

Articolo tradotto da STEFANO GENTILE, Socio di DEBRA Italia, dall'originale in lingua inglese pubblicato in data 18 Marzo 2014 sulla Rivista HUMAN MOLECULAR GENETICS della Oxford University, e trasmesso al traduttore dalla DEBRA Italia ..

**LE MANIFESTAZIONI DELLA EPIDERMOLISI
BOLLOSA DISTROFICA “ RECESSIVA “ –
DISCORDANTI NEI GEMELLI MONOZIGOTI –
METTONO IN EVIDENZA IL RUOLO DEL
FATTORE TGF – Beta COME INDICATORE
DELLE VARIAZIONI DELLA SEVERITA’ DELLA
MALATTIA.**

RICERCATORI : Teresa Odorisio, Giovanna Zambruno, Michela Di Salvio, Angela Orecchia, Giovanni Di Zenzo, Eugenia Piccinni, Francesca Cianfarani, e Daniele Castiglia presso
IDI – IRCSS – Roma.
Antonella Travaglione e Paolo Uva dal Polaris di Cagliari .
Barbara Bellei dal San Gallicano IRCSS di Roma
Andrea Conti dalla Univ. Policlinico di Modena

Il testo italiano è rigorosamente fedele all'originale. L'articolo originale è dotato di foto a colori , diagrammi e foto in bianco e nero e tabelle varie che non vengono riprodotte rinviando per queste al testo originale.

Per le tabelle ed i diagrammi , sono state fedelmente tradotte in italiano le relative didascalie, laddove presenti. Nel capitolo finale “ MATERIALI E METODI “ sono state saltate le traduzioni relative a descrizioni molto tecniche (dichiarando i vari “ OMISSIS “) perché il presente elaborato è destinato a “ non addetti ai lavori “ e quindi compilato perché sia il più possibile comprensibile.

Si riporta in calce un Glossario, che, alla luce della difficoltà di “ accesso “ agli acronimi ed ai termini scientifici, si ritiene una appendice assolutamente indispensabile per migliorare la comprensione dell'intero studio.

La Epidermolisi Bollosa Distrofica Recessiva è una malattia genetica della pelle caratterizzata da una abnorme fragilità della pelle che si manifesta con formazione di vesciche, le quali si trasformano inevitabilmente in cicatrici. La causa è attribuibile alla “ codifica “ del gene COL 7 A 1 (collagene di tipo VII) che è l’attore più importante per la adesione delle fibre che collegano lo stato “ membrana “ della epidermide al derma.

Le stesse mutazioni del COL 7 A 1 spesso determinano invece differenziazioni della malattia sia fra famiglie diverse che nella stessa famiglia. Ciò suggerisce che ulteriori agenti modificatori contribuiscano all’andamento della RDEB.

Nel presente studio si analizzeranno le manifestazioni “ fenotipiche “ di due gemelli monozigoti (v. Glossario) affetti da RDEB, manifestazioni marcatamente differenti benché i due pazienti abbiano presentato livelli di collagene VII molto vicini. Le analisi a largo spettro del genoma nei fibroblasti dei due fratelli hanno mostrato differenti rilevazioni dei geni, unitamente alla inibizione dei meccanismi di azione del TGF Beta.(v. Glossario). In particolare si è rilevato che la DECORINA , una proteina componente della matrice della pelle con proprietà “ antifibrotiche “, fosse più presente nel gemello affetto da una forma più lieve di EB. E coerentemente i fibroblasti del gemello affetto dalla forma più acuta hanno manifestato un comportamento “ profibrotico “ ed una capacità di “ contrarsi “ caratterizzati da un aumento delle proteine ACTIN della muscolatura liscia, dalla espressione dell’inibitore 1 dell’attivatore del plasminogeno, rilascio di collagene 1 e contrazioni del gel di collagene (come meglio illustrato più avanti . N d T). Queste cellule producono anche quantità crescenti di citochine IL 6 “ pro infiammatorie “ e la proteina MCP 1 monocita chemio tattica / chemioattrattante dei monociti 1. Entrambi i percorsi del TGF Beta (v. Glossario), il classico Smads e l’altro MAPKs sono risultati più attivi nei fibroblasti del gemello più colpito. Il comportamento “ profibrotico ” di questi fibroblasti è risultato essere inibito dal rilascio della DECORINA (v. Glossario) nelle cellule. I dati a nostra disposizione mostrano che la quantità di collagene tipo 7 non è il solo fattore determinante la gravità della malattia ed indicano che i percorsi metabolici del fattore TGF Beta son in qualche modo responsabili nel condizionare la variabilità della malattia. Ma c’è inoltre che le risultanze del presente studio identificano nella proteina DECORINA un possibile attore antifibrotico / infiammatorio in interventi terapeutici sulla RDEB.

1 – INTRODUZIONE

- 1.1 – La Epidermolisi Bollosa Distrofica Recessiva fa parte di un gruppo di malattie ereditarie della pelle, provocate da mutazioni del gene COL 7 A 1 che codifica i collagene tipo VII , il quale produce le fibre di “ ancoraggio “ che garantiscono l’adesione fra la zona “ membrana “ del derma e gli strati superiori della epidermide .
- 1.2 – I pazienti affetti da DEB hanno una produzione / presenza di collagene C 7 ridotta o assente, manifestando così una insufficiente o totalmente assente adesione delle fibre che si traduce in una separazione dei tessuti sotto lo strato compatto della zona membrana.
- 1.3 – La DEB può essere ereditata come forma “ dominante “ (DDEB) o come forma “ recessiva ” (RDEB).
- 1.4 .- La manifestazione clinica è ad ampio spettro, partendo da vesciche localizzate o perfino deformazione delle unghie fino a lesioni estese della pelle e delle mucose. In particolare la variante “ severa – generalizzata “ di RDEB si manifesta con uno sviluppo precoce di “ fusione “ delle dita dei piedi o delle mani, interessamento pressoché scontato del cavo orale e dell’esofago e rischio elevato di sviluppare carcinomi “ a squame “ (rischio che supera il 90 % in pazienti intorno ai 55 anni di età).
- 1.5 – Tra questi due estremi si collocano tutta una serie di manifestazioni cliniche nelle quali la formazione di vesciche e cicatrici può essere estesa a tutto il corpo o localizzata

prevalentemente alle estremità, ma in forma più lieve della RDEB severa – generalizzata, la malattia non si evolve fino alla fusione delle dita ed il coinvolgimento delle mucose e dell'esofago è meno frequente e più leggero.

- 1.6 – Le correlazioni fra il tipo di mutazione genetica e le manifestazioni specifiche della malattia indicano che l'azione prematura della sintesi proteica dei “ codoni “ in entrambi gli alleli del collagene COL 7 A 1 si traduce di solito nella mancata produzione di C 7 con l'assenza di fibre di ancoraggio. Il tutto si estrinseca nella comparsa della Epidermolisi Bollosa Distrofica Recessiva in forma grave ed estesa.
- 1.7 – Dall'altra parte nella compagine dei gemelli eterozigoti (v. Glossario) per la assenza o la mutazione “ particolare “ di almeno un allele (v. Glossario) si può giungere alla sintesi di livelli inferiori di C 7 mutanti e quindi andare incontro a forme più lievi di RDEB.
- 1.8 – Sebbene proprio le mutazioni genetiche del COL 7 A 1 sono da ritenersi fra le cause maggiori della comparsa dei sintomi clinici della DEB, è stato provato che le stesse alterazioni genetiche nel COL 7 A 1 possono essere associate a manifestazioni cliniche molto diverse in fratelli affetti da RDEB.
- 1.9 – L'ipotesi è supportata anche dalle manifestazioni eterogenee osservate su pazienti portatori delle stesse mutazioni, ma senza alcun grado di parentela fra loro.
- 1.10 – Si è ipotizzato che il polimorfismo di un singolo nucleotide nel promotore del gene MMP 1 (v. Glossario) che codifica la matrice della metallo proteinasi influenzi i differenti livelli di gravità della RDEB.
- 1.11 – Benchè la MMP1 con poliformismo a singolo nucleotide sia stato mostrato influenzare la produzione di collagene COL 7 A 1, non è stata ancora confermata alcuna correlazione fra l'allele ad alto rischio (v.paragr. 1.6) e la gravità della malattia.
- 1.12 – Ciò porta ad immaginare che la MMP1 SNP (v. Glossario) non sia l'unico agente che modifichi la RDEB, ma che esistano altri fattori influenti non legati direttamente alla abbondanza di C 7.
- 1.13 – Le conseguenze derivanti dalle mutazioni del COL 7 A 1 hanno un forte impatto sul livello patologico della malattia nonché sulla possibile mortalità. Benchè la fragilità della pelle di pazienti affetti da RDEB è conseguenza diretta della “ sregolatezza “ del C 7 , il peso maggiore della malattia consiste nella formazione di ulcere e nei tentativi incessanti di ricostruzione dei tessuti poiché sono compromessi i normali processi di formazione dei diversi strati dell'epitelio e delle matrici extracellulari.
- 1.14 – Ciò porta all'alternarsi di ritardi nella guarigione delle ferite, del manifestarsi di infiammazioni che si cronicizzano, fibrosi, cicatrizzazioni ma anche l'aumento del rischio che si sviluppino SCC (Carcinomi a Cellule Squamose).
- 1.15 – Va notato che pazienti affetti da RDEB possono sviluppare i carcinomi appena citati anche indipendentemente dalla produzione di C 7, la qualcosa ancor di più che altri fattori gioca un ruolo nel condizionare le conseguenze a valle, che complicano questa malattia.
- 1.16 – Le citochine (v. Glossario) presenti nella zona della ferita giocano un ruolo centrale nello stimolare e coordinare l'attività dei diversi tipi di cellule permettendo una normale guarigione in normali condizioni fisiologiche.
- 1.17 – Molto poco è dato sapere su quali cellule pro – infiammazione, quali percorsi molecolari e quali tipi di citochine siano particolarmente attivi nella pelle fragile dei pazienti DEB, e se uno sviluppo di citochine “ deviate “ possa condizionare il percorso clinico e come sia possibile contrastare eventuali conseguenze indesiderate.
- 1.18 – Con lo scopo di individuare le molecole che influenzano lo sviluppo clinico della malattia nei pazienti DEB, nel presente studio saranno posti sotto analisi due gemelli “ monozigoti (v. Glossario) affetti entrambi da RDEB, che presentano significative differenti manifestazioni della malattia.

