



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche
Clinica Medica 3

SCUOLA DI DOTTORATO IN
SCIENZE MEDICHE CLINICHE E SPERIMENTALI

INDIRIZZO: METODOLOGIA CLINICA E SCIENZE ENDOCRINOLOGICHE
XXII CICLO

**CARATTERIZZAZIONE GENETICA E FUNZIONALE
DI FIBROBLASTI ISOLATI DA
PAZIENTI AFFETTI DA SINDROME DI ALSTRÖM**

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Antonio Tiengo

Coordinatore del dottorato: Ch.mo Prof. Giovanni Federspil

Supervisore: Ch.mo Prof. Roberto Vettor
Dott.ssa Gabriella Milan

Dottorando: Elisabetta Zulato

Indice

RIASSUNTO	1
SUMMARY	5
I. INTRODUZIONE	9
1. LA SINDROME DI ALSTRÖM	9
1.1. CLINICA	9
1.2. EPIDEMIOLOGIA	12
1.3. IL GENE <i>ALMS1</i>	13
1.3.1. Identificazione del gene <i>ALMS1</i>	15
1.3.2. Mutazioni del gene <i>ALMS1</i>	17
1.4. VARIABILITA' FENOTIPICA	18
1.5. DIAGNOSI	19
2. LA FIBROSI	21
2.1 IL FIBROBLASTO	21
II. SCOPO DELLA TESI	25
III. MATERIALI E METODI	27
1. SOGGETTI	27
2. ANALISI DI MUTAZIONI	29
2.1 PCR SU cDNA E SU cDNA	29
2.2 PCR DI SEQUENZA	29
3. COLTURE PRIMARIE DI FIBROBLASTI	30
3.1 COLTURE BIDIMENSIONALI	30
3.2 COLTURE TRIDIMENSIONALI IN HYAFF11™	30
4. ANALISI ISTOLOGICA E MORFOLOGICA	31

5. ANALISI DI ESPRESSIONE GENICA	32
5.1. ESTRAZIONE DI RNA TOTALE DA FIBROBLASTI	32
5.2. TRATTAMENTO CON DNAsi	32
5.3. DNA MICROARRAY	32
5.4. RT-REAL TIME PCR	36
6. SAGGI FUNZIONALI	38
6.1. SAGGIO DI INCORPORAZIONE DI ³ [H]-PROLINA	38
6.2. SAGGIO DI PROLIFERAZIONE	39
6.3. SAGGIO DI VITALITA' CELLULARE	40
6.4. ANALISI DEL CICLO CELLULARE	40
6.5. SAGGIO TUNEL	41
7. STATISTICA	41
IV. RISULTATI	43
1. IL TEST GENETICO	43
2. STUDI DI ESPRESSIONE GENICA E FUNZIONALI IN FIBROBLASTI ALMS	47
2.1 ANALISI MORFOLOGICA E ULTRASTRUTTURALE DI FIBROBLASTI ALMS	47
2.2 ANALISI DEL PROFILO D'ESPRESSIONE GENICA MEDIANTE DNA MICROARRAYS	50
2.3 ESPRESSIONE E PRODUZIONE DI PROTEINE DELLA MATRICE EXTRACELLULARE	56
2.4 VALUTAZIONE DELLA DURATA DEL CICLO CELLULARE	58
2.5 VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE DI COL1A1 E DELLA PROLIFERAZIONE CELLULARE IN RISPOSTA A FATTORI PROFIBROTICI	59
2.6 VALUTAZIONE DELLA RISPOSTA A STIMOLI APOPTOTICI	61

V. DISCUSSIONE	65
VI. BIBLIOGRAFIA	79
<i>APPENDICE 1</i> FIGURE SUPPLEMENTARI E TABELLE	85
<i>APPENDICE 2</i> KEGG PATHWAYS	97
<i>APPENDICE 3</i> ABBREVIAZIONI	99

Riassunto

**CARATTERIZZAZIONE GENETICA E FUNZIONALE
DI FIBROBLASTI ISOLATI DA
PAZIENTI AFFETTI DA SINDROME DI ALSTRÖM**

La Sindrome di Alström (ALMS) è una malattia genetica autosomica recessiva estremamente rara (circa 560 casi descritti nel mondo) causata da mutazioni del gene *ALMS1*, e caratterizzata da diversi quadri sintomatologici che coinvolgono molteplici sedi anatomiche.

Nel nostro laboratorio è possibile effettuare un test genetico per la ricerca di mutazioni nel gene *ALMS1*, basato sul sequenziamento diretto del gene in soggetti che presentano un elevato sospetto clinico di ALMS. Dato il ruolo ancora dibattuto dell'analisi genetica in pazienti ALMS o in familiari, abbiamo cercato di valutare l'impatto e l'utilità di questo servizio, evidenziando come l'associazione di un'accurata anamnesi clinica e del test genetico reso disponibile consenta la formulazione di una diagnosi conclusiva in circa l'80% dei casi sospetti.

In diversi reperti autoptici di tessuti di pazienti ALMS è stata descritta una estesa fibrosi interstiziale, che si ritiene poter essere responsabile delle progressive alterazioni funzionali che si osservano in modo particolare a livello cardiaco, epatico e renale, e che influenzano severamente la prognosi e la sopravvivenza dei pazienti.

I meccanismi patogenetici alla base dello sviluppo della fibrosi in ALMS non sono ancora stati analizzati in dettaglio, e non è chiaro se rappresentino un effetto diretto della mutazione, o una risposta secondaria a un danno cellulare dovuto alla perdita di funzione del gene *ALMS1*.

Il lavoro descritto in questa tesi analizza il ruolo di mutazioni del gene *ALMS1* nello sviluppo della fibrosi utilizzando colture primarie di fibroblasti di 4 pazienti ALMS, ottenute da una biopsia cutanea in una zona che non mostrava segni di fibrosi.

