha recentemente dimostrato un ruolo cruciale del β 3AR (noto regolatore della CFTR) nel rilascio della S1P²⁸, noi crediamo che la presenza di mutazioni genetiche a carico del recettore β 3AR, come la variante polimorfica Trp64Arg (nota per ridurre la funzione del recettore)²⁹, possa essere responsabile di peggiore "outcome" nei pazienti FC. Per il nostro studio su una popolazione di pazienti affetti da FC, gli obiettivi sono i seguenti:

- a) correlare i livelli circolanti di S1P e la severità della patologia respiratoria;
- b) valutare la presenza della variante polimorfica Trp64Arg del gene codificante il β 3AR correlandola con i livelli circolanti della S1P.

Materiali e metodi

Popolazione di studio

La nostra popolazione è costituita da un gruppo di pazienti adulti affetti da FC seguiti, in regolare follow-up, presso il nostro Centro di Riferimento Regionale della Campania per la diagnosi e cura della Fibrosi Cistica dell'Adulto.

Sono stati inclusi pazienti che rispondevano ai seguenti criteri di inclusione:

1. diagnosi di FC (test del sudore positivo e/o determinazione delle mutazioni genetiche);
2. capacità di prestare consenso informato;
3. non fumatori;
4. capacità di eseguire un esame spirometrico riproducibile.

Sono stati esclusi i pazienti che presentavano uno o più dei seguenti criteri:

1. altre patologie polmonari acute o croniche o che hanno presentato infezioni delle vie respiratorie nelle 3-4 settimane precedenti l'arruolamento;
2. impossibilità di raccogliere il consenso informato;
3. coinvolgimento in clinical trial nelle precedenti quattro settimane;

Il gruppo di controllo comprende soggetti sani di comparabili caratteristiche generali (età, sesso) in assenza di gravi patologie.

Metodi

In tutti i pazienti al momento dell'arruolamento sono stati raccolti anamnesi, esame obiettivo, auxometria; sono stati effettuati spirometria, test microbiologici su materiale biologico proveniente dalle vie aeree e gli esami ematochimici di routine.

La spirometria è stata eseguita secondo le linee guida ATS/ERS. Almeno tre manovre forzate sono state completate per ogni test e la migliore capacità vitale forzata (FVC) e il migliore FEV1 sono stati considerati per l'analisi dei dati.

Il materiale biologico proveniente dalle alte vie aeree è stato raccolto mediante due tipologie di campionamento:

- escreato, ottenuto da pazienti collaboranti ed in grado di espettorare;
- aspirato ipofaringeo, nei pazienti incapaci di espettorare, o non collaboranti ed in tutti i pazienti con scarsità di secrezioni.

Estrazione DNA

Il DNA genomico è stato estratto da sangue intero dei pazienti affetti da FC e dai controlli. Al momento del reclutamento i pazienti sono stati sottoposti ad un prelievo ematico (3 mL) raccolto in tubi contenenti EDTA ed il DNA è stato estratto mediante un kit commerciale (Wizard® Genomic DNA Purification Kit-Promega). In breve, 300 µL di sangue sono stati trasferiti in una provetta da 1.5 mL, mescolati in un rapporto 1:2

con una soluzione di lisi (*Cell Lysis Solution*) e incubato 10 min a temperatura ambiente. Successivamente, è stata effettuata una centrifugazione a 13.000 g per 1 min a temperatura ambiente. Dopo aver rimosso il surnatante, il “pellet” è stato nuovamente trattato con una soluzione di lisi (*Nuclei Lysis Solution*) e mescolato per inversione. In seguito, è stata aggiunta una soluzione per precipitare le proteine (*Protein Precipitation Solution*) con diluizione 1:3 e la miscela è stata “vortexata” vigorosamente per 10-20 secondi. Dopo una centrifugazione a 13.000 g per 3 min a temperatura ambiente, il surnatante (DNA privo di proteine) è stato trasferito in un tubo nuovo da 1.5 mL contenente isopropanolo 1:1 e mescolato fino ad osservare la massa di DNA (flocculo). Il campione è stato poi centrifugato a 13.000 x g per 1 min e il surnatante è stato rimosso. Il “pellet” di DNA visibile sul fondo è stato poi risospeso in Etanolo 70 %, centrifugato a 13.000 x g per 1 min e poi, dopo aver rimosso il surnatante, il DNA precipitato è stato infine risospeso in acqua distillata (nuclease-free). I campioni di DNA sono stati poi quantificati mediante lettura spettrofotometrica a 260 nm e la purezza è stata verificata considerando il rapporto di assorbanza 260-280nm. Infine, il campione di DNA estratto, è stato congelato a -80°C.

Reazione a catena della polimerasi (PCR)

La *Polymerase Chain Reaction (PCR)* è una tecnica che permette, attraverso l'utilizzo di una specifica DNA polimerasi, l'amplificazione

esponenziale di frammenti di dsDNA (DNA a doppio filamento) situati tra due tratti a sequenza nota, complementari agli oligonucleotidi appositamente disegnati ed utilizzati come primers della reazione. In questo studio abbiamo amplificato una regione del gene codificante per il recettore β -3 adrenergico, utilizzando i seguenti oligonucleotidi: **β 3AR-FWD** (5'-GAGCCAGGTGATTTGGGAGA-3'), **β 3AR-REV** (5'-GGTTGGTCACAGCCAGGTA -3'). La reazione di polimerizzazione è stata allestita utilizzando i seguenti componenti: 0,1 μ L di Taq polimerasi ad alta fedeltà (5 U/uL, *Platinum® Taq Polymerase High Fidelity-Invitrogen*), 2 μ L 10x PCR *High Fidelity* buffer, 0,5 μ L MgSO₄ 50 mM, 0,4 μ L dNTP mix 10mM, 0,5 μ L β 3AR-FWD primer 10 μ M, 0,5 μ L β 3AR-REV primer 10 μ M, 300 ng di DNA ed acqua distillata per un volume finale di 20 μ L. La reazione è stata eseguita secondo il seguente protocollo di amplificazione:

1. 94°C, per 2 minuti
 2. 94°C per 15 sec
 3. 55°C per 30 sec
 4. 72°C per 1 min
 5. 72°C per 10 min
 6. 4°C per ∞
- } 40 cicli

