



**Università
di Genova**

DISTAV

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA TERRA, DELL'AMBIENTE E DELLA VITA

Corso di Laurea Magistrale in BIOLOGIA APPLICATA e SPERIMENTALE

Indirizzo Alimenti e Nutrizione

Anno Accademico 2023-2024

TESI DI LAUREA

“La variabilità del quadro clinico riscontrato nei pazienti affetti da Fibrosi Cistica in risposta ai farmaci modulatori di CFTR è in relazione ad una diversa modulazione di MMP9 plasmatica”

Candidata

Ferrari Alessia

Relatore

Prof. Monica Averna

Correlatore

Prof. Francesco Piacente

INDICE

1. INTRODUZIONE

1.1 COS' È LA FIBROSI CISTICA

1.2 EPIDEMIOLOGIA

1.3 EZIOLOGIA E MUTAZIONI

1.4 MANIFESTAZIONI E SINTOMI

1.5 DIAGNOSI

1.6 TRATTAMENTO

1.7 FIBROSI CISTICA E STATO NUTRIZIONALE

1.8 MODULATORI E BIODISPONIBILITA'

1.9 MODELLI DI STUDIO

1.10 ANALISI PROTEOMICA E BIOINFORMATICA SU PBMCs IN PAZIENTI IN TERAPIA
CON IVACAFTOR

1.11 METALLO PROTEASI E RUOLO DI MMP9 NELLA FIBROSI CISTICA

2. OBIETTIVI

3. MATERIALI E METODI

3.1 MATERIALI

3.2 DICHIARAZIONE ETICA

3.3 PAZIENTI DONATORI E RACCOLTA CAMPIONI

3.4 ISOLAMENTO PBMCs E TRATTAMENTO CELLULE

3.5 ANALISI WESTERN BLOT

3.6 ANALISI ZYMOGRAFICA

3.7 DOSAGGIO DELL'ATTIVITA' DI CFTR

3.8 ANALISI STATISTICA

4. RISULTATI

4.1 CORRELAZIONE TRA ESPRESSIONE DI MMP9 E RECUPERO DELL'ATTIVITA' DI CFTR
IN UN PAZIENTE SOTTOPOSTO A TERAPIA IVACAFTOR

4.2 ESPRESSIONE DI MMP9 IN PBMCs DI PAZIENTI FC PRIMA E DOPO TERAPIA CON
TRIKAFTA®

4.3 ATTIVITÀ DI MMP9 IN CAMPIONI DI PLASMA DI PAZIENTI FC DURANTE TERAPIA
TRIKAFTA®

4.4 STUDIO DEL PATHWAY INTRACELLULARE ASSOCIATO ALL'ESPRESSIONE DI MMP9
IN PBMCs DI PAZIENTI FC DURANTE TERAPIA TRIKAFTA®

5. DISCUSSIONE

6. BIBLIOGRAFIA

1. INTRODUZIONE

1.1 COS' È LA FIBROSI CISTICA

La fibrosi cistica (detta anche mucoviscidosi o malattia fibrocistica del pancreas) è una malattia congenita autosomica recessiva con andamento cronico. [1]

Da testi rinvenuti dalla storia medioevale germanica è riportato un verso che recita “Morirà presto il bambino la cui pelle baciata avrà sapore di sale” alludendo proprio a questa malattia. Solo nel 1938 viene clinicamente descritta nella sua complessità dalla professoressa Dorothy Andersen della Columbia University di New York.

È una patologia causata da una mutazione nel gene CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), il quale codifica per una proteina canale implicata nella secrezione di cloro ed elettroliti nei tessuti epiteliali di vari organi. La mutazione comporta alterazioni nel trasporto elettrolitico con produzione di un muco denso e viscoso che causa ostruzione, distruzione e cicatrizzazione dei lumi ghiandolari con conseguente alterazione della secrezione delle ghiandole esocrine. [2]

È una patologia multiorgano con ripercussioni gravi soprattutto a livello polmonare, pancreatico, epatico e riproduttivo.

I sintomi e la gravità della malattia variano notevolmente da individuo a individuo in base al tipo di mutazione.

1.2 EPIDEMIOLOGIA

Si stima che in Italia 1 soggetto su 30 sia portatore sano del gene della fibrosi cistica, quindi, circa 2 milioni di persone affette solo in Italia; una coppia su 900 circa è composta da due portatori, con il 25% di probabilità, per la coppia, di avere un bambino malato ad ogni gravidanza. Per questo motivo ogni 2500-3000 nuovi nati nasce un bambino affetto da fibrosi cistica ed è infatti la più frequente fra le malattie genetiche gravi e letali in tutte le popolazioni di origine europea e nordamericana, mentre è meno diffusa tra popolazioni africane e asiatiche. La distribuzione tra maschi e femmine all'interno della popolazione invece è pressoché identica.

Per merito dei continui progressi terapeutici, assistenziali e diagnostici, la prevalenza dei pazienti FC (affetti da fibrosi cistica) in Italia, con età uguale e superiore ai 18 anni, si attesta intorno al 62.7%. [3]

La tabella 1 seguente riassume alcune delle più importanti informazioni riguardanti la popolazione FC Italiana nell'anno 2021, documentate dal Registro Italiano Fibrosi Cistica (RIFC).

Outcome		Females		Males		Total	
PwCF registered in the ECFSPR	n (%)	25765	(47.7)	28278	(52.3)	54043	(100)
Age at follow-up (years) (pwCF alive on 31/12/2021)	median (25 th pctl-75 th pctl)	19.2	(10.0-31.4)	20.3	(10.4-32.8)	19.8	(10.1-32.1)
Patients ≥ 18 years (pwCF alive on 31/12/2021)	n (%)	13500	(52.8)	15486	(55.1)	28986	(54.0)
Age at diagnosis (months)*	Median (25 th pctl-75 th pctl)	3.6	(1.2-31.9)	3.6	(1.2-30.0)	3.6	(1.2-31.1)
PwCF with at least one F508del allele recorded*	n (%)	19495	(80.3)	21334	(80.3)	40829	(80.3)
PwCF living with lung transplant**	n (%)	1463	(6.0)	1406	(5.3)	2869	(5.6)
PwCF living with liver transplant**	n (%)	108	(0.4)	230	(0.9)	338	(0.7)
PwCF deceased in 2021***	n (%)	175	(0.7)	171	(0.6)	346	(0.7)
Age at death (years)***	median (25 th pctl-75 th pctl)	34.0	(25.0-44.0)	32.0	(21.0-43.0)	33.0	(22.0-44.0)

* Only people with CF seen during the year by clinical staff. The total number presented is 51,168.

** Only people with CF alive at 31/12/2021. The total number of the CF population presented is 50,852.

*** Only people with CF seen during the year. For the United Kingdom, all individuals with a confirmed diagnosis of CF were included (N=10,907). The total number presented is 51,907.

Tabella 1, RIFC, Report 2021

The number of people with CF registered in the ECFSPR varies across countries and continues to grow.

Number of people with CF registered in the ECFSPR in 2021.

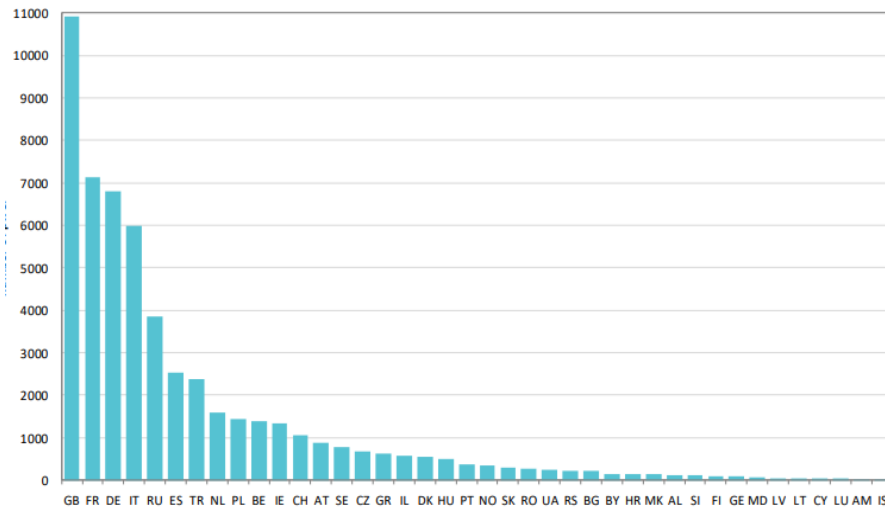


Figura 1, RIFC, Report 2021

Age distribution is remarkably skewed towards childhood and adolescence in CF.

Distribution of age at follow up by sex.

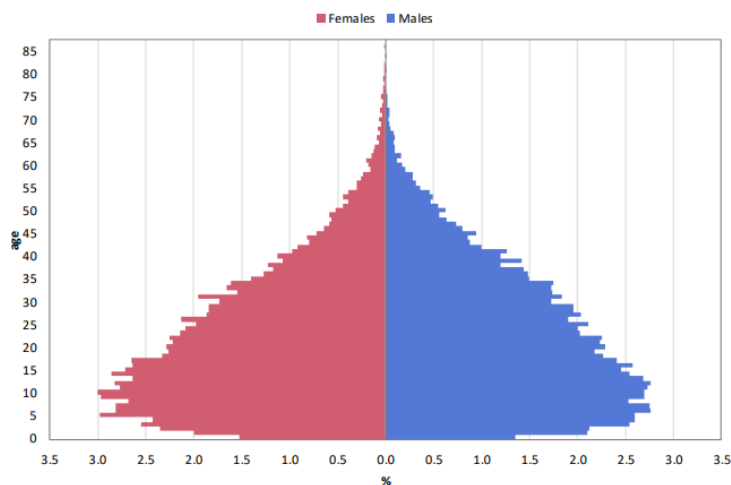


Figura 2, RIFC, Report 2021

1.3 EZIOLOGIA E MUTAZIONI

La fibrosi cistica è causata da una mutazione su entrambi gli alleli del gene che codifica per la proteina CFTR, posto sul cromosoma 7, locus q31.2; il gene è composto da circa 230.000 paia di basi e comprende 27 esoni che codificano una proteina di 1480 aminoacidi e peso molecolare di 168 kDa. Questa particolare proteina agisce come canale anionico, collocandosi sul lato apicale della membrana plasmatica delle cellule epiteliali. È responsabile della secrezione di cloruro, bicarbonato, glutatione e tiocianato su stimolazione del segnale cAMP/PKA (AMP-ciclico/ proteina chinasi A) [4]. Appartiene alla famiglia dei trasportatori di membrana ABC (ATP binding cassette), la maggior parte dei quali necessita dell'attività ATPasica per trasportare i substrati attraverso le membrane [5]. La proteina è composta da quattro domini: due transmembrana MSD1 e MSD2 (Membrane Spanning Domain 1 e 2) e 2 domini di legame per i nucleotidi NBD1 e NBD2 (Nucleotide-Binding Domains 1 e 2) [6-9]. La porzione intracellulare rappresenta l'80% della massa totale e comprende i siti di gating ATP-dipendenti e i siti di fosforilazione per la proteina chinasi A (PKA), che una volta fosforilati rendono il canale attivo.[10]

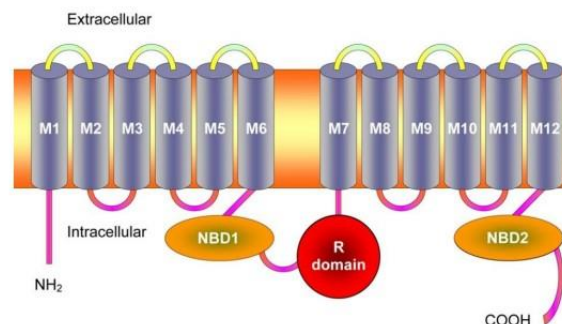


Figura 3, Struttura del canale CFTR

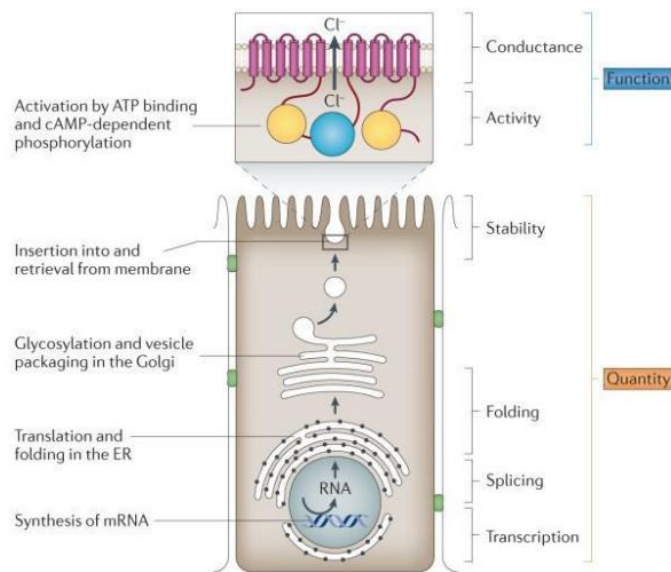


Figura 4, Conseguenze molecolari delle variazioni nel gene CFTR, Cutting Garry R. (2015) Cystic fibrosis genetics: from molecular understanding to clinical application. Nat. Rev. Genet. 16, 47.

Ad oggi sono state individuate più di 2000 mutazioni della proteina CFTR, raggruppate in 6 classi principali in base alla loro specifica alterazione funzionale:

- Le mutazioni di Classe I derivano da delezioni, frameshifts e mutazioni nonsense che causano la terminazione prematura dell'RNA messaggero con conseguente produzione di una proteina incompleta e instabile che viene rapidamente degradata. I soggetti colpiti da questo tipo di mutazione non possiedono alcun canale CFTR e manifestano un fenotipo FC grave. [11,12]
- Le mutazioni di classe II consentono la sintesi della proteina ma inducono modifiche post-traduzionali con alterazioni del trasporto e della localizzazione in membrana; quindi, i pazienti hanno una ridotta quantità di proteina funzionante. Tra queste mutazioni la più frequente è la F508del (anche nota come $\Delta F508$). [13]
- Le mutazioni di classe III consentono il trasporto e la maturazione della proteina CFTR fino a formare il canale CFTR nella membrana della cellula ma la cui funzionalità è compromessa, per cui si ha una riduzione dei tempi di apertura del canale. [11,12]
- Le mutazioni di classe IV influenzano la permeabilità agli ioni mediata da CFTR con diminuzione della conduttanza del canale e della velocità di efflusso degli anioni. [14,15]
- Le mutazioni della V categoria sono responsabili di una resa di sintesi proteica inferiore rispetto ai soggetti sani a causa di un meccanismo di splicing alterato nell'RNA messaggero.

- Le mutazioni della classe VI riducono la stabilità della proteina CFTR sulla membrana della cellula a causa di un aumento del turnover proteico dovuto ad una alterazione all'estremità C-terminale della proteina. [13-16]

	MUTATION CLASSES					
	I	II	III	IV	V	VI
CFTR DEFECT	NO SYNTHESIS	PROCESSING DEFECT	REGULATION DEFECT	DECREASED CONDUCTANCE	REDUCED SYNTHESIS	REDUCED STABILITY
FUNCTIONAL CONSEQUENCES	CFTR IS NOT SYNTHESIZED	FOLDING DEFECT, NO TRAFFIC	CHANNEL OPENING DEFECT	ION TRANSPORT DEFECT	DECREASED CFTR SYNTHESIS	DECREASED HALF-LIFE OF CFTR
TYPE OF MUTATIONS	FRAMESHIFT; NONSENSE; CANONICAL SPLICE	AMINOACID DELETION; MISSENSE	AMINOACID CHANGE; MISSENSE		SPLICING DEFECT; MISSENSE	AMINOACID CHANGE; MISSENSE
EXAMPLES OF MAIN MUTATIONS	R553X G542X W128X 621+1G -> T	F508del N1303K I507del R560T	G551D G1349D G178R	R117H R347P R117C R334W	3849+10kbC -> T 3120+1G -> A 2789+5G -> A	4326delTC 4279insA

Figura 5, Classificazione delle mutazioni CFTR. Data sourced from: Boyle, M. P., & De Boeck, K. (2013). A new era in the treatment of cystic fibrosis: correction of the underlying CFTR defect. *The Lancet. Respiratory medicine*, 1(2), 158–163. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(12\)70057-7](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(12)70057-7).

Le mutazioni di classe I, II, III sono associate ad un fenotipo severo, tra queste rientra la mutazione F508del, che consiste in una delezione di tre nucleotidi corrispondenti ad un residuo di fenilalanina in posizione 508 [17]. Questo difetto impedisce alla proteina di assumere una conformazione regolare e di collocarsi stabilmente sulla membrana della cellula, dove dovrebbe agire come canale per il passaggio del cloro e degli altri elettroliti.

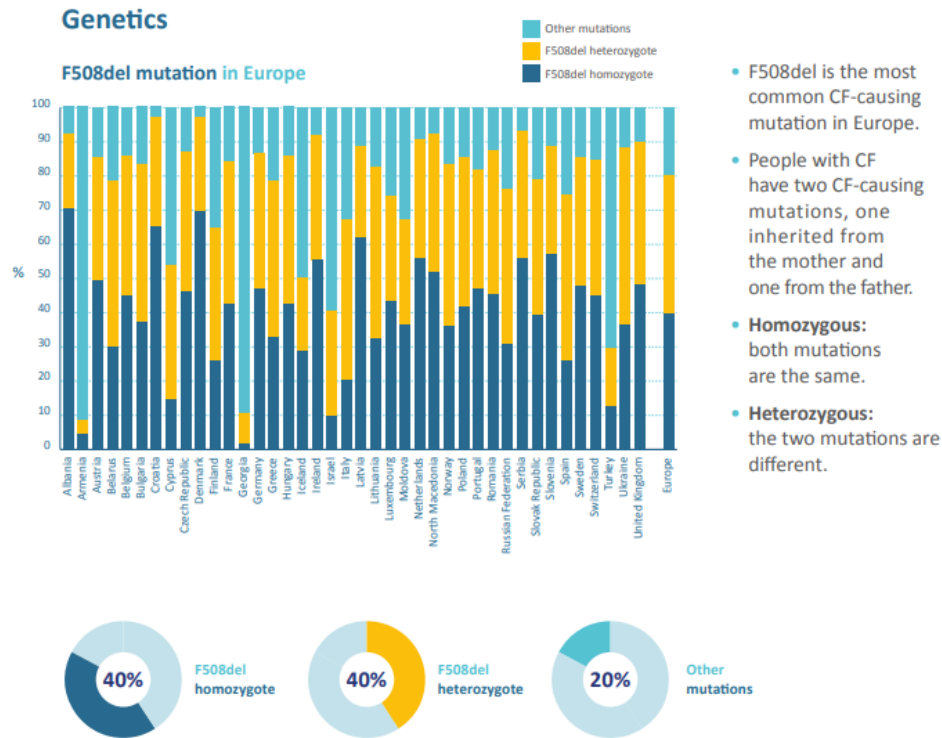


Figura 6, ECFSPR Report annuale 2021, Zolin A, Orenti A, Jung A, van Rens J et al, 2023.