La caratterizzazione morfologica di colture bidimensionali ha evidenziato nei fibroblasti ALMS una forma allungata e la presenza di estroflessioni citoplasmatiche, che non si osservano nei fibroblasti di controllo. I fibroblasti ALMS, coltivati su supporti tridimensionali di acido ialuronico, che mimano condizioni dinamiche di stress fisiologico, stimolando la deposizione di matrice extracellulare (ECM), mostrano una ridotta motilità e una incapacità di migrazione all'interno della matrice di supporto stessa. Questo potrebbe indicare possibili alterazioni delle strutture citoscheletriche, come anche suggerito dalla particolare disposizione delle fibre del citoscheletro, parallela alla polarità del nucleo, evidenziata nei fibroblasti ALMS mediante microscopia elettronica.

L'analisi del profilo d'espressione genica, mediante la tecnica dei microarrays, ha permesso di evidenziare nei fibroblasti ALMS la modulazione di numerosi geni che codificano per proteine che svolgono funzioni a livello della proliferazione, regolazione del ciclo cellulare e di fenomeni apoptotici. Sono inoltre risultati modulati geni per proteine della ECM, strutture implicate nella replicazione cellulare, microtubuli e filamenti intermedi.

In accordo con i dati di array, abbiamo confermato mediante qPCR l'aumento dell'espressione nei fibroblasti ALMS di componenti della ECM (*POSTN* e collagene), che correla con una maggiore produzione di proteine collagene, quantificata attraverso l'analisi dell'incorporazione di ³[H]-prolina. I fibroblasti ALMS presentano inoltre un ciclo cellulare più lungo in diverse condizioni di

coltura, una aumentata responsività a fattori pro-fibrotici e una maggiore resistenza alla morte cellulare indotta dal trattamento con diversi stimoli apoptotici.

I risultati presentati in questa tesi descrivono alcuni aspetti del fenotipo dei fibroblasti ALMS che possono essere utili nella comprensione della fisiopatologia della Sindrome, con particolare riguardo alla fibrosi. Possiamo ipotizzare che la presenza di mutazioni a livello del gene *ALMS1* determini nei fibroblasti un rallentamento del ciclo cellulare e una maggiore resistenza a stimoli apoptotici. Conseguentemente, i fibroblasti ALMS non vanno incontro a fenomeni di apoptosi, ma persistono, continuano a proliferare, seppur lentamente, producendo un eccesso di componenti della ECM, responsabile del progressivo rimodellamento della normale architettura tissutale, portando allo sviluppo di fibrosi. Il microambiente circostante potrebbe inoltre essere caratterizzato dalla presenza di numerosi mediatori pro-fibrotici e infiammatori, in grado di stimolare ulteriormente l'attività fibrogenica.

Nel loro insieme, i risultati ottenuti permettono da una parte di considerare la fibrosi presente nella ALMS un difetto primario direttamente legato alla presenza di mutazioni del gene *ALMS1*, dall'altra suggeriscono che *ALMS1* sia una proteina multifunzionale e intervenga in fenomeni intra- ed extra-cellulari.

Summary

**GENETIC AND FUNCTIONAL
CHARACTERIZATION OF FIBROBLASTS FROM
ALSTRÖM SYNDROME PATIENTS**

Alström Syndrome (ALMS) is a rare monogenic autosomal recessive disorder, characterized by a wide spectrum of clinical manifestations with multiple organ involvement and caused by mutations in the *ALMS1* gene.

Since 2006 our Hospital has offered the possibility to search for *ALMS1* mutations under the full coverage of National Health Service. The role of genetic testing in ALMS individuals and families is still under debate. We evaluated the impact and usefulness of this service on population as well as the medical community, showing that the combination of typical signs and symptoms with the genetic investigation seems to reach a conclusive ALMS diagnosis in almost 80% of cases.

Severe systemic fibrosis is a universal observation in postmortem and biopsy specimens of ALMS patients and may result in early organ failure and death. The molecular mechanisms involved in the development of ALMS fibrosis are poorly investigated and it is unknown if the fibrotic damage is a direct result of mutations in the *ALMS1* gene or, alternatively, a secondary response to cellular insult due to the loss of ALMS1 function.

We suggest that ALMS fibrosis could be a primary event and we focused on the role of *ALMS1* mutations in the development of fibrosis using primary cultured fibroblasts of 4 ALMS patients obtained from derma, a region with no signs of fibrosis.

Morphological analyses of two dimensional imaging of hematoxylin-eosin-stained fibroblasts evidenced that ALMS cells are more elongated, with well defined cytoplasmic extensions, compared to controls. ALMS fibroblasts cultured in hyaluronan-based scaffolds (3D cultures) to mimic the dynamic stress conditions stimulating formation of ECM showed cytoskeleton alterations and migration impairment.

Microarray experiments detected 560 differentially expressed genes in ALMS fibroblasts, including genes related to ‘extracellular matrix (ECM) and fibrosis’, ‘cell cycle’, ‘apoptosis’ and ‘cellular architecture and motility’. Expression changes of these gene clusters correlated with enhanced collagen deposition, increased cell cycle length, and resistance to cell-death in ALMS fibroblasts.

Taken together all our results give many insights about the ALMS fibroblast phenotype which can help us to understand the pathophysiology of ALMS, especially regarding the fibrosis.

We suggest that fibroblasts carrying *ALMS1* mutations divide more slowly and are less susceptible to apoptosis. Consequently, they continue to proliferate in an uncontrolled manner and produce an excess of ECM, resulting in fibrosis. ALMS fibroblasts are responsive to profibrotic inductors that could be present in the microenvironment and might contribute to the perpetuation of fibrosis.

In conclusion, we show for the first time that fibrosis in ALMS is a primary defect due to *ALMS1* mutations leading to the fibrotic phenotype described in ALMS patients. Secondly, ALMS fibrosis is a result of excessive ECM production and a failure to eliminate myofibroblasts by cell death. Our findings described *ALMS1* as a multifunctional protein, with roles in cell cycle progression, migration, apoptosis and ECM production.