Il prodotto di PCR così ottenuto è stato testato mediante corsa elettroforetica su un gel all'1,5 % in TBE. Il prodotto di PCR atteso è di circa 500 bp. (Fig. 4)

Digestione enzimatica

Nello screening dei pazienti, prima di proseguire con l'accurato sequenziamento della sequenza d'interesse, abbiamo ritenuto opportuno verificare la presenza della banda anomala mediante valutazione della presenza di un sito di restrizione generato dal polimorfismo (*restriction fragment length polymorphism-RFLP*). Gli enzimi di restrizione sono endonucleasi di origine batterica capaci di riconoscere una sequenza palindromica di DNA e determinare la rottura del legame fosfodiesterico. Nel nostro caso abbiamo digerito il frammento con l'enzima *BstNI*, un enzima di restrizione specifico per la sequenza CC (A/T) GG. La digestione del prodotto PCR da 500 bp con *BstNI* produce frammenti delle seguenti dimensioni:

Allele WT (C)- 15, 18, 34, 61, 97, 118, 126 bp

Allele Mutato (T)- 15, 18, 34, 118, 126, 158 bp

La digestione è stata completata utilizzando i seguenti reagenti:

- DNA stampo da digerire (200 ng)
- 5 unità di enzima per 1µg di DNA da digerire
- Buffer in cui l'enzima ha il 100% di attività (Buffer 3 -NEB)
- Acqua distillata (nuclease free)

Una volta preparata, la MIX di reazione è stata incubata a 60°C per 3h. I prodotti di digestione ottenuti sono stati poi testati, sempre mediante corsa elettroforetica, su un gel 2.5% in TBE.

Sequenziamento del DNA

I campioni di DNA, sono stati sequenziati automaticamente, al servizio sequenze: microgem con il 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

È stato utilizzato il metodo di Sanger che prevede l'uso di fluorocromi di colori differenti per contrassegnare le 4 basi azotate che compongono il DNA. Questo permette di visualizzare le basi come tanti picchi di colore diversi. Per la sequenza sono stati utilizzati oligonucleotidi concentrati 2,5 μ M e DNA concentrato 50 ng.

Estrazione di linfomonociti da sangue intero

I linfomonociti sono stati isolati mediante stratificazione su *Ficoll* (Ficoll-PaqueTM Plus, GE Healthcare- *HISTOPAQUE SIGMA*), seguendo le istruzioni fornite dalla ditta produttrice. I campioni di sangue periferico raccolti in provette in EDTA sono stati diluiti 1:1 con soluzione fisiologica (PBS 1X).

Il sangue così diluito è stato stratificato in un ulteriore tubo sterile contenente la soluzione di *Ficoll* (1:1,5). Il campione stratificato, è stato centrifugato a 2.000 rpm per 20 minuti, senza freno a temperatura ambiente. In seguito alla centrifugazione e alla stratificazione, i linfomonociti sono distinguibili sotto forma di anello bianco, il quale è stato accuratamente prelevato e trasferito in un nuovo tubo sterile. L'anello recuperato è stato quindi diluito con soluzione fisiologica (PBS 1X) e centrifugato a 1.800 rpm per 15 minuti a temperatura ambiente e

senza freno. In seguito alla centrifugazione, le cellule di interesse precipitano sul fondo formando un “pellet”. A tal punto il surnatante è stato eliminato ed è stato eseguito un secondo lavaggio in PBS, con le stesse modalità sopra descritte, centrifugando a 2.000 rpm per 10 minuti a temperatura ambiente e senza freno.

Il surnatante è stato completamente eliminato ed il concentrato costituito dai linfomonociti, è stato conservato a -80°C fino al suo utilizzo.

Estrazione proteica

Il “pellet” di linfomonociti è stato risospeso in buffer RIPA contenente inibitori di proteasi (Complete-Roche, Indianapolis, IN, USA) e di fosfatasi (Phospho-STOP-Roche, Indianapolis, IN, USA). Il “pellet” risospeso è stato sonicato ed in seguito centrifugato a 4°C per 10 min a 1.300 rpm. Il surnatante ottenuto, contenente le proteine totali, è stato conservato a -80°C fino al suo utilizzo (vedi paragrafi successivi).

Determinazione della concentrazione delle proteine

Le proteine totali, ottenute dai lisati dei linfomonociti, sono state quantizzate utilizzando un saggio DC Protein Assay Reagent A (Bio-Rad Laboratories, Richmond, California, USA). Con questa metodica la quantità proteica del campione è ottenuta confrontando la sua assorbanza a 750 nm con quella di un campione standard a concentrazione nota, utilizzato come riferimento.

In particolare, il campione utilizzato come standard è diluito secondo concentrazioni decrescenti. Sulla base delle assorbanze di tali standard a concentrazione nota, viene estrapolata una retta di riferimento dalla quale è possibile ottenere le concentrazioni dei campioni di nostro interesse, conoscendone esclusivamente l'assorbanza, attraverso lettura spettrofotometrica a 750nm.

Il procedimento si avvale dei seguenti step:

- Caricare in 12 pozzetti di una *multiwell*, 5 μ L di Albumina di Siero Bovino (BSA) a concentrazione nota e crescente.
- Caricare nei pozzetti liberi della medesima *multiwell* 2,5 μ L di RIPA buffer e 2,5 μ L di campione.
- Aggiungere in tutti i pozzetti 25 μ L di reagente A', ottenuto miscelando 1 mL di Bio-Rad DCTM Protein Assay Reagent A con 20 μ L di DC-TM Protein Assay Reagent S; successivamente si aggiungono 200 μ L di Bio-Rad Dc Protein Assay Reagent B.
- Il tempo necessario affinché la reazione possa consentire una lettura colorimetrica è di 15 minuti.

La lettura dei campioni avviene tramite l'incidenza di un fascio di luce che indurrà l'emissione di un flusso luminoso captato a una lunghezza d'onda di 750 nm. Il colore sviluppato, rilevato spettrofotometricamente, è direttamente proporzionale alla concentrazione delle proteine presenti nei campioni.

Le concentrazioni ottenute da tale procedura sono state moltiplicate per due giacché il campione è stato precedentemente diluito con RIPA (1:2).