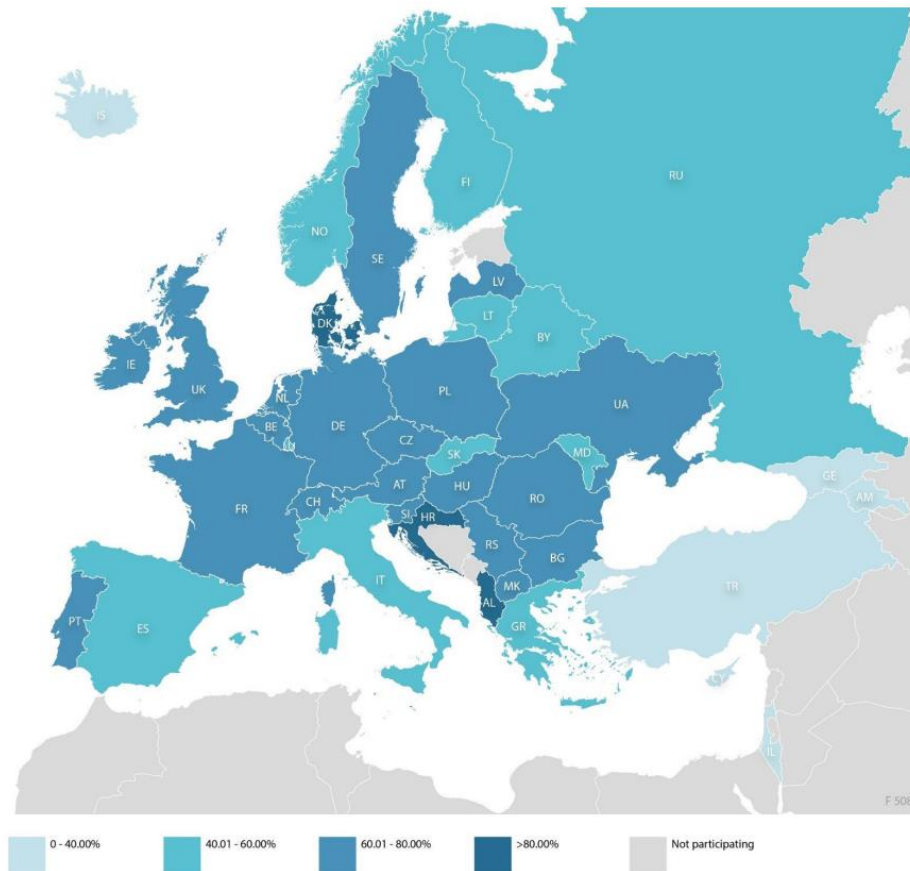


Figura 7, Distribuzione geografica della variante F508del, ECFSPR Report annuale 2021, Zolin A, Orenti A, Jung A, van Rens J et al, 2023.

1.4 MANIFESTAZIONI E SINTOMI

Il malfunzionamento e/o l'assenza del canale CFTR si ripercuote su tutte le secrezioni esocrine dei tessuti epiteliali nelle cui cellule il canale è presente, portando ad una diminuzione del contenuto di cloro e acqua e alla produzione di un muco denso e viscoso.

I segni più comuni della fibrosi cistica sono pelle salata [18], scarsa crescita e scarso aumento di peso nonostante una normale assunzione di cibo [19], accumulo di muco denso e appiccicoso nel distretto polmonare, digestivo e negli organi riproduttivi, ove provoca ostruzione [20], infezioni polmonari frequenti, difficoltà digestive e sterilità. [21]

Le manifestazioni più gravi si hanno a livello polmonare e del sistema digerente.

Nei polmoni l'accumulo di muco denso riduce la clearance mucociliare impedendo la rimozione efficace dei batteri e favorendo così le infezioni, inoltre causa ostruzione delle vie aeree con conseguente infiammazione e la manifestazione di bronchiti e polmoniti ricorrenti, soprattutto ad opera di microrganismi quali *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* [22]; nei casi più gravi lo stato di malattia può aggravarsi fino a insufficienza respiratoria.

I segni clinici riguardanti l'apparato digestivo invece interessano il pancreas nell'85% dei pazienti. A causa dell'ostruzione dei dotti pancreatici gli enzimi digestivi non riescono ad essere riversati nel duodeno per contribuire alla digestione degli alimenti. Questo comporta insufficienza pancreatica, sintomi diarroici e malassorbimento. Con il progredire della malattia i pazienti possono sviluppare una forma secondaria di diabete e stati di pancreatiti acute che tendenzialmente evolvono in forme croniche.

In alcuni pazienti può essere compromessa anche la funzionalità del fegato per ostruzione dei dotti biliari con accumulo di bile e prodotti di scarto e in un numero ristretto di casi questa condizione può evolvere in cirrosi, insufficienza epatica e ipertensione portale.

Altri sintomi che possono comparire sono il malassorbimento dei grassi, i ritardi nella crescita e nello sviluppo, la riduzione della densità ossea, la maggiore vulnerabilità dei reni alla formazione di calcoli renali, infertilità maschile ed indebolimento del sistema immunitario.

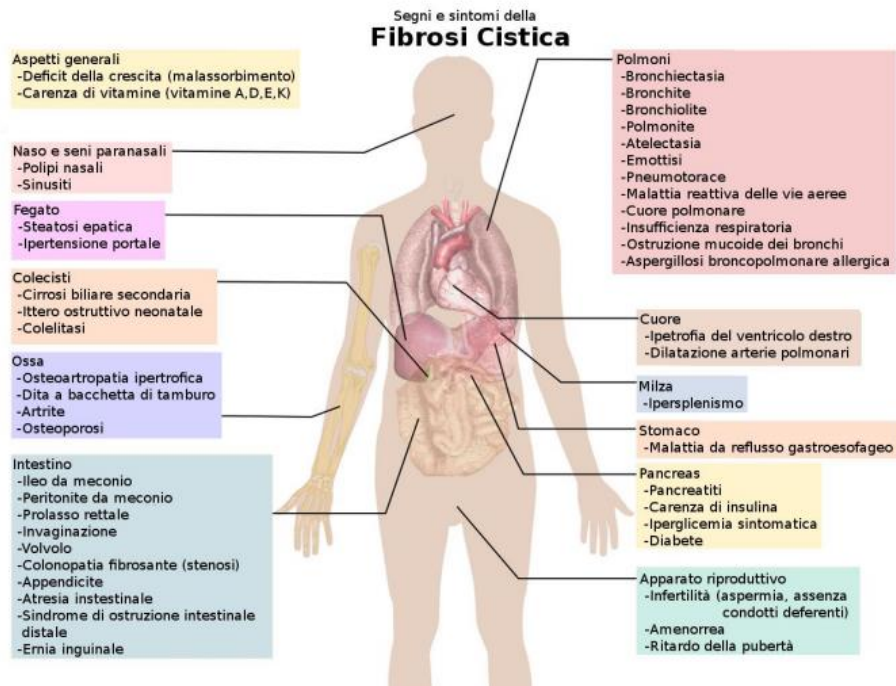


Figura 8, Manifestazioni cliniche della fibrosi cistica Kliegman, Robert; Richard M Kliegman, Nelson essentials of pediatrics, St. Louis, Mo, Elsevier Saunders, 2006.

1.5 DIAGNOSI

La fibrosi cistica può essere diagnosticata grazie a vari metodi, quali lo screening neonatale, il test del sudore e test genetici.

Il test del sudore è efficace, indolore e non invasivo. Consta di quattro fasi principali al fine di misurare la concentrazione di sale nel sudore: prima viene indotta la produzione di sudore mediante ionoforesi con pilocarpina, poi il sudore viene raccolto, quantificato in peso o volume e infine misurata la concentrazione di cloruro. Il limite al di sopra del quale il test è ritenuto positivo confermando la diagnosi di FC equivale a 60 mEq/L, mentre risulta negativo con valori di cloro al di sotto di 40 mEq/L. Valori compresi tra 30 e 60 mEq/L suggeriscono una condizione borderline, spesso dovuta a mutazioni che determinano una parziale funzionalità del canale [23-24].

Lo screening neonatale ha come obiettivo la diagnosi precoce e consiste in un piccolo prelievo di sangue, effettuato dal tallone del neonato tra le prime 48/72 ore di vita [25]. Vengono analizzati i livelli di Tripsinogeno Immunoreattivo (IRT), precursore degli enzimi pancreatici. Nei neonati affetti da FC i livelli di IRT aumentano, viene però richiesto un secondo screening per l'accertamento diagnostico a circa 1-2 settimane dopo la prima misurazione [26].

Infine, grazie alle tecniche di Next-Generation Sequencing (NGS) e PCR (Polymerase Chain Reaction) è possibile effettuare il test genetico per individuare una mutazione specifica. Vengono prelevati campioni di sangue ed eventualmente campioni di saliva o cellule derivanti dalla mucosa della bocca. Questo approccio è molto importante sia per individuare i portatori

sani all'interno della popolazione sia per sviluppare terapie specifiche e personalizzate sulla base della mutazione individuale [27].

1.6 TRATTAMENTO

Nonostante non vi sia ancora una cura definitiva per la fibrosi cistica a causa dell'ampia variabilità individuale dovuta alle molteplici mutazioni, attualmente sono impiegati trattamenti per gestire efficacemente i sintomi, consentendo un notevole miglioramento nella vita delle persone affette.

L'aspetto più importante a cui mirano le terapie per la fibrosi cistica è la limitazione dell'infiammazione e il trattamento del danno polmonare, per questo vengono prescritti antibiotici, cortisonici, antinfiammatori e si ricorre all'utilizzo di dispositivi meccanici di inalazione e farmaci per eliminare il muco in eccesso.

Possiamo suddividere i trattamenti in quattro categorie principali:

1. La prima categoria comprende i trattamenti finalizzati ad attenuare i sintomi.
2. Gli obiettivi primari sono facilitare la rimozione di muco dai polmoni diminuendo l'infiammazione e gestire l'insufficienza pancreatica.
3. La terapia più utilizzata al momento è la terapia personalizzata attraverso l'individuazione del difetto genetico e l'impiego di farmaci modulatori del canale CFTR; si tratta di farmaci capaci di migliorare o ripristinare parzialmente l'espressione, la funzione e la stabilità della proteina CFTR difettosa [28]
4. Resta poi una categoria più marginale e ancora in fase di sperimentazione che consiste nella terapia genica. In realtà è una terapia limitata alla sola classe di individui affetti dalla mutazione di tipo I, per i quali non sono applicabili altri trattamenti. Sono stati condotti diversi studi di trasferimento genico attraverso vettori virali come adenovirus, adeno-associati e lipo-cationici senza però ottenere sull'uomo gli esiti ottenuti in vitro [29].

I modulatori possiamo distinguerli in correttori o potenziatori: i correttori promuovono una maggiore disponibilità del canale sulla superficie apicale delle membrane delle cellule, i potenziatori migliorano la funzionalità della proteina mutata facilitandone l'apertura e il passaggio degli ioni.

Attualmente esistono quattro farmaci modulatori disponibili sul mercato ed efficaci su persone con determinate mutazioni del canale:

Name	Mode of action	Clinical Stage	Mutations
Ivacaftor (VX770)	Potentiator	FDA-approved 2012	R117H, G551D, G1244E, G1349D, G178R, G551S, S1251N, S1255P, S549N e S549R
Orkambi® (Lumacaftor + Ivacaftor)	Corrector + potentiator	FDA-approved 2015	F508del homozygous
Symkevi® (Tezacaftor + Ivacaftor)	Corrector + potentiator	FDA-approved 2018	Patients heterozygous for F508del and one of the following mutations: P67L, R117C, L206W, R352Q, A455E, D579G, 711+3A→G, S945L, S977F, R1070W, D1152H, 2789+5G→A, 3272 26A→G o 3849+10kbc→T
Trikafta® (Elexacaftor + Tezacaftor + Ivacaftor)	Corrector + corrector + potentiator	FDA-approved 2019	F508del heterozygous

Tabella 2, Modulatore CFTR per il trattamento della Fibrosi Cistica.

- Ivacaftor, anche noto come VX-770 (Vertex. Kalydeco® Product Monograph. 2019) è il primo modulatore prodotto nel 2019, è un potenziatore del canale, efficace nei pazienti con mutazioni di gating di classe III, andando a correggere la capacità di apertura del canale, favorendo il passaggio degli ioni [30-31]. Tuttavia, si è dimostrato efficace solo in una parte dei pazienti affetti da tale mutazione.
- Lumacaftor/Ivacaftor (Vertex. Orkambi® Product Monograph. 2019) è un farmaco costituito da un correttore e il potenziatore, indicato per la terapia dei pazienti con mutazione F508del. Questo secondo modulatore aiuta la proteina CFTR a raggiungere la superficie delle cellule epiteliali, formare il canale del cloro e renderlo parzialmente funzionante. Trial clinici hanno dimostrato un significativo miglioramento della funzione polmonare nei soggetti trattati, di contro si sono però verificati effetti avversi che hanno spinto i ricercatori a trovare nuove alternative. [32,33,34]
- Tezacaftor/Ivacaftor (Vertex. Symkevi® Product Monograph. 2020): Migliora la sintesi della proteina e il trasferimento alla membrana, inoltre rispetto al farmaco precedente ha un profilo di sicurezza maggiore. Indicato in pazienti con doppia mutazione F508del o mutazione F508del associata ad altre ulteriori mutazioni che consentono una funzionalità residua della proteina CFTR. Ha dimostrato efficacia nel miglioramento della funzionalità polmonare [35].
- Ivacaftor/Elexacaftor/Tezacaftor (Vertex Trikafta® Prescribing Information. 2020) combina due correttori ed il potenziatore. Indicato per la doppia mutazione F508del e gli eterozigoti per F508del. Elexacaftor e Tezacaftor svolgono un ruolo cruciale nel facilitare il trasferimento di CFTR alla membrana epiteliale mentre Ivacaftor aumenta la conduttanza del canale una volta posizionato adeguatamente sulla superficie. Trial clinici hanno dimostrato un aumento significativo della funzionalità polmonare, diminuzione delle infezioni e miglioramento della qualità di vita. Attualmente è uno degli approcci terapeutici più efficaci nei pazienti con mutazione F508del. Nonostante

ciò, è bene ricordare che non costituisce una cura definitiva e una interruzione della terapia riporta il paziente alle condizioni pretrattamento [36,37].

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 e difficilmente prevedibile.



Figura 9, La disponibilità di elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor in Europa ha significato un notevole aumento dell'utilizzo dei modulatori tra il 2020 e 2021.

5 In the majority of countries in Europe, more than 50% of all adults with CF are now eligible to receive a CFTR modulator treatment.

People with CF eligible for at least one modulator, by country and last CFTR modulator, adults seen in 2021 who had never had a transplant.

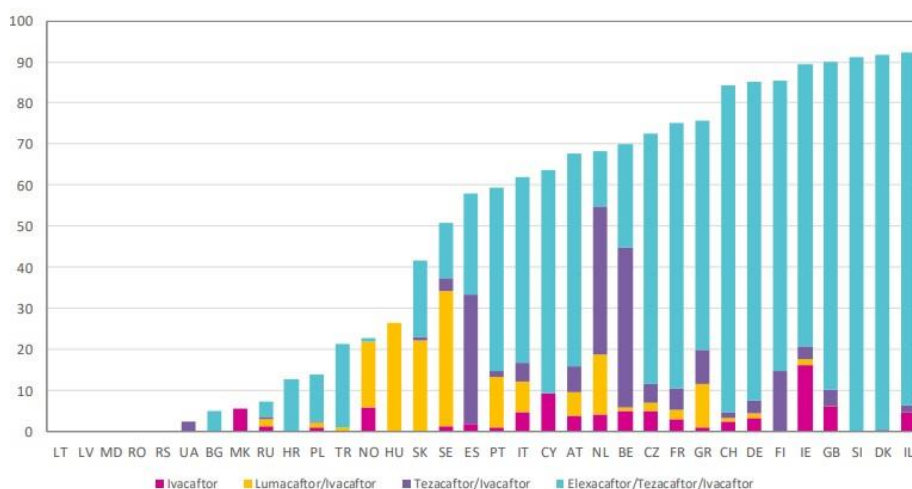


Figura 10, ECFSPR Report annuale 2021, Zolin A, Orenti A, Jung A, van Rens J et al, 2023.

1.7 FIBROSI CISTICA E STATO NUTRIZIONALE

La fibrosi cistica è una condizione patologica caratterizzata da uno squilibrio tra il fabbisogno energetico e l'apporto nutrizionale. Nei soggetti affetti il fabbisogno energetico è maggiore a causa dell'aumento del lavoro respiratorio, dovuto alla fibrosi e all'ostruzione delle vie aeree, dell'implementazione della risposta infiammatoria alle infezioni polmonari croniche e del diminuito assorbimento intestinale degli alimenti [38]. Questo provoca una condizione di carenza proteica e vitaminica, oltre che energetica.

Studi di coorte hanno evidenziato una maggior sopravvivenza tra i pazienti con migliore stato nutrizionale. Non possiamo dire che una corretta alimentazione sia un trattamento sufficiente a curare la patologia ma uno stato di malnutrizione sicuramente influenza negativamente la sua evoluzione e la qualità della vita dei soggetti malati.

La dieta deve dunque essere ipercalorica e la presenza di insufficienza pancreatica deve essere corretta con un'adeguata terapia enzimatica e con l'integrazione di vitamine liposolubili (A, D, E, K).

Un paziente FC dovrebbe assumere circa il 120-150% delle calorie assunte da un soggetto sano, fino ad un 200% se pratica attività sportiva.

Lo stato di malnutrizione comporta una perdita significativa di tessuto muscolare, per questo è importante aumentare l'apporto proteico intorno a 2-3 gr/kg di peso/die.

Il 40% delle calorie giornaliere dovrebbe derivare dai lipidi, assicurandosi di assumere sufficienti quantità di acidi grassi essenziali.

La quota di zuccheri dovrebbe derivare da carboidrati complessi principalmente, con un consumo minore di zuccheri semplici. Importante assumere ad ogni pasto gli enzimi pancreatici per consentire la digestione e l'assorbimento dei nutrienti.

Particolare attenzione va riposta verso l'assunzione di sali minerali, in particolare al sodio, se necessario anche sottoforma di integratori salini, specie durante i climi più caldi e durante attività fisica intensa. [39-44]

Nei soggetti affetti da FC è molto importante soddisfare il fabbisogno di vitamine liposolubili che tendono ad essere perse in fase di malattia.

In particolare, si registra un calo di vitamina A, la cui carenza è associata ad una funzione polmonare compromessa e ad infiammazione sistemica. Le linee guida ESPGHAN (European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition) suggeriscono una integrazione giornaliera di betacarotene nei soggetti FC.

La carenza di vitamina D è una delle condizioni più comuni nei pazienti a causa del malassorbimento, ciò si ripercuote sull'aumento del rischio di esacerbazioni polmonari e fragilità ossea. Viene dunque raccomandata una somministrazione di vitamina D3, mantenendo monitorati i livelli ogni 3-6 mesi.

Anche la vitamina K diminuisce a causa delle terapie antibiotiche a cui spesso i pazienti sono sottoposti, questi infatti vanno a ridurre la flora batterica intestinale produttrice di vitamina K2. Questo deficit può comportare sanguinamento gastrointestinale, ematuria, epistassi, sanguinamento sottocutaneo. Viene suggerita una somministrazione regolare di vitamina K, la cui dose può essere aumentata se sotto terapia antibiotica.

Da non trascurare anche l'eventuale carenza di vitamina E perché può causare un aumento dello stress ossidativo.

Importanti sono le concentrazioni di elettroliti e minerali, tra cui sodio, calcio, zinco e ferro:

- Il sodio deve essere integrato, soprattutto nei neonati, la cui unica fonte di nutrimento è il latte materno, molto povero di sodio, e la cui carenza può causare alterazione nella crescita e scompensi elettrolitici.
- Una carenza di ferro può derivare soprattutto da malassorbimento e deve essere corretta per evitare complicanze gravi come l'anemia sideropenica.
- Il calcio svolge un ruolo importante nel mantenimento della densità ossea, per questo viene raccomandato nei pazienti FC un dosaggio annuale del calcio per valutarne l'andamento.
- Lo zinco è un minerale importante in molti processi metabolici, come costituente di proteine ed enzimi, per il riparo del DNA, per l'apoptosi e una sua carenza comporta una maggiore suscettibilità ad infezioni batteriche, virali e funginee. Una supplementazione di zinco migliora l'appetito, lo stato nutrizionale e la funzionalità polmonare per questo è raccomandata dalle linee guida ESPGHAN.