- 1.19 – I gemelli monozigoti non hanno sempre identico DNA, ma tuttavia condividono quasi il 100 % del loro polimorfismo genetico, cosicché essi rappresentano un valido campione per analizzare le differenze della attività dei geni in relazione alle differenze “ fenotipiche “.
- 1.20 – Come primo approccio è stato verificato se il rilascio di C 7 nello strato basale in zona “ membrana” della pelle fosse nei due gemelli confrontabile dopodiché si è prodotta una ricerca a largo spettro sulla espressione del genoma su culture di fibroblasti (v. Glossario) per tentare di rilevare la presenza di molecole di diversa natura nei due gemelli.
- 1.21 – I risultati mirano ad individuare la esistenza di “ geni modificatori protettivi “ che possano interagire con il percorso metabolico del TGF Beta.

2. RISULTATI

2.1 – RILEVANZE CLINICHE E MOLECOLARI NEI DUE GEMELLI AFFETTI DA RDEB

- 2.1.1 – I gemelli studiati hanno manifestato fin dalla nascita vesciche nella pelle distribuite su tutto il corpo nonché nel cavo orale. Anche le unghie dei piedi e delle mani erano interessate già in tenera età fino a causare la perdita precoce delle unghie stesse.
- 2.1.2 – Durante la loro infanzia poi si manifestarono i primi sintomi di difficoltà nella deglutizione e lo sviluppo di stenosi dell’esofago fino a richiedere interventi di “ dilatazione “ in endoscopia.
- 2.1.3 – Il livello di gravità della malattia è stato analogo fino alla prima adolescenza quando uno dei due fratelli ha subito un intensificarsi delle manifestazioni sia sulla pelle del corpo che nella bocca in maniera apparentemente spontanea.
- 2.1.4 – Dagli esami condotti alla età di 33 anni si è potuto rilevare che il gemello con intensità più lieve della malattia presentava lesioni con vesciche sulla pelle ed atrofizzazione limitate alle zone esposte a traumi (leggi : urti - N.d.T.), con particolare riguardo alle mani, ai piedi, alle ginocchia ed ai gomiti, mentre nel gemello affetto dalla versione più grave della malattia, le vesciche le erosioni e le ulcerazioni interessavano quasi tutto il corpo.
- 2.1.5 – In entrambi i fratelli poi si era aggravata la distruzione delle unghie con caduta delle stesse. Il cuoio capelluto ed i capelli non erano invece minimamente coinvolti.
- 2.1.6 – Il gemello con forma violenta aveva vesciche molto diffuse in tutto il corpo (fenomeno tipico delle RDEB grave) mentre l’altro gemello evidenziava bolle consistenti ma localizzate prevalentemente sulle estremità.
- 2.1.7 – Nei gemelli sono state sottoposte a “ screening “ le mutazioni del collagene COL 7 A 1 risultate accostabili a quelle di gemelli eterozigoti, come precedentemente asserito.
- 2.1.8 – La mutazione di base consiste in uno “ slittamento di struttura “ che conduce ad una PTC (?), ad un decadimento dell’ mRNA (RNA messaggero) e carenza di proteine, o alla assolutamente indispensabile rimozione dei polipeptidi instabili (si consiglia Wikipedia alla voce “ splicing “ – N.d.T.)
- 2.1.9 – La mutazione finale provoca invece un “ sito donatore “ per l’esone 53 (v. Glossario) che porta ad un mRNA più breve , portatore di PTC (?). Tuttavia ciò consente anche uno sviluppo nel sito donatore canonico, che dà luogo alla sintesi fra una minima quantità di mRNA a catena lunga ed i polipeptidi C 7.
- 2.1.10 – Oltre che nel sangue, queste mutazioni del collagene COL 7 A 1 sono state confermate dalla mappa genetica del DNA estratta da culture di cellule cheratinose e fibroblasti prelevati con biopsie dalla pelle di entrambi i gemelli.
- 2.1.11 – La reale condizione clinica dei due gemelli monozigoti è stata ulteriormente confermata dalla analisi genica (tecnica omessa N.d.T.) e dalla sequenza /posizione delle proteine amelogenine.

- 2.1.12 – Inoltre questi soggetti condividono la stessa condizione (Eterozigosi 14/24) del SNP (v. Glossario) (Polimorfismo del Singolo Nucleoide) rsl 799750, nell'agente promotore MMP 1 (v. Glossario) e la stessa sequenza comprendente la regione promotrice ed il primo esone (v. Glossario) del gene TGF Beta 1, laddove sono localizzati sia il polimorfismo del singolo nucleotide SNPs rs 1800469 (omozigotico CC) che l'rs 1982073 (omozigotico TT) e l'rs 1800471 (omozigotico GG).
- 2.1.13 – In sintonia con le conseguenze sopra illustrate delle mutazioni del collagene COL 7 A 1, le analisi condotte con la tecnica della " immunofluorescenza " sui campioni di pelle dei gemelli hanno rivelato un forte decadimento della colorazione del C 7 all'interno dello strato basale della pelle in area " membrana ", se confrontato con la pelle di donatori sani.
- 2.1.14 – L'intensità del segnale residuo è grossolanamente confrontabile fra i due gemelli, benché appaia leggermente più debole nella pelle del paziente affetto dalla forma meno grave di EB. L'intensità delle macchie (e/o della colorazione) per : Laminin 332, Collagene 17, ed Integrin Beta 4 (v. Glossario), che sono componenti dello strato basale della pelle in zona membrana per altre forme di Epidermolisi Bollosa, è analoga fra i due fratelli.

FIG 1 – DIDASCALIE

- *Caratterizzazioni cliniche, biochimiche ed immunoistologiche di gemelli monozigoti affetti da Epidermolisi Bollosa Distrofica Recessiva .*
- *A) Il gemello con una manifestazione più grave della malattia presenta vesciche ed erosioni mentre nel fratello le lesioni della pelle sono circoscritte alle zone del corpo più esposte a traumi (leggi: urti), come mani piedi gomiti e ginocchia.*
- *B) La immunocolorazione della giunzione fra derma ed epidermide nelle zone di pelle non coinvolte dalle manifestazioni suddette e dello stesso paziente mostra una colorazione molto ridotta del C 7 ed analoga nei due gemelli.*
- *C) l'analisi di cellule cheratinose in sospensione (dopo " lisi ") conferma la evidenza molto ridotta di C 7 in entrambi i fratelli, soprattutto se confrontata con i risultati di soggetti sani. Si può notare che la quantità di C 7 è leggermente più elevata nella lisi in sospensione del gemello più aggredito.*
- *D) L'analisi " Western Blot " (v. Glossario) di un medium concentrato e trattato di fibroblasti gemelli in cultura di 50 microgrammi / ml di acido ascorbico, che favorisce la secrezione di collagene. Un segnale molto debole è rilevabile nei campioni prelevati da entrambi i gemelli (S : gemello più grave . M : gemello meno grave).*

- 2.1.15 – L'analisi di tipo " Western Blot " (v. Glossario) delle proteine estratte da cellule cheratinose di base con il ricorso ad un anticorpo policlonale anti – C 7 ha confermato che i gemelli hanno livelli molto bassi di proteine C 7 di valore standard soprattutto se confrontati con i livelli di soggetti sani.
- 2.1.16 – L'analisi ha in più evidenziato che il gemello con forma più grave di EB è in grado perfino di produrre quantità di C 7 leggermente maggiori del fratello (Fig. 1 C).
- 2.1.17 – L'analisi " Western Blot " di cellule concentrate in sospensione da culture di fibroblasti ha rafforzato i dati ottenuti da estratti di cellule cheratinose (Fig. 1 D). Prese insieme queste evidenze portano a concludere che le differenze nella gravità della malattia fra i due gemelli NON dipendono dalla " abbondanza " di C 7.