Per procedere successivamente agli esperimenti di elettroforesi su gel di poliacrilamide (SDS-Page), è stato opportuno utilizzare la stessa quantità proteica dei campioni in esame. Pertanto, 50 µg di proteine di ogni campione da analizzare sono stati addizionati di una soluzione contenete colorante (Laemmli buffer) e agenti denaturanti (DTT 1X).

La denaturazione delle proteine è stata completata incubando i campioni a 95°C per 10 minuti.

L'elettroforesi su gel di poliacrilamide (SDS-PAGE)

L'elettroforesi su gel di poliacrilamide in presenza di SDS (Sodio-dodecil-solfato) è la principale tecnica di separazione di proteine in base al loro peso molecolare. Il gel di poliacrilamide è formato da una matrice chimicamente inerte di acrilamide e N,N'-metilenbisacrilamide (agente di cross-linking) che vengono fatti polimerizzare assieme. È importante ricordare che più è elevata la concentrazione di acrilamide tanto maggiore sarà la capacità del gel di separare proteine di piccole dimensioni.

Le condizioni denaturanti sono conferite dalla presenza dell'SDS, un detergente anionico che serve a spezzare tutte le interazioni non covalenti nelle proteine native. Il Sodio-dodecil-solfato si lega alle catene polipeptidiche in un rapporto di circa una molecola di detergente per ogni

2 residui amminoacidici. Il complesso tra l'SDS e la proteina denaturata viene così ad assumere una carica netta approssimativamente proporzionale alla massa della proteina.

Affinché ci sia passaggio di corrente, il gel deve essere immerso in un tampone di corsa (25 mM Tris, 192 mM glicina, 0,1% (w/v) SDS, pH 8.3 e acqua distillata).

La corsa elettroforetica si determina applicando un voltaggio costante di 180V.

Trasferimento

Le proteine separate mediante elettroforesi sono state trasferite su una membrana di PVDF (*Polyvinylidene Difluoride*) utilizzando un apposito supporto di trasferimento (BIORAD) contenente il tampone di trasferimento (25 mM Tris, 192 mM di glicina, pH 8.3, miscelato con metanolo e acqua distillata). Il trasferimento è stato eseguito applicando una corrente di 100V per 1 ora a 4°C.

Immunoblotting

Per rivelare la presenza di proteine sulla membrana di PVDF, dopo il trasferimento, è stato seguito il seguente protocollo:

1. **Rilevazione con rosso *Ponceau***: la colorazione delle proteine con Rosso Ponceau è stata eseguita per accertare l'avvenuto trasferimento delle proteine dal gel elettroforetico alla membrana.

Una volta accertata la presenza delle bande è stata effettuata una serie di lavaggi con TBS 1X (Tris-buffered saline) contenente Tween-20 0,1 % (TBS-T 0.1%).

2. **Blocking:** è lo step di saturazione dei siti idrofobici sulla membrana che prevede l'utilizzo di latte al 5% in TBS-T 0,1%. Tutto ciò evita l'interazione dell'anticorpo con siti aspecifici. La membrana è stata incubata con il blocking per 1h.
3. **Incubazione con anticorpo primario:** l'utilizzo di un anticorpo primario è necessario per legare la proteina di nostro interesse. Nel nostro studio è stato utilizzato l'anticorpo monoclonale *rabbit* per la proteina sfingosina chinasi 1 (SphK1- *Santa Cruz*) e un mouse anti-GAPDH (*Santa-Cruz*) utilizzato per la normalizzazione dell'espressione proteica.

Nel nostro lavoro l'anticorpo anti-SphK1 è stato diluito in rapporto 1:1000, mentre per GAPDH (il nostro normalizzatore) è stato diluito in rapporto 1:4000, in latte al 5% in TBS-T 0.1 %.

Per permettere la reazione antigene-anticorpo è stato necessario lasciare la membrana a contatto con la soluzione contenente anticorpo over night a 4°C ed in agitazione.

4. **Lavaggi:** il giorno seguente la soluzione contenente l'anticorpo è stata rimossa e la membrana è stata sottoposta a 3 lavaggi di 10 minuti con TBS- T 0,1% in modo da eliminare l'anticorpo residuo in eccesso.

5. **Incubazione con anticorpo secondario:** in seguito la membrana è stata incubata con un anticorpo secondario (anti-rabbit per SPK1 e anti-mouse per GAPDH) coniugato all'enzima perossidasi di rafano, diluito 1:2000 in latte al 5% per 60 minuti.
6. **Lavaggi:** in seguito la membrana è stata lavata nuovamente per 10 minuti in TBS- T 0,1% per almeno 3 volte, per eliminare l'anticorpo secondario in eccesso.
7. **Sviluppo della membrana:** per rilevare la presenza della proteina di interesse, viene sfruttata la reazione della perossidasi di rafano legata covalentemente agli anticorpi secondari. Pertanto, fornendo il substrato (ECL) all'enzima, questo catalizza una reazione chemioluminescente.

La luce emessa in seguito all'ossidazione del substrato, viene captata e rilevata come banda ad intensità variabile da uno apposito strumento (Chemidoc, Biorad).

Quantizzazione immunoblot

Per poter quantificare il contenuto di proteina di interesse in ogni campione in esame, l'intensità delle bande ottenute dalla reazione di perossidasi è stata quantizzata attraverso un programma di analisi densitometrica delle bande (Image Lab della BIORAD).

Analisi statistica

I dati sono presentati come media \pm deviazione standard. Per le analisi statistiche è stato utilizzato il T-test di Student. Tutti i valori “p” sono stati calcolati con un test e le differenze sono state ritenute significative quando $p < 0.05$.

Risultati

Lo studio è stato condotto presso il Centro di Riferimento Regionale della Campania per la diagnosi e cura della Fibrosi Cistica dell'Adulto, dell'A.O.U. "Federico II" di Napoli. I pazienti sono stati arruolati tra quelli afferenti agli ambulatori, per visite ambulatoriali di follow-up, nel corso degli ultimi 3 anni.

Sono stati arruolati 64 pazienti affetti da FC e 10 soggetti sani (gruppo di controllo). Il gruppo di pazienti FC presentava età media di 31 anni e 11 mesi (range 18-55 anni), con il genere femminile maggiormente rappresentato (N=35, 55%). L'età media al momento della diagnosi era di 9,56 anni (Range 0-49); circa il 33,2% ha ricevuto la diagnosi entro il primo anno di vita mentre il 21,8% dopo i 18 anni. Il gruppo di controllo era costituito da 2 maschi e 8 femmine con un'età media di 33 anni e 4 mesi (range 29-39 anni). Il 29,6% era omozigote DF508 mentre il 32% è risultato essere eterozigote DF508.