Fat-soluble vitamin guidelines for pancreatic insufficient people with cystic fibrosis.

Vitamin	Supplementation	Serum reference values and monitoring frequency
Fat-soluble vitamins		
Vitamin A	Amounts dependent on serum values, and supplement form: Retinol (preformed): - Start low - Adapt rapidly to target normal serum reference range Beta carotene (provitamin A): - Prescribe 1 mg/kg/d (maximum 50 mg/d) for 12 weeks - Follow with maintenance dose (maximum 10 mg/d)	Normal reference range provided by the laboratory processing the sample Monitor annually and 3–6 months after a dosage change. Also test when pregnancy is considered.
Vitamin D	Dependent on serum values, which vary with dietary intake and sun exposure: - Starting dose of D3 (cholecalciferol) o Infants 400 IU/d (advance to upper limit of 1000 IU/d) o All others 800 IU/d (advance to upper limit of 2000 for children 1–10 years, and 4000 IU/d for older) - Maintenance dose: adapt to annual serum values, preferably measured at the end of dark months	Serum-25 (OH) D minimum 20 ng/mL (50 nmol/L) Monitor annually, and check 3–6 months after a dosage change
Vitamin E (tocopherols)	α -tocopherol dosing: 100–400 IU/d 50 IU/d for infants <12 months (1 mg = 1.49 IU)	Plasma α -tocopherol:cholesterol ratio >5.4 mg/g Monitor annually, and check 3–6 months after a dosage change
Vitamin K	Vitamin K ₁ - Infants: 0.3–1.0 mg/d - Older children and adults: 1–10 mg/d	Routine biochemical measurement not widely available

Tabella 3, Review 2023, Nutritional Care in Children with Cystic Fibrosis, Mariotti Zani, Grandinetti et al.

Quando la nutrizione orale non è sufficiente si può considerare una supplementazione nutrizionale notturna mediante l'utilizzo di un sondino naso-gastrico. La nutrizione parenterale invece è raramente indicata e dovrebbe essere utilizzata solo come ultima soluzione nei pazienti FC [45].

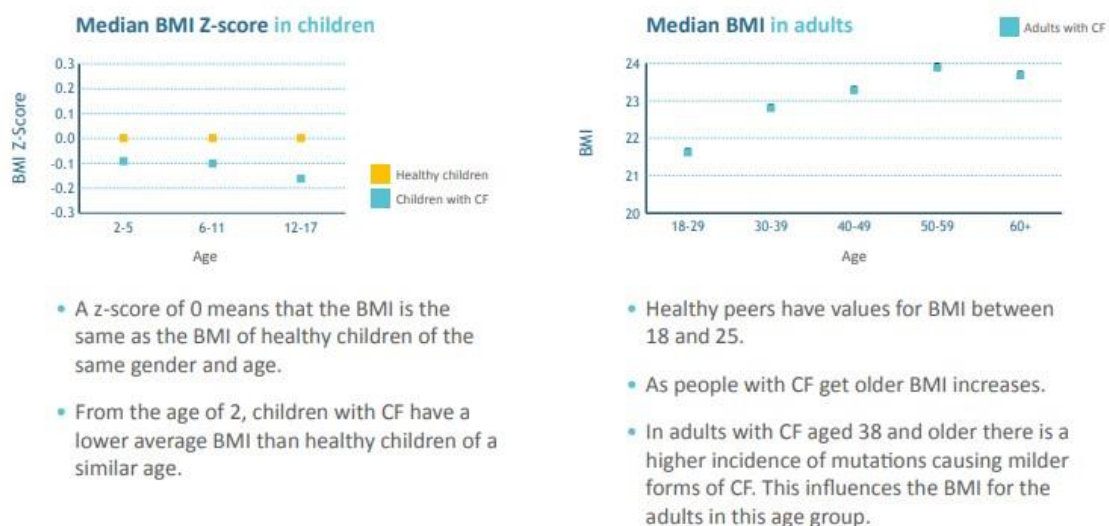


Figura 11, ECFSPR Report annuale 2021, Zolin A, Orenti A, Jung A, van Rens J et al, 2023.

1.8 MODULATORI E BIODISPONIBILITA'

Non esistono linee guida, né studi sui livelli ematici raggiunti in rapporto alla relazione temporale tra assunzione di modulatori di CFTR e alimenti. Bisogna infatti tener conto che alimenti e farmaci orali si mescolano nello stomaco, quindi, quanto più è rapida la digestione del pasto, più è probabile che l'efficacia terapeutica diminuisca a causa di una rapida clearance del farmaco.

Nel caso di Kalydeco si è osservata una migliore biodisponibilità in corrispondenza di un pasto più ricco di grassi, è sufficiente una tazza di latte o yogurt interi oppure pasta condita con quantità discrete di olio.

Anche nel caso di Trikafta è importante associare la somministrazione del farmaco con un pasto ricco in lipidi. Per supportare la sufficiente assunzione di grassi e in particolare di quelli definiti essenziali è consigliata l'integrazione con Dalvik, supplemento a base di DHA, generalmente carente nei pazienti con FC.

Gli studi di farmacocinetica valutano come il farmaco viene assorbito a livello intestinale, con quale velocità arriva nel sangue, a quale dose e per quanto tempo vi rimane e come viene eliminato. Questi studi hanno dimostrato che un pasto con grassi aumenta il livello e la

permanenza nel sangue delle molecole che costituiscono il Trikafta, soprattutto dell'elxacaftor e dell'ivacaftor, e ciò si traduce in una maggiore efficacia. Tuttavia, non è stata approfondita ancora la relazione tra quantità di grassi contenuti nell'alimentazione e i livelli del farmaco nel sangue e dunque non conosciamo la dose minima di grassi indispensabile per garantire una maggiore efficacia del farmaco. [1]

1.9 MODELLI DI STUDIO

La ricerca nel campo della Fibrosi Cistica è in parte incentrata sull'approfondimento della comprensione degli effetti dei farmaci attualmente usati anche su soggetti con mutazioni considerate fino ad oggi non pienamente compatibili; in parte invece è volta alla realizzazione di nuove terapie applicabili anche ai soggetti con mutazioni prive ancora di una potenziale terapia.

Dagli anni '90 sono stati utilizzati come modelli di studio animali quali topi, furetti e maiali, fondamentali per capire il funzionamento della fisiopatologia della Fibrosi Cistica e per la progettazione di nuovi farmaci.

Tra gli animali sottoposti a studio, nei topi si sono riscontrate più somiglianze con l'uomo per quanto concerne il tratto respiratorio superiore ma hanno struttura e funzionalità differenti lungo le vie aeree inferiori, rendendoli meno suscettibili alle infezioni, diversamente da quanto accade nell'essere umano. Sono stati quindi prodotti modelli murini che simulassero le condizioni infiammatorie osservate nei pazienti con FC e utilizzati poi modelli animali più rappresentativi per l'uomo ovvero furetti e maiali. [46]

Ovviamente bisogna tener conto che gli studi sugli animali non sono mai sufficientemente esaustivi per ritrarre a pieno le condizioni che si verificano nel modello umano.

Per questi motivi la Ricerca si è evoluta sviluppando modelli umani ex vivo per monitorare terapie e sviluppare nuovi farmaci.

I modelli attualmente più utilizzati sono i potenziali nasali e gli organoidi rettali e respiratori:

- I potenziali nasali vengono acquisiti prelevando cellule epiteliali attraverso la procedura di "spazzolamento" che consiste nel tamponare l'interno delle cavità nasali con apposito strumento. È un metodo minimamente invasivo e consente di prelevare un'adeguata quantità di cellule. Il limite di questo modello è la lunga durata del periodo di incubazione a cui le cellule devono essere sottoposte per realizzare una coltura cellulare adeguata allo studio e ciò potrebbe comportare dei cambiamenti rispetto alle condizioni iniziali del paziente in esame. [47]
- Gli organoidi sono tessuti 3D di cellule aggregate che rappresentano l'organo da cui sono state isolate. Il vantaggio di questo modello è quello di poter impiegare cellule

progenitrici respiratorie ed intestinali direttamente estratte dal paziente e replicare la condizione di malattia. Tuttavia, il processo di raccolta è molto invasivo. [48,49]

Accanto a questi modelli la recente attività scientifica si è focalizzata sul possibile utilizzo dei leucociti direttamente isolati dai pazienti allo scopo di poter superare i problemi nel campionamento e nella durata della coltura. Tra i vantaggi spiccano la facilità con cui si possono ottenere queste cellule attraverso semplici prelievi di sangue e la disponibilità immediata del campione che rende possibile un'analisi diretta e in tempo reale sulla progressione della malattia [50-52]. Anche se non si tratta di cellule epiteliali, i leucociti esprimono anch'essi CFTR e diversi studi hanno dimostrato che alterazioni nel canale di queste cellule comportano anomalie nella risposta immunitaria con alterata produzione di citochine, fagocitosi batterica e accumulo di cellule immunitarie nella mucosa bronchiale degli individui affetti da questa patologia [53-55]

1.10 ANALISI PROTEOMICA E BIOINFORMATICA SU PBMCs IN PAZIENTI IN TERAPIA CON IVACAFTOR

Allo scopo di trovare un possibile biomarker leucocitario relativo alla risposta al farmaco il gruppo in cui mi sono inserita durante il periodo di tirocinio ha analizzato, con un approccio di tipo proteomico, i PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells) isolati da quattro pazienti FC, sottoposti ad un trattamento ex vivo con il potenziatore VX770 e rispondenti positivamente al trattamento. La positività al trattamento è stata valutata mediante dosaggio del canale CFTR.

L'analisi proteomica ha permesso l'identificazione di un profilo proteomico leucocitario di più di 1800 proteine e l'analisi statistica basata sull'abbondanza proteica ha riportato la presenza di 474 proteine modulate, sia down-regolate che up-regolate, associate al recupero dell'attività del canale CFTR.

Inoltre, l'analisi proteomica è stata associata ad un'analisi bioinformatica [56] che ha rivelato il coinvolgimento di due pathways intracellulari nel recupero della funzionalità del canale dopo trattamento cellulare con VX770: uno relativo alla migrazione transendoteliale dei leucociti e l'altro alla regolazione dell'actina citoscheletrica, in entrambi i pathways sono state individuate proteine down-regolate dopo trattamento.

Tra le proteine down-regolate è stata individuata MMP9 (Matrix Metalloprotease 9) che in passato il mio gruppo aveva già dimostrato essere up-regolata nei leucociti di pazienti con mutazione F508del [57] e che la letteratura riporta spesso in relazione alla patologia della fibrosi cistica [58, 59,60].

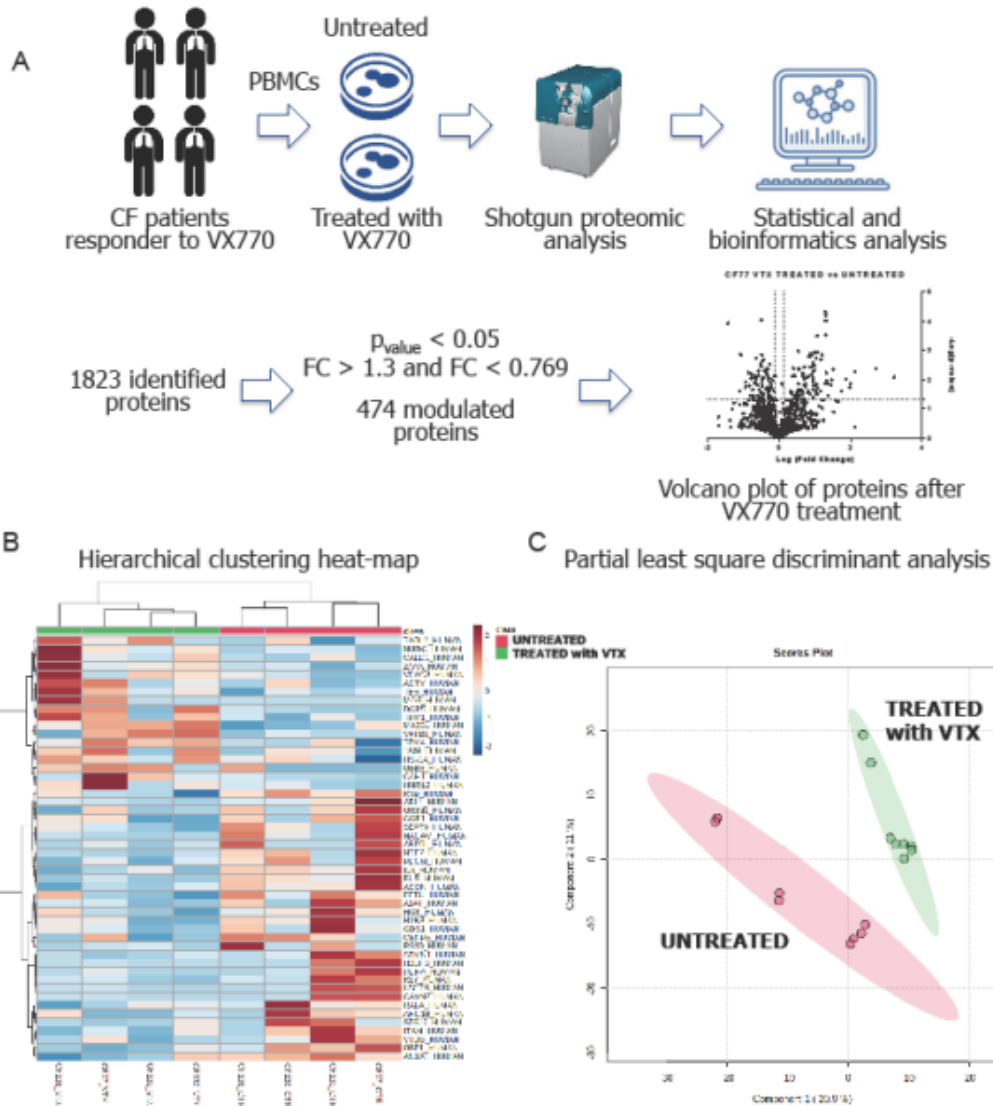


Figura 12 Proteomica shotgun di PBMCs trattati con VX770 e non trattati. (A) Le proteine modulate sono state poi elaborate attraverso approccio bioinformatico per identificare i meccanismi biologici associati al ripristino dell'attività del canale CFTR. In figura è mostrato un grafico Volcano plot (A), rappresentativo di quattro proteine un Clustering heat-map (B) e (C) partial least square discriminant analysis (PLS-DA) dei PBMCs trattati con VX770 (verde) e non trattati (rosso). La heat-map è stata creata utilizzando i valori proteomici medi di ciascun campione analizzato, mentre per la PLS-DA sono stati utilizzati anche i replicati tecnici.

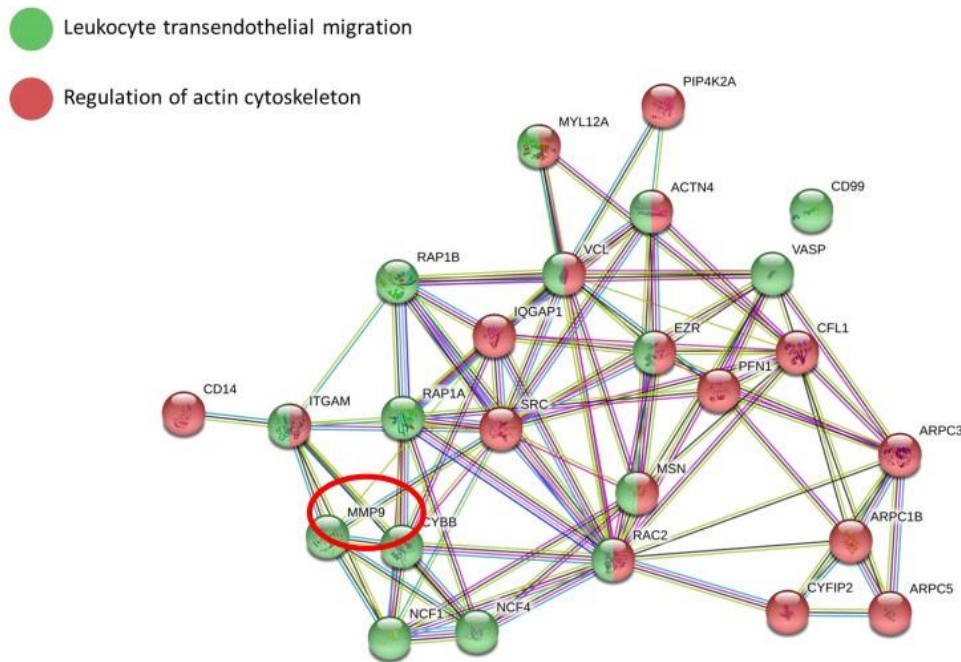


Figura 13: Analisi della rete STRING delle proteine downregolate nei monociti trattati con VX770: il farmaco altera fortemente la migrazione transendoteliale dei leucociti e la funzione del citoscheletro di actina.

1.11 METALLO PROTEASI E RUOLO DI MMP9 NELLA FIBROSI CISTICA

Le MMP (Matrix Metalloprotease), una superfamiglia di metallo-endopeptidasi note come metzincine, sono inizialmente sintetizzate come proenzimi inattivi [58] da vari tipi di cellule strutturali e immunitarie, tra cui macrofagi, neutrofili, cellule epiteliali, cellule endoteliali e fibroblasti. Mentre i polimorfonucleati producono continuamente MMP, molti altri tipi di cellule rilasciano questi enzimi solo in risposta a stimoli infiammatori e in relazione al rimodellamento dei tessuti e riparazione delle ferite. In seguito alla loro sintesi, le MMP diventano enzimaticamente attive attraverso precisi eventi di clivaggio che portano alla scissione di substrati specifici per l'esecuzione di funzioni biologiche cruciali. Queste funzioni comprendono la degradazione del tessuto connettivo e dell'epitelio alveolare, il rilascio di citochine e fattori di crescita e la regolazione della mobilità e della migrazione cellulare attraverso il rimodellamento della ECM (Matrice Extracellulare). Inoltre, le MMP partecipano attivamente al processo di riparazione della ferita catalizzando il normale turnover della ECM. Sebbene le MMP condividano somiglianze strutturali nel loro sito catalitico contenente ioni di zinco (Zn^{2+}), presentano differenze nella specificità del substrato, nella localizzazione cellulare e tissutale, nelle associazioni di membrana e nei meccanismi di regolazione. Diverse MMP sono state ritenute in grado di svolgere un ruolo patologico nella FC [59]. In particolare, la gelatinasi B MMP9 è stata osservata essere sia quantitativamente up-regolata sia dotata di

una maggiore attività enzimatica nelle secrezioni delle vie aeree inferiori dei pazienti con FC [60]. Il gene umano MMP9 è situato all'interno della regione genomica 20q13.12 e codifica per una proteina composta da 707 aminoacidi. Questa proteina è secreta nello spazio extracellulare sotto forma di un proenzima inattivo, noto come pro-MMP9. La pro-MMP9 rimane in uno stato inattivo a causa della presenza di 80 residui amminoacidici nella regione N-terminale, dove un motivo di commutazione in cisteina coordina lo ione zinco, formando il dominio catalitico della proteina e mantenendola così in uno stato inattivo [61]. Nello spazio extracellulare, altre proteinasi, come la MMP3 o la MMP2, scindono la pro-MMP9 inattiva, convertendola nella forma attiva, con peso molecolare di 84 kDa. Dopo la secrezione, la MMP9 acquisisce la capacità di degradare il collagene, contribuendo potenzialmente al deterioramento e alla disfunzione dei tessuti. Oltre alla sua capacità di potenziare le chemochine, svolge un ruolo fondamentale nella modulazione dei processi infiammatori [62,63].