I. Introduzione

1. LA SINDROME DI ALSTRÖM

La Sindrome di Alström [ALMS (MIM #203800)] è una patologia monogenica rara, a trasmissione autosomica recessiva, causata da mutazioni nel gene *ALMS1* [1]. Fu descritta per la prima volta nel 1959 da C.H. Alström *et al.* [2], in una famiglia di tre pazienti svedesi. Attualmente, il numero di pazienti ALMS diagnosticati è approssimativamente di circa 560 casi (database c/o Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA: <http://www.jax.org/>).

1.1. CLINICA

La Sindrome di Alström presenta diversi quadri sintomatologici e coinvolge molteplici sedi anatomiche, in particolare cuore, reni, fegato, polmoni, apparato genitale e riproduttivo. Le manifestazioni cliniche più importanti includono una progressiva distrofia retinica, che conduce a cecità il 90% dei pazienti entro la seconda decade di vita, perdita uditiva neurosensoriale bilaterale e obesità [1, 3, 4]. Alcuni bambini presentano cardiomiopia dilatativa, che può manifestarsi come insufficienza cardiaca congenita. La cardiomiopia si può presentare anche in età già adulta, e in generale colpisce il 60% dei pazienti [3]. Con il sopraggiungere dell'adolescenza, si verifica quasi costantemente una condizione di iperinsulinemia e insulino resistenza, che spesso si accompagna allo sviluppo di diabete mellito di tipo 2 in età adulta. Manifestazioni cliniche secondarie sono ipotiroidismo, iperuricemia, ipertrigliceridemia e complicanze dermatologiche, come acanthosis nigricans e alopecia. Meno frequentemente,

nell'infanzia, si può osservare insufficienza respiratoria con infezioni ricorrenti e asma bronchiale. In età adulta si possono riscontrare disturbi urologici, nefropatia cronica progressiva e, in alcuni casi, insufficienza renale. La maggioranza dei pazienti presenta bassa statura, come conseguenza di un'accelerata maturità scheletrica e bassi livelli di GH, a cui spesso si associano scoliosi e cifosi [3, 5, 6]. Il paziente adulto può inoltre presentare ipogonadismo maschile e iperandrogenismo femminile, fibrosi polmonare e insufficienza epatica progressiva. Sono stati descritti sintomi neurologici, come assenze, atassia e dolore muscolare inspiegato. I pazienti non presentano tipicamente dimorfismi facciali, né anomalie delle dita o ritardo mentale; mostrano tuttavia alcune caratteristiche facciali distintive, come occhi incavati, faccia rotonda, orecchie ingrandite, calvizia frontale e anomalie dentali [4, 6].

La valutazione di alcuni reperti autoptici di diversi tessuti di pazienti ALMS ha evidenziato la presenza di una fibrosi interstiziale diffusa in molti organi e apparati, che correla con i fenotipi clinici osservati e che suggerisce un meccanismo patologico comune [3]. L'analisi ha sottolineato in tutti i reperti istopatologici osservati la presenza di fibrosi renale interstiziale e glomerulare, che può interessare un numero variabile di glomeruli, i quali appaiono confinati in regioni di densa fibrosi interstiziale, eterogenee per severità da paziente a paziente. A livello epatico si è riscontrata la presenza di aree steatosiche o di cirrosi epatica microlobulare, che spesso determina una severa ipertensione portale. Si è osservata fibrosi interstiziale pancreatica, fibrosi della vescica, fibrosi del miocardio di vario grado. A livello testicolare è stata descritta atrofia caratterizzata da poche cellule di Leyding e fibrosi oblitterante dei tubuli seminiferi; a livello ovarico sono state osservate regioni densamente fibrotiche

con modificazioni cistiche. Alterazioni patologiche polmonari includono bronchiolite obliterante ostruttiva, aree focali di bronchite suppurativa e bronchiectasie, alveoli con parete inspessita caratterizzata dalla presenza di larghi fasci di fibre collagene localizzati in prossimità del tessuto normale e un importante infiltrato macrofagico. È stata descritta riduzione degli strati cellulari posteriori della retina, con cellule retiniche periferiche quasi assenti e presenza di depositi di melanina [3].