Tutti i pazienti sono stati sottoposti ad esame spirometrico per determinare il grado di compromissione funzionale respiratoria: il 36% presentava una buona funzione respiratoria ($FEV^1 \geq 80\%$) mentre il 6% mostrava una compromissione della funzionalità respiratoria di grado molto severo ($FEV^1 < 30\%$) (Fig. 5).

Il 62,5% dei pazienti presentava una colonizzazione cronica delle vie aeree da *Pseudomonas Aeruginosa* e *Staphylococcus Aureus* mentre il restante 47,5% solo da *Staphylococcus Aureus*.

Il 65,6% presentava insufficienza pancreatica in terapia sostitutiva con estratti pancreatici e il 31,25% diabete mellito correlato alla Fibrosi Cistica (CFRD) in trattamento insulinico.

Analisi della variante polimorfica Trp64Arg (rs4994)

Il DNA genomico è stato estratto dal sangue intero di 64 pazienti e 10 controlli. Dopo aver compiuto una prima ricerca sistematica di mutazioni puntiformi nelle regioni che rappresentano gli “*Hot Spots*” del gene CFTR abbiamo praticato l’analisi per valutare la presenza della variante polimorfica del recettore β -3AR Trp64Arg utilizzando oligonucleotidi specifici per amplificare, mediante PCR, una regione di circa 500 bp nell’esone 1 del gene *adbr3* codificante per il recettore β -3AR. Successivamente, dopo aver controllato mediante elettroforesi su gel d’agarosio la corretta amplificazione del prodotto, abbiamo effettuato una purificazione utilizzando un kit commerciale (PCR purification kit-Qiagen). La presenza della mutazione (C/T) è stata rilevata mediante analisi RFLP con l’enzima di restrizione BstNI, che discrimina tra le sequenze normali e mutate, all’interno della regione DNA amplificata (Fig. 6). Come mostrato in figura 6, in 15 dei 64 pazienti con FC abbiamo osservato la presenza di una banda di 158 bp generata dalla presenza della mutazione C/T in posizione 387 dell’esone 1 del gene *adbr3*. Pertanto, per verificare la presenza della mutazione, il DNA dei pazienti è stato amplificato e sottoposto a sequenziamento diretto. (Fig. 7)

Come atteso, tale procedura ha confermato la presenza della variante polimorfica in tutti i pazienti che presentavano la banda di 158 bp. In nessun controllo abbiamo riscontrato la presenza della variante polimorfica del gene *adbr3* (Fig. 6). Abbiamo valutato la distribuzione di ciascun genotipo del gene *adbr3* tra i soggetti sani e i pazienti con FC. I nostri risultati mostrano che la distribuzione di diversi genotipi Trp/Trp e Trp/Arg non era paragonabile tra i gruppi FC e quelli sani (controlli). La frequenza dell'allele C/C (Trp/Trp) era più alta nei partecipanti sani rispetto ai pazienti con FC (100 % vs 75,5%). La frequenza del genotipo C/T (Trp/Arg) è risultata più alta nei pazienti con FC rispetto ai controlli, suggerendo l'effetto deleterio di questo genotipo. Nessun soggetto analizzato presentava il genotipo T/T (Arg/Arg).

La presenza della variante Trp64Arg è associata ad una riduzione dei livelli linfomonocitari di Sfingosina chinasi 1 (SphK1)

Come in precedenza evidenziato, l'analisi genetica ha dimostrato che la variante polimorfica Trp/Arg è presente con un'alta frequenza nei pazienti con FC. Pertanto, poiché tale mutazione induce ipofunzione del recettore β -3AR, ed è responsabile dell'attivazione dell'SphK1 e conseguente produzione di S1P, abbiamo misurato i livelli linfomonocitari della SphK1 nella nostra popolazione tramite immunoblot (Fig.8). I dati ottenuti mostrano una riduzione dei livelli di SphK1 nei pazienti che presentano la variante polimorfica Trp64Arg (n=9) rispetto a quelli in cui tale mutazione

era assente (Trp64Trp) (n=9). Tale risultato supporta l'ipotesi di un effetto deleterio esercitato della variante polimorfica sul signaling della S1P.

I 15 pazienti del gruppo Trp/Arg presentavano un trend di riduzione dei valori di FEV1 e FVC rispetto ai 49 pazienti del gruppo Trp/Trp, sebbene non statisticamente significativa (FEV1 % predetto 63,7% vs 66,5%; FVC 75,7 vs 80,8, rispettivamente)(Tabella 1). Probabilmente, il mancato impatto clinico del polimorfismo del genotipo Trp/Arg sugli indici funzionali respiratori, può essere ascrivibile all'esiguità del campione oggetto di studio. È nostra intenzione proseguire nell'arruolamento dei pazienti al fine di verificare la rilevanza di tale polimorfismo sulla clinica dei pazienti affetti da FC.

Discussione e conclusioni

La FC è la malattia genetica a trasmissione autosomica recessiva più frequente nella popolazione caucasica. L'assenza di una netta correlazione genotipo-fenotipo e la grande variabilità genetica non consentono allo stato attuale di prevedere l'andamento clinico del singolo paziente con FC. La storia clinica è caratterizzata da frequenti riacutizzazioni respiratorie che, progressivamente, conducono alla colonizzazione cronica delle vie aeree e all'alterazione strutturale delle stesse, producendo un insulto cronico che esita nell'insufficienza respiratoria. La precocità della diagnosi e l'adeguatezza degli interventi terapeutici sono fondamentali per limitare la progressione della malattia.

In questo studio abbiamo presentato dati originali di 64 pazienti provenienti da un singolo centro FC raccolti tra il 2015 e il 2018 finalizzati a definire:

- la frequenza della variante polimorfica Trp64Arg del gene codificante per il β 3AR;
- l'impatto di tale polimorfismo sulla produzione di S1P;
- l'impatto del polimorfismo sulla severità della malattia respiratoria cronica.