È stato confermato che la MMP9 è la metalloproteasi predominante presente nelle secrezioni broncopulmonari di pazienti affetti da FC [64]. La distruzione della parete bronchiale nei pazienti FC può essere influenzata dalla produzione di MMP9 attraverso una serie di meccanismi: degradazione dell'elastina, degradazione della fibronectina e dei diversi tipi di collagene presenti nella membrana basale delle vie aeree inferiori [65]. La degradazione delle componenti della membrana basale da parte della MMP9 potrebbe potenzialmente aumentare l'infiammazione, consentendo il movimento di cellule e molecole pro-infiammatorie sia verso il lume delle vie aeree inferiori sia verso le pareti bronchiali. Inoltre, è stato dimostrato che la MMP9 è direttamente coinvolta nel danneggiamento della cartilagine dell'apparato respiratorio, così come è evidente il suo ruolo nella degradazione della cartilagine articolare [66].

Tra i meccanismi proposti che regolano la secrezione di MMP9, la letteratura suggerisce un processo mediato dal calcio [57, 67], influenzato dall'attività della proteina chinasi C (PKC). [57, 68-70]

2. OBIETTIVI

L'obiettivo principale della mia Tesi di Laurea Magistrale è stato quello di ricercare in pazienti affetti da fibrosi cistica possibili biomarcatori che potessero dare indicazioni riguardo la comprensione della variabilità di risposta clinica dei pazienti FC ai farmaci modulatori di CFTR. Il gruppo di ricerca nel quale mi sono inserita durante il tirocinio, aveva già condotto uno studio importante per individuare potenziali biomarcatori leucocitari correlati al recupero farmacologico dell'attività del canale CFTR. In particolare, mediante un'analisi *ex vivo* su PBMCs trattati con il potenziatore di CFTR Ivacaftor, è stata riscontrata una modulazione

dell'espressione di MMP9 in relazione al recupero o meno dell'attività di CFTR. Questi dati sono stati poi confermati *in vivo* misurando l'espressione di MMP9 leucocitaria di un paziente sottoposto a terapia con Ivacaftor correlando i dati ottenuti con alcuni dati clinici quali FEV1 e test del sudore per un anno intero.

A questo punto è iniziato il mio studio in pazienti FC sottoposti al nuovo farmaco Trikafta[®], in quanto questo farmaco risulta essere di più recente sperimentazione e applicabile ad un numero maggiore di soggetti perché adatto a differenti tipologie di mutazioni FC. Abbiamo monitorato in ogni paziente quale fosse la variazione dell'espressione di MMP9 pre-terapia e nei successivi 5 mesi e 10 mesi dopo l'inizio della stessa, correlando i risultati con i parametri clinici e in base a questi ultimi i pazienti sono stati suddivisi in rispondenti e non rispondenti al farmaco. Inizialmente abbiamo analizzato l'espressione di MMP9 nei leucociti isolati dai pazienti, successivamente siamo passati all'analisi del plasma degli stessi, per confermare se ciò che era stato osservato in cellula si riproponeva anche nell'analisi plasmatica. Evidenziare una corrispondenza tra cellula e plasma nell'espressione di una proteasi come MMP9 permetterebbe di monitorare non solo la risposta alla terapia attraverso un semplice prelievo di sangue rapido e non invasivo, ma anche evidenziare e comprendere la variabilità di risposta dei pazienti ad una terapia potenzialmente efficace per tutti. L'obiettivo finale della nostra ricerca è proprio quello di confermare la modulazione di MMP9 plasmatica come biomarker di risposta alle nuove terapie per la fibrosi cistica con modulatori di CFTR, con lo scopo ultimo di poter promuovere una sempre più necessaria medicina personalizzata.

3. MATERIALE E METODI

3.1 MATERIALI

I materiali utilizzati per il saggio Western Blot sono stati anticorpo anti-MMP9, anticorpo anti-P-ERK1/2, anticorpo anti-ERK1/2, anticorpo secondario anti-coniglio e anti-topo legati alla perossidasi HRP, anti-Ik β e anti- β -actina prodotti da Santa Cruz Biotechnology Inc. (Dallas, TX, USA), membrana di nitrocellulosa Amersham[™] Protran[®] Premium 0.45- μ m prodotta da GE Healthcare (Chicago, IL, USA), polvere di latte al 5% e PBS. I segnali immunoreattivi sono stati rilevati attraverso il reagente ECL Select[™] Western Blotting Detection e sono stati acquisiti e quantificati con ChemiDoc[™] XRS dotato di Quantity One Image Software 4.6.1 (Bio-Rad Laboratori Srl, Segrate (MI), Italia).

Per il trattamento delle cellule il materiale adoperato è stato un mix inibitori di proteasi (100X), un mix inibitori di fosfatasi (100X) ottenuti da Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA); un terreno di coltura RPMI 1640, il Lympholyte[®]-H specifico per l'isolamento di linfociti

e monociti e un riferimento di peso molecolare pre-colorato SHARPMASS VI MW per monitorare la separazione di proteine durante corsa elettroforetica, prodotti da Euroclone SpA (Milan, Italy).

Il VX770 è il principio attivo del modulatore Ivacaftor, utilizzato per il trattamento cellulare *ex vivo*.

Per l'analisi zimografica sono stati impiegati un tampone di Laemmli modificato per diluire le cellule, gel di poliacrilammide all'8% con gelatina, Triton X-100, BRIJ®35 Detergent Calbiochem® ottenuti da Sigma-Aldrich (Milan, Italy). Per colorare il gel è stata usata una soluzione preriscaldata al 45% (v/v) di metanolo, 10% (v/v) di acido acetico e Coomassie Blue R-250 allo 0,25% e una soluzione decolorante al 30% (v/v) di metanolo e al 10% (v/v) di acido acetico. Per l'analisi computerizzata delle immagini è stato utilizzato il software Quantity One Image Software 4.6.1 (Bio-Rad Laboratories Srl, Segrate (MI), Italia).

Per il dosaggio dell'attività di CFTR è stato utilizzato dibutiril-cAMP e VX700 come stimolo e buffer CFTR, NaI 5 mM e la molecola fluorescente GST-HS-YFP. Per la lettura della fluorescenza è stato impiegato il lettore Mithras LB940 di Berthold Technologies.

3.2 APPROVAZIONE COMITATO ETICO

Tutti i partecipanti hanno dato il loro consenso informato scritto prima di essere inclusi nello studio, compreso il permesso di conservare i campioni e di utilizzarli per la ricerca.

Il protocollo dello studio era conforme alle disposizioni della Dichiarazione di Helsinki e a quelle dell'Ospedale Pediatrico G. Gaslini di Genova, Italia. Il Comitato Etico di Genova ha approvato lo studio con il numero di protocollo A-CF2014 460REG2014.

3.3 PAZIENTI DONATORI E RACCOLTA CAMPIONI

Presso il Centro Fibrosi Cistica dell'istituto Giannina Gaslini di Genova, sono stati prelevati campioni di sangue dai pazienti affetti da FC durante gli esami clinici di routine. Per lo studio iniziale in cui sono stati valutati i livelli di MMP9 in PBMCs è stato reclutato un paziente in trattamento con Ivacaftor e affetto da mutazione F508del.

Successivamente sono stati reclutati altri sedici pazienti sottoposti a terapia con Trikafta e quattro donatori non FC come controlli, di cui sono state valutate le condizioni cliniche tramite ppFEV1 (Percent Predicted Forced Expiratory Volume) e test del sudore. Per ciascun paziente e i rispettivi controlli sono stati raccolti circa 8 mL di sangue in tre provette vacuette® PREMIUM ciascuna contenente 3 mL di EDTA 5 mM.

3.4 ISOLAMENTO PBMCs E TRATTAMENTO CELLULE

I campioni di sangue sono stati diluiti in 50 mL di RPMI 1640 in Falcon™, stratificati accuratamente su Lympholyte®-H e centrifugati a 800×g per 20 minuti a 22 °C in centrifuga senza freno. Dopo la centrifugazione, i PBMCs sono stati raccolti nell'interfaccia tra lo strato superiore, contenente la frazione plasmatica, e lo strato inferiore contenente Lympholyte®-H. Per rimuovere le piastrine, i PBMCs sono stati lavati due volte con RPMI 1640 e poi risospesi in terreno di coltura (RPMI 1640, contenente 10% (v/v) FBS (siero fetale bovino), 10 U/mL penicillina, 100 µg/mL streptomina, 2 mM L-glutammina) a una densità cellulare di 10⁶/mL. I PBMCs sono stati utilizzati per l'analisi Western blot, analisi proteomica e analisi zimografica.

3.5 ANALISI WESTERN BLOT

I PBMCs FC e non FC appena isolati, sono stati lisati a 10⁷/mL tramite sonicazione in tampone Laemmli e riscaldati per 5 minuti a 95 °C; aliquote da 30 µL di ciascun campione sono state sottoposte a gel di elettroforesi SDS-PAGE seguito da Western Blot. Le membrane di nitrocellulosa sono state bloccate mediante incubazione per 1 ora a temperatura ambiente con polvere di latte al 5% (w/v) in PBS contenente lo 0,05% (v/v) di Tween-20. In seguito, le membrane sono state incubate per una notte a 4 °C con i seguenti anticorpi primari: anti-MMP9 (1:1000), anti-β-actina (1:1000), anti-P-ERK1/2 (1:2000), anti-ERK1/2 (1:2000) e anti-Ikβ (1:1000). L'anticorpo secondario (anti-coniglio o anti-topo) coniugato con perossidasi è stato applicato per 1 h a 22 °C (diluizione 1:5000). Per valutare le membrane con tutti gli anticorpi primari è stata eseguita una procedura di stripping e re-probing con tutti gli anticorpi primari. I segnali immunoreattivi sono stati sviluppati utilizzando il reagente ECL Select™ Western Blotting Detection e sono stati acquisiti e quantificati con ChemiDoc™ XRS dotato di Quantity One Image Software 4.6.1 (Bio-Rad Laboratori Srl, Segrate (MI), Italia). In alternativa è stato usato ECL Western Blotting Detection Reagent.

3.6 ANALISI ZYMOGRAFICA SU PLASMA

Per valutare l'attività della MMP9 plasmatica è stata utilizzata la zimografia. Inizialmente, 1 µL di campioni di plasma FC e non FC sono stati diluiti in un tampone di Laemmli modificato. Successivamente, i campioni sono stati sottoposti a elettroforesi a 4 °C per 1 ora e mezza, senza bollitura o riduzione, utilizzando un gel di poliacrilamide all'8% (v/v) copolimerizzato con 1 mg/mL di gelatina. Il gel è stato incubato per 1 ora a 25 °C in Tris HCl 0,05M (pH 7,4) contenente il 2,5% (v/v) di Triton X-100, seguito da due lavaggi con Tris HCl 0,05M (pH 7,4) e

da un'incubazione notturna a 37 °C in Tris HCl 0,05M (pH 7,4), contenente 10mM CaCl₂, 0,15M NaCl e lo 0,05% (v/v) di detergente BRIJ®35. Successivamente, il gel è stato fissato e colorato per 2 ore con una soluzione preriscaldata contenente il 45% (v/v) di metanolo, il 10% (v/v) di acido acetico e Coomassie Blue R-250 allo 0,25%. Gli zimogrammi sono stati poi decolorati utilizzando una soluzione al 30% (v/v) di metanolo e al 10% (v/v) di acido acetico. I livelli relativi di attività della MMP9 sono stati calcolati tramite planimetria computerizzata e l'intensità delle aree digerite MMP9-dipendenti è stata determinata con il software Quantity One Image Software 4.6.1 (Bio-Rad Laboratories Srl, Segrate (MI), Italia).

3.7 DOSAGGIO DELL'ATTIVITA' Di CFTR

Per valutare l'attività del canale CFTR, i PBMCs ($1,5 \times 10^6$) sono stati prima stimolati con 100 μ M dibutiril-cAMP e 5 μ M VX770 per 20 min a 37 °C in 200 μ L di buffer CFTR. Le cellule non stimolate sono state mantenute in buffer CFTR per 20 min a 37 °C. Quindi sono stati aggiunti 5 μ M di Nal e dopo 30 secondi è stato purificato il supernatante mediante centrifugazione (13000xg per 20sec, Temperatura ambiente). Il supernatante è stato trasferito in una piastra da 96 pozzetti, aggiungendo 1 μ g di GST-HS-YFP purificato. Dopo 5 minuti in agitazione è stata letta la fluorescenza a lunghezza d'onda di eccitazione $\lambda_{ex} = 485 \pm 15$ nm e di emissione $\lambda_{em} = 535 \pm 10$ nm, utilizzando il lettore Mithras LB940 (Berthold Technologies) ed elaborata graficamente. Dalla curva di soppressione della fluorescenza è stata estrapolata la concentrazione di Nal ed è stata indicata l'attività di CFTR come picomoli di Nal scambiate al minuto su 10^3 cellule.

3.8 ANALISI STATISTICA

Dove possibile, i dati sono stati presentati come specificato nella legenda di ciascuna figura. La significatività della differenza è stata analizzata sia mediante test non parametrici che parametrici, come specificato nella legenda delle figure, utilizzando il pacchetto software Prism 4.02 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA), il valore soglia per significatività statistica è stata assunta con $p < 0,05$.

4. RISULTATI

4.1 CORRELAZIONE TRA ESPRESSIONE DI MMP9 E RECUPERO DELL'ATTIVITA' DI CFTR IN UN PAZIENTE SOTTOPOSTO A TERAPIA IVACAFTOR

L'analisi proteomica e bioinformatica, precedentemente svolta dal gruppo di ricerca del mio laboratorio, ha evidenziato che in fase di malattia la metalloproteasi MMP9, che, come è stato ampiamente dimostrato, svolge un ruolo cruciale nella progressione della Fibrosi Cistica [71,72], è fortemente espressa. MMP9, oltre a degradare il collagene e contribuire alla distruzione del parenchima polmonare, porta ad un aumento della concentrazione di citochine e chemochine coinvolte nella modulazione dei processi infiammatori. Quindi, poiché la sovra espressione della MMP9 nei leucociti di pazienti FC sembra svolgere un ruolo sostanziale nella patogenesi della fibrosi cistica [73-75], la diminuzione di espressione di MMP9 osservata nei PBMCs di pazienti FC trattati con VX770 potrebbe rappresentare uno dei potenziali effetti positivi del farmaco nel mitigare la progressione del danno polmonare.

Per confermare questo risultato, abbiamo condotto un'analisi in Western Blot (WB) dell'espressione di MMP9 in leucociti di un paziente (F508del/G1349D) in terapia con Ivacaftor. Quindi abbiamo confrontato i dati ottenuti con i parametri clinici del paziente e l'attività del canale CFTR, entrambi riportati in Tabella 4. Da questo confronto si evidenzia una forte correlazione inversa tra l'espressione di MMP9, il ripristino dell'attività del canale CFTR e la normalizzazione dei parametri clinici.

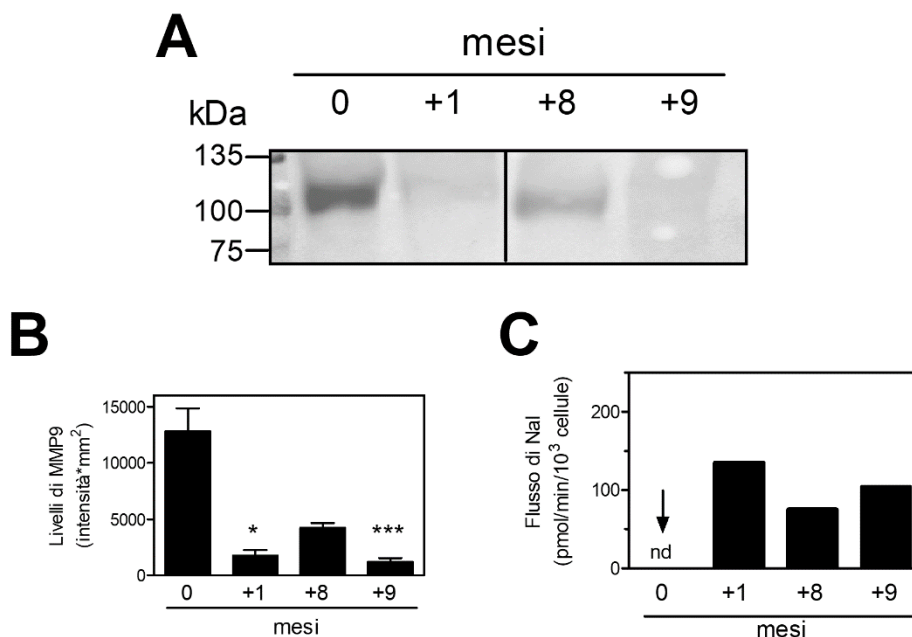


Figura 14: Livelli di MMP9 in PBMCs di un paziente dopo il trattamento in vivo ed ex vivo con VX770: (A) I PBMCs sono stati raccolti da un paziente affetto da FC con mutazioni CFTR G1349D (classe 3, difetto di gating) e F508del in momenti specifici dall'inizio della terapia orale con Ivacaftor. Una parte delle cellule è stata sottoposta ad analisi Western Blot per la misurazione dei livelli di MMP9. In (A) sono indicati i marcatori di peso molecolare (MW) delle proteine 50 (kDa). (B) È stata eseguita quantificazione dei segnali immunoreattivi e i dati rappresentano le medie \pm la deviazione standard di cinque quantificazioni. L'analisi statistica è stata condotta utilizzando il test Kruskal-Wallis seguito dal test di confronto multiplo di Dunn. *** $p < 0,001$; * $p < 0,05$. (C) Sono stati selezionati valori di attività di CFTR e usati per il confronto con MMP9.

Month(s)	CFTR activity [§]	FEV1 (%)	Sweat chloride (mEq/l)	
			NaCl	Cl
0	0	54	93	115
+1	135	89	66	38
+8	75	105	51	28
+9	62	105	75	47

Tabella 4: Vengono rappresentati i parametri clinici di un paziente affetto da mutazione F508del e G1349D. Sono riportati a partire dal tempo 0, poi a distanza di 1, 8 e 9 mesi i valori dell'attività del canale CFTR, i valori di FEV1 in percentuale e i valori di NaCl e ioni cloruro relativi al test del sudore espressi in mEq/L.

4.2 ESPRESSIONE DI MMP9 IN PBMCs DI PAZIENTI FC PRIMA E DOPO TERAPIA CON TRIKAFTA®

Per verificare se l'espressione di MMP9 potesse essere considerato un buon indicatore dell'efficacia di altre terapie per la fibrosi e per aumentare la numerosità della sperimentazione in vivo, abbiamo deciso di arruolare nel nostro studio una coorte più ampia di pazienti FC sottoposti alla terapia con il nuovo farmaco Trikafta®. Questo modulatore è adatto al trattamento di un numero più esteso di mutazioni, per questo molti pazienti idonei al trattamento con il farmaco sono risultati elegibili per il nostro studio.

Per condurre le nostre analisi in vivo, abbiamo arruolato sedici pazienti (150, 87, 153, 73, 154, 164, 166, 173, 174, 68, 179, 85, 76, 108, 161, 157) sottoposti a terapia con Trikafta®, per monitorare l'espressione di MMP9.

Prima dell'inizio della terapia abbiamo misurato i livelli di MMP9 nei PBMCs isolati sia dai sedici pazienti sopra indicati sia da quattro soggetti sani usati come controlli.