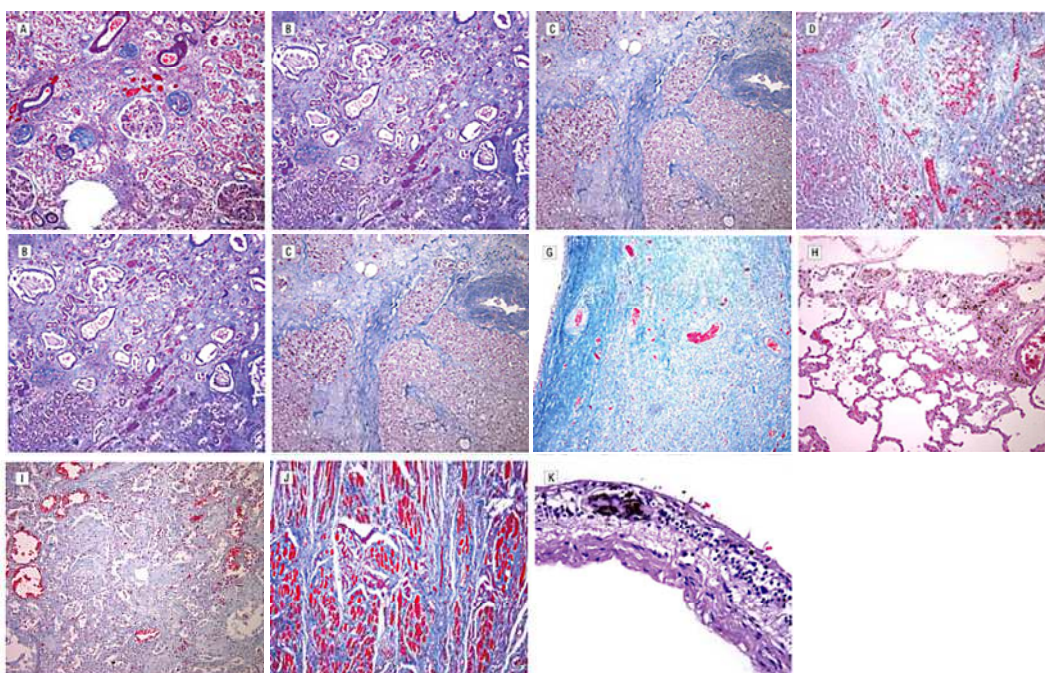


Figura 1. Analisi istopatologica di tessuti caratterizzati da fibrosi di pazienti ALMS. (A) Corteccia renale. (B) Midollare del rene. (C) Pancreas. (D) Fegato. (E) Miocardio. (F) Testicolo. (G) Ovaio. (H) Polmone. Presenza infiltrato macrofagico. (I) Polmone con bronchiolite obliterante ostruttiva. (J) Vescica. (K) Retina. Tricromia di Masson in A, B, C, D, G, I, J. Colorazione con ematossilina-eosina in E, F, H, K. [3].

Non esiste alcuna terapia che possa curare o prevenire le complicanze della Sindrome.

1.2 EPIDEMIOLOGIA

La frequenza stimata di ALMS è di un caso ogni 100000 nuovi nati [7]. La Sindrome è stata riscontrata in diverse etnie e aree geografiche dell'Europa, Asia, Africa e America settentrionale. Non sono state descritte differenze etniche o razziali legate all'incidenza della patologia, sebbene sia stata descritta principalmente in individui dell'Europa settentrionale e centrale. Diversi casi sono stati riportati anche in Nuova Scozia (Canada) all'interno della comunità degli Accadi [8].

Comunità chiuse e la consanguineità possono aumentare la frequenza di mutazioni in omozigosi, responsabili della patologia. La consanguineità rende infatti parte del genoma della prole omozigote, tanto più stretto è il grado di parentela. Tratti di genoma omozigoti includeranno inevitabilmente alleli difettosi, e, dal momento che popolazioni consanguinee presentano un'uguale frequenza di mutazioni, è atteso che la consanguineità favorisca l'insorgenza di eterogeneità allelica e di locus [9]. La popolazione dell'Arabia Saudita è rimasta confinata al suo interno per molti secoli e presenta un grado di consanguineità di circa il 50%. Si ritiene pertanto che le mutazioni insorte nelle vecchie generazioni possano essere all'origine di condizioni autosomiche recessive presenti nel territorio. Aldahmesh e collaboratori [9] studiarono quattro famiglie saudite che presentavano uno o più individui affetti da ALMS. L'identificazione di quattro nuove mutazioni nel gene *ALMS1* in questa famiglie dimostra la presenza di eterogeneità allelica anche per una patologia così rara, ed è un esempio di come la consanguineità diminuisca l'effetto fondatore, che si presuppone essere alla base di patologie rare, anche in popolazioni altamente conservate, poiché è in grado di

modificare l'assetto genetico nelle popolazioni dove l'accoppiamento tra consanguinei avviene frequentemente.

1.3 IL GENE *ALMS1*

ALMS1 è uno dei geni più estesi del genoma umano associato allo sviluppo di una patologia [10]. È un gene relativamente “nuovo”, dalla funzione non ancora nota; localizza sul cromosoma 2p13 ed è costituito da 23 esoni che si estendono in una regione genomica di circa 230 kb. *ALMS1* è ubiquitariamente espresso a bassi livelli in tutti i tessuti coinvolti nella patologia, e non mostra omologie di sequenza significative con altri geni. Sono state descritte diverse varianti di splicing in differenti tessuti, sia nell'uomo, sia nel topo. Il trascritto completo di circa 12.9 kb codifica per una proteina putativa di 461.2 kDa, costituita di 4169 aminoacidi. L'esone 1 codifica per un tratto di poliglutammato (aa 13-29), che consiste in una ripetizione $(GAG)_nGAA(GAG)_3$, seguita da un segmento di 7 residui di alanina [11, 12]. Non sono state individuate associazioni tra la lunghezza del tratto e l'insorgenza delle Sindrome. L'esone 8, che si estende per circa 6 kb, è costituito quasi interamente da un dominio di tandem-repeats, che codifica per 34 ripetizioni imperfette di 45-50 aminoacidi (aa 540-2201). La natura idrofilica della proteina e l'assenza di sequenze segnale o regioni transmembrana suggeriscono una sua localizzazione intracellulare. Sono stati invece identificati potenziali segnali di localizzazione nucleare (aa 3805-3830 e aa 3937-3954), e una ricca regione in istidine (aa 3486-3523) nella sequenza murina [11].

L'analisi *in silico* della sequenza proteica di *ALMS1* predice un *pattern* leucine-zipper (aa 2480-2501) e numerosi siti di glicosilazione, N-miristolazione e

fosforilazione (*Prositate*). ALMS1 non presenta omologie significative con nessuna proteina umana nota. Sono stati identificati geni ortologhi in diverse specie animali (NCBI: National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>) [6].