Come noto da precedenti evidenze, i livelli di S1P sono ridotti nei pazienti con FC ma non esistono dati sull'impatto della variante polimorfica ipofunzionante Trp64Arg su tali livelli.

Il primo risultato rilevante del nostro studio è che la variante polimorfica ipofunzionante Trp64Arg è presente in un'alta percentuale di pazienti con FC ma in nessuno dei controlli. Inoltre, i pazienti con FC con la variante polimorfica presentavano una ridotta espressione linfocitaria dei livelli di SphK1, l'enzima responsabile della formazione del S1P. Tale risultato supporta il coinvolgimento del β 3AR sulla produzione di S1P. Infatti, l'ipofunzione di tale recettore, determina una ridotta sintesi della sfingosina fosforilata. Nella nostra popolazione di studio, lievi differenze, non statisticamente significative, sono emerse tra i due gruppi di pazienti, suggerendo che la variante polimorfica Trp64Arg del β 3AR si possa associare ad un fenotipo clinico respiratorio più severo. Questo dato andrà confermato in studi con coorti più numerose e potrebbe consentire in futuro l'identificazione di S1P come biomarcatore nella popolazione di pazienti con FC.

Infatti, nonostante l'aspettativa di vita dei pazienti con FC sia aumentata negli ultimi decenni, la mortalità rimane altissima. Ad oggi, l'individuazione di un biomarcatore facilmente misurabile nel sangue, rappresenta uno degli obiettivi più rilevanti per la gestione clinica di pazienti con FC.

Infine, dimostrando con una casistica più numerosa una correlazione tra i livelli di S1P e la severità clinica della patologia respiratoria, si aprirebbero le porte a nuove linee di ricerca per lo sviluppo di terapie che abbiano come target l'asse β 3AR/S1P e, nell'ambito della medicina di precisione,

aiuterebbe a personalizzare la terapia farmacologica anche in base all'eventuale presenza di varianti polimorfiche del β 3AR.

Questo risultato consentirebbe non solo una stratificazione prognostica dei pazienti con FC, ma anche la possibilità di predire la risposta a specifici trattamenti e di monitorarne nel tempo l'efficacia.

I nostri obiettivi futuri saranno, quindi:

- implementare la casistica arruolando i restanti pazienti seguiti presso il nostro Centro incrementando, inoltre, il numero dei controlli sani;
- valutare il ruolo del recettore β 3AR e di S1P sulla funzione delle cellule dendritiche (DC) ed epiteliali nasali (NEC) isolate dai pazienti FC.

In definitiva, i dati di questo studio supportano l'ipotesi di un effetto negativo esercitato dalla variante polimorfica Trp64Arg sul signaling della S1P. Ulteriori studi sono necessari per comprendere l'impatto clinico di tale dato e fornire spunti per nuovi scenari terapeutici per i pazienti affetti da FC.

Figure e tabelle

Figura 1: Struttura del canale CFTR.

Come membro della superfamiglia ABC, CFTR (la metà N-terminale è mostrata schematicamente in celeste e la metà C-terminale in rosa) possiede due domini MSD (MSD1 e MSD2, verde-grigio più scuro e rosa rispettivamente), due domini NBD (NBD1 e NBD2, più leggero verde acqua e rosa rispettivamente) e il dominio R regolatore (arancione) unico che è fosforilato (Ps verde) nella proteina attiva.