2.2 – IL CONFRONTO DEGLI ANDAMENTI DELLA PRESENZA DI GENI IN CULTURE DI FIBROBLASTI DEI DUE GEMELLI, RIVELA CHE LE DIFFERENZE NELLA " ESPRESSIONE " DI GENI INFLUISCONO SULLA SEGNALEZIONE DI TGF – Beta (Fattore di sviluppo di crescita - v. Glossario N.d.T.).

- 2.2.1 – Per individuare i meccanismi che mutano la malattia e/o i fattori che potenzialmente influenzano le differenze nelle manifestazioni tipiche fra fratello e fratello, si è utilizzato un RNA completo depurato dei fibroblasti primari e prelevato da campioni bioptici di pelle non lesionata, per sottoporlo ad “ ibridazione “ su supporti a matrice (si veda anche per le righe successive la esauriente descrizione su Wikipedia alla voce MICROARRAY di DNA . – N.d.T.)
- 2.2.2 – Una analisi dell’arricchimento di gruppi di geni (metodo GSEA) è stata utilizzata per tentare di individuare gruppi di geni sensibilmente perturbati.
- 2.2.3 – Tra i gruppi di geni sensibilmente “ arricchiti “ (FRD minore di 0,05) nel gemello affetto dalla forma più aggressiva di EB è stato rilevato che ci fossero diversi geni coinvolti nella “ contrazione muscolare “. In particolare i fibroblasti del gemello più grave hanno manifestato livelli maggiori nel mRNA sia di “ alpha – smooth muscle actin “ che di “ plasminogen activator inhibitor 1 “, che sono due geni espressi dai fibroblasti contrattili e pro – fibre, a seguito della azione del TGF – Beta (Tabella 1).
- 2.2.4 – Fra i geni con incrementato numero di componenti cellulari appartenenti al gemello meno affetto, il proteoglicano Decorina (v. Glossario) è stato individuato in quattro supporti su quattro(del “ sistema “ di analisi N.d.T.). La Decorina (DCN) è un componente della matrice extracellulare che “ fissa “ il TGF Beta inibendone l’azione.
- 2.2.5 – Anche la interleuchina 7 (IL 7) , altro inibitore del TGF Beta che tuttavia agisce intra – cellule, è stata trovata incrementata nel numero di componenti cellulari nel gemello meno grave.(v. Tabella 1).
- 2.2.6 – Altri geni influenti sulla attività del TGF – Beta e sulla fibrosi sono stati individuati con differenti numeri di componenti cellulari, nello specifico i geni che codificano per MMP3, ZEB1, DKK2, TGF BetaRII, e BMP2K (riportati i soli acronimi per difficoltà di traduzione specifica N.d.T.) (v. Tabella 1).
- 2.2.7 – I dati provenienti dai “ Microarrays “ (v. paragrafo 2.2.1) erano convalidati dal metodo di analisi qRT – PCR (v. Glossario) il quale conferma la evidenza differenziale di tutti i geni sopra elencati (Fig. 2A).
- 2.2.8 – E’ stata anche testata la espressione di proteine da parte di quei geni. L’analisi denominata “ Western Blot “ (v. Glossario) ha confermato i diversi livelli di DECORIN polipeptide e di DECORIN proteoglicana nei fibroblasti dei due gemelli. (Fig. 2 B)
- 2.2.9 – L’attore è stato identificato in una cellula “ superassottigliante “ che segue l’assimilazione dei glicosaminoglicani con il condroitinase, e che riduce le dimensioni della DECORINA da 100 a 40 KDa (Fig. 2 B pannello in basso). Significativi incrementi nel rilascio di IL 7 ed MMP 3 (v. Glossario) sono stati rilevati con il metodo ELISA nella cellula “ super assottigliante “ del gemello con forma più lieve di EB (Fig. 2 C)
- 2.2.10 – Ad ulteriore conferma, Alfa – SMA (v. Glossario) e PA1-1 hanno manifestato livelli di evidenza più elevati negli estratti di cellule del gemello con manifestazioni cliniche più gravi. (Fig. 2 D). L’analisi per “ immunofluorescenza “ condotta su culture di fibroblasti semiconfluenti ha evidenziato che Alfa – SMA era espressa in una percentuale maggiore di cellule nel gemello più grave rispetto alle cellule del gemello meno affetto (Fig. 2 E).
- 2.2.11 – Nonostante la forte differenza osservata nella trascrizione dell’inibitore DKK 2 che segnala la proteina Wnt (v. Glossario) l’esame Western Blot su estratti di cellule indica livelli analoghi di proteine intracellulari nei due fratelli (Fig S 3 nel materiale “ supplementare “).
- 2.2.12 – Anche il fattore di crescita TGF – Beta R 2 ha mostrato livelli non significativamente differenti negli estratti di cellule dei due gemelli nonostante le differenze mostrate durante la fase di trascrizione (Fig. S 3 del materiale supplementare).

- TABELLA 1 - (V. TESTO ORIGINALE) -

FIG 2 – DIDASCALIE

Conferma delle diverse espressioni di geni. A) Le differenze fra la espressione di geni relativamente al tracciato molecolare del fattore di crescita TGF – Beta sono confermate da analisi di qRT – PRC (v. Glossario) sui campioni di fibroblasti prelevati dai due gemelli monozigoti. I valori sono espressi come rapporto fra il gemello più grave rispetto al più lieve; sono stati riportati anche i risultati ottenuti con metodo diverso (genearray).

B) – La analisi tipica “ Western Blot (v. Glossario) della Decorina nei fibroblasti lisati (pannello superiore) e del mezzo condizionato, prima e dopo il trattamento con Condroitinase ABC (pannello inferiore). Rimuovendo la catena di glicosaminoglicani, la Condroitinase riduce la dimensione della DCN (Decorina – v- Glossario) da 100 KDa (proteoglicano) a 40 KDa (proteina di base). I fibroblasti del gemello con forma lieve d EB producono livelli maggiori sia delle proteine di base che dei proteoglicani, rispetto ai fibroblasti dell’altro gemello.

C) – Analisi con il metodo ELISA (v. Glossario) per la interleuchina IL – 7 e per la proteina MMP 3 nei fibroblasti del gemello meno grave confermano i livelli più alti che nel gemello più grave. Il “ mezzo “ condizionato è stato raccolto dopo aver tenuto le cellule in uno stato di “ scarsità di nutrienti “ (cellular starvation).

D) – Analisi con il metodo “ Western Blot “ (v. Glossario) condotta sulla proteina Alfa – SMA (v. Glossario) e sull’inibitore 1 degli attivatori della plasmino genesi (PAI 1) nei lisati totali dei fibroblasti. L’enzima GAPDH (v. Glossario) è stato scelto come indicatore di carico / sovrapposizione. I livelli più alti delle proteine analizzate sono stati manifestati nei fibroblasti del gemello più grave.

E) – Analisi con “ sonde rivelatrici di fluorescenza “ della presenza della proteina Alfa- SMA (v. Glossario) (elaborazione verde) nei monostrati di fibroblasti “ semi confluenti “. DAP 1 (blu) è stato usato per la colorazione dei nuclei. La presenza di cellule Alfa – SMA è stata indicata come percentuale di cellule fluorescenti sul totale.

2.3 – I FIBROBLASTI DEL GEMELLO AFFETTO DALLA FORMA PIU’ GRAVE DI E.B. MANIFESTANO UN “ COMPORTAMENTO” PRO – INFIAMMATORIO E PRO – FIBROTICO

2.3.1 – Come sopra illustrato (vedi paragrafo 2.2.10 e figura 2 punto b) i fibroblasti del gemello più grave hanno espresso livelli più elevati sia di Alfa – SMA che di PAI – 1, che sono entrambi indicatori di una differenziazione delle cellule “ muscolari “ indotta dal fattore di crescita TGF – Beta 1 (v. Glossario) (si ricorda che TGF – Beta 1 stimola i fibroblasti a produrre ad esempio il collagene – N.d.T.)

2.3.2 – Una “ ibridazione “ con matrici ad alta densità (v. Glossario alla voce Gene array Hybridization) ha mostrato che il gene TGF Beta 1 era “ sregolato “ nei fibroblasti del gemello più grave, con un incremento della “ curva “ appena sotto il valore di soglia (maggiore di 2).

2.3.3 – A questo punto con il metodo di analisi ELISA è stata misurata la concentrazione del TGF Beta 1 nei fibroblasti in sospensione per rilevare sia un precursore latente sia la forma attiva senza i peptidi eventualmente associati.

2.3.4 – I risultati evidenziano un ammontare significativamente cresciuto di citochine rilasciate nella cultura di cellule prelevate nel gemello più grave (Fig. 3 A) . Parallelamente l’alternarsi dell’ Eson 1 (v. Glossario) e delle “ zone promotrici “ del gene TGF Beta 1 nei campioni di DNA prelevati dai fibroblasti di entrambi i gemelli, esclude la presenza di nuove mutazioni genetiche. Mostra anzi genotipi identici nei SNPs (Polimorfismo a Singolo Nucleotide), che sono conosciuti per essere associati in maniera funzionale nella produzione di proteine e nel tasso di trascrizione dei geni.