Nonostante la funzione della proteina rimanga sconosciuta, l'analisi proteomica basata sulla spettrometria di massa condotta da Mann *et al.* [13] in centrosomi isolati durante l'interfase del ciclo cellulare ha rilevato la presenza di ALMS1 a livello centrosomico. Hearn *et al.* [14] hanno confermato la co-localizzazione di ALMS1 e di γ -tubulina a livello dei centrosomi e dei corpi basali delle cellule ciliate. Il centrosoma è il centro di organizzazione dei microtubuli, che regola l'assemblaggio del fuso mitotico e organizza le strutture microtubulari citoscheletriche che guidano il traffico di vescicole intracitoplasmatico. I corpi basali invece ancorano l'assonema microtubulare di cilia e flagelli e contribuiscono a organizzare il traffico intracellulare. L'analisi di Hearn *et al.* [14] in colture di fibroblasti di un paziente ALMS ha mostrato un normale assemblaggio delle cilia primarie, suggerendo che all'origine della Sindrome vi sia un alterato funzionamento di queste strutture, e non un difetto nella loro formazione. Recentemente, le cilia primarie non mobili sono state descritte possedere funzioni sensoriali [13, 15-21], e sembrano essere presenti in quasi tutti i tipi cellulari [18, 21]. Sono state identificate infatti in epatociti, cellule β -pancreatiche, e soprattutto nei neuroni ipotalamici responsivi alla leptina [22, 23], dove sembrano avere un ruolo nell'avvertire i segnali periferici di sazietà [22-24]. La localizzazione della proteina ALMS1 suggerisce quindi un suo ruolo nell'organizzazione dei microtubuli, nel trasporto intracellulare e nella funzionalità ciliare, e consente di classificare la ALMS come 'ciliopatia', una

classe di malattie genetiche umane che hanno in comune difetti nella struttura o nella funzione ciliare [25], tra cui la Sindrome di Bardet-Biedl (BBS), le malattie policistiche renali, i difetti di lateralità e la distrofia retinica [17, 19]. La ALMS condivide con la Sindrome di Bardet-Biedl diverse caratteristiche fenotipiche, come obesità addominale, insulino resistenza e diabete mellito di tipo 2 [13, 25]. Sono stati identificati 12 loci BBS [26], che codificano per proteine risultate coinvolte nelle funzioni dei corpi basali e nel trasporto vescicolare in cellule ciliate, suggerendo che alterazioni di questi meccanismi siano critici nella patogenesi delle ciliopatie [18]. Mutazioni in geni BBS sono state recentemente associate a difetti nel processo di ciliogenesi e a una maggiore propensione *in vitro* di fibroblasti del derma ad accumulare trigliceridi e differenziare in senso adipogenico che potrebbe essere implicata nello sviluppo di obesità in pazienti con BBS [27]. Un alterato trasporto delle vescicole contenenti i trasportatori di glucosio GLUT4 a livello della membrana plasmatica potrebbe invece spiegare l'insorgenza di insulino resistenza [28]. Sembra inoltre che una ridotta fertilità dei maschi ALMS [29] derivi da un difetto nella formazione dei flagelli mobili delle code degli spermatozoi.

1.3.1 Identificazione del gene *ALMS1*

La Sindrome di Alström è nota dal 1959, quando il Dott. Alström [2], un medico svedese a cui si deve il nome della patologia, classificò tale malattia e ricostruì gli alberi genealogici di diverse famiglie di affetti. Da questi e da altri studi [30], si dedusse l'ereditarietà di tipo autosomico recessivo della patologia.

Nel 1992, i ricercatori del Jackson Laboratory iniziarono a studiare le caratteristiche genotipiche e fenotipiche di individui affetti imparentati tra loro e

appartenenti alla popolazione degli Accadi, della Nuova Scozia. [8]. Gli Accadi emigrarono dalla Francia settentrionale all'Accadia (Nuova Scozia, Canada) nella prima decade del diciassettesimo secolo. A seguito della 'Grande Deportazione' dalle loro colonie di origine durante la Guerra dei Sette Anni in Europa, gli Accadi stabilirono colonie in Francia, Quebec, Louisiana, Sud Carolina, Massachusetts e nelle Colonie Americane, vivendo relativamente isolati in piccole comunità per molti anni. La ricostruzione dell'albero genealogico attraverso 13 generazioni di una famiglia di Accadi con 5 individui ALMS, discendente da una coppia ancestrale comune, permise di identificare un aplotipo comune in una regione di 14.9 cM del cromosoma 2p12-13 [31]. Successivamente, Macari *et al.* [32] confermarono il locus *ALMS1* in una famiglia algerina. Un'ampia analisi di linkage in altre 12 famiglie non imparentate che segregavano per la ALMS permise di ridefinire la regione critica in un intervallo di 6.1 cM del cromosoma 2p13 [8].

Nel 2002, due gruppi di ricerca indipendenti (Jackson Laboratory, USA e Southampton University, UK) identificarono il gene *ALMS1* come responsabile della Sindrome di Alström. Collin *et al.* [11], attraverso un'ulteriore mappatura fisica e di ricombinazione, definirono il locus *ALMS1* in una regione critica più ristretta di 2 cM, all'interno della quale identificarono 16 geni e cluster di EST come candidati sulla base del *pattern* di espressione e di funzione. Tra questi, un trascritto non caratterizzato (KIAA0328) risultò espresso in diversi tessuti coinvolti nella ALMS. L'analisi di sequenza in individui affetti evidenziò variazioni del trascritto che segregavano con la ALMS in sei famiglie non imparentate, permettendo di identificare il gene *ALMS1* [11]. Nello stesso periodo, Hearn *et al.* [12] riscontrarono in un paziente con le caratteristiche

cliniche tipiche della ALMS una traslocazione cromosomica reciproca bilanciata, che coinvolgeva la regione critica precedentemente implicata nella Sindrome. La traslocazione sull'allele materno interessava un frammento genomico di 1.7 kb, comprendente l'esone 4 e l'inizio dell'esone 5 del gene *ALMS1*, che determinava la rottura della sequenza codificante. L'allele paterno portava invece una delezione di 2 bp nell'esone 8 in posizione 2141 (c.[2141_2142delCT]), che determina lo slittamento del modulo di lettura e la presenza di un codone di STOP cinque codoni a valle della delezione [12].