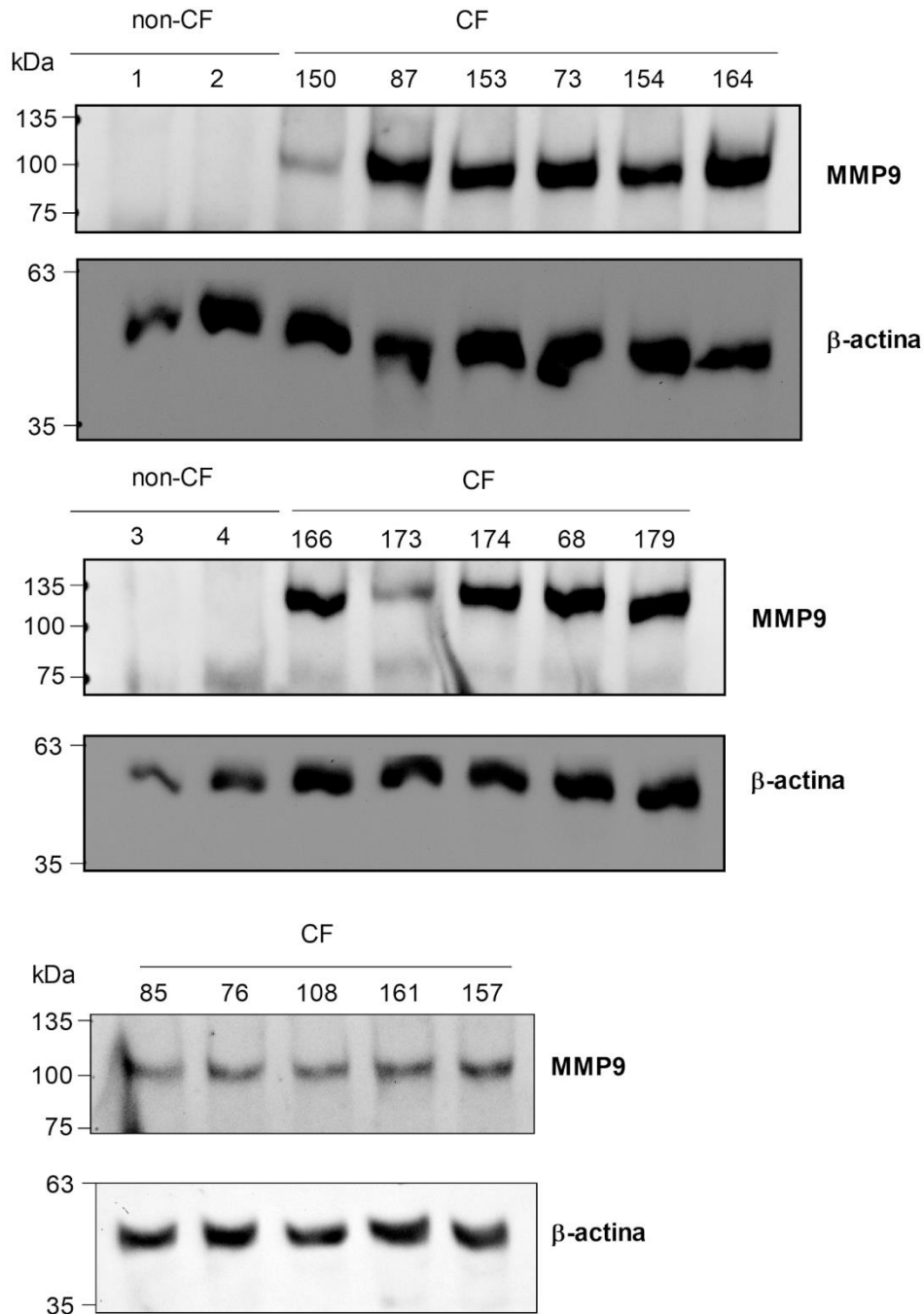


Figura 15: Analisi Western Blot dell'espressione di MMP9 intracellulare condotta su PBMCs ottenuti da n= 16 pazienti FC donatori e n=4 pazienti non FC (come controlli). È stata valutata anche l'espressione di β -actina come gene housekeeping.

In figura 15 si nota come l'espressione di MMP9 sia elevata in tutti i pazienti affetti da FC, mentre risulta praticamente assente nei soggetti di controllo non FC.

Abbiamo quindi analizzato l'espressione di MMP9 dopo terapia dei PBMCs di cinque di questi pazienti di cui avevamo raccolto le cellule prima del trattamento (PRE) e dopo 5 (POST I) e 10 (POST II) mesi di terapia Trikafta®.

Come riportato in figura 16 in quattro dei cinque pazienti analizzati si verificava una diminuzione di espressione di MMP9 dopo terapia, mentre in un paziente questo non si verificava. A questo punto abbiamo confrontato i risultati ottenuti con i dati clinici degli stessi pazienti riportati in Tabella 5.

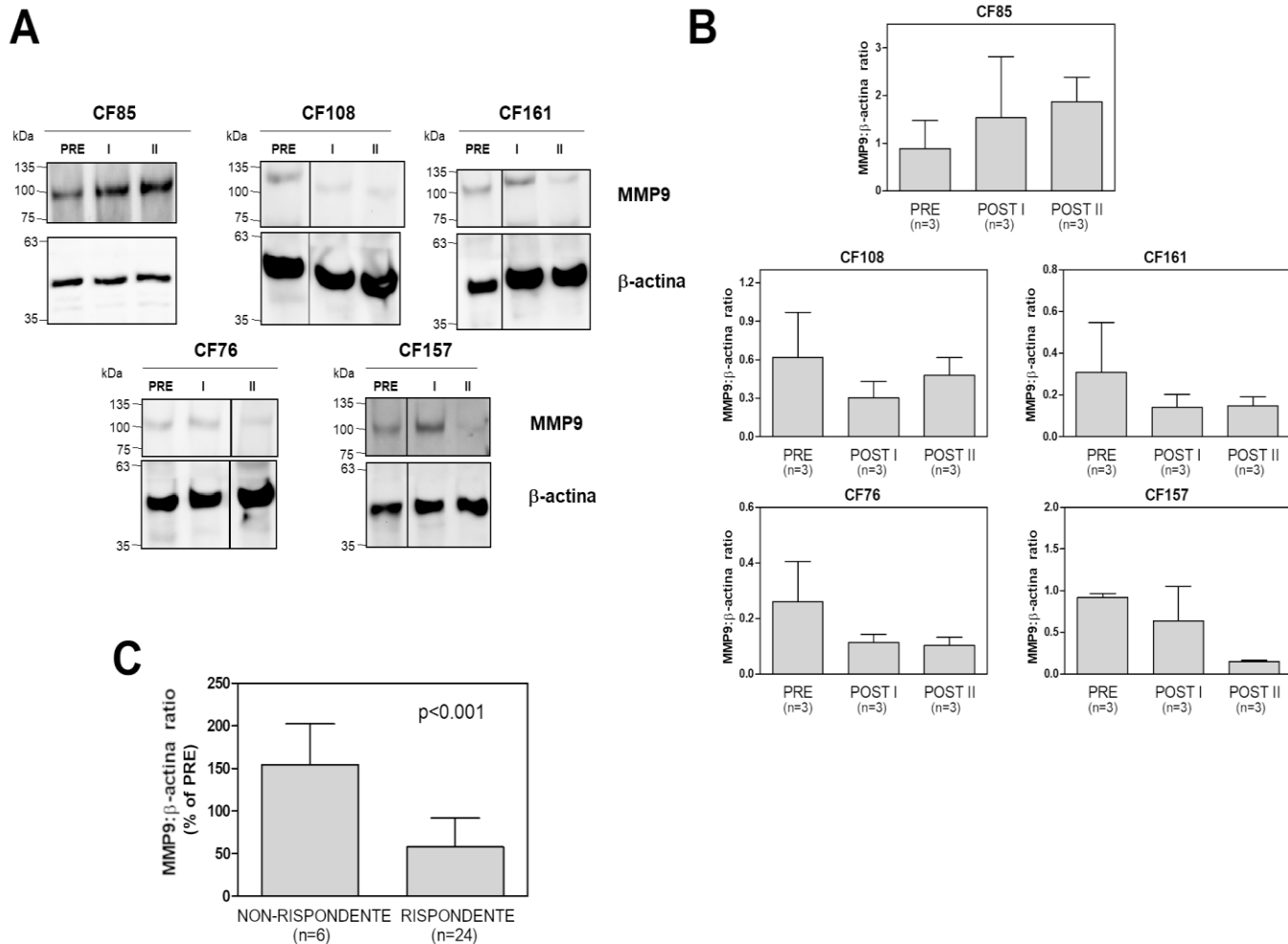


Figura 16: Espressione di MMP9 in soggetti con fibrosi cistica in terapia con Trikafta® valutata attraverso Western Blot in PBMCs isolati da un paziente non rispondente (85) e da quattro rispondenti (76,108,157,161) PRE e POST terapia a due intervalli di distanza (POST I dopo 5 mesi, POST II dopo 10 mesi). La misurazione della β -actina è stata riportata come housekeeping. (A) Sono illustrati i blot dei cinque pazienti. (B) Per ogni campione sono stati quantificati i livelli di MMP9, i rapporti MMP9- β -actina sono stati mediati e riportati con la rispettiva deviazione standard. (C) I segnali immunoreattivi sono stati quantificati e i rapporti MMP9: β -actina ottenuti dopo la terapia (POST I e POST II) sono stati espressi come percentuali dei rapporti prima della terapia (PRE), sia per i rispondenti che non rispondenti. I dati rappresentano le medie con la deviazione standard di tre quantificazioni per ciascun campione. Secondo il test di Mann-Whitney test, $p < 0,001$.

In particolare, nelle Figure 16A e 16B, possiamo osservare una forte riduzione dell'espressione intracellulare dei livelli di MMP9 in quattro pazienti (76, 108, 157, 161) dopo soli cinque mesi di terapia (POST I), e questa modificazione di espressione di MMP9 persisteva anche dopo dieci mesi di trattamento (POST II). Al contrario, questo andamento non si osservava nel paziente numero 85, dove il livello di espressione di MMP9 rimaneva elevato sia dopo cinque mesi sia dopo dieci mesi di trattamento (POST I e POST II). Inoltre, poiché la modulazione di MMP9 prima e dopo trattamento correlava perfettamente con i dati clinici abbiamo considerato i primi quattro pazienti come “rispondenti” e il quinto paziente come “non rispondente” alla terapia con Trikafta®.

Nella figura 16B notiamo come non esista una differenza statisticamente significativa tra i risultati del POST I e del POST II per ciascun campione ma vediamo invece una differenza significativa nei livelli di MMP9 in seguito al trattamento con il farmaco tra rispondenti e non rispondenti alla terapia (Figura 16C).

CF Patient Sample Timing	Age	Gender	CFTR Mutation	FEV1 (%)	Sweat Chloride Test *	CFTR Activity §
76-PRE	48	M	F508del/F508del	86	113	ND
76-POST I				83	67	106
76-POST II				78	NA	36
85-PRE	23	F	F508del/E585X	34	104	85
85-POST I				35	96	24
85-POST II				35	97	NA
108-PRE	29	F	F508del/L1065P	69	NA	ND
108-POST I				72	13	189
108-POST II				72	NA	166
157-PRE	14	F	F508del/I1005R	89	NA	13
157-POST I				135	NA	229
157-POST II				122	70	157
161-PRE	16	F	F508del/F508del	67	132	32
161-POST I				113	35	109
161-POST II				113	NA	136

*Tabella 5: Parametri clinici di n=5 pazienti FC in terapia con Trikafta®, classificati in rispondenti e non rispondenti. I dati sono stati raccolti prima della terapia (PRE), successivamente al POST I dopo 5 mesi da inizio terapia e POST II dopo 10 mesi da inizio terapia. NA= dato non disponibile ND= livelli non rilevabili. * rappresenta l'unità di misura in mEq/L. § indica la misura dello ione ioduro in pico-moli al minuto per 10³ cellule.*

4.3 ATTIVITÀ DI MMP9 IN CAMPIONI DI PLASMA DI PAZIENTI FC DURANTE TERAPIA CON TRIKAFTA®

Poiché i risultati ottenuti con i PBMCs sembrano evidenziare che la diminuzione di espressione di MMP9 nei leucociti possa essere un indicatore di efficacia di terapie con modulatori di CFTR, abbiamo deciso di proseguire gli studi andando ad analizzare l'andamento di MMP9 anche nel plasma, valutandolo come attività enzimatica, attraverso un'analisi zimografica. Infatti, il plasma, essendo facile da ottenere in maniera rapida e del tutto non invasiva, rappresenta il campione biologico per eccellenza per individuare biomarker di patologie.

Abbiamo quindi misurato l'attività di MMP9 prima dell'inizio della terapia con Trikafta in campioni di plasma raccolti contemporaneamente all'isolamento dei PBMCs dalla stessa coorte dei sedici pazienti FC presentati nel capitolo 4.2.

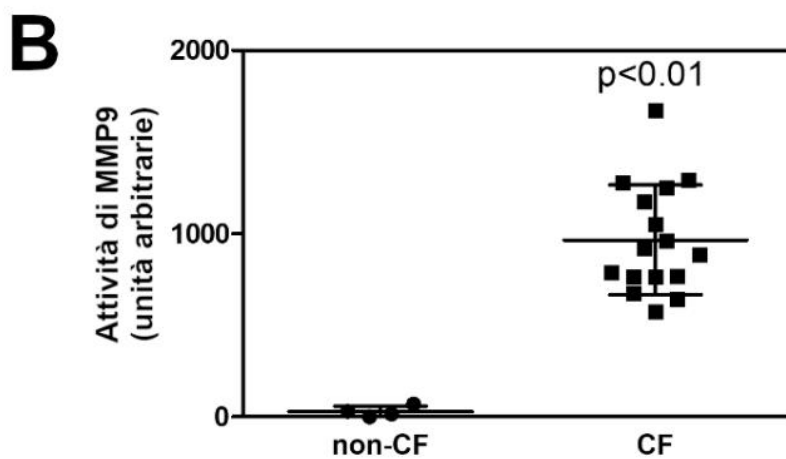
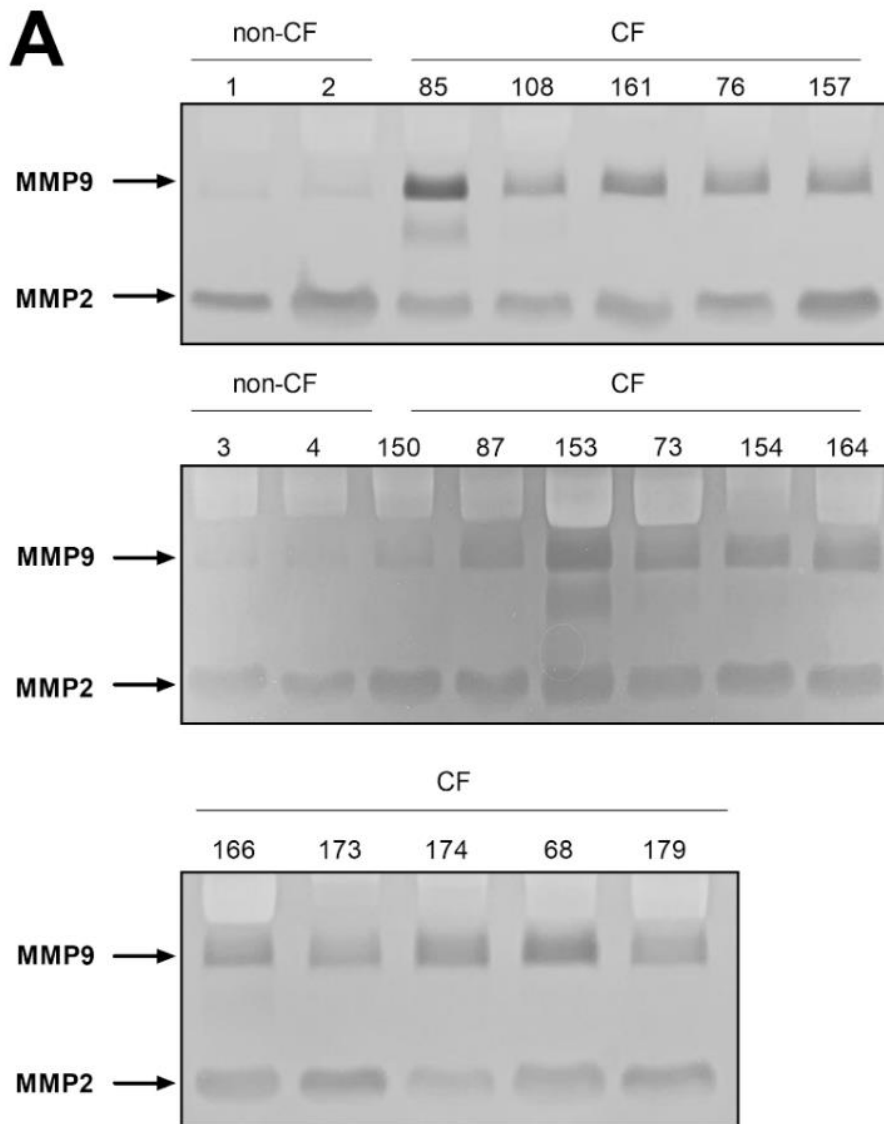


Figura 17: Valutazione dell'attività di MMP9 in campioni di plasma di pazienti FC donatori (n=16) e non FC (n=4), attraverso analisi zimografica su SDS-PAGE (8%). Si osservano bande litiche indicative dell'attività enzimatica di MMP9 e MMP2 come indicato (A). Le bande sono state poi quantificate e rappresentate come medie +/- deviazione standard, $p < 0,01$ come determinato dal test Mann-Whitney (B).

Come illustrato in figura 17 l'attività enzimatica di MMP9 nei campioni di plasma dei pazienti FC prima della terapia era significativamente più alta rispetto ai controlli (pazienti non FC), dato risultato coerente con i risultati ottenuti dall'analisi di PBMCs degli stessi pazienti. Per verificare se l'attività enzimatica di MMP9 rilevata nel plasma durante la terapia seguisse lo stesso andamento di quello che si era osservato nei leucociti, abbiamo quantificato l'attività dell'enzima nei campioni di plasma dei cinque pazienti selezionati precedentemente come rispondenti e non rispondenti alla terapia prima e dopo trattamento con Trikafta® attraverso analisi zimografica.