2.3.5 – Le osservazioni sopra riportate suggeriscono che le differenze nella espressione del fattore di crescita TGF Beta 1 fra i due gemelli NON sono determinate da alterazioni nella sequenza dei geni. (paragrafo 2.3.4). Dato che la “ trascrizione “ (v. Glossario) del

collagene COL 7 A 1 è stimolata dalla presenza di proteine SMAD (v. Glossario) i dati ricavati possono anche spiegare perché la espressione di C 7 risulta leggermente incrementata nelle cellule prelevate dalla pelle del gemello più grave.

- 2.3.6 – La più importante risposta dei fibroblasti alla attività / stimolo del TGF Beta 1 (V. paragrafo 2.1.1) è una deposizione di componenti della matrice extracellulare (ECM – v. Glossario).
- 2.3.7 – La analisi con tecnica Western Blot (v. Glossario) sui fibroblasti in sospensione ha rilevato livelli incrementati nel rilascio del collagene 1 nel gemello più affetto, rafforzando l'informazione che una attività esaltata del TGF Beta 1 si traduca in un aumento della gravità della malattia.
- 2.3.8 – Si è passati poi ad analizzare l'attività “ contrattile “ delle cellule di entrambi i gemelli tramite un “ saggio su fibroblasti coltivati in gel di collagene “ per 48 ore. Trascorso questo intervallo di tempo i fibroblasti del gemello più grave riuscivano a contrarre il gel di collagene fino al 46 % circa dell'area iniziale, mentre lo stesso numero di cellule prelevate dal gemello meno grave nello stesso intervallo di tempo contraevano l'area di partenza del gel di collagene appena al 95 % (cioè in sostanza la contraevano solo del 5 %) (Fig. 3 C).
- 2.3.9 – I fibroblasti esprimono diverse citochine che possono esercitare una azione autocrina e paracrina (cioè secernere un “ messaggero chimico “ che modifichi la fisiologia delle cellule che li circondano, siano esse omologhe o eterologhe . N.d.T.), svolgendo un ruolo centrale come mediatori della fibrosi (riparazione di un danno tessutale N.d.T. – disponibile glossario di 3 fogli sul tema).
- 2.3.10 – Una analisi su “ matrice “ di citochine anticorpi è stata poi condotta su supporti elaborati dai fibroblasti dei due gemelli. La analisi ha determinato livelli significativamente più alti per due citochine pro – infiammazione, la Interleuchina IL – 6 e la proteina “ macrofaga e chemo attrattiva MCP – 1 , nel gemello affetto dalla forma più acuta di EB.
- 2.3.11 – Queste citochine sono stimulate dal fattore TGF Beta e favoriscono la trasformazione dei fibroblasti in “ mio fibroblasti “. Ciò prova che i fibroblasti del gemello più grave manifestano diverse caratteristiche nelle cellule che favoriscono infiammazioni e fibrosi.

FIG. 3 – DIDASCALIE

- A) – L'analisi ELISA rivela il livello totale della proteina TGF Beta 1 in un supporto elaborato di fibroblasti rimasti per 24 ore in assenza di “ nutrienti “.*
- B) – Analisi Western Blot per la proteina / collagene di tipo 1 su supporto trattato con la stessa quantità di fibroblasti nei due campioni, raccolti dopo 24 ore di “ digiuno “.*
- C) – Saggio di “ contrattilità “ in gel di collagene. Immagini rilevate al momento “ zero “ e dopo 48 ore. Gli istogrammi riportano la percentuale di area contratta rispetto alla superficie di partenza.*
- D) – L'analisi con matrici sulle chemochine espresse dai fibroblasti dei due gemelli indica che il rilascio di IL – 6 e di MCP – 1 è più spinto nei fibroblasti del gemello più grave. Il diagramma confronta i dati gemello per gemello.*

2.4 – MANIFESTAZIONE DELLE ATTIVITA' DEL TGF – Beta 1 NEI FIBROBLASTI DEL GEMELLO PIU' GRAVE

- 2.4.1 – Le differenti tipologie di fibroblasti rilevate nei due gemelli confermano ancor più il contributo della azione del TGF Beta ai risultati clinici discordanti nei due gemelli. La manifestazione canonica del TGF Beta è supportata dalla attivazione di fattori di trascrizione del Smad; tuttavia altri agenti mediatori, prevalentemente le proteine MAPKs, vengono attivati come reazione alla stimolazione esercitata da TGF Beta..
- 2.4.2 – Per meglio distinguere lo stato di attività del fattore di crescita TGF Beta tra i fibroblasti dei due gemelli, gli agenti mediatori Smad e MAPKs sono stati sottoposti ad analisi con

modalità Western Blot (v. Glossario) in condizioni di base o a seguito di aggiunta di TGF – beta 1 (Fig. 4 A).

- 2.4.3 – E' stata centrata una dose adatta di reazione di TGF Beta, e la concentrazione minimale di 0,25 ng/ml capace di innescare una reazione biologica è stata scelta per rilevare le differenze nella risposta dei fibroblasti agli stimoli di TGF Beta 1, sia nell'uno che nell'altro gemello.
- 2.4.4 – Le cellule del gemello più grave hanno manifestato quantità più elevate di anticorpi Smad 2, p-p 38 e p-ERK 1/2, in condizioni di base. Più nel dettaglio, mentre nelle condizioni sperimentali il p –Smad 2 è stato praticamente irrilevabile nelle cellule del gemello meno grave, un livello crescente dell'anticorpo citato era sempre rilevabile nei campioni prelevati dal gemello più grave.
- 2.4.5 – A seguito di un trattamento con TGF Beta 1 gli sforzi di entrambi i fibroblasti hanno fortemente incrementato l'anticorpo p –Smad 2 fino a livelli analoghi mentre gli altri due, p-p 38 e p-ERK 1/2 sono aumentati solo nelle cellule del gemello meno grave. Sorprendentemente nel gemello in condizioni più gravi i livelli degli anticorpi p-ERK 1/2 e p-p 38 sono diminuiti a seguito del trattamento con TGF Beta.
- 2.4.6- Per approfondimenti ulteriori sulla capacità e bravura dei fibroblasti a reagire agli stimoli del fattore di crescita TGF Beta è stato allestito un saggio di “ contrattilità “ in gel di collagene su due modalità e cioè in assenza o in presenza di TGF Beta 1, nella quantità di 0,25 ng/ml (nanogrammi per millilitro) (Fig. 4 B)
- 2.4.7 – La aggiunta di TGF Beta 1 ha provocato la contrazione del gel nei preparati di entrambi i gemelli, benché la riduzione della superficie del preparato confrontata con la contrazione rilevata nelle condizioni di base è stata apprezzabile solo nel lattice contenente cellule del gemello meno grave.
- 2.4.8 – Tuttavia perfino in presenza di TGF Beta 1 aggiunto, la “ contrattilità “ dei fibroblasti del gemello meno grave è risultata meno marcata di quella espressa in condizioni di base (zero) dai fibroblasti del gemello più grave.

FIG. 4 – DIDASCALIE

I FIBROBLASTI DEL GEMELLO MENO GRAVE REAGISCONO AL TRATTAMENTO CON TGF-Beta 1-

- A) – Analisi con la tecnica Western Blot per la rilevazione di anticorpi p- Smad 2, p-p 38, p-ERK 1/2 in fibroblasti trattati e non trattati con TGF Beta 1 per u'ora e per tre ore. I dati sono riportati come valore densimetrico di tre saggi ed espressi come rapporto fra le proteine fosforilate e le proteine totali, normalizzate a GAPDH. (v. Glossario). Il gel rappresentato è l'unico nel quale l'anticorpo p –Smad 2 era rilevabile a malapena nelle cellule del gemello meno grave alle condizioni di base (zero).*
- B) – Saggio di “ contrattilità “ in gel di collagene alla presenza o in assenza di TGF Beta 1. Le immagini sono state fissate dopo 48 ore dal trattamento effettuato con una dose di 0,25 ng / ml di TGF Beta 1 , La percentuale di contrazione riferita alla superficie di partenza del gel è riportata nel diagramma a destra.*

2.5 – UNA SOVRA – ESPRESSIONE DI DECORINE (DCN) MITIGA LE MANIFESTAZIONI PRO . INFIAMMAZIONE E PRO – FIBROSI DEI FIBROBLASTI DEL GEMELLO PIU' GRAVE

- 2.5.1 – La Decorina (DCN – v. Glossario) , una delle molecole che nel gemello più lieve è stata trovata sovra – regolata (v. Glossario alla voce CELL REGULATION – N.d.T.) tracciando un profilo dei geni, manifesta marcate proprietà antifibrotiche.: Ed è per questo che si è deciso di approfondire se la DCN possa mitigare le manifestazioni pro- fibrotiche nei fibroblasti del gemello più grave.

