

## ABSTRACT

La fibrosi cistica è una malattia congenita autosomica recessiva con andamento cronico, causata da una mutazione nel gene CFTR ( Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) che causa produzione di un muco denso e viscoso con ripercussioni gravi soprattutto a livello polmonare, pancreatico, epatico e riproduttivo. Ad oggi sono state individuate più di 2000 mutazioni della proteina CFTR. Tra queste mutazioni la più frequente è la F508del (anche nota come  $\Delta F508$ ), associata ad un fenotipo severo.

A causa dell'ampia variabilità individuale dovuta alle molteplici mutazioni, non esiste ancora una cura definitiva per la fibrosi cistica. La terapia più utilizzata al momento è un approccio personalizzato attraverso l'individuazione del difetto genetico e l'impiego di farmaci modulatori del canale CFTR, in grado di migliorare o ripristinare parzialmente l'espressione, la funzione e la stabilità della proteina CFTR difettosa. Attualmente esistono quattro farmaci modulatori disponibili sul mercato ed efficaci su pazienti con determinate mutazioni del canale: Ivacaftor, Orkambi®, Symkevi® e Trikafta®. Nonostante questi farmaci consentano di trattare in modo appropriato un gran numero di pazienti migliorandone la qualità e la durata della vita, non sono adattabili a tutte le tipologie di soggetti e anche coloro che risultano idonei per questa terapia talvolta rispondono in maniera piuttosto variabile. Per questo motivo la Ricerca nel campo della Fibrosi Cistica è in parte incentrata sull'approfondimento della comprensione degli effetti dei farmaci attualmente usati su soggetti con mutazioni considerate compatibili ma rispondenti in maniera variabile, in parte invece è volta alla realizzazione di nuovi farmaci per soggetti con mutazioni non ancora idonee per le terapie disponibili.

Ad oggi i modelli più utilizzati per monitorare l'andamento dell'effetto delle terapie a livello molecolare sono i potenziali nasali e gli organoidi rettali e respiratori, la cui preparazione però non è esente da una certa invasività e lunghezza nei tempi di realizzazione. Per questi motivi negli ultimi anni ci si è focalizzati sulla possibilità di inserire accanto a questi modelli anche i PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells) che esprimono CFTR deficitaria nei pazienti affetti da fibrosi cistica correlata con alcune disfunzionalità specifiche relative alla risposta immunitaria.

Nel gruppo di ricerca in cui mi sono inserita, ci siamo posti l'obiettivo di individuare in questo modello cellulare potenziali biomarkers correlati all'efficacia di terapie con modulatori di CFTR.

In particolare, tra le proteine modulate da terapia con Ivacaftor la Metalloproteasi 9 della Matrice (MMP9) risultava quella maggiormente coinvolta, valutando la correlazione tra l'espressione di MMP9 e il recupero dell'attività del canale CFTR in PBMCs di un paziente sottoposto a terapia.

Infatti, l'analisi in Western Blot dei livelli di MMP9 rivelavano una diminuzione di espressione in corrispondenza al recupero dell'attività del canale e ad un miglioramento dei parametri clinici del paziente sottoposto a terapia.

Successivamente siamo passati ad analizzare l'espressione di MMP9 nei PBMCs di pazienti FC sottoposti a terapia con il nuovo modulatore Trikafta®. Anche in questo caso i risultati ottenuti hanno dimostrato correlazione tra la modulazione di MMP9, attività di CFTR e condizioni cliniche dei pazienti.

Inoltre, per poter confermare che la modulazione di MMP9 potesse essere considerata un buon indicatore di risposta ai farmaci modulatori di CFTR, abbiamo monitorato mediante zimografia l'attività enzimatica di MMP9 direttamente in campioni di plasma degli stessi pazienti di cui avevamo già analizzato i PBMCs.

I risultati ottenuti hanno rivelato una diminuzione dell'attività enzimatica di MMP9 nel plasma dei pazienti che rispondevano bene alla terapia, mentre nei pazienti che non mostravano miglioramenti i valori enzimatici rimanevano invariati.

Infine, per ottenere maggiori informazioni riguardo l'espressione di MMP9 e la progressione della malattia FC, abbiamo studiato il possibile pathway intracellulare legato alla sua sintesi, soffermandoci in particolare sullo stato di fosforilazione di ERK1/2 e la conseguente modulazione di I $\kappa$ B $\alpha$  ed NF- $\kappa$ B, essendo riportato in letteratura che quest'ultimo è un fattore trascrizionale di MMP9. I risultati ottenuti, seppur ancora preliminari, hanno evidenziato che l'espressione di MMP9 nei pazienti rispondenti positivamente alla terapia sia sotto stretto controllo del pathway ERK1/2/NF $\kappa$ B mentre nei non rispondenti la mancata riduzione di MMP9 possa essere causata da una potenziale alterazione nella modulazione dello stato di fosforilazione di ERK1/2.

In conclusione, i dati ottenuti e raccolti in questa tesi suggeriscono che la modulazione dell'espressione di MMP9 possa essere considerata un buon indicatore dell'efficacia di terapie effettuate con farmaci modulatori di CFTR.

Ulteriori studi rivolti comprensione dell'alterazione nella modulazione dell'espressione di MMP9 nei pazienti non rispondenti alla terapia saranno necessari per ottenere maggiori informazioni riguardo la variabilità di risposta clinica dei pazienti alle terapie a cui sono sottoposti. Questa conoscenza sarà

utile per promuovere una sempre più necessaria medicina personalizzata che possa garantire miglioramenti nelle risposte individuali alle terapie.