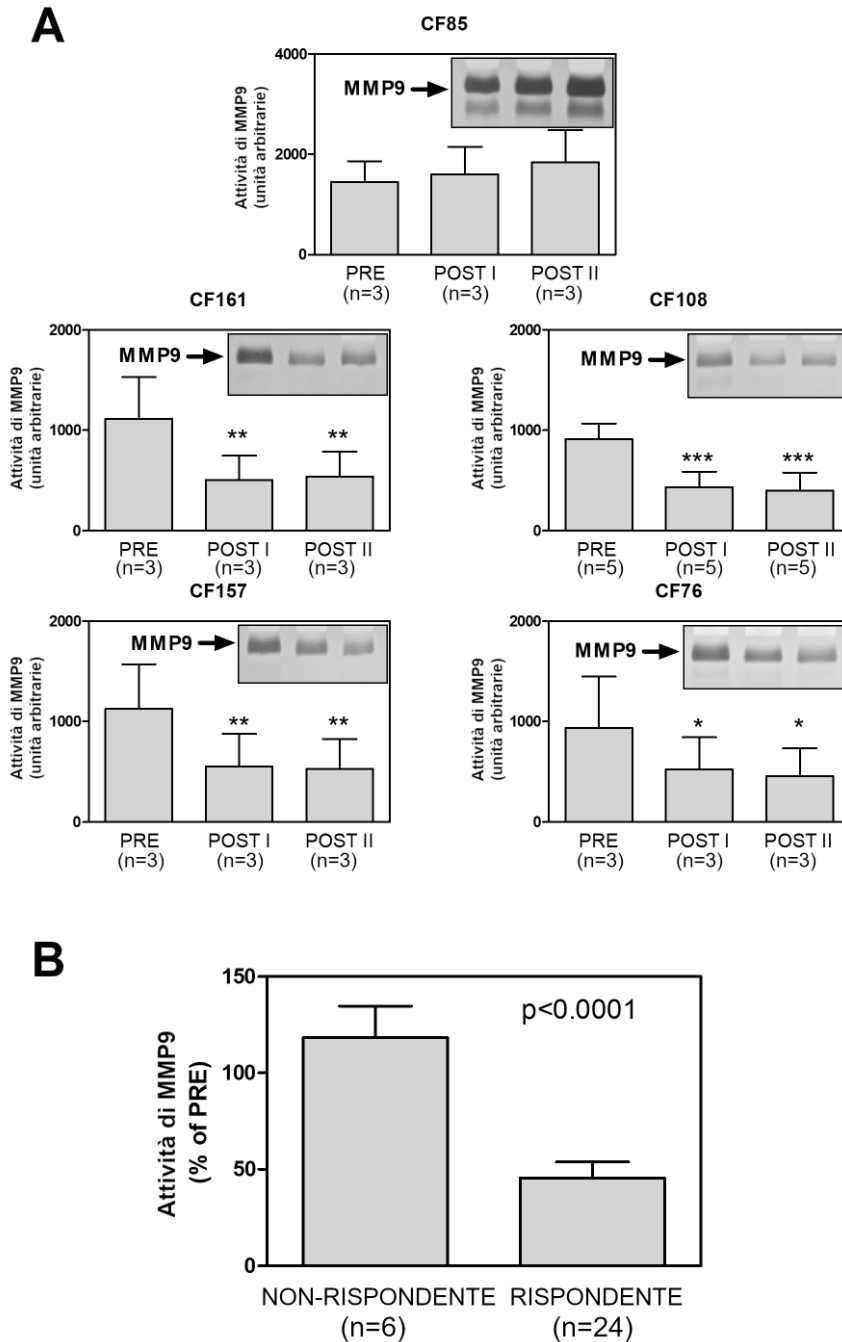


Figura 18: Attività enzimatica di MMP9 in campioni di plasma di n=5 pazienti FC PRE e POST terapia con Trikafta®. (A) Attività di MMP9 misurata in 1 µL di plasma ottenuto da un paziente non rispondente (85) e quattro rispondenti (76,108,157,161) PRE e POST I (dopo 5 mesi) e POST II (dopo 10 mesi) da inizio terapia. L'analisi è stata condotta attraverso zimografia. Per ogni paziente viene illustrato uno zimogramma ottenuto in triplicato. Le bande litiche sono state quantificate e riportate le medie +/- le deviazioni standard ottenute da tre quantificazioni per ogni paziente FC. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, eseguito con test ANOVA seguito da post HOC Turkey. (B) L'attività della MMP9 rilevata dopo inizio della terapia

(POST I+POST II) è stata riportata come percentuale dell'attività della metalloproteasi prima della terapia (PRE), per i non rispondenti e i rispondenti. I dati sono le medie \pm deviazione standard di tre quantificazioni per ciascun paziente FC, $p < 0,001$, secondo il t-test non accoppiato.

In figura 18 è illustrata l'analisi dell'attività enzimatica della MMP9 plasmatica dei cinque pazienti di cui avevamo analizzato precedentemente i PBMCs. Come possiamo notare l'attività enzimatica rimane elevata nel plasma del paziente non rispondente anche dopo la terapia. Al contrario, nei rispondenti assistiamo ad una diminuzione della proteasi plasmatica di circa il 50%. Questi risultati suggeriscono che i livelli di MMP9 misurati nel plasma sembrano corrispondere a quelli secreti dai PBMCs.

Inoltre, per supportare ulteriormente la nostra ipotesi che vede la modulazione dell'espressione di MMP9 plasmatica come utile indicatore dell'efficacia della terapia con modulatori di CFTR, abbiamo valutato le variazioni di attività enzimatica di MMP9 nel plasma di altri sei pazienti FC (73, 153, 164, 173, 174, 179), selezionati tra i rimanenti undici pazienti affetti da FC che avevano iniziato la terapia con Trikafta®, i cui campioni plasmatici e parametri clinici (Tabella 6) erano già disponibili.

CF patient	Age	Gender	CFTR mutation	FEV1 (%)		Sweat Chloride test*	
				PRE	POST I	PRE	POST I
68	34	M	F508del/N1303K	PRE: 62	POST I: 83	PRE: 120	POST I: 94
73	35	M	F508del/G542X	PRE: 32	POST I: 44	PRE: 109	POST I: 109
87	55	F	F508del/R334W	PRE: 77		PRE: 115	
150	31	M	F508del/2184insA	PRE: 83		PRE: 70	
153	17	F	F508del/R553X	PRE: 43	POST I: 75	PRE: NA	POST I: 47
154	25	F	F508del/W1282X	PRE: 106		PRE: NA	
164	17	F	F508del/W1282X	PRE: 113	POST I: 152	PRE: 110	POST I: 50
166	22	F	F508del/F508del	PRE: 77	POST I: 99	PRE: 107	POST I: NA
173	14	M	F508del/S13R	PRE: 111	POST I: 101	PRE: NA	POST I: NA
174	14	M	F508del/2183AA>G	PRE: 81	POST I: 89	PRE: NA	POST I: 52
179	31	M	F508del/D110H	PRE: 92	POST I: 107	PRE: NA	POST I: NA

Tabella 6: Parametri clinici per ulteriori pazienti FC, inclusi gli otto pazienti che avevano iniziato la terapia in fase precoce. PRE indica prima della terapia, POST I dopo 5 mesi da inizio terapia, NA dato non disponibile, * indica ione cloruro in mEq/L.

Come riportato in figura 19 A possiamo osservare in quattro dei pazienti analizzati (179,173,164,153) una diminuzione dei livelli di MMP9 plasmatica rispetto all'inizio della terapia con Trikafta®, sia al primo follow-up dopo 5 mesi da inizio terapia (POST1) sia al secondo follow-up a distanza di 10 mesi post terapia (POST2). Questa diminuzione plasmatica di MMP9 correla con il miglioramento dei parametri clinici degli stessi pazienti, alcuni dei quali sono mostrati in tabella 6. I pazienti 73 e 174 invece che non hanno ottenuto beneficio clinico mostrano livelli di attività di MMP9 invariati. In figura 19 B, sono riportate le quantificazioni delle bande di attività di MMP9 su zimogramma. Questi risultati confermano la potenzialità dell'utilizzo della modulazione di MMP9 come biomarker dell'efficacia della terapia con modulatori di CFTR.

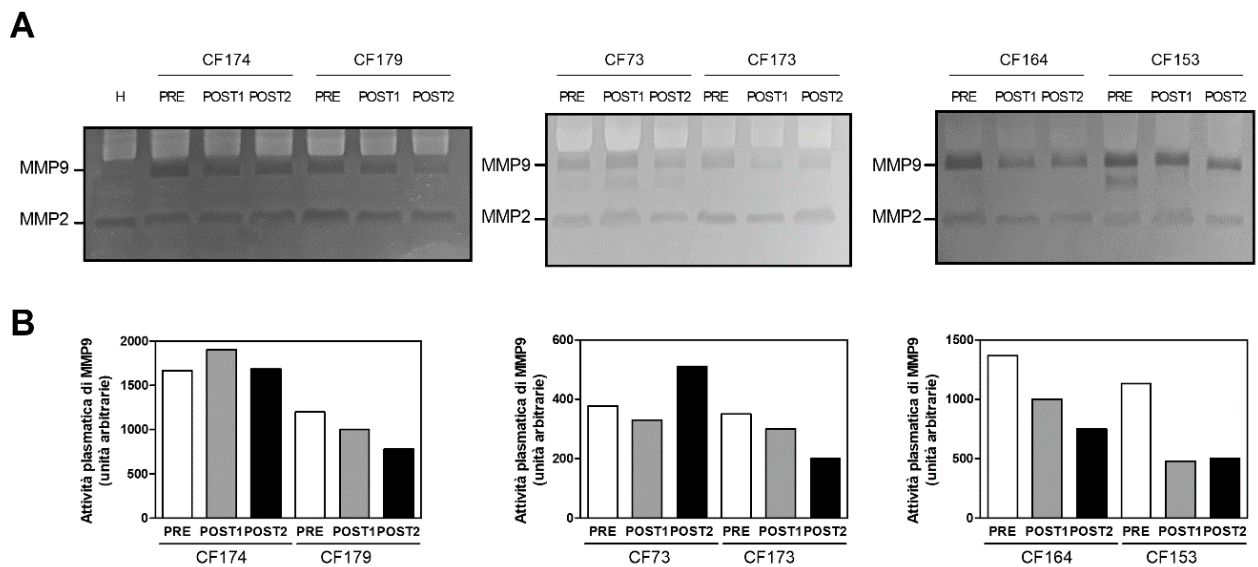


Figura 19: Confronto dell'attività enzimatica della MMP9 plasmatica in sei pazienti FC pre-terapia con Trikafta[®] e a 5 mesi e 10 mesi dopo inizio della stessa. L'analisi dell'attività enzimatica della MMP9 è stata condotta su 1 μ L di plasma raccolto da sei pazienti affetti da FC, sia prima (PRE) che dopo l'inizio della terapia (POST I e POST II) utilizzando l'analisi zimografica (A). Quantificazione delle bande litiche generate dall'attività enzimatica di MMP9 PRE, POST I e POST II (B).

4.4 STUDIO DEL PATHWAY INTRACELLULARE ASSOCIATO ALL'ESPRESSIONE DI MMP9 IN PBMCs DI PAZIENTI FC DURANTE TERAPIA CON TRIKAFTA[®]

Abbiamo voluto studiare il pathway intracellulare relativo all'espressione di MMP9 nei pazienti di cui avevamo valutato i livelli di proteina nei rispettivi PBMCs.

Nonostante sia ampiamente noto che, oltre ai neutrofili, altri tipi di cellule come macrofagi e cellule epiteliali producano MMP9 [76,77], la specifica via di segnalazione responsabile dell'aumento della MMP9 nella fibrosi cistica non è stata ancora sufficientemente chiarita. Alcuni studi propongono il coinvolgimento della chinasi Extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) e del fattore nucleare kB (NF-kB) nel promuovere l'espressione della MMP9 [78, 79]. Abbiamo quindi deciso di analizzare se fossero proprio queste le proteine coinvolte nell'aumento dell'espressione di MMP9 nei PBMCs dei pazienti FC e nella modulazione della proteasi promossa o meno dalla terapia.

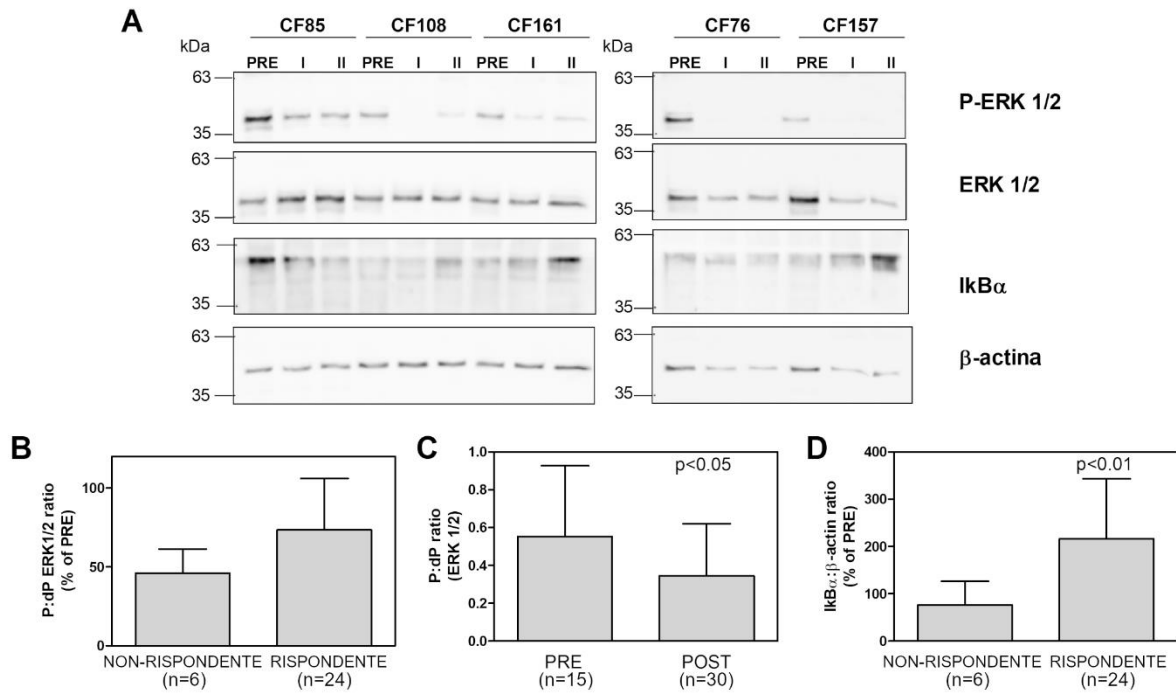


Figura 20: Via di segnalazione intracellulare associata all'espressione di MMP9 in pazienti ($n=5$) con FC dopo la terapia con Trikafta[®]. (A) L'analisi della fosforilazione di ERK1/2 e della modulazione di IκBα è stata condotta su PBMCs isolati da un paziente non-rispondente (85) e da quattro pazienti rispondenti (108,161,76,157), sia prima (PRE) che inizio della terapia (I e II), utilizzando l'analisi Western Blot. (B) I segnali immunoreattivi sono stati quantificati e i rapporti tra le forme fosforilate (P) e defosforilate (dP) di ERK1/2 ottenuti dopo l'inizio della terapia (I+II) sono stati espressi come percentuale dei rapporti pre-terapia (PRE) per rispondenti e non. (C) il rapporto P: dP ERK1/2 è stato confrontato tra i rapporti pre-terapia (PRE) e post-terapia (POST). (D) I rapporti IκBα: β-actina ottenuti post-terapia (I+II) sono stati riportati come percentuale dei rapporti pre-terapia (PRE), sia per i non rispondenti che per i rispondenti. I dati rappresentano le medie con deviazione standard di tre quantificazioni per ciascun paziente con FC, $p<0,05$ e $p<0,01$, secondo il test di Mann Whitney.

In figura 20 A sono riportati i Western Blot eseguiti su PBMCs dei primi cinque pazienti FC analizzati (vedi paragrafo 4.2). Come si può evidenziare i livelli di p-ERK1/2 nei PBMCs di tutti e cinque i pazienti FC isolati prima della terapia con Trikafta[®] erano più alti di quelli ottenuti a cinque e dieci mesi dall'inizio della terapia (Figura 20 C, POST I e POST II). La diminuzione dei livelli di queste chinasi e quindi il loro grado di defosforilazione non risulta statisticamente differente nei pazienti rispondenti rispetto ai non rispondenti (Figura 20 B), suggerendo che Trikafta[®] può indurre la defosforilazione di p-ERK1/2 ma solo questo dato non è sufficiente per correlarlo all'efficacia terapeutica del modulatore. Infatti, se p-ERK1/2 induce l'espressione della MMP9 nei leucociti, come è stato precedentemente riportato [78], la defosforilazione di p-ERK1/2 sarebbe in linea con i dati relativi alla modulazione di MMP9 ottenuti da PBMCs dei pazienti rispondenti alla terapia ma non da quelli dei non rispondenti. Per chiarire la motivazione di questa incongruenza, abbiamo studiato alcuni eventi a valle del signaling, in particolare quelli legati alla via di NF-κB, dal momento che è stato dimostrato che questo fattore di trascrizione nucleare è coinvolto nella promozione dell'espressione di

MMP9 [80]. In particolare, la fosforilazione e la successiva degradazione dell'inibitore del fattore nucleare-kB (I κ B α) promuovono la traslocazione nel nucleo di NF-kB, qui si lega alla sequenza specifica del promotore di MMP9 inducendone l'espressione.

Abbiamo quindi analizzato la modulazione di I κ B α nei PBMCs dei pazienti rispondenti e non rispondenti.

Come riportato in Figura 20 A e C i livelli di I κ B α dopo la terapia con Trikafta[®] aumentavano in maniera significativa nei PBMCs dei pazienti rispondenti rispetto a quelli dei non rispondenti che, diversamente, continuavano a diminuire anche dopo terapia. Questa modulazione di I κ B α correla quindi con la modulazione dell'espressione di MMP9, indicando che la terapia, utile per ripristinare l'attività di CFTR, facilita la down-regolazione di MMP9 attraverso la via di segnalazione trascrizionale mediata da NF-kB.

Possiamo quindi concludere che l'alterata concentrazione di calcio intracellulare osservata nelle cellule dei pazienti affetti da fibrosi cistica a causa della ridotta attività di CFTR [77,80,] insieme a segnali pro-infiammatori, può innescare l'attivazione di ERK1/2 e la conseguente fosforilazione e degradazione di I κ B α . Questi eventi causano la dissociazione di NF-kB che trasloca nel nucleo, promuovendo la trascrizione dell'mRNA di MMP9 aumentando l'espressione della sua proteina. Di conseguenza, MMP9 diventa rilevabile sia nell'ambiente intracellulare che nel plasma dei pazienti affetti da FC. I risultati ottenuti suggeriscono che la terapia con Trikafta[®] sia in grado di ridurre la degradazione di I κ B α , impedendo la migrazione di NF-kB al nucleo e quindi bloccando la trascrizione dell'mRNA di MMP9 (vedi Figura 21).

In definitiva, è possibile affermare che la terapia con Trikafta[®] sul pathway ERK1/2-NF-kB promuova una riduzione significativa dei livelli di MMP9 nei pazienti rispondenti. Nei non rispondenti, il quadro non è altrettanto chiaro. Infatti, nonostante la mancata diminuzione di MMP9 correli con la continua degradazione di I κ B α , lo stato di defosforilazione di ERK1 /2 dopo terapia suggerisce che potrebbe esserci, oltre a questa chinasi, qualche altra molecola coinvolta nella fosforilazione di I κ B α . Per riuscire a comprendere quindi se questa potenziale alterazione sul pathway ERK1/2-NF-kB-MMP9 possa in qualche modo spiegare la mancanza di risposta alla terapia del paziente non rispondente (FC85), saranno necessari ulteriori studi su coorti di pazienti decisamente più ampie.

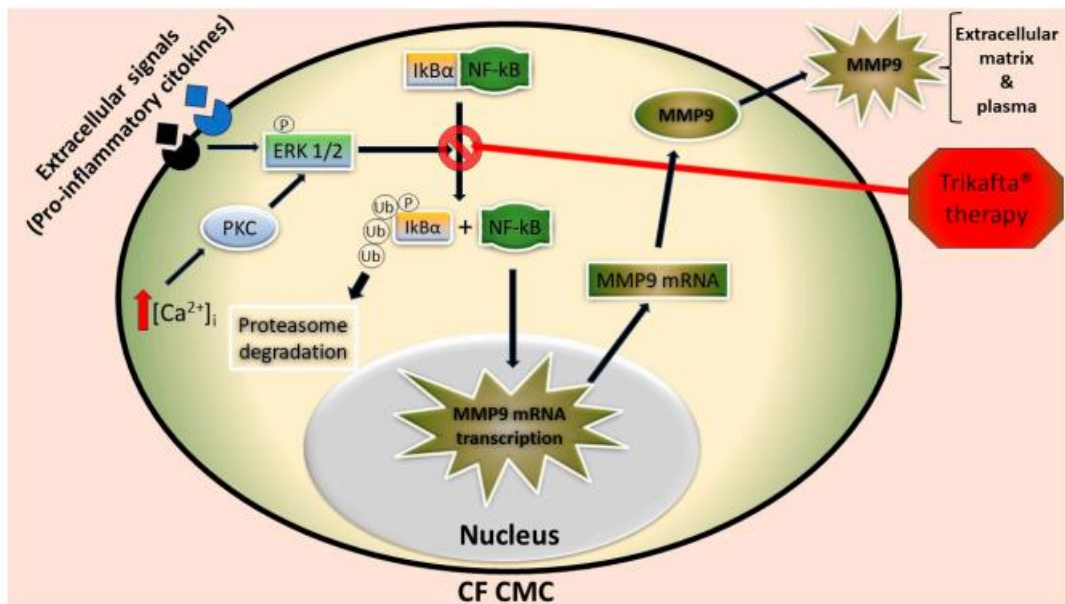


Figura 21: Illustrazione schematica del possibile effetto della terapia con Trikafta® sul pathway intracellulare di NF-κB che porta all'aumento della MMP9 nei PBMCs di pazienti FC. [Ca²⁺]_i: concentrazione di calcio intracellulare; P: gruppo fosforico; Ub: ubiquitina.