- 2.5.2 – La DCN rilasciata si accumula nella “matrice extracellulare “ dove intrappola il fattore di crescita TGF Beta impedendogli così la sua attività biologica. A questo punto si è passati ad esaminare a mezzo di “ immunofluorescenza “ come si esprimesse la Decorina nella pelle di entrambi i gemelli.
- 2.5.3 – Un reale incremento nella espressione della proteina analizzata è stato denunciato da una colorazione tipica diffusa nella pelle del gemello meno grave se confrontata con sezioni di pelle del gemello più grave. (Fig. 5 A e B).
- 2.5.4 – Si è anche approfondita la valutazione della espressione di DCN con il metodo analitico “Western Blot “ (v. Glossario) condotto su proteine liberate dalla matrice extracellulare rilasciate da culture di fibroblasti di entrambi i fratelli
- 2.5.5 – Un quantitativo più alto di DCN è stato rilevato negli estratti di ECM del gemello più lieve (Fig. 5 C) e questo ha suggerito che il comportamento meno “ contrattile “ e “ pro infiammatorio “ di queste cellule possa essere attribuito alla attività inibitoria della DCN sul TGF Beta (Vedi paragr. 2.5.2).

FIG 5 – DIDASCALIE

LA ESPRESSIONE DI DECORINA RILASCIATA NELLA MATRICE EXTRACELLULARE DEI FIBROBLASTI DEI DUE GEMELLI MONOZIGOTI

- A) – Colorazione della DCN nelle due sezioni di pelle (verde). I nuclei sono colorati in blu (e = epidermide / d = derma). S gemello più grave . – M gemello meno grave*
- B) – Rappresentazione tridimensionale della intensità della fluorescenza nelle sezioni di pelle. I valori sono espressi analizzando 10 campi selezionati casualmente.*
- C) – Livelli delle proteine DCN rilevati su prelievi di matrice extracellulare dei fibroblasti. Una eguale quantità di proteine estratte è stata caricata nei due campioni.*
- 2.5.6 – Per avere conferma che un incremento nella espressione della proteina DCN possa contrastare le manifestazioni “ contrattili “ dei fibroblasti del gemello maggiormente colpito dalla RDEB il nucleo ricombinato della proteina è stato inserito in miscele di collagene contenente i fibroblasti prima che la miscela gelificasse.
- 2.5.7 – In presenza della DCN il lattice si contraeva sensibilmente meno a confronto con quello privo di aggiunta, entrambe le culture osservate alle condizioni di base (al 100 % circa rimaneva l’area iniziale nella cultura trattata con DCN mentre il 40 % diventava quella priva di DCN) e poi di nuovo osservate a seguito di trattamento con TGF Beta (contrazione dell’area 55 % contro 30 %).
- 2.5.8 – E quindi in assenza di stimoli provenienti dal fattore di crescita TGF Beta la proteina DCN si è mostrata in grado di prevenire quasi del tutto l’attività contrattile dei fibroblasti.
- 2.5.9 – Per testare ulteriormente la capacità anti – fibrotica della DCN nella malattia sotto studio, i fibroblasti contrattili del gemello più colpito sono stati modificati con un vettore (e quindi “ inseriti “ in esso –N.d.T.) contenente la catena completa DCN c DNA. Le cellule così modificate che sovra esprimevano la DCN venivano sottoposte alla prova di contrattilità nel gel ed alla capacità di esprimere Smad 2 (v. Glossario) (Fig. 6 B e C)
- 2.5.10 – Il gel di collagene trattato con le cellule modificate sopra descritte è risultato contrarsi molto meno del gel preparato con cellule modificate con vettore privo di pc DNA 3 (85% contro il 49 %) (Fig. 6 B). Ma in più la sovra espressione di DCN ottenuta con la modifica tramite un plasmide (vettore) portava anche alla inibizione della contrazione del lattice corretto con 0,25 ng/ml di TGF Beta (41 % contro 17,5 %).
- 2.5.11 – Un esame condotto con metodo Western Blot su proteine liberate del lattice ma arricchite con fibroblasti con DCN aggiunto ha portato a rilevare un consistente incremento dei livelli di proteine p-Smad 2 (Fig. 6 C), indicando così che la inibizione della attività del TGF Beta portava a prevenire la contrazione cellulare.

2.5.12 – Entrambe le risultanze prese insieme indicano che la espressione di Decorina DCN, sia che sia liberata come proteina esogena o manifestata da modifica tramite vettore è in grado di mitigare il potenziale pro – fibrotico dei fibroblasti prelevati dalla pelle del gemello più malato.

FIG 6 – DIDASCALIE

LA PROTEINA DCN HA LA CAPACITA' DI MITIGARE IL COMPORTAMENTO PRO – FIBROTICO DEI FIBROBLASTI APPARTENENTI AL GEMELLO PIU' GRAVE

- A)- *Saggio sulla contrazione del gel di collagene condotta su fibroblasti del gemello più grave immersi alla concentrazione di 20.000 cellule per millilitro in una soluzione contenente o non contenente 200 mM di proteina DCN umana, trattata e non trattata con aggiunta di 0,25 ng / ml di TGF Beta 1. Le immagini sono state fissate 48 ore dopo l'aggiunta del TGF Beta 1 . Nell'istogramma è riportata la percentuale di contrazione nel gel rispetto alla superficie iniziale, nelle varie condizioni sperimentali appena descritte.*
- B)- *Saggio sul gel di collagene per testare la capacità di contrazione dei fibroblasti prelevati dal gemello più grave inseriti con un “ vettore “ contenente il nucleo della proteina DCN ovvero con un vettore privo.. L'istogramma si esprime in percentuale di contrazione nelle diverse condizioni di sperimentazione.*
- C)- *Espressione della proteina Smad 2 “ fosforilata “ nella totalità dei lisati ottenuta dai gel contenenti fibroblasti del gemello più grave inseriti con il “ vettore “ contenente DCN umana ovvero privo della stessa. I dati sono espressi come rapporto fra la quantità totale di proteina e la quantità “ fosforilata “.*

3.- DISCUSSIONE

- 3.1 – Il migliore rivelatore di Epidermolisi Bollosa Distrofica Recessiva è il livello di C 7 nella pelle. (C 7 : complesso di proteine di attacco alla membrana . N.d. T.). Questo è determinato da una particolare combinazione di mutazioni del collagene COL 7 A 1 , che colpiscono il genoma dei pazienti.
- 3.2 – Tuttavia molte osservazioni hanno portato ad asserire che non ci sono correlazioni scontate ed assolute fra il fenomeno nel genoma e le manifestazioni tipiche. Per esempio i fratelli possono presentare manifestazioni cliniche molto differenti fra loro. Essi condividono lo stesso genoma per il COL 7 A 1 ma la loro pelle può contenere quantità diverse di C 7 .
- 3.3 – Agenti modificatori a livello genetico ed epigenetico sono ritenuti svolgere un loro ruolo. Cionondimeno le conoscenze in materia sono abbastanza limitate. In aggiunta ci sono recenti evidenze che il livello di C 7 non è l'unico fattore che determini la malattia.
- 3.4 – Per prima cosa un “ profilo “ del proteoma (v. Glossario) di fibroblasti prelevati da soggetti sani e da pazienti affetti da RDEB ha portato a rilevare che la insufficienza di C 7 ha un impatto sulla espressione di un elevato numero di proteine necessarie al mantenimento di membrane del basamento cutaneo e delle matrici extracellulari (che danno luogo a tessuti connettivi – v. Glossario alla voce ECM – N.d.T.)
- 3.5 – Secondariamente la guarigione delle ferite di pazienti affetti da forme acute di RDEB può procedere anche in assenza di rigenerazione del C 7 , come è stato osservato in un test clinico con il ricorso a fibroblasti allogenici o iniezioni del solo vettore e dopo una terapia consistente nel trapianto di midollo osseo allogenico.
- 3.6 – Gli esempi sopra illustrati richiamano l'attenzione sui meccanismi aggiuntivi non ancora chiari e non basati sul C 7 che tuttavia stimolano la capacità di rigenerazione della pelle danneggiata e comunque pertinenti con gli studi discordanti condotti sui nostri due gemelli.

3.7 – Indubbiamente il gemello affetto dalla forma più grave presenta ulcerazioni ed infiammazioni marcate anche se la quantità di C 7 nella pelle e nelle cellule della pelle è analoga o addirittura leggermente maggiore che nel fratello !. Il che ci porterebbe a concludere che abbiamo la migliore dimostrazione che l'aumentare del C 7 nella pelle NON è l'unico " indicatore " della gravità della malattia.