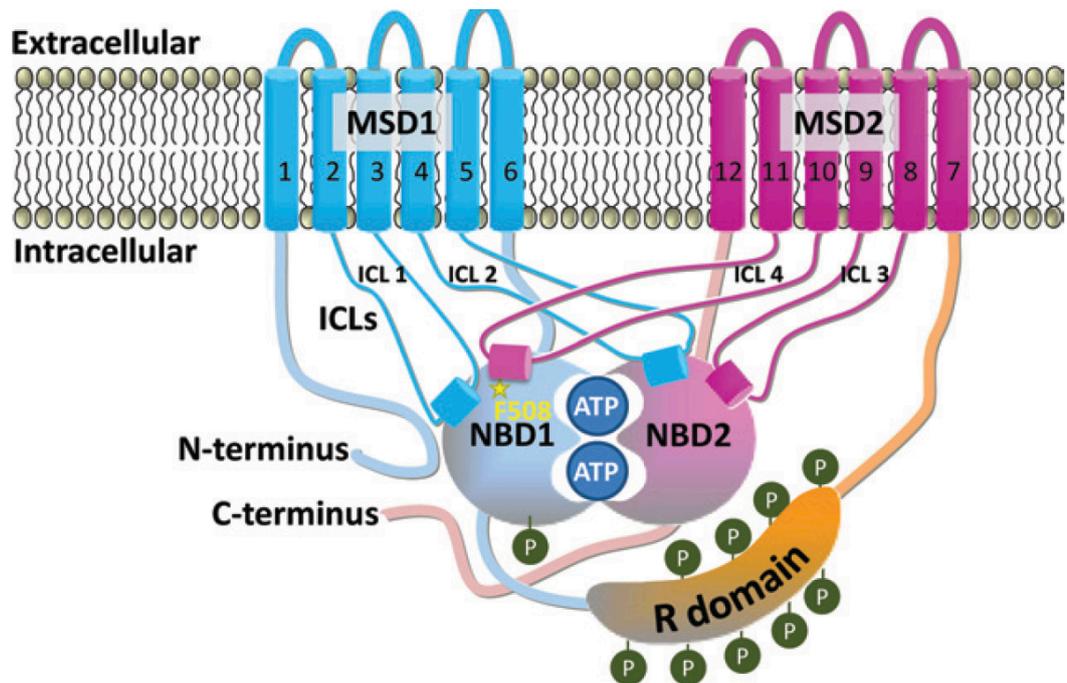


Figura 2: Classi di mutazioni di CFTR

Normal	I	II	III	IV	V	VI
<p>CFTR DNA</p> <p>Nucleus</p> <p>Full-length CFTR RNA</p> <p>Endoplasmic reticulum</p> <p>Nascent CFTR</p> <p>Golgi</p> <p>Mature functional CFTR</p> <p>Cl⁻ Cl⁻ Cl⁻ Cl⁻ Cl⁻ Cl⁻</p>	<p>CFTR DNA</p> <p>Nucleus</p> <p>Unstable truncated RNA</p> <p>Endoplasmic reticulum</p> <p>Absent nascent CFTR</p> <p>Golgi</p> <p>Absent functional CFTR</p>	<p>CFTR DNA</p> <p>Nucleus</p> <p>Full-length CFTR RNA</p> <p>Endoplasmic reticulum</p> <p>Protease destruction of CFTR</p> <p>Golgi</p> <p>Absent functional CFTR</p>	<p>CFTR DNA</p> <p>Nucleus</p> <p>Full-length CFTR RNA</p> <p>Endoplasmic reticulum</p> <p>Nascent CFTR</p> <p>Golgi</p> <p>Defective channel regulation</p>	<p>CFTR DNA</p> <p>Nucleus</p> <p>Full-length CFTR RNA</p> <p>Endoplasmic reticulum</p> <p>Nascent CFTR</p> <p>Golgi</p> <p>Defective CFTR channel</p>	<p>CFTR DNA</p> <p>Nucleus</p> <p>Correct RNA</p> <p>Incorrect RNA</p> <p>Endoplasmic reticulum</p> <p>Scarce nascent CFTR</p> <p>Golgi</p> <p>Scarce functional CFTR</p>	<p>CFTR DNA</p> <p>Nucleus</p> <p>Full-length CFTR RNA</p> <p>Endoplasmic reticulum</p> <p>Nascent CFTR</p> <p>Golgi</p> <p>Decreased CFTR membrane stability</p>
Type of mutations	Nonsense; frameshift; canonical splice	Missense; amino acid deletion	Missense; amino acid change	Missense; amino acid change	Splicing defect; missense	Missense; amino acid change
Specific mutation examples ³¹	Gly542X Trp1282X Arg553X 621+1G → T	Phe508del Asn1303Lys Ile507del Arg560Thr	Gly551Asp Gly178Arg Gly551Ser Ser549Asn	Arg117His Arg347Pro Arg117Cys Arg334Trp	3849+10kbc → T 2789+5G → A 3120+1G → A 5T	4326delTC Gln1412X 4279insA

Figura 3. Biosintesi della Sfingosina

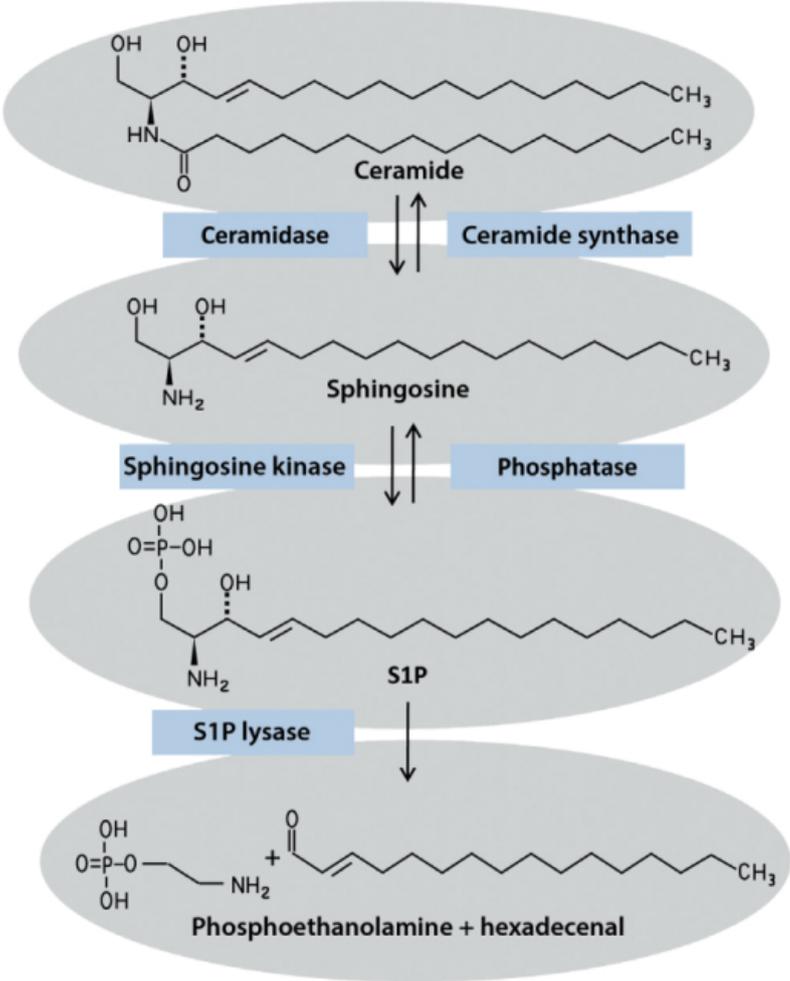


Figura 4: Figura rappresentativa di elettroforesi su gel d'agarosio al 1,5 % per valutare la corretta dimensione dei prodotti di amplificazione, mediante PCR, della regione di interesse del gene codificante per il β 3AR (500bp). La PCR è stata effettuata su DNA genomico estratto dal sangue dei pazienti con FC e dai controlli sani.