1.3.2 Mutazioni del gene *ALMS1*

ALMS è una patologia a trasmissione autosomica recessiva, causata da mutazioni nel gene *ALMS1*. La maggioranza degli individui diagnosticati sono risultati essere eterozigoti composti. In letteratura sono state riportate un totale di 81 variazioni di *ALMS1* associate alla Sindrome [7]. Sono state descritte mutazioni non-senso, delezioni e inserzioni che causano lo slittamento del modulo di lettura e una traslocazione reciproca, tutte predittive della formazione di una proteina tronca. La maggior parte delle mutazioni è localizzata a livello dell'esone 16 (circa il 40% delle mutazioni note), dell'esone 10 (23%) e dell'esone 8 (21%), mentre meno frequentemente sono state riportate mutazioni negli esoni 12 e 18. La variazione nota che è risultata essere più frequente è una delezione dell'esone 16 (c.[10775delC]), descritta in circa 125 bambini inglesi [6]. Non è escluso che mutazioni in altri esoni possano dare fenotipi non identificati o non patologici, o avere effetti deleteri sulla sopravvivenza fetale.

Sono stati identificati numerosi polimorfismi a singolo nucleotide, il cui significato funzionale non è noto [6].

1.4 VARIABILITÀ FENOTIPICA

L'espressione ubiquitaria del gene *ALMS1* può spiegare la natura sindromica della ALMS.

La patologia mostra un'ampia variabilità fenotipica, i cui meccanismi alla base non sono ancora stati chiariti.

Le mutazioni identificate nel gene *ALMS1* associate all'insorgenza della patologia localizzano in posizioni distinte del gene, e potrebbero concorrere in maniera diversa allo sviluppo e alla progressione della malattia, spiegando la variabilità fenotipica tra i pazienti ALMS. In relazione a questo, sono in corso studi per la definizione di possibili correlazioni genotipo-fenotipo, volti a valutare il ruolo della posizione delle mutazioni identificate. Marshall e collaboratori [3] hanno evidenziato come mutazioni nell'esone 16 sembrano essere maggiormente associate a fenotipi patologici più gravi. Vi è infatti una correlazione significativa tra mutazioni in questa regione del gene e l'insorgenza di degenerazione retinica nell'arco del primo anno di vita, disfunzioni urologiche, cardiomiopatia dilatativa e diabete mellito di tipo 2. Pazienti con mutazioni nell'esone 8 mostrano invece un'incidenza inferiore di malattia renale [3].

Le differenze nella progressione della ALMS in individui con la stessa mutazione suggeriscono che la variabilità fenotipica osservata in molti individui affetti dalla Sindrome potrebbe essere inoltre il risultato di interazioni di elementi genetici (geni *modifiers*) e fattori ambientali con il locus *ALMS1*. Il linkage al locus *ALMS1* è sicuramente necessario e sufficiente per spiegare lo stato morboso; tuttavia, i geni responsabili della Sindrome di Bardet-Biedl e di Laurence-Moon potrebbero essere buoni candidati come geni *modifiers* della ALMS.

Collin *et al.* [11] descrissero il caso di due giovani maschi non imparentati aventi la stessa mutazione in omozigosi nel gene *ALMS1* (c.[10775delC]). I pazienti presentavano entrambi retinopatia e cardiomiopatia infantile a esordio nei primi medi di vita, obesità dall'età di 2 anni, diabete mellito di tipo 2 e insufficienza renale dall'età di 10 anni. Il primo ebbe un'improvvisa recidiva della cardiomiopatia dilatativa all'età di 18 anni, senza alcuna evidenza di disfunzione epatica. Il secondo paziente, invece, presentò una severa insufficienza epatica all'età di 20 anni e non manifestò alcuna recidiva della cardiomiopatia.

Un altro esempio di una stessa mutazione a capo di fenotipi diversi è riportato in una coppia di fratelli affetti da ALMS. I due pazienti, portatori di una sostituzione nucleotidica in posizione 11571 dell'esone 16 (c.[11571C>G]), predittiva di una proteina tronca in posizione 3820, mostravano differenze fenotipiche nell'espressione della malattia. Un soggetto soffriva dall'età di 3 mesi di asma bronchiale non allergica e, dall'età di 9 anni, di diabete mellito di tipo 2, acanthosis nigrans e deficit uditivo neurosensoriale. Il secondo paziente presentava invece dall'età di 2 anni cardiomiopatia dilatativa, e, al momento dell'ultima osservazione, non mostrava le manifestazioni fenotipiche presenti nel fratello. Alcuni di questi fenotipi, tuttavia, insorgono in relazione all'età e pertanto non è certo possano essere considerati delle differenze fenotipiche reali tra i due fratelli.

1.5 DIAGNOSI

La Sindrome di Alström viene diagnosticata sulla base delle caratteristiche cliniche osservate, senza richiedere generalmente la conferma genetica. L'ampia variabilità fenotipica e il ritardo con cui alcune caratteristiche fenotipiche

insorgono rendono tuttavia la diagnosi molto difficile nella prima infanzia. Con la crescita del bambino e il manifestarsi di alcuni fenotipi tipici della patologia, che si rendono evidenti solo nella seconda decade di vita, la diagnosi clinica risulta più agevole.

Recentemente, sono stati definiti un set di criteri diagnostici in base all'età del paziente, attraverso i quali formulare una diagnosi di ALMS [1]. L'analisi genetica per la presenza di mutazioni nel gene *ALMS1* è consigliata nel momento in cui l'anamnesi del paziente evidenzia la presenza solo di alcuni aspetti clinici, che non sono patognomonicamente per la diagnosi.

La diagnosi di ALMS è certa nel caso dell'identificazione di due mutazioni del gene *ALMS1* nel paziente, o di un singolo allele *ALMS1* mutato associato alla presenza di caratteristiche cliniche conformi ai criteri diagnostici delineati, o di una storia familiare di ALMS.