5. DISCUSSIONE

I dati ottenuti dagli studi svolti in precedenza nel laboratorio di Ricerca nel quale ho lavorato durante il tirocinio, hanno inizialmente permesso di identificare specifici profili proteomici associati al recupero dell'attività di CFTR nei leucociti FC dopo trattamento ex vivo con il potenziatore VX770.

Inizialmente questo ha permesso di identificare quali proteine potessero essere potenzialmente associate al recupero della funzionalità del canale CFTR e formulare l'ipotesi di un loro utilizzo come biomarcatori leucocitari nel monitorare ma anche prevedere l'efficacia delle terapie farmacologiche nella fibrosi cistica.

Grazie all'analisi proteomica e bioinformatica sono stati individuati due pathways leucocitari rappresentativi delle proteine down-regolate dopo trattamento con VX770: una via associata alla migrazione transendoteliale dei leucociti e l'altra associata alla regolazione dell'actina citoscheletrica. Questi dati sono in linea con quelli riportati in letteratura, i quali evidenziano il ruolo centrale dell'actina nell'attivazione della CFTR mediata da AMP ciclico [81]. Infatti, è stato dimostrato che i trattamenti terapeutici in grado di correggere la funzione del canale CFTR ripristinano la disorganizzazione dell'actina citoscheletrica nei soggetti affetti da fibrosi cistica [81]. Inoltre, è stato riportato che l'estremità C-terminale di CFTR contribuisce a modellare il citoscheletro di actina [82].

Per quanto riguarda la via associata alla migrazione transendoteliale dei leucociti invece è stato riportato [51] che la CFTR difettosa blocca l'attivazione dell'integrina indotta dai chemoattrattanti nei leucociti influenzandone la loro migrazione verso il parenchima polmonare. Questa alterazione potrebbe spiegare l'accumulo dei leucociti a livello della mucosa bronchiale evidenziato nei pazienti FC.

Tra le singole proteine presenti nei pathways identificati dall'analisi bioinformatica, sono state identificate diverse metalloproteasi coinvolte nella fibrosi cistica, tra cui MMP8, MMP9, MMP16. Tra queste però solo MMP9 risultava ridotta in quantità dopo l'inizio della terapia. Come riportato in letteratura, si tratta di un enzima particolarmente presente nell'infiammazione [64,65,71,72,83,84] e risulta up-regolato sia in quantità che in attività nelle secrezioni delle vie aeree inferiori dei pazienti con FC [78].

Inoltre, in un ulteriore studio precedentemente condotto nel nostro laboratorio, è stato rivelato che i PBMCs di pazienti FC omozigoti per la delezione della fenilalanina 508 esprimono costitutivamente e rilasciano elevate quantità di MMP9 [77], a causa di alterazioni dell'omeostasi del calcio intracellulare [77,80]. In seguito alla sua secrezione, la MMP9 acquisisce la capacità di degradare il collagene, contribuendo potenzialmente alla distruzione e alla disfunzione del parenchima polmonare, ma anche di potenziare la produzione delle chemochine coinvolte nella modulazione dei processi infiammatori [62,63].

Queste evidenze indicano che una elevata espressione di MMP9 nei leucociti di pazienti FC assume un ruolo patogenico nella promozione dell'infiammazione delle vie aeree inferiori e del danno polmonare, poiché vengono reclutati un gran numero di leucociti nel sito di infiammazione che sostengono una forte produzione di MMP9. Per questo nei pazienti FC dopo l'inizio della terapia con modulatori del canale CFTR, la diminuita espressione di MMP9 potrebbe essere uno degli effetti positivi ottenuto dal trattamento farmacologico.

Questi risultati positivi hanno posto le basi per considerare MMP9 come un potenziale biomarker leucocitario indicativo dell'efficacia della terapia e del recupero dell'attività di CFTR. Dopo aver condotto gli esperimenti *ex vivo* sono state effettuate anche le analisi *in vivo*, per confrontare i risultati ottenuti con i parametri clinici dei pazienti reclutati per lo studio. I dati ottenuti hanno confermato ciò che già avevamo osservato *ex vivo*, dimostrando ancora una volta la correlazione tra la diminuzione dei livelli di MMP9 e l'efficacia della terapia con Ivacaftor.

Durante la mia attività di tirocinio, mi sono occupata di effettuare le stesse analisi svolte dopo terapia Ivacaftor sui PBMCs e plasma di pazienti FC in terapia con il nuovo modulatore Trikafta[®], approvato recentemente da EMA e AIFA e potenzialmente utile alla maggior parte dei pazienti FC. Tra i pazienti selezionati per lo studio però non tutti avevano risposto positivamente alla terapia da un punto di vista clinico, e per questo motivo abbiamo classificato i pazienti in "rispondenti" e in "non rispondenti". Purtroppo, nell'ambito della fibrosi cistica, le terapie sviluppate, nonostante per molti siano risultate decisamente positive, per altri ancora non si sono dimostrate risolutive. Proprio per comprendere la variabilità di risposta clinica tra pazienti potenzialmente idonei ad una specifica terapia con modulatori di CFTR abbiamo deciso di individuare innanzitutto un biomarker di efficacia terapeutica e avendolo potenzialmente trovato nella modulazione dell'espressione della proteasi MMP9, approfondire i nostri studi e utilizzarli come base per lo sviluppo di una medicina personalizzata.

Come riportato nei Risultati abbiamo dimostrato che in 11 pazienti analizzati i livelli di MMP9 nel plasma subivano un significativo decremento dopo terapia solo nei pazienti clinicamente rispondenti in maniera positiva, mentre nei non rispondenti i livelli di enzima rimanevano elevati.

In accordo con la letteratura [77], abbiamo dimostrato che la terapia nei PBMCs dei pazienti rispondenti promuoveva una significativa riduzione dei livelli di fosforilazione di ERK1/2, con conseguente riduzione dell'espressione di MMP9; ma, inaspettatamente, anche nei PBMCs dei pazienti non rispondenti abbiamo assistito ad una diminuzione di p-ERK1/2, nonostante i livelli di MMP9 fossero rimasti elevati.

Per comprendere questa anomalia abbiamo indagato quali eventi fossero coinvolti a valle del pathway individuando un fattore trascrizionale coinvolto nei processi infiammatori, NF-κB [85], a sua volta modulato dall'inibitore IκBα. Questo inibitore quando viene fosforilato si stacca da NF-κB e migra al proteasoma dove viene degradato lasciando libero il fattore trascrizionale di migrare al nucleo e promuovere la trascrizione del gene di MMP9 [86]. Nei rispondenti, infatti, dopo terapia l'aumento significativo di IκBα osservato correla con la diminuita espressione di MMP9 sia intracellulare che plasmatica. Nei pazienti non rispondenti, dove MMP9 rimane altamente espressa, assistiamo ad una continua diminuzione dei livelli intracellulari di IκBα che lasciano libero NF-κB di migrare al nucleo. Questi risultati suggeriscono che la terapia Trikafta[®] promuove la modulazione dell'espressione di MMP9 tramite l'attivazione o l'inibizione di NF-κB, promuovendo la degradazione o meno del suo inibitore citosolico, IκBα.

I dati riportati in letteratura [78,79,85-88] e quelli ottenuti dal nostro studio suggeriscono che la potenziale chinasi coinvolta nel processo di fosforilazione di I κ B α possa essere p-ERK1/2. Infatti, la terapia promuove la defosforilazione di p-ERK1/2 in tutti i pazienti analizzati.

Nei PBMCs dei pazienti non rispondenti, però, la diminuzione di p-ERK1/2 osservata dopo terapia, sembrerebbe non essere sufficiente ad evitare la degradazione di I κ B α , e quindi MMP9 continua ad essere espressa ad alti livelli.

Una spiegazione di questo potenziale fallimento nell'ottenere una quota sufficiente di p-ERK1/2 defosforilata potrebbe essere il coinvolgimento di altre chinasi nel processo di fosforilazione di I κ B α , come documentato in letteratura [85,86]. È possibile che i pazienti non rispondenti, identificati in questo studio, subiscano una segnalazione alterata e differente dai pazienti rispondenti con conseguente amplificazione del processo di fosforilazione di I κ B α . A causa dell'attivazione di questa via alternativa di fosforilazione, l'inibitore di NF- κ B non riesce ad evitare la degradazione che il farmaco Trikafta[®] avrebbe potuto prevenire e quindi MMP9 continua ad essere altamente espressa.

In conclusione, i dati ottenuti in questo studio e raccolti in questa tesi, confermano che la modulazione plasmatica di MMP9 può essere un buon indicatore dell'efficacia di terapie con modulatori di CFTR. I risultati ottenuti sembrano incoraggianti e forniscono informazioni riguardo la possibilità di comprendere le motivazioni per cui alcuni pazienti, nonostante presentino mutazioni idonee per terapie con modulatori e assumano una dieta corretta per ottenere il massimo assorbimento del farmaco, purtroppo non ottengano i risultati attesi da un punto di vista clinico.

Sarebbe interessante, come spunto per studi futuri, analizzare più a fondo la via di signaling intracellulare coinvolta nell'espressione di MMP9 e l'eventuale presenza di altre proteine che potrebbero essere coinvolte nella variabilità di risposta dei pazienti ai farmaci con modulatori di CFTR.

A questo scopo ulteriori analisi potrebbero essere condotte su modelli cellulari più adatti, come ad esempio i macrofagi dei pazienti. Le informazioni ottenute potranno chiarire ulteriormente i motivi della variabilità di risposta dei pazienti alle terapie e potranno essere utili per lo sviluppo di nuovi farmaci indirizzando la cura per la fibrosi cistica verso un approccio di tipo personalizzato.

6. BIBLIOGRAFIA

[1] 2024 - Fondazione per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica - ETS

[2] Autori vari, 8 – “Pneumologia”, in Gianni Bona, Roberto Miniero (a cura di), “Pediatria pratica”, 9ª ed., Saluzzo, Minerva Medica, 2013 [1975], p. 92, ISBN 978-88-7711-774-8.

[3] Comitato Scientifico RIFC 2021: Marco Salvatore, Serena Quattrucci, Vincenzo Carnovale, Rita Padoan, Giovanna Florida, Gianna Puppo Fornaro, Donatello Salvatore, Domenica Taruscio.

[4] Frizzell RA, Hanrahan JW. Physiology of epithelial chloride and fluid secretion. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012 Jun;2(6): a009563. doi: 10.1101/cshperspect. a009563. PMID: 22675668; PMCID: PMC3367533.

[5] Moran O. The gating of the CFTR channel. *Cell Mol Life Sci.* 2017 Jan;74(1):85-92. doi: 10.1007/s00018-016-2390-z. Epub 2016 Oct 1. PMID: 27696113.

[6] Gadsby DC, Nairn AC. Control of CFTR channel gating by phosphorylation and nucleotide hydrolysis. *Physiol Rev.* 1999 Jan;79(1 Suppl): S77-S107. doi:10.1152/physrev.1999.79.1. S77. PMID: 9922377.

[7] Seavilleklein G, Amer N, Evagelidis A, Chappe F, Irvine T, Hanrahan JW, Chappe V. PKC phosphorylation modulates PKA-dependent binding of the R domain to other domains of CFTR. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2008 Nov;295(5):C1366-75. doi:10.1152/ajpcell.00034.2008. Epub 2008 Sep 17. PMID: 18799655.

[8] Chappe V, Hinkson DA, Zhu T, Chang XB, Riordan JR, Hanrahan JW. Phosphorylation of protein kinase C sites in NBD1 and the R domain control CFTR channel activation by PKA. *J Physiol.* 2003 Apr 1;548(Pt 1):39-52. doi: 10.1113/jphysiol.2002.035790. Epub 2003 Feb 14. PMID: 12588899; PMCID: PMC2342791.

[9] Aleksandrov L, Mengos A, Chang X, Aleksandrov A, Riordan JR. Differential interactions of nucleotides at the two nucleotide binding domains of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem.* 2001 Apr 20;276(16):12918-23. doi: 10.1074/jbc.M100515200. Epub 2001 Jan 29. PMID: 11279083.

[10] Moran O. On the structural organization of the intracellular domains of CFTR. *Int J Biochem Cell Biol.* 2014 Jul; 52:7-14. doi: 10.1016/j.biocel.2014.01.024. Epub 2014, Feb 7. PMID: 24513531.

[11] Zielenski J, Tsui LC. Cystic fibrosis: genotypic and phenotypic variations. *Annu Rev Genet.* 1995; 29:777-807. doi: 10.1146/annurev.ge.29.120195.004021. PMID: 8825494.

[12] Veit G, Avramescu RG, Chiang AN, Houck SA, Cai Z, Peters KW, Hong JS, Pollard HB, Guggino WB, Balch WE, Skach WR, Cutting GR, Frizzell RA, Sheppard DN, Cyr DM, Sorscher EJ, Brodsky JL, Lukacs GL. From CFTR biology toward combinatorial pharmacotherapy: expanded classification of cystic fibrosis mutations. *Mol Biol Cell.* 2016 Feb 1;27(3):424-33. doi: 10.1091/mbc.E14-04-0935. PMID: 26823392.

- [13] Rafeeq MM, Murad HAS. Cystic fibrosis: current therapeutic targets and future approaches. *J Transl Med.* 2017 Apr 27;15(1):84. doi: 10.1186/s12967-017-1193-9. PMID: 28449677; PMCID: PMC5408469.
- [14] Sheppard DN, Rich DP, Ostedgaard LS, Gregory RJ, Smith AE, Welsh MJ. Mutations in CFTR associated with mild-disease-form Cl⁻ channels with altered pore properties. *Nature.* 1993 Mar 11;362(6416):160-4. doi: 10.1038/362160a0. PMID: 7680769.
- [15] Hämmerle MM, Aleksandrov AA, Riordan JR. Disease-associated mutations in the extracytoplasmic loops of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator do not impede biosynthetic processing but impair chloride channel stability. *J Biol Chem.* 2001 May 4;276(18):14848-54. doi: 10.1074/jbc.M011017200. Epub 2001 Feb 6. PMID: 11278813.
- [16] Lukacs GL, Durie PR. Pharmacologic approaches to correcting the basic defect in cystic fibrosis. *N Engl J Med.* 2003 Oct 9;349(15):1401-4. doi: 10.1056/NEJMp038113. PMID: 14534332.
- [17] Science.ca Profile: Lap-Chee Tsui.
- [18] Quinton PM. "Cystic fibrosis: lessons from the sweat gland". *Physiology (Bethesda).* 2007 Jun;22(3):212–25.
- [19] Hardin DS. "GH improves growth and clinical status in children with cystic fibrosis – a review of published studies." *Eur J Endocrinol,* 2004 Aug, 151(1):581–5.
- [20] De Lisle RC, "Pass the bicarb: the importance of HCO₃⁻ for mucin release". *J Clin Invest.* 2009 Sep; 119(9):2535–7.
- [21] O'Malley CA. "Infection control in cystic fibrosis: cohorting, cross-contamination, and the respiratory therapist". *Respir Care.* 2009 May; 54(5): 641–57.
- [22] Rimessi A, Bezzetti V, Patergnani S, Marchi S, Cabrini G, Pinton P. Mitochondrial Ca²⁺-dependent NLRP3 activation exacerbates the *Pseudomonas aeruginosa*-driven inflammatory response in cystic fibrosis. *Nat Commun.* 2015 Feb 4; 6:6201. doi: 10.1038/ncomms7201. PMID: 25648527.
- [23] Farrell PM, White TB, Ren CL, Hempstead SE, Accurso F, Derichs N, Howenstine M, McColley SA, Rock M, Rosenfeld M, Sermet-Gaudelus I, Southern KW, Marshall BC, Sosnay PR. Diagnosis of Cystic Fibrosis: Consensus Guidelines from the Cystic Fibrosis Foundation. *J Pediatr.* 2017 Feb; 181S:S4-S15.e1. doi: 10.1016/j.jpeds.2016.09.064. Erratum in: *J Pediatr.* 2017 May; 184:243. PMID: 28129811.
- [24] Gonçalves AC, Marson FAL, Mendonça RMH, Bertuzzo CS, Paschoal IA, Ribeiro JD, Ribeiro AF, Levy CE. Chloride and sodium ion concentrations in saliva and sweat as a method to diagnose cystic fibrosis. *J Pediatr (Rio J).* 2019 Jul-Aug;95(4):443-450. doi: 10.1016/j.jpeds.2018.04.005. Epub 2018 May 19. PMID: 29782810.
- [25] De Boeck K, Vermeulen F, Dupont L. The diagnosis of cystic fibrosis. *Presse Med.* 2017 Jun;46(6 Pt 2): e97-e108. doi: 10.1016/j.lpm.2017.04.010. Epub 2017 May 31. PMID:28576637.

[26] Crossley JR, Elliott RB, Smith PA. Dried-blood spot screening for cystic fibrosis in the newborn. *Lancet*. 1979 Mar 3;1(8114):472-4. doi: 10.1016/s0140-6736(79)90825-0. PMID: 85057.

[27] Ratjen F, Bell SC, Rowe SM, Goss CH, Quittner AL, Bush A. Cystic fibrosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2015 May 14; 1:15010. doi: 10.1038/nrdp.2015.10. PMID: 27189798; PMCID: PMC7041544.

[28] Bell SC, De Boeck K, Amaral MD. New pharmacological approaches for cystic fibrosis: promises, progress, pitfalls. *Pharmacol Ther*. 2015 Jan; 145:19-34. doi: 10.1016/j.pharmthera.2014.06.005. Epub 2014 Jun 14. PMID: 24932877.

[29] Griesenbach U, Pytel KM, Alton EW. Cystic Fibrosis Gene Therapy in the UK and Elsewhere. *Hum Gene Ther*. 2015 May;26(5):266-75. doi: 10.1089/hum.2015.027. PMID: 25838137; PMCID: PMC4442579.

[30] Van Goor F, Yu H, Burton B, Hoffman BJ. Effect of ivacaftor on CFTR forms with missense mutations associated with defects in protein processing or function. *J Cyst Fibros*. 2014 Jan;13(1):29-36. doi: 10.1016/j.jcf.2013.06.008. Epub 2013 Jul 23. PMID: 23891399.

[31] Ramsey BW, Davies J, McElvaney NG, Tullis E, Bell SC, Dřevínek P, Griese M, McKone EF, Wainwright CE, Konstan MW, Moss R, Ratjen F, Sermet-Gaudelus I, Rowe SM, Dong Q, Rodriguez S, Yen K, Ordoñez C, Elborn JS; VX08-770-102 Study Group. A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation. *N Engl J Med*. 2011 Nov 3;365(18):1663-72. doi: 10.1056/NEJMoa1105185. PMID: 22047557; PMCID: PMC3230303.