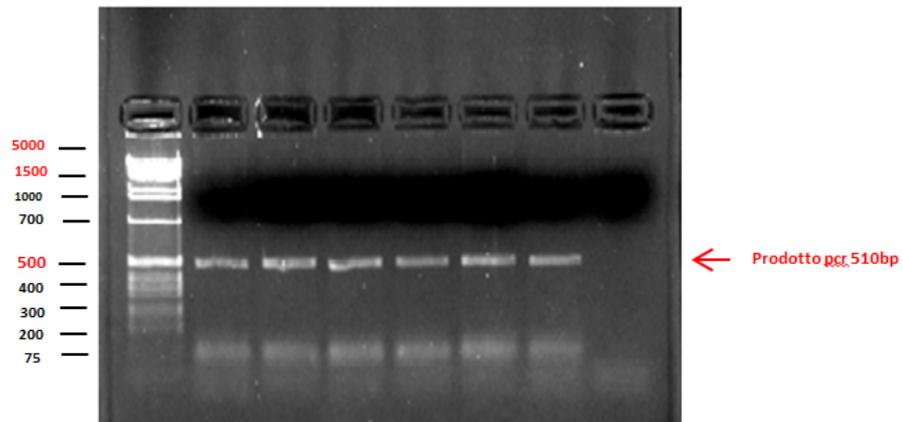


Figura 5: Distribuzione FEV1

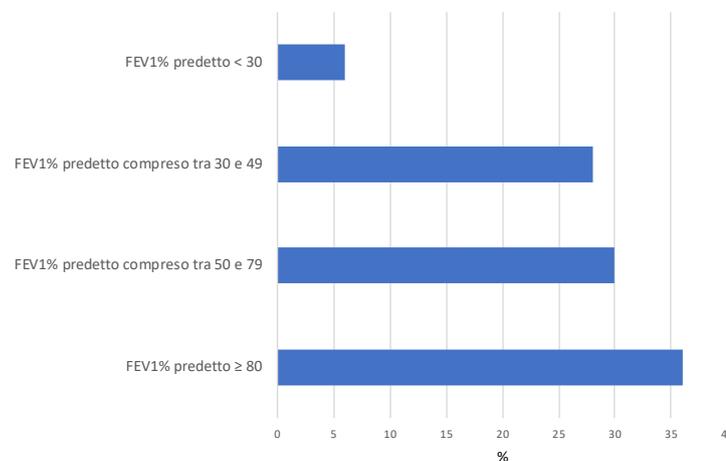


Figura 6: Figura rappresentativa di una elettroforesi su gel d'agarosio al 2,5 % per valutare la presenza della variante polimorfica C387T (TRP64ARG) mediante digestione (RFLP) dei prodotti di PCR effettuata su DNA genomico estratto dal sangue dei pazienti con FC e dai controlli sani.

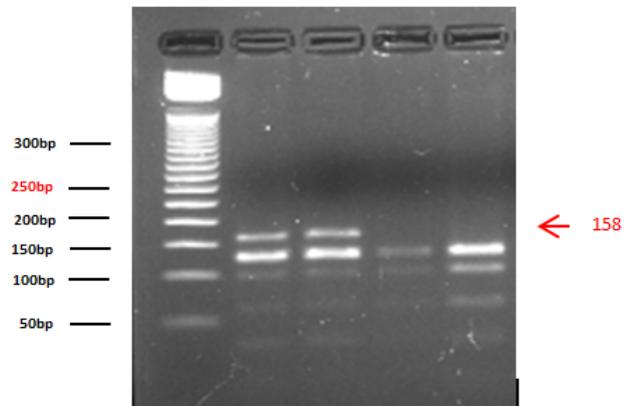


Figura 7: Sequenza diretta dell'esone 1 del gene adbr3. La freccia mostra la presenza della mutazione in eterozigosi C/T (Trp64Arg).

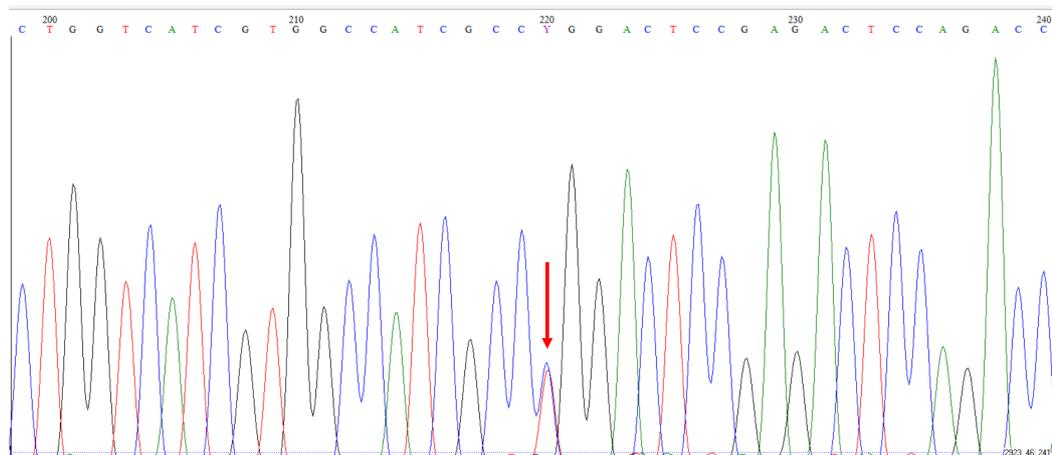


Figura 8: Pannelli rappresentativi (in alto) e grafico a barre (in basso) mostrandoti i livelli di SphK1 nei lisati totali di linfomonociti dei pazienti con FC WT (Trp/Trp) o presentanti la variante polimorfica Trp64Arg. I livelli della proteina GAPDH sono stati utilizzati come controllo di caricamento (*p<0.05 vs WT).

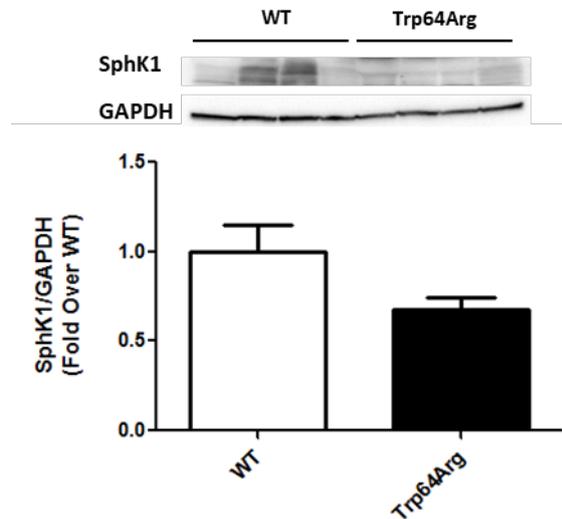


Tabella 1: Gruppi genotipo Trp/Arg e genotipo Trp/Trp a confronto

	Pazienti FC	
	Trp/Arg	Trp/Trp
Variabili fenotipiche	n=15	n=49
Sex (F)	4	31
BMI	22,8	22,9
FEV1 % predetto	63,7	66,5
FVC % predetto	75,7	80,8
Omozigoti DF508	27%	30%