2. LA FIBROSI

La fibrosi viene generalmente definita un disordine fibroproliferativo, caratterizzato da una produzione eccessiva e incontrollata di matrice extracellulare (ECM), che determina il progressivo rimodellamento e la perdita della normale architettura tissutale, portando ad alterazioni funzionali del tessuto interessato.

Da un punto di vista clinico, può essere considerata una condizione irreversibile del processo di riparazione tissutale, durante la quale viene persa la normale omeostasi tissutale e non avviene la risoluzione dei meccanismi di cicatrizzazione [33, 34].

2.1 IL FIBROBLASTO

Il fibroblasto è la cellula principalmente coinvolta nell'eccessiva produzione di ECM che caratterizza i disordini fibrotici.

In condizioni fisiologiche, il fibroblasto è una cellula relativamente quiescente a lunga vita, e generalmente non se ne osserva la proliferazione e la morte [35]. Nel tessuto adulto, riveste un ruolo chiave nel mantenimento e nell'omeostasi della ECM, regolandone il normale turnover, attraverso il controllo del differenziamento epiteliale e dell'infiammazione. I fibroblasti sintetizzano i principali costituenti fibrillari dell'ECM, quali collagene di tipo I, II e IV e fibronectina, e contribuiscono alla formazione delle membrane basali, attraverso la secrezione di collagene di tipo IV e laminina. Sono inoltre importanti per la sintesi di proteasi, come metalloproteasi (MMPs), essenziali per la degradazione e il rinnovamento della matrice. I fibroblasti sono infine coinvolti nel mantenimento dell'omeostasi dei vicini epitelii, attraverso la secrezione di fattori di crescita e

interazioni dirette tra cellule mesenchimali ed epiteliali [35, 36].

I fibroblasti hanno un ruolo prominente nei normali fenomeni di riparazione tissutale [35]. Durante questi processi, si osserva la conversione del fibroblasto dalla sua condizione di cellula quiescente a un fenotipo attivato che esprime α -smooth-muscle actin (α -SMA), denominato miofibroblasto, e caratterizzato da un'attiva proliferazione e secrezione di livelli elevati di proteine della ECM. Fibroblasti attivati rilasciano livelli aumentati di MMPs (in particolare MMP2, MMP3 e MMP9), che favoriscono un rapido turnover dell'ECM, determinandone in alcuni casi cambiamenti nella sua composizione, e mostrano un'aumentata sintesi di fattori di crescita, come HGF, IGF, NGF, EGF, FGF2 e WNT1, che stimolano la proliferazione degli epitelii adiacenti. I miofibroblasti possono inoltre modulare la risposta immunitaria successiva a un danno tissutale, attraverso la secrezione di citochine e chemochine, come interleuchina-1 e MCP1 [36, 37].

A seguito della loro attivazione, i miofibroblasti invadono la sede della lesione del tessuto, producono ECM che funge da supporto per altri tipi cellulari, e possiedono elementi citoscheletrici che favoriscono la contrazione nella cicatrizzazione delle ferite [37].

Il normale processo di riparazione tissutale è un fenomeno autolimitante, che vede la riconversione dei miofibroblasti a una condizione di quiescenza, o la loro eliminazione attraverso meccanismi di apoptosi [38]. La rimozione dei fibroblasti attivati risulta cruciale nella fase di risoluzione delle risposte fibroproliferative, e lo squilibrio tra proliferazione e apoptosi sembra essere implicato nello sviluppo di fibrosi progressive. In condizioni patologiche, i miofibroblasti sembrano non andare incontro ad apoptosi, ma persistono nel

tessuto, continuano a proliferare e a produrre un eccesso di ECM, che è causa della formazione del tessuto fibrotico [38-40].

Fibroblasti isolati da cheloidi sono infatti risultati resistenti all'apoptosi. Questo suggerisce che *in vivo* i cheloidi possano formarsi come conseguenza di un alterato processo di riparazione, caratterizzato da una prolungata fase proliferativa conseguente lo sviluppo di un fenotipo resistente all'apoptosi, che determina l'instaurarsi di una condizione di continua ed eccessiva produzione di collagene [41]. Analogamente, fibroblasti di pazienti con fibrosi polmonare idiopatica isolati dalla sede della lesione sembrano possedere pathways pro-apoptotici silenziati rispetto a fibroblasti di controllo, nonostante la presenza di elevati livelli di induttori di apoptosi [42].

I meccanismi cellulari coinvolti nello sviluppo e nel mantenimento del fenotipo attivato dei miofibroblasti, implicato nelle fibrosi progressive, non sono conosciuti. Diverse citochine e fattori di crescita prodotti da cellule immunitarie, o rilasciati localmente da cellule mesenchimali ed epiteliali, noti promuovere la proliferazione dei fibroblasti, la sintesi di collagene, la migrazione, il differenziamento e inibire l'apoptosi, rivestono probabilmente un ruolo chiave nel determinare il verificarsi di normali eventi di riparazione oppure di processi patologici. Il TGF- β (transforming growth factor- β) è considerato uno tra i più importanti fattori pro-fibrotici. Questa citochina stimola l'attivazione e il differenziamento di fibroblasti in miofibroblasti, l'espressione di recettori di superficie per fattori di crescita e di componenti della ECM, la resistenza all'induzione di apoptosi, e inibisce la degradazione del collagene down-regolando gli enzimi responsabili della digestione della ECM e promuovendo l'espressione di inibitori delle proteasi [34, 43, 44].

II. Scopo della tesi

La Sindrome di Alström è una rara patologia a trasmissione autosomica recessiva causata da mutazioni del gene *ALMS1* e caratterizzata da un pleomorfismo fenotipico con compromissione funzionale multiorgano.