- 3.8 – I gemelli monozigoti dovrebbero condividere il 100 % del loro " polimorfismo " genetico. Tuttavia è evidente che mutazioni su singoli nucleoidi e variazioni nelle duplicazioni possono aver luogo dopo il concepimento monozigotico, spiegando le conseguenze genetiche sulle manifestazioni della malattia. Le chiazature del corpo di almeno uno dei due gemelli possono essere una spiegazione possibile per le differenze nella manifestazione della malattia.
- 3.9 – Tuttavia non sono state rilevate né differenze significative nella espressione della proteina C 7 sia nella pelle sana che nelle cellule dei due gemelli, né tantomeno sono state rilevate mutazioni nel genoma di queste cellule dopo aver rielaborato la sequenza del COL 7 A 1.
- 3.10 – Le diverse modificazioni " epigenetiche " che possono influenzare la espressione e la trascrizione delle proteine senza alterare la sequenza del DNA possono essere responsabili delle discordanze della malattia (fra i due gemelli ? N.d.T.).
- 3.11 – E' intrigante pensare che , poiché le manifestazioni esteriori della malattia si sono differenziate durante l'adolescenza, le modificazioni "ambientali " abbiano mirato all'epigenoma (attività del DNA nell'esprimere geni diversi nelle diverse cellule N.d.T.) delle cellule, ad esempio alterando il processo di aggiunta di gruppi metilici e/o lo stato delle cromatine .
- 3.12 – Questi cambiamenti sono ereditati stabilmente tramite proliferazioni successive di cellule e possono anche influenzare il comportamento delle cellule stesse. E' indubbio che i due gemelli monozigoti abbiano accresciuto nel tempo differenze nella " metilazione " del DNA (v. paragrafo precedente) e nella modificazione degli istoni (proteine alcaline con diverse funzioni N.d.T.) nel tempo ed all'interno di differenti tipi di tessuto organico.
- 3.13 – Qualunque possa essere il meccanismo coinvolto, i gemelli monozigoti hanno meno variabili di altri fratelli. E' stato scelto di confrontare la espressione di geni nei fibroblasti primari dell'organismo umano perché proprio queste cellule sono determinanti nella patologia della RDEB.
- 3.14 - Indubbiamente le alterazioni delle omeostasi (cioè della capacità di un organismo e/o delle cellule di mantenere il proprio status a dispetto di eventuali cambiamenti " ambientali ") dei tessuti, giocano un ruolo importante nell'influenzare la intensità della RDEB, con particolare riguardo alla aggressività del Carcinoma a Cellule Squamose (SCC).
- 3.15 – Il particolare le incessanti guarigioni e cicatrizzazioni, che sono le maggiori manifestazioni in pazienti affetti da RDEB sono fortemente dipendenti dal comportamento dei fibroblasti. Poiché i gemelli monozigoti del presente studio manifestano differenze di comportamento nell'alternarsi di guarigioni e di infiammazioni persistenti, è lecito immaginare che il comportamento dei fibroblasti giochi un ruolo centrale nel " modulare " la gravità della malattia.
- 3.16 – Ci sono buone ragioni per rilevare che le alterazioni nelle interazioni del TGF Beta contribuiscano in maniera significativa alle differenze nelle manifestazioni della malattia rilevate nei due gemelli.. Questo " percorso metabolico " appare essere pesantemente presente nella patogenesi della RDEB: a) come già detto, è stato osservato un incremento nella secrezione di TGF Beta in fibroblasti prelevati da pazienti con RDEB / C 7 negativa confrontato con fibroblasti di soggetti sani. b) il TGF Beta favorisce la cicatrizzazione delle ferite e tuttavia una eccessiva attività del TGF Beta 1 è deleteria per la guarigione perché porta ad una anomala deposizione di " matrice extracellulare " ed ad una anormale formazione di cicatrici. c) un collagene murino COL 7 A 1 " ipomorfo " con bassi livelli di C 7 sviluppa manifestazioni tipiche della RDEB nella sua forma grave , caratterizzate da precoce formazione di vesciche sulla pelle e sulle mucose, distrofia delle unghie e deformità

dovute a “ fusione “ della pelle stessa, da associare ad una crescente reazione infiammatoria, all’accumulo di TGF Beta, all’aumentato numero di fibroblasti ed ad un rimodellamento della matrice del derma.

- 3.17 – E’ rilevante notare che queste cavie hanno manifestato un incremento nella attività del TGF Beta 1 sulle ferite ed un ritardo nella cicatrizzazione della pelle. In base a queste conseguenze si è immaginato che una inibizione dello sviluppo metabolico del TGF Beta possa prevenire complicazioni nelle cavie e quindi diventare una tecnica di intervento per la stessa malattia nell’uomo.
- 3.18 – Poiché si sono trovate attivazioni differenti della interazione del TGF Beta nei fibroblasti dei due gemelli ci si è chiesti se i fibroblasti prelevati dal gemello meno grave fossero reattivi agli stimoli prodotti dal TGF Beta.
- 3.19 – La capacità di questi fibroblasti (del gemello meno grave) di contrarre il gel trattato con TGF Beta 1 indica che queste cellule sono reattive al TGF Beta . Sorprendentemente il trattamento con TGF Beta 1 ha esercitato un effetto inibitorio sulla “ fosforilazione “ sia del p – 38 (MAPK Mitogen Activated Protein Kinases) che della ERK (Extracellular Signal Regulated Kinases) nel gemello più grave (v, anche paragrafo 2.4.5)
- 3.20 – Poiché il percorso metabolico (la trasmissione di segnali) è comune a diversi “ reattori agli stimoli “, una plausibile spiegazione alle evidenze sopra elencate è che diversi fattori agiscono simultaneamente attraverso lo stesso percorso di segnalazione e che l’induzione di stimoli con l’aggiunta di TGF Beta dall’esterno “sovraccarichi “ il sistema determinando un effetto inibitore (!). La evidenza che la interleuchina IL 6 e la proteina MCP – 1 (Monocyte Chemopractant Protein 1) sono sovra regolate nel gemello più grave è in linea con la esaltazione della azione del fattore TGF Beta (sempre nei fibroblasti del gemello più grave).
- 3.21 – Indubbiamente IL – 6 e MCP – 1 sono esaltate a seguito della azione di stimolo del TGF Beta esercitata su diversi tipi di cellule inclusi i fibroblasti e promuovono il reclutamento di monociti e l’infiammazione del tessuto connettivo.
- 3.22 – Si è anche pensato che possa esistere un circuito chiuso di “ auto – stimolazione “ (una sorta di circolo vizioso N.d.T.) per il quale la sovra – espressione di IL 6 ed MCP 1 mediata dal fattore TGF Beta contribuisca alla differenziazione dei fibroblasti in “ mio – fibroblasti ” i quali a loro volta amplificano gli effetti pro – infiammatori e pro – fibrotici del TGF Beta.
- 3.23 – Fra i geni trovati essere sovra regolati nel gemello affetto dalla forma più lieve c’è la Interleuchina IL 7, che agisce “ spingendo “ l’Smad 7 , uno Smad inibitore, che interferisce con la interazione fra TGF Beta e gli Smad (Small Mother Against Decapentaplegic – complessi proteici – possono penetrare nel nucleo e fungere da “ fattori di trascrizione “ - N- d.T.).
- 3.24 – E’ stato provato che questa citochina ha proprietà antifibrotiche ed è stata testata come potenziale agente terapeutico verso la fibrosi polmonare (formazione di tessuto “cicatrizziale” nel polmone – N.d.T.), e come tale la IL 7 potrebbe essere presa in considerazione come possibile modificatore di geni nel due gemelli.
- 3.25 – Uno dei geni più fortemente sovra regolati nel gemello con forma più lieve è la proteina DCN. Degno di nota il fatto che la DCN era sovra espressa anche dal vivo nella pelle del gemello citato e rilasciata a livelli più alti, per accumularsi nella matrice extracellulare su campioni in vitro. La DCN inibisce l’attività del TGF Beta “ imprigionandolo “, e quindi impedendo l’interazione con i “ recettori “ del TGF Beta stesso.
- 3.26 – Se la attività del TGF Beta esercita un ruolo nella patologia e nelle manifestazioni cliniche dei pazienti affetti da RDEB, la DCN va vista come un gene modificatore capace di attenuare gli effetti dell’azione del TGF Beta.
- 3.27 – Il rilascio della proteina TGF Beta 1 era incrementato di due livelli nei fibroblasti del gemello più grave. Dal momento che si è dimostrato che il TGF Beta inibisce la sintesi della DCN nel fibroblasti del derma, si è portati a pensare che questo “ circolo vizioso “ possa contribuire a peggiorare la malattia del gemello più grave.

- 3.28 – Nelle nostre sperimentazioni la DCN sia somministrata dall'esterno ovvero sovra espressa a seguito di inserimento di cDNA, è stata capace di mitigare le manifestazioni fibrotiche dei fibroblasti del gemello più grave. Secondo quanto appena detto la DCN si presenta come un candidato potenziale atto a prevenire o almeno mitigare le complicazioni della malattia in pazienti affetti da RDEB .
- 3.29 – A questo riguardo le proprietà terapeutiche della DCN sono state sottoposte a prova in studi pre – clinici usando campioni animali per altre patologie connesse anche con gli eccessi di cicatrizzazioni, come l'infarto del miocardio, la glomerulo nefrite, l'arteriosclerosi e la fibrosi della cornea.
- 3.30 – Infine sarebbe interessante poter analizzare un campionario di pelli donate da pazienti affetti da RDEB , per vedere se possa esistere una correlazione seria fra i livelli di espressione della DCN e la gravità della malattia.
- 3.31 – Tuttavia ciò comporterebbe di poter disporre di una raccolta di campioni “ omogenei “, dato che l'età dei pazienti, le abitudini e le zone del corpo da cui dovessero essere prelevati i campioni sono tutti fattori che possono influenzare la espressione della DCN da analizzare.
- 3.32 – In conclusione le alterazioni del comportamento del fattore TGF Beta osservate nei due gemelli monozigoti rivelano un percorso metabolico pertinente con la variabilità delle manifestazioni cliniche della malattia in studio. E si può aggiungere che i risultati del presente studio rivelano un ruolo precedentemente non riconosciuto della DCN come molecola con capacità anti fibrotiche ed anti infiammatorie nelle Epidermolisi Bollosa Distrofica Recessiva.