[32] Paterson SL, Barry PJ, Horsley AR. Tezacaftor and ivacaftor for the treatment of cystic fibrosis. *Expert Rev Respir Med*. 2020 Jan;14(1):15-30. doi:10.1080/17476348.2020.1682998. Epub 2019 Oct 31. PMID: 31626570.

[33] Clancy JP, Rowe SM, Accurso FJ, Aitken ML, Amin RS, Ashlock MA, Ballmann M, Boyle MP, Bronsveld I, Campbell PW, De Boeck K, Donaldson SH, Dorkin HL, Dunitz JM, Durie PR, Jain M, Leonard A, McCoy KS, Moss RB, Pilewski JM, Rosenbluth DB, Rubenstein RC, Schechter MS, Botfield M, Ordoñez CL, Spencer-Green GT, Vernillet L, Wisseh S, Yen K, Konstan MW. Results of a phase IIa study of VX-809, an investigational CFTR corrector compound, in subjects with cystic fibrosis homozygous for the F508del-CFTR mutation. *Thorax*. 2012 Jan;67(1):12-8. doi: 10.1136/thoraxjnl_2011-200393. Epub 2011 Aug 8. PMID: 21825083; PMCID: PMC3746507.

[34] Wainwright CE, Elborn JS, Ramsey BW. Lumacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del CFTR. *N Engl J Med*. 2015 Oct 29;373(18):1783-4. doi: 10.1056/NEJMc1510466. PMID: 26510034.

[35] Lommatzsch ST, Taylor-Cousar JL. The combination of tezacaftor and ivacaftor in the treatment of patients with cystic fibrosis: clinical evidence and future prospects in cystic fibrosis therapy. *Ther Adv Respir Dis*. 2019 Jan-Dec; 13:1753466619844424. doi: 10.1177/1753466619844424. PMID: 31027466; PMCID: PMC6487765.

[36] Middleton PG, Mall MA, Dřevínek P, Lands LC, McKone EF, Polineni D, Ramsey BW, Taylor-Cousar JL, Tullis E, Vermeulen F, Marigowda G, McKee CM, Moskowitz SM, Nair N, Savage J, Simard C, Tian S, Waltz D, Xuan F, Rowe SM, Jain R; VX17-445-102 Study Group. Elexacaftor-

Tezacaftor-Ivacaftor for Cystic Fibrosis with a Single Phe508del Allele. *N Engl J Med*. 2019 Nov 7;381(19):1809-1819. doi: 10.1056/NEJMoa1908639. Epub 2019 Oct 31. PMID: 31697873; PMCID: PMC7282384.

[37] Hoy SM. Elexacaftor/Ivacaftor/Tezacaftor: First Approval. *Drugs*. 2019 Dec;79(18):2001-2007. doi: 10.1007/s40265-019-01233-7. PMID: 31784874.

[38] Bell SC, Saunders MJ, Elborn JS, Shale DJ. "Resting energy expenditure and oxygen cost of breathing in patients with cystic fibrosis." *Thorax*. 1996; 51:126-31.

[39] King SJ, Collins CE, Crowder T et al. "Nutritional management of cystic fibrosis in Australia and New Zealand". *Nutrition & Dietetics* 2008.

[40] Borowitz D, Robinson KA, Rosenfeld M et al. "Cystic Fibrosis Foundation evidence_based guidelines for management of infants with cystic fibrosis". *J Pediatr*. 2009.

[41] Robinson KA, Saldanha IJ, McKoy NA. "Management of infants with cystic fibrosis: A summary of the evidence for the Cystic Fibrosis Foundation working group on care of infants with cystic fibrosis". *J Pediatr*. 2009.

[42] Sinaasappel M, Stern M, Littlewood J et al. "Nutrition in patients with cystic fibrosis: a European Consensus". *J Cyst Fibros*. 2002.

[43] UK Cystic Fibrosis Trust Nutrition Working Group. "Nutrition management of Cystic Fibrosis" 2002.

[44] Kerem E, Conway S, Elborn S, Heijerman H for the Consensus Committee. "Standards of care for patients with cystic fibrosis: a European consensus." *J Cyst Fibros*. 2005.

[45] Dodge JA. "Malnutrition and age-specific nutritional management in cystic fibrosis." *Neth J Med*. 1992 Oct;41(3-4):127-9.

[46] Rosen BH, Chanson M, Gawenis LR, Liu J, Sofoluwe A, Zoso A, Engelhardt JF. Animal and model systems for studying cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2018 Mar;17(2S): S28-S34. doi: 10.1016/j.jcf.2017.09.001. Epub 2017 Sep 19. PMID: 28939349; PMCID: PMC5828943.

[47] Di Lullo AM, Scorza M, Amato F, Comegna M, Raia V, Maiuri L, Ilardi G, Cantone E, Castaldo G, Iengo M. An "ex vivo model" contributing to the diagnosis and evaluation of new drugs in cystic fibrosis. *Acta Otorhinolaryngol Ital*. 2017 Jun;37(3):207-213. doi: 10.14639/0392-100X-1328. PMID: 27897275; PMCID: PMC5463510.

[48] Dekkers JF, Wiegerinck CL, de Jonge HR, Bronsveld I, Janssens HM, de Winter-de Groot KM, Brandsma AM, de Jong NW, Bijvelds MJ, Scholte BJ, Nieuwenhuis EE, van den Brink S, Clevers H, van der Ent CK, Middendorp S, Beekman JM. A functional CFTR assay using primary cystic fibrosis intestinal organoids. *Nat Med*. 2013 Jul;19(7):939-45. doi: 10.1038/nm.3201. Epub 2013 Jun 2. PMID: 23727931.

[49] Nadkarni RR, Abed S, Draper JS. Organoids as a model system for studying human lung development and disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016 May 6;473(3):675-82. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.12.091. Epub 2015 Dec 22. PMID: 26721435.

[50] Guerra L, D'Oria S, Favia M, Castellani S, Santostasi T, Polizzi AM, Marigliò MA, Gallo C, Casavola V, Montemurro P, Leonetti G, Manca A, Conese M. CFTR-dependent chloride efflux in cystic fibrosis mononuclear cells is increased by ivacaftor therapy. *Pediatr Pulmonol*. 2017 Jul;52(7):900-908. doi: 10.1002/ppul.23712. Epub 2017 Apr 26. PMID: 28445004.

[51] Sorio C, Montresor A, Bolomini-Vittori M, Caldrelli S, Rossi B, Dusi S, Angiari S, Johansson JE, Vezzalini M, Leal T, Calcaterra E, Assael BM, Melotti P, Laudanna C. Mutations of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene Cause a Monocyte-Selective Adhesion Deficiency. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016 May 15;193(10):1123-33. doi: 10.1164/rccm.201510-1922OC. PMID: 26694899.

[52] Favia M, Gallo C, Guerra L, De Venuto D, Diana A, Polizzi AM, Montemurro P, Marigliò MA, Leonetti G, Manca A, Casavola V, Conese M. Treatment of Cystic Fibrosis Patients Homozygous for F508del with Lumacaftor-Ivacaftor (Orkambi®) Restores Defective CFTR Channel Function in Circulating Mononuclear Cells. *Int J Mol Sci*. 2020 Mar 31;21(7):2398. doi: 10.3390/ijms21072398. PMID: 32244302; PMCID: PMC7177453.

[53] Averna M, Pedrazzi M, Minicucci L, De Tullio R, Cresta F, Salamino F, Pontremoli S, Melloni E. Calpain inhibition promotes the rescue of F (508) del-CFTR in PBMCs from cystic fibrosis patients. *PLoS One*. 2013 Jun 13;8(6): e66089. doi: 10.1371/journal.pone.0066089. PMID: 23785472; PMCID: PMC3681946.

[54] Regamey N, Tsartsali L, Hilliard TN, Fuchs O, Tan HL, Zhu J, Qiu YS, Alton EW, Jeffery PK, Bush A, Davies JC. Distinct patterns of inflammation in the airway lumen and bronchial mucosa of children with cystic fibrosis. *Thorax*. 2012 Feb;67(2):164-70. doi: 10.1136/thoraxjnl-2011-200585. Epub 2011 Oct 18. PMID: 22008188.

[55] Tang XX, Fok KL, Chen H, Chan KS, Tsang LL, Rowlands DK, Zhang XH, Dong JD, Ruan YC, Jiang X, Yu SS, Chung YW, Chan HC. Lymphocyte CFTR promotes epithelial bicarbonate secretion for bacterial killing. *J Cell Physiol*. 2012 Dec;227(12):3887-94. doi: 10.1002/jcp.24101. PMID: 22552906.

[56] Averna, Marco Pedrazzi, Silvia Vercellone, Elettra Barberis, Michela Capraro, Roberta De Tullio, Identification of Potential Leukocyte Biomarkers Related to Drug Recovery of CFTR: Clinical Applications in Cystic Fibrosis. *Int. J. Mol. Sci*. 2021, 22, 3928. <https://doi.org/10.3390/ijms220839>.

[57] Mueller C, Braag SA, Keeler A, Hodges C, Drumm M, Flotte TR. Lack of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in CD3+ lymphocytes lead to aberrant cytokine secretion and hyperinflammatory adaptive immune responses. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011 Jun;44(6):922-9. doi: 10.1165/rcmb.2010-0224OC. Epub 2010 Aug 19. PMID: 20724552; PMCID: PMC3135852.

[58] Fridman R, Toth M, Chvyrkova I, Meroueh SO, Mobashery S. Cell surface association of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B). *Cancer Metastasis Rev*. 2003 JunSep;22(2-3):153-66. doi: 10.1023/a:1023091214123. PMID: 12784994.

[59] Gaggar A, Hector A, Bratcher PE, Mall MA, Griese M, Hartl D. The role of matrix metalloproteinases in cystic fibrosis lung disease. *Eur Respir J*. 2011 Sep;38(3):721-7. doi: 10.1183/09031936.00173210. Epub 2011 Jan 13. PMID: 21233269; PMCID: PMC4036453.

- [60] Gaggar A, Li Y, Weathington N, Winkler M, Kong M, Jackson P, Blalock JE, Clancy JP. Matrix metalloprotease-9 dysregulation in lower airway secretions of cystic fibrosis patients. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007 Jul;293(1): L96-L104. doi: 10.1152/ajplung.00492.2006. Epub 2007 Mar 23. PMID: 17384080.
- [61] Napoli S, Scuderi C, Gattuso G, Bella VD, Candido S, Basile MS, Libra M, Falzone L. Functional Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Melanoma. *Cells*. 2020 May 7;9(5):1151. doi: 10.3390/cells9051151. PMID: 32392801; PMCID: PMC7291303.
- [62] Van den Steen PE, Proost P, Wuyts A, Van Damme J, Opdenakker G. Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO-alpha and leaves RANTES and MCP-2 intact. *Blood*. 2000 Oct 15;96(8):2673-81. PMID: 11023497.
- [63] Opdenakker G, Van den Steen PE, Van Damme J. Gelatinase B: a tuner and amplifier of immune functions. *Trends Immunol*. 2001 Oct;22(10):571-9. doi: 10.1016/s1471-4906(01)02023-3. PMID: 11574282.
- [64] Roderfeld M, Rath T, Schulz R, Seeger W, Tschuschner A, Graf J, Roeb E. Serum matrix metalloproteinases in adult CF patients: Relation to pulmonary exacerbation. *J Cyst Fibros*. 2009 Sep;8(5):338-47. doi: 10.1016/j.jcf.2009.06.001. Epub 2009 Jul 14. PMID: 19604728.
- [65] Shute J. Matrix metalloproteinase 9: marker or mediator of tissue damage in asthma? *Clin Exp Allergy*. 2002 Feb;32(2):168-71. doi: 10.1046/j.1365-2222.2002.01302.x. PMID: 11929475.
- [66] Tsuchiya K, Maloney WJ, Vu T, Hoffman AR, Huie P, Sibley R, Schurman DJ, Smith RL. Osteoarthritis: differential expression of matrix metalloproteinase-9 mRNA in nonfibrillated and fibrillated cartilage. *J Orthop Res*. 1997 Jan;15(1):94-100. doi: 10.1002/jor.1100150114. PMID: 9066532.
- [67] Roomans GM. Calcium and cystic fibrosis. *Scan Electron Microsc*. 1986;(Pt 1):165-78. PMID: 3738414.
- [68] Liu JF, Crépin M, Liu JM, Barritault D, Ledoux D. FGF-2 and TPA induce matrix metalloproteinase-9 secretion in MCF-7 cells through PKC activation of the Ras/ERK pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 May 17;293(4):1174-82. doi: 10.1016/S0006-291X(02)00350-9. PMID: 12054499.
- [69] Park MJ, Park IC, Lee HC, Woo SH, Lee JY, Hong YJ, Rhee CH, Lee YS, Lee SH, Shim BS, Kuroki T, Hong SI. Protein kinase C-alpha activation by phorbol ester induces secretion of gelatinase B/MMP-9 through ERK 1/2 pathway in capillary endothelial cells. *Int J Oncol*. 2003 Jan;22(1):137-43. PMID: 12469196.
- [70] C. Delacourt, P. Rouet-Benzineb, C. Delclaux, J. L'Hour, A. Harf, C. Lafuma, Modulatory effects of PKC activity on increased 92-kDa gelatinase secretion by neonatal alveolar macrophages, *Am. J. Physiol*. 273 (1997) L989eL996.
- [71] Xu X, Abdalla T, Bratcher PE, Jackson PL, Sabbatini G, Wells JM, Lou XY, Quinn R, Blalock JE, Clancy JP, Gaggar A. Doxycycline improves clinical outcomes during cystic fibrosis

exacerbations. *Eur Respir J.* 2017 Apr 5;49(4):1601102. doi: 10.1183/13993003.01102-2016. PMID:28381428.

[72] Garratt LW, Sutanto EN, Ling KM, Looi K, Iosifidis T, Martinovich KM, Shaw NC, KicicStarcevic E, Knight DA, Ranganathan S, Stick SM, Kicic A; Australian Respiratory Early Surveillance Team for Cystic Fibrosis (AREST CF). Matrix metalloproteinase activation by free neutrophil elastase contributes to bronchiectasis progression in early cystic fibrosis. *Eur Respir J.* 2015 Aug;46(2):384-94. doi: 10.1183/09031936.00212114. Epub 2015 Apr 30. PMID: 25929954.

[73] Atkinson JJ, Senior RM. Matrix metalloproteinase-9 in lung remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003 Jan;28(1):12-24. doi: 10.1165/rcmb.2002-0166TR. PMID: 12495928.

[74] Pandey KC, De S, Mishra PK. Role of Proteases in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Front Pharmacol.* 2017 Aug 8; 8:512. doi: 10.3389/fphar.2017.00512. PMID: 28848433; PMCID: PMC5550664.

[75] Öz HH, Cheng EC, Di Pietro C, Tebaldi T, Biancon G, Zeiss C, Zhang PX, Huang PH, Esquibies SS, Britto CJ, Schupp JC, Murray TS, Halene S, Krause DS, Egan ME, Bruscia EM. Recruited monocytes/macrophages drive pulmonary neutrophilic inflammation and irreversible lung tissue remodeling in cystic fibrosis. *Cell Rep.* 2022 Dec 13;41(11):111797. doi: 10.1016/j.celrep.2022.111797. PMID: 36516754; PMCID: PMC9833830.

[76] Sagel SD, Kapsner RK, Osberg I. Induced sputum matrix metalloproteinase-9 correlates with lung function and airway inflammation in children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 2005 Mar;39(3):224-32. doi: 10.1002/ppul.20165. PMID: 15635615.

[77] Averna M, Bavestrello M, Cresta F, Pedrazzi M, De Tullio R, Minicucci L, Sparatore B, Salamino F, Pontremoli S, Melloni E. Abnormal activation of calpain and protein kinase Ca promotes a constitutive release of matrix metalloproteinase 9 in peripheral blood mononuclear cells from cystic fibrosis patients. *Arch Biochem Biophys.* 2016 Aug 15;604:103-12. doi: 10.1016/j.abb.2016.06.015. Epub 2016 Jun 25. PMID: 27349634.

[78] Verhaeghe C, Remouchamps C, Hennuy B, Vanderplasschen A, Chariot A, Tabruyn SP, Oury C, Bours V. Role of IKK and ERK pathways in intrinsic inflammation of cystic fibrosis airways. *Biochem Pharmacol.* 2007 Jun 15;73(12):1982-94. doi: 10.1016/j.bcp.2007.03.019. Epub 2007 Mar 24. PMID: 17466952.

[79] Wang, H.; Cebotaru, L.; Lee, H.W.; Yang, Q.F.; Pollard, B.S.; Pollard, H.B.; Guggino, W.B. CFTR Controls the Activity of NF- κ B by Enhancing the Degradation of TRADD. *Cell. Physiol. Biochem.* 2016, 40, 1063–1078.

[80] Averna M, Stifanese R, De Tullio R, Minicucci L, Cresta F, Palena S, Salamino F, Pontremoli S, Melloni E. Evidence for alteration of calpain/calpastatin system in PBMCs of cystic fibrosis patients. *Biochim Biophys Acta.* 2011 Dec;1812(12):1649-57. doi: 10.1016/j.bbadis.2011.09.013. Epub 2011 Sep 29. PMID: 219834881.

[81] Castellani S, Favia M, Guerra L, Carbone A, Abbattiscianni AC, Di Gioia S, Casavola V, Conese M. Emerging relationship between CFTR, actin and tight junction organization in cystic

fibrosis airway epithelium. Histol Histopathol. 2017 May;32(5):445-459. doi: 10.14670/HH-11-842. Epub 2016 Nov 11. PMID: 27834058.

[82] Watson MJ, Lee SL, Marklew AJ, Gilmore RC, Gentsch M, Sassano MF, Gray MA, Tarran R. The Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Uses its C-Terminus to Regulate the A2B Adenosine Receptor. *Sci Rep.* 2016 Jun 9; 6:27390. doi: 10.1038/srep27390. PMID: 27278076; PMCID: PMC4899698.

[83] Bergin DA, Hurley K, Mehta A, Cox S, Ryan D, O'Neill SJ, Reeves EP, McElvaney NG. Airway inflammatory markers in individuals with cystic fibrosis and non-cystic fibrosis bronchiectasis. *J Inflamm Res.* 2013; 6:1-11. doi: 10.2147/JIR.S40081. Epub 2013 Jan 23. PMID: 23426081; PMCID: PMC3576001.

[84] Devereux G, Steele S, Jagelman T, Fielding S, Muirhead R, Brady J, Grierson C, Brooker R, Winter J, Fardon T, McCormick J, Huang JT, Miller D. An observational study of matrix metalloproteinase (MMP)-9 in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2014 Sep;13(5):557-63. doi: 10.1016/j.jcf.2014.01.010. Epub 2014 Feb 11. PMID: 24525080.

[85] DiDonato JA, Hayakawa M, Rothwarf DM, Zandi E, Karin M. A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF- κ B. *Nature.* 1997 Aug 7;388(6642):548-54. doi: 10.1038/41493. PMID: 9252186.

[86] Venkatakrishnan A, Stecenko AA, King G, Blackwell TR, Brigham KL, Christman JW, Blackwell TS. Exaggerated activation of nuclear factor- κ B and altered I κ B β processing in cystic fibrosis bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000 Sep;23(3):396-403. doi: 10.1165/ajrcmb.23.3.3949. PMID: 10970832.

[87] Knorre, A.; Wagner, M.; Schaefer, H.E.; Colledge, W.H.; Pahl, H.L. DeltaF508-CFTR causes constitutive NF- κ B activation through an ER-overload response in cystic fibrosis lungs. *Biol. Chem.* 2002, 383, 271–282.

[88] Bhattacharyya, S.; Feferman, L.; Sharma, G.; Tobacman, J.K. Increased GPNMB, phospho-ERK1/2, and MMP-9 in cystic fibrosis in association with reduced arylsulfatase B. *Mol. Genet. Metab.* 2018, 124, 168–175.