Bibliografia

1. *O'Sullivan BP, Freedman SD. Cystic fibrosis. Lancet. 2009 May 30;373(9678):1891-904. doi: 10.1016/S0140-6736(09)60327-5. Epub 2009 May 4. Review. PubMed PMID: 19403164*
2. *Davis P., Drumm M., Konstan M. Cystic fibrosis: State of the art; Am. J. Respir. Crit. Care. Med. 1996; 154:1229-1256*
3. *Riordan JR, Rommens JM, Kerem B et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. Science 1989;245:1066–73*
4. *Cantiello HF. Electrodifusional ATP movement through CFTR and other ABC transporters. Pflugers Arch. 2001;443 Suppl 1:S22-7. Epub 2001 Aug 11. Review. PubMed PMID: 11845298*
5. *Kim Chiaw P, Eckford PD, Bear CE. Insights into the mechanisms underlying CFTR channel activity, the molecular basis for cystic fibrosis and strategies for therapy. Essays Biochem. 2011 Sep 7;50(1):233-48. doi: 10.1042/bse0500233. Review. PubMed PMID: 21967060.*
6. *Pier GB, Grout M, Zaidi TS et al. Role of mutant CFTR in hypersusceptibility of cystic fibrosis patients to lung infections. Science. 1996 Jan 5;271(5245):64-7. PubMed PMID: 8539601*
7. *Chmiel JF, Berger M, Konstan MW. The role of inflammation in the pathophysiology of CF lung disease. Clin Rev Allergy*

- Immunol.* 2002 Aug;23(1):5-27. Review. PubMed PMID: 12162106
8. Boyle MP, De Boeck K. A new era in the treatment of cystic fibrosis: correction of the underlying CFTR defect. *Lancet Respir Med.* 2013 Apr;1(2):158-63. doi: 10.1016/S2213-2600(12)70057-7. Epub 2013 Jan 30. Review. Erratum in: *Lancet Respir Med.* 2013 Apr;1(2):10
 9. Kerem B, Kerem E. The molecular basis for disease variability in cystic fibrosis. *Eur J Hum Genet.* 1996;4(2):65-73. Review. PubMed PMID: 8744024.
 10. Castellani C, Cuppens H, Macek M Jr et al Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cyst Fibros.* 2008 May;7(3):179-96. doi: 10.1016/j.jcf.2008.03.009. Review. PubMed PMID: 18456578; PubMed Central PMCID: PMC2810954.
 11. Kerem, E. and Kerem, B. (1996), Genotype-phenotype correlations in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 1996;22:387–95.
 12. Boyle MP. Adult cystic fibrosis. *JAMA* 2007;298:1787–93
 13. Burgel PR, Bellis G, Olesen HV et al ERS/ECFS Task Force on The Provision of Care for Adults with Cystic Fibrosis in Europe. Future trends in cystic fibrosis demography in 34 European countries. *Eur Respir J* 2015;pii: ERJ-01963-2014.

14. Ramsey BW, Davies J, McElvaney NG, et al. A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D Mutation. *N Engl J Med* 2011;365:1663–72.
15. Accurso FJ, Rowe SM, Clancy JP et al. Effect of VX-770 in persons with cystic fibrosis and the G551D-CFTR mutation *N Eng J Med* 2010;363:1991-2003.
16. Davies JC, Wainwright CE, Canny GJ, et al. Efficacy and safety of ivacaftor in patients aged 6 to 11 years with cystic fibrosis with a G551D mutation. *Am J Respir CritCare Med* 2013;187:1219–25.
17. Wainwright C, Elborn JS, Ramsey BW, Marigowda G, Huang X, Cipolli M, Colombo C, Davies JC, De Boeck K, Flume PA, Konstan MV, McColley SA, McCoy K, McKone EF, Munck A, Ratjen F, Rowe Sm, Waltz D, Boyle MP for the TRAFFIC and TRANSPORT Study Groups. Lumacaftor–Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del CFTR. *N Engl J Med* 2015; 373:220-231
18. Laurans M, Arion A, Fines-Guyon M et al *Pseudomonas aeruginosa* and cystic fibrosis: first colonization to chronic infection. *Arch Pediatr* 2006;13:S22–9.
19. Valenza G, Tappe D, Turnwald D et al Prevalence and antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from

- sputa of patients with cystic fibrosis. J Cyst Fibros 2008;7:123–7*
20. Veltman M, Stolarczyk M, Radzioch et al *Correction of lung inflammation in a F508del CFTR murine cystic fibrosis model by the sphingosine-1-phosphate lyase inhibitor LX2931. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2016;311(5):L1000-L1014*
21. Malik FA, Meissner A, Semenkova I et al *Sphingosine-1-Phosphate Is a Novel Regulator of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Activity. PLoS One. 2015;10(6):e0130313.*
22. Tibboel J, Reiss I, de Jongste JC, Post M. *Sphingolipids in lung growth and repair. Chest. 2014;145(1):120-128.*
23. Xu Y, Krause A, Limberis M, Worgall TS, Worgall S. *Low sphingosine-1-phosphate impairs lung dendritic cells in cystic fibrosis. Am J Respir Cell Mol Biol. 2013;48(2):250-7.*
24. Cannavo A, Liccardo D, Komici K et al *Sphingosine Kinases and Sphingosine 1-Phosphate Receptors: Signaling and Actions in the Cardiovascular System. Front Pharmacol. 2017 Aug 23;8:556. doi: 10.3389/fphar.2017.00556.*
25. Chew WS, Wang W, Herr DR *To fingolimod and beyond: The rich pipeline of drug candidates that target S1P signaling. Pharmacol Res. 2016 Nov;113(Pt A):521-532*

26. Grassmé H, Henry B, Ziobro et al β 1-Integrin Accumulates in Cystic Fibrosis Luminal Airway Epithelial Membranes and Decreases Sphingosine, Promoting Bacterial Infections. *Cell Host Microbe*. 2017;21(6):707-718.e8.)
27. Bossard F, Silantieff E, Lavazais-Blancou E et al β 1, β 2, and β 3 adrenoceptors and Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor 1 expression in human bronchi and their modifications in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011;44(1):91-8.)
28. Cannavo A, Rengo G, Liccardo D et al β 1AR-blockade prevents post-ischemic myocardial decompensation via β 3AR-dependent protective sphingosine-1 phosphate signaling. *J Am Coll Cardiol* 2017; 70:182-192.)
29. Kimura K, Sasaki N, Asano A et al Mutated human beta3-adrenergic receptor (Trp64Arg) lowers the response to beta3-adrenergic agonists in transfected 3T3-L1 preadipocytes. *Horm Metab Res*. 2000;32(3):91-6.)