4 . MATERIALI E METODI

4.1 – SUI PAZIENTI E SUL CODICE ETICO

- 4.1.1 – Il presente studio si è rivolto ad una coppia di gemelli monozigoti, di nazionalità italiana, affetti da Epidermolisi Bollosa Distrofica Recessiva, diagnosticata in precedenza con criteri “ clinici “ creando una mappatura di antigeni (con la tecnica della immunofluorescenza) ed uno screening delle mutazioni del collagene COL 7 A 1.
- 4.1.2 – Sono stati prelevati ai pazienti dei campioni di sangue trattati con acido etilendiamminicotetracetico e dei campioni di pelle da zone del corpo non coinvolte, nella stessa ubicazione degli avambracci. Parte dei prelievi biotipici è stata sottoposta ad analisi di immunofluorescenza, e parte a culture cellulari.
- 4.1.3 – Dai due pazienti si è ottenuto un consenso scritto su informativa. I protocolli adottati rispettano gli standard etici della Commissione per le Sperimentazioni sull'Uomo degli Istituti IDI ed IRCSS, nonché i principi della Dichiarazione (Convenzione ?) di Helsinki .

4.2 – ANALISI GENETICHE

- 4.2.1 – Adottando un kit di analisi commerciale (Quiage, Hildn, Germany) si è estratto il DNA dal sangue e dalle culture di cellule della pelle (fibroblasti e cheratinociti) dal quale è stata ricavata l'intera codificazione del COL 7 A 1. Con il DNA dal sangue ed un kit di analisi Amp FLSTR (dall'Inghilterra – v. testo originale N.d.T.) è stata perfezionata la verifica della “ zigosità “ dei due gemelli.
- 4.2.2 – La analisi con elettroforesi (per dettagli tecnici v. testo originale N.d.T.) è stata condotta con un “ analizzatore genetico “(OMISSIS). Le dimensioni degli alleli rilevate con un software della Applied Biosystem. Il genotipo relativo al “ Polimorfismo a Singolo Nucleotide “ (SNP) identificato dal codice rs 1799750 all'interno della proteina MMP 1 (v. Glossario) è stato controllato (OMISSIS) (v. testo originale N.d.T.). Un frammento del gene TGF Beta 1...

(OMISSIS) è stato amplificato con agenti....dal DNA purificato dai fibroblasti.

4.3 – CULTURE CELLULARI

- 4.3.1 – Da biopsie effettuate su pelle sana dalla stessa parte del corpo dei due gemelli sono state organizzate culture di fibroblasti primari e di cheratinociti. I fibroblasti sono stati cresciuti in un supporto (Dulbecco e Ham...) con aggiunta di siero da feto bovino al 10 %, penicillina e streptomina al 50 microgr/ml, glutammina ed acido ascorbico.
- 4.3.2 – Le cellule poi sottoposte come di routine a “ sottoculture “ ed usate per sperimentazioni. I cheratinociti venivano coltivati su uno strato nutriente di fibroblasti da cavia, come già precedentemente accennato.

4.4 – STUDI CON IMMUNOFLUORESCENZA

- 4.4.1 – Una parte dei prelievi bioptici veniva congelata in OCT. Per rilevare le proteine delle giunzioni fra derma ed epidermide, delle sezioni di pelle venivano seccate con aria mentre per la rilevazione della DCN altre sezioni di pelle erano immerse in etanolo poi ghiacciato...

...(segue lungo elenco di metodi e mezzi adottati per i quali si rimanda al testo originale in lingua inglese).
Si sono potuti registrare con una telecamera digitale almeno sette campi scelti casualmente e procedere al conteggio delle cellule “ fluorescenti “.

4.5 – ANALISI CON “ MICROARRAY “

- 4.5.1 – E’ stato estratto il RNA totale per mezzo di Trizol (della Life Technologies – Olanda) da culture di fibroblasti primari dei due gemelli al sesto passaggio.... (OMISSIS)
- 4.5.2 – Sono state rilevate le differenze nella espressione dei geni usando il “ limma package” ...(OMISSIS) e quindi isolati i geni con espressioni differenti nei due pazienti ed accantonati per ulteriori analisi.... (OMISSIS).
- 4.5.3 – I dati grezzi e normalizzati sono stati raccolti in un archivio informatico NGBI – GEO con il codice di accesso GSE 51056.

4.6 – REAZIONE A CATENA DELLA POLIMERASI

(Metodo che simultaneamente AMPLIFICA e QUANTIFICA il DNA, “ in tempo reale “)

- 4.6.1 – E’ stato testato il RNA da campioni usati per le analisi di cui al precedente capitolo e da campioni ottenuti aggiungendo dosi di fibroblasti coltivati.
(OMISSIS)
- 4.6.2 – Gli esperimenti descritti sono stati ripetuti per TRE volte ed hanno fornito risultati analoghi (fra loro).

4.7 – ELISA

- 4.7.1 – Da culture di fibroblasti primari dei due gemelli rispettando il protocollo del produttore dei kit ELISA utilizzati (R & D Systems) si sono ricavati i livelli di TGF Beta 1, IL – 7 e MMP 3. E’ stato anche utilizzato un lettore a raggi ultravioletti della Biorad Laboratories – USA. I campioni sono stati analizzati TRE volte per ogni paziente.

4.8 – ANALISI CON METODO “ WESTERN BLOT “ (v. Glossario)

- 4.8.1 – Per analizzare la espressione di C 7 in cellule della pelle sottoposte a culture e prelevate sia dai gemelli che da soggetti sani, sono stati posti su ghiaccio estratti di cheratinociti primari con un buffer RIPA ... (OMISSIS).
- 4.8.2 – Un “ supporto “ concentrato si è ottenuto da un egual numero di fibroblasti primari prelevati dai gemelli e da soggetti sani, fatti crescere in 50 microgrammi /ml di acido ascorbico.
(OMISSIS)
- 4.8.3 – I fibroblasti primari, privati del siero per 24 ore, sono stati sia trattati che non trattati con TGF Beta 1 (R & D Systems) a differenti concentrazioni comprese fra 0,25 e 2 mng/ml.
(OMISSIS)
- 4.8.4 – Per rilevare il collagene 1 rilasciato, è stato raccolto un “ supporto “ da cultura di fibroblasti primari privato del siero per 24 ore ed un volume prefissato e standardizzato per numero di cellule è stato caricato su un “ SDS – PAGE ”, trasferito su nitrocellulosa ed incubato in un reagente per un’ora...
- 4.8.5 – Per rilevare la DCN rilasciata, un “ supporto “ da cultura di fibroblasti primari privati del siero per 24 ore è stato sottoposto a dialisi con...
(OMISSIS)
- 4.8.6 – La rilevazione della DCN associata alla matrice extracellulare è stata effettuata come descritto. Brevemente, singoli strati di fibroblasti sono stati incubati tutta la notte...per arrivare al conteggio dei fibroblasti distaccatisi.

4.9 – MATRICI DI CITOCHINE

- 4.9.1 – Lo studio dei diversi livelli di espressione delle citochine è stato affrontato su supporto di culture di fibroblasti primari (provenienti dai due gemelli) separati dal siero usando un kit della RAYBIOTECH – USA
(OMISSIS)
- Confrontando la intensità dei segnali è stato possibile calcolare i differenti livelli di espressione delle citochine dei due pazienti.

4.10 – LA ESPRESSIONE DELLA DCN – COSTRUZIONE DELLA MOLECOLA PLASMIDE DI DNA ED “ INFETTAZIONE “ (neologismo).

- 4.10.1- Per preparare la realizzazione della espressione di una catena completa della DCN, si è perfezionata una reazione a catena della polimerasi (PCR) in tempo reale di mRNA liberata da fibroblasti umani, usando un enzima....
(OMISSIS)
- 4.10.2 – La “ infettazione “ di fibroblasti a mezzo di pcDNA 3 – DCN è stata affrontata con un metodo della LONA di Colonia (Germania) ottimizzando i protocolli prescritti dal produttore con i seguenti interventi...
(OMISSIS)
- 4.10.3 – Dopo un “ riposo” di 48 ore le cellule” infettate “ sono state usate per preparare lattici come descritto nel successivo capitolo- . In parallelo una sovra espressione di DCN nelle cellule infettate è stata confermata con analisi Western Blot, usando gli anticorpi sopra citati.

4.11 – TEST DI CONTRAZIONE IN GEL DI COLLAGENE

- 4.11.1 – Una “ soluzione “ di collagene è stata elaborata miscelando un collagene tipo 1 solubile in acidi (da Symates Biomateriaux – Francia) , una concentrazione di 5 volte di “Dulbecco’s Modified Eagle Medium “ ed infine una soluzione tampone (composta da idrossido di

sodio, carbonato di sodio e 200 mm di “ acido 4-2 idrossietil – 1 – piperazinil – etansolfonico “, nel rapporto 7:2:1.

