

ABSTRACT TESI "STUDIO DELL'ESPRESSIONE DEI GENI CFTR E FOXI1 IN FIBROSI CISTICA E TERAPIA DI PRECISIONE MEDIANTE UN MODELLO PRECLINICO PAZIENTE SPECIFICO"

La Fibrosi cistica (FC) è una patologia autosomica recessiva monogenica, multi-sistemica e cronica dovuta a varianti patogenetiche che interessano il gene CFTR (Cystic Transmembrane conductance Regulator) localizzato sul braccio lungo del cromosoma 7. Tale gene codifica per l'omonima proteina canale coinvolta principalmente nel trasporto dello ione cloruro localizzata a livello della regione apicale delle cellule epiteliali. I principali effetti della patologia si manifestano a livello polmonare, pancreatico, intestinale e a livello dell'apparato riproduttivo. Ad oggi si contano 2114 varianti geniche, le quali vengono suddivise in 6 classi: nella classe I sono presenti quelle varianti che non portano ad alcuna produzione della proteina, la classe II vengono inserite quelle varianti che causano difetti nel normale processamento della proteina, la classe III racchiude quelle varianti che causano difetti di gating (apertura e chiusura) del canale, la classe IV comprende varianti che generano proteine con difetti di conduttanza, la classe V raggruppa quelle varianti che portano alla produzione di proteine generate da splicing aberrante, la classe VI racchiude le varianti che causano un elevato turnover della proteina in membrana. Nonostante questa prima classificazione, è noto che una variante patogenetica non sempre può essere inserita all'interno di una singola classe, in quanto gli effetti che genera sulla proteina sono estremamente variabili, con difetti funzionali spesso multipli. Questa classificazione è stata sfruttata a livello terapeutico. Infatti, sono stati sviluppati due tipi di farmaci con azione diversa: correttori, i quali mirano alla correzione del ripiegamento della proteina e dei difetti di esporto dal reticolo endoplasmatico come nel caso delle varianti di classe II; potenziatori, i quali incrementano la funzionalità della proteina utilizzati per le varianti di classe III e IV. I migliori risultati terapeutici sono stati ottenuti attraverso la terapia combinatoria dei due farmaci, in particolare la terapia con miglior successo è stata ottenuta combinando due diversi correttori e un potenziatore. Sono inoltre interessanti gli approcci di amplificazione, volti cioè ad aumentare la quantità di proteina CFTR disponibile per i correttori e potenziatori, anche inducendo una maggiore attività trascrizionale del gene CFTR. Per la corretta applicazione di queste terapie modulatorie di precisione è indispensabile la conoscenza dei livelli di espressione del CFTR, sia a livello dell'mRNA che a livello proteico, nonché dell'effetto funzionale delle varianti patogenetiche. Per queste caratterizzazioni e per lo studio *in vitro* degli effetti dei farmaci modulatori, in ambito di FC sono stati sviluppati diversi tipi di sistemi cellulari in grado di mimare l'epitelio respiratorio dei pazienti. A questo scopo, il mio gruppo di ricerca ha messo a punto un sistema di cellule epiteliali derivate da brushing nasale e coltivate in condizioni di coltura riprogrammanti (CRC), denominate CF-CRC-AESC. A partire dalla caratterizzazione di alcuni campioni di queste cellule, il progetto di tesi ha lo scopo di valutare l'analisi dell'espressione del CFTR mediante l'utilizzo di due metodiche: la RT-PCR e la ddPCR. Inoltre, sono state messe a confronto le espressioni di due geni (CFTR e FOXI1) in diverse condizioni sperimentali (brushing e CF-CRC-AESC differenziate). Il gene CFTR quale gene malattia all'origine della FC, il gene FOXI1 quale marcatore del differenziamento dell'epitelio respiratorio. Sta infatti emergendo l'ipotesi che nella patogenesi della FC possa originarsi anche un alterato differenziamento dell'epitelio respiratorio, con un ruolo ancora poco chiaro del CFTR. Infine, è stata valutata la possibilità di un'applicazione di terapia personalizzata paziente-specifica su una variante rara del CFTR, la variante patogenetica L1077P. Dal lavoro di tesi è emerso che l'espressione del CFTR risulta analizzabile da entrambe le metodiche RT-PCR e ddPCR, con risultati confrontabili. Infatti, vi è un'ottima correlazione tra risultati ottenuti con le due metodiche e, nonostante la variabilità analitica introdotta da ciascun metodo, risultano entrambi efficienti, con un vantaggio in favore della ddPCR che presenta maggiore sensibilità e riproducibilità, senza la necessità di utilizzare geni housekeeping o calibratori per la standardizzazione dei risultati. L'analisi di espressione del CFTR ha mostrato un'elevata variabilità biologica interindividuale nella popolazione analizzata, apparentemente non dipendente dal genotipo mutato di CFTR. Questa variabilità è mantenuta anche nella popolazione di CF-CRC-AESC differenziate analizzata, in cui è evidente una elevata espressione del CFTR, fino anche a livelli superiori rispetto ai rispettivi brushing. Un quadro simile è stato evidenziato anche per il gene FOXI1 nei brushing, anche se in questo caso sembra non essere mantenuta l'espressione ad alti livelli,

quando misurata nelle cellule CF-CRC-AESC differenziate corrispondenti. Per quanto riguarda l'applicazione della terapia di precisione alla variante rara L1077P, è stata valutata la risposta alla combinazione ETI (Elexacaftor (correttore), Tezacaftor (correttore), Ivacaftor (potenziatore)). Le analisi di immunoblot, test di swelling sugli organoidi e saggio in camera di Ussing hanno mostrato un buon recupero della quantità e funzionalità della proteina CFTR, a livelli paragonabili al recupero mostrato dalla variante patogenetica più frequente e già caratterizzata F508del. Per contro, le stesse analisi effettuate sulla variante patogenetica W1282X, non hanno mostrato alcun recupero funzionale (come atteso, trattandosi di un codone di stop). Questo studio ha mostrato che il sistema sperimentale utilizzato risulta molto utile sia per studi di espressione genica che studi funzionali del CFTR, i quali hanno portato a diversi spunti per analisi future sia in ambito di espressione genica quantificabile come approccio diagnostico, prognostico e terapeutico, sia in ambito di terapia di precisione di varianti patogenetiche rare, che alternativamente non potrebbero essere studiate in trial clinici.