(seguono altri trattamenti ... OMISSIS)

4.11.2 – Dopo 12 ore di incubazione il gel veniva staccato da ogni supporto (“ pozzetto “) e lasciato flottare. La superficie dei vari campioni di gel veniva misurata in tre tempi diversi, al distacco, dopo 24 ore e dopo 48 ore, con l’ausilio di computer (metodo Aviovision-Zeiss).

(seguono ulteriori trattamenti OMISSIS)

Gli esperimenti sono stati eseguiti un minimo di due volte.

4.12 – ANALISI STATISTICHE

4.12.1 – Tutti i valori numerici sono stati espressi con le oscillazioni standard (in + o in -) tranne dove differentemente specificato. Gli esperimenti pratici sono stati eseguiti su tre campionature e ripetuti almeno due volte.

4.12.2 – Le valutazioni statistiche sono state effettuate usando un t – test “ unpaired “ (cioè su due gruppi indipendenti – ad es. diabetici e non diabetici). I valori medi sono stati considerati significativamente differenti quando la probabilità delle differenze della grandezza in esame scende sotto il 5 % .

MATERIALE ULTERIORE

E’ disponibile on – line sul sito della rivista “ Human Molecular Genetics “ (Oxford Journals)

SPONSORS

Questo lavoro è stato sostenuto da Debra International, finanziato da Debra UK e dal Ministero della Salute.

BIBLIOGRAFIA

Si rimanda al testo originale in lingua inglese.

ROMA 16 GENNAIO 2017

GLOSSARIO

- **ACTIN** Famiglia di proteine che formano “ filamenti “.
- **ALLELE** Due o più forme alternative dello stesso gene , che occupano la stessa posizione in ciascun cromosoma omologo. Spesso l’effetto di un allele è prevalente ai fini della espressione del carattere (ed è “ dominante “) rispetto all’altro (detto : “ recessivo “).
- **ALFA – SMA** Alfa Smooth Muscle Actin : proteina tra i maggiori costituenti dell’apparato contrattile.
- **BATCHES** Lotto, Gruppo di..., Partita
- **BMZ** Strato basale della pelle in zona “ membrana “.
- **CELL REGULATION** (da : National Cancer Institute) Ogni processo che controlla la serie di eventi per mezzo dei quali una cellula inizia il suo ciclo vitale. Durante lo sviluppo di una cellula la cellula stessa effettua una copia del proprio DNA ed altri elementi e si divide in due. Quando tale percorso non si svolge in maniera corretta, la cellula può dividersi in maniera incontrollata (questo può dar luogo ad esempio all’insorgere di un tumore).
- **CHEMOATTRACTANT** Letteralmente “ chemio tattico “ . Dicesi ad es. di proteina che genera uno stimolo chimico il quale può produrre una reazione positiva o negativa.
- **CODONE** Unità di informazione del codice genetico.
- **CODONE DI TERMINAZIONE** Segnala la terminazione della sintesi proteica.
- **COLLAGENE** E’ la principale proteina del tessuto connettivo negli animali. Nell’uomo rappresenta circa il 6% del peso corporeo. La biosintesi del collagene avviene ad opera di diversi tipi cellulari a seconda del tessuto (ad esempio per il tessuto connettivo se ne occupano i “ fibroblasti “ (v. più avanti), per le ossa gli “ osteoblasti “ . Esistono moltissimi tipi di collagene classificati con numeri romani. Il COL VII è coinvolto nella patologia denominata Epidermolisi Bollosa.
- **DECORIN** Proteina componente del tessuto connettivo gioca un ruolo molto importante nella “ strutturazione “ della matrice della pelle. Può esaltare o inibire l’attività del fattore di crescita TGF Beta 1 . Fa parte della famiglia di proteine denominate PROTEOGLICANI.
- **DONOR** Donatore
- **ECM** Matrice extra – cellulare . Dà luogo a “ tessuto connettivo “ a supporto delle cellule, del loro ancoraggio, e di divisione fra i diversi tessuti.
- **ELISA** Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay . Metodo di analisi immunologica . Ha lo scopo di ricercare specifici anticorpi in un dato “ liquido “ biologico, avendo a disposizione ANTIGENI a cui questi possano legarsi, o viceversa. In caso di esito positivo per conferma si esegue il Western Blot (v. più avanti).
- **ESONE** (EXpressed regiON). Gli esoni costituiscono insieme agli INTRONI la porzione di un gene . Una sequenza di Esoni è “ codificante “ per una proteina, ma può esserlo anche una sequenza esoni – introni.
- **FENOTIPO** L’insieme della morfologia, sviluppo e comportamento di un individuo (e quindi anche delle interazioni fra geni ed ambiente esterno.
- **FIBROBLASTI** Cellule tipiche del tessuto connettivo che producono collagene, fibre elastiche e glicoproteine. Hanno il compito preciso di sintetizzare il collagene e la elastina, sostanze proteiche necessarie a mantenere elastica e “ compatta “ la pelle.
- **GAPDH** Acronimo che sta per Glicer Aldeide – 3 – FosfatoDeidrogenasi . Enzima appartenente alla classe delle “ Ossidoriduttasi “.
- **GEMELLI MONOZIGOTI** Un solo ovulo viene fecondato, ed entro dieci giorni si divide in due embrioni. Sono praticamente uguali, hanno lo stesso patrimonio genetico

di partenza e lo stesso sesso. Si è scoperto che in età adulta possono presentare un patrimonio genetico differente. Gli scienziati ritengono che queste variazioni siano maturate nel corso della vita in seguito a divisioni cellulari sopraggiunte. (scoperta importantissima per la ricerca !).

- **GENEARRAY HYBRIDIZATION** E' una tecnica di analisi . Un microarray di DNA (anche noto come " matrici ad alta densità ") è un insieme di microscopiche sonde di DNA attaccate ad una superficie solida come il vetro, o chip di silicio formanti un array (matrice)
- **GRAFTS** Innesti (ad es. di pelle)
- **HARVESTED** Raccolto, prelevato, prodotto da...
- **HEALING** Guarigione
- **IL 7** Interleuchina. Proteina secreta da cellule del sistema immunitario. Può anche essere classificata come " citochina ". A seconda dei compiti e delle funzioni che svolgono se ne contano fino a 35. Ad esempio la IL 31 è la citochina centrale per l'induzione ed il mantenimento del prurito !
- **INTEGRIN Beta 4** (ITG B 4) Gene che esercita le stesse funzioni delle laminine (v. più avanti)
- **LAMININ 332** Fa parte di una famiglia di proteine che regolano lo sviluppo delle cellule , la loro motilità e l'adesione l'una all'altra. In particolare la 332 è uno dei componenti più importanti delle fibre denominate " filamenti di ancoraggio".
- **LOCUS** "Sito " cromosomico di un gene .
- **MCP 1** Proteina chemio statica / chemio attrante dei monociti 1 .
- **MMP 1** Enzima / proteina anche conosciuta come collagene interstiziale e fibroblastico.
- **mRNA** " RNA messaggero ". Codifica e porta informazioni durante la trascrizione dal DNA ai siti della SINTESI PROTEICA. In altri termini trasmette le informazioni genetiche (mediante le lettere G, U, A e C che stanno per Guanina, Uracile, Adenina e Citosina.
- **MITTEN HAND** Mano che presenta perdita delle unghie, " fibrosi " della pelle e " fusione " delle dita.
- **NUCLEOIDE** Unità ripetitiva degli acidi nucleici (DNA e RNA).
- **PATHWAY** Percorso metabolico (di una cellula).
- **PROMOTER REGION** Una zona di DNA dove inizia la trascrizione di un particolare gene.
- **PROTEOMA** (Proteine / genoma) E' l'intero complesso di proteine che può esprimere un genoma.
- **qRT / PCR** (PCR quantitativa, in tempo reale) E' un metodo di analisi che simultaneamente " amplifica " la reazione a catena della polimerasi (PCR) ed amplifica il DNA (tra i vari metodi, accurato ed affidabile è l'utilizzo di sonde rivelatrici di fluorescenza).
- **RNA** Acido RIBONUCLEICO ; è assemblato come una catena di nucleoidi.
- **SCAR** Cicatrice.
- **SIGNALLING** Comunicazione, interazione fra cellule.
- **SMAD** (Small Mother Against Decapentaplegic) Classe di proteine che modulano l'attività del fattore di crescita TGF Beta 1 .
- **SNP** (Single Nucleoid Polymorphism) Variazione nella sequenza del DNA.
- **SPLICE** " montaggio " (Donor splice : sito donatore)
- **TETRANUCLEOIDE** Sequenza nota di quattro nucleoidi che all'interno di un genoma serve come riconoscimento del DNA.
- **TGF Beta** Fattore Beta di sviluppo della crescita (è una citochina) . Stimola i fibroblasti a produrre ad es. il collagene.

- **TRASCRIZIONE** Trasferimento dell'informazione genetica dal DNA al RNA. Se il DNA " codifica " una proteina, la trascrizione è l'inizio del processo che porta alla **SINTESI DI PEPTIDI** (proteine funzionali).
- **WESTERN BLOT** Tecnica di analisi per la rilevazione di proteine specifiche in campioni complessi, con il ricorso ad elettroforesi e successiva interazione con anticorpi specifici.
- **Wnt** Proteina che regola la proliferazione delle cellule.
- **WOUNDS** Ferite.