La fibrosi rappresenta una caratteristica fenotipica comune in pazienti ALMS. Aree di estesa fibrosi interstiziale sono state descritte in molti tessuti, e sembrano essere responsabili di importanti alterazioni funzionali d'organo che influenzano negativamente la prognosi e molto spesso determinano il decesso prematuro dei pazienti [1].

Nel nostro laboratorio è stato possibile ottenere colture primarie di fibroblasti da una biopsia cutanea di 4 pazienti ALMS che afferiscono al nostro centro per la gestione clinica.

I fibroblasti del derma rappresentano un buon modello cellulare per lo studio dei meccanismi patologici che regolano l'infiammazione e la riparazione tissutale, in modo particolare nei disordini fibrotici, come per esempio nella formazione dei cheloidi [41] e nello sviluppo della sclerodermia [45].

Le colture primarie di fibroblasti da noi ottenute sono state quindi utilizzate come modello cellulare *in vitro* per studi morfologici, di espressione genica e funzionali, al fine di evidenziare cambiamenti dovuti alla presenza del trascritto *ALMS1* mutato.

III. Materiali e Metodi

1. SOGGETTI

In questo studio sono stati analizzati 4 pazienti (PT1-PT4), 3 maschi e 1 femmina di età compresa tra i 24 e 36 anni, che presentavano le caratteristiche cliniche tipiche della ALMS e che afferiscono al reparto della Clinica Medica III per la gestione clinica. Il gruppo comprende una coppia di 2 fratelli (PT2 e PT3). Tutti i pazienti presentavano retinopatia dalla prima infanzia, cecità, riduzione dell'udito. I PT1 e PT4 sono risultati affetti da diabete mellito di tipo 2, secondo i criteri WHO (World Health Organization). PT3 presentava una alterata tolleranza al glucosio (IGT). Tutti i pazienti mostravano dislipidemia. Il PT4 risultava essere obeso (BMI=34.4), mentre i PT2 e PT3 erano moderatamente sovrappeso (BMI 25-30). Nessun soggetto presentava infarto cardiaco, cardiomiopatia e pneumopatie. Due pazienti (PT1 e PT3) manifestavano disfunzioni renali e tre (PT2, PT3, PT4) ipogonadismo. Tutti i pazienti mostravano disfunzione epatica di vario grado.

In tutti i pazienti è stata identificata la mutazione presente nel gene *ALMS1*, ognuna delle quali è stata precedentemente descritta da Marshall *et al.* [6]. Le varianti sono state identificate dall'analisi del DNA genomico (gDNA) e dei trascritti ottenuti da colture primarie di fibroblasti isolate dai pazienti. Il PT1 presenta una mutazione in omozigosi nell'esone 10 (c.[8938C>T]), predittiva di una proteina tronca a livello dell'aa 2980 (p.Q2980X). I PT2 e PT3 sono portatori della stessa mutazione in omozigosi nell'esone 8 (c.3425C>G), per cui si può predire la formazione di un codone di STOP in posizione 1142 (p.S1142X). Il PT4 è un eterozigote composto e presenta una transversione nell'esone 8 e una delezione di 4 nucleotidi a livello dell'esone 16, che provoca uno slittamento del modulo di lettura. Entrambe le varianti predicono la formazione di due proteine tronche di 722 (p.K722X) e di 3790 (p.D3771fsX3790) aa rispettivamente.

Le caratteristiche fenotipiche e la descrizione della mutazione identificata in ciascun paziente sono riportate in tabella 1.

TABELLA 1. Caratteristiche genetiche e fenotipiche dei pazienti affetti dalla ALMS.

	PT1	PT2	PT3	PT4
	○	□	▽	◇
Mutazione <i>ALMS1</i> *	c.[8938C>T] +[8938C>T] (esone 10) p.Q2980X	c.[3425C>G] +[3425C>G] (esone 8) p.S1142X	c.[3425C>G] +[3425C>G] (esone 8) p.S1142X	c. [2164A>T] +[11313_11316delTAGA] (esone 8)+(esone16) p.K722X+D3771fsX3790
Età	37 anni	24 anni	36 anni	29 anni
Sesso	femmina	maschio	maschio	maschio
BMI (kg/m ²)	22.2	27	27.7	34.4
Bassa statura	Si	Si	Si	Si
Retinopatia	Si (1 anno)	Si (3 mesi)	Si (3 mesi)	Si (1 mese)
Perdita uditiva	Si (19 anni)	Si (1 anno)	Si (6 anni)	Si (10 anni)
Diabete mellito di tipo 2	Si (32 anni)	No	IGT (34 anni)	Si (27 anni)
Dislipidemia	Si (25 anni)	Si (4 mesi)	Si (13 anni)	Si (10 anni)
Cardiomiopatia	No	No	No	No
Pneumopatia	No	No	No	No
Disfunzioni epatiche	Moderato (25 anni)	Moderato (24 anni)	Moderato (12 anni)	Si (10 anni)
Nefropatia	Moderato (32 anni)	No	Moderato (35 anni)	Si (24 anni)
Ipogonadismo	No	Si	Si	Si

I parametri riportati sono relativi alle osservazioni al momento della biopsia cutanea.

La nomenclatura della mutazioni è definita secondo le indicazioni riportate da den Dunnen *et al.* [46]; il numero dell'esone in cui la mutazione è localizzata è riportato in parentesi.

Tre soggetti sani, 2 femmine e 1 maschio di età compresa tra i 53 e i 74 anni, che non presentavano alterazioni metaboliche ed endocrinologiche al momento della biopsia cutanea, sono stati utilizzati come controlli.

Ciascun soggetto ha fornito il proprio consenso informato, sia per la biopsia cutanea, sia per l'utilizzo del gDNA, e il protocollo di ricerca è stato approvato dal Comitato Etico dell'Azienda Ospedaliera di Padova.

2. ANALISI DI MUTAZIONI

2.1 PCR SU cDNA e gDNA

L'analisi genetica per la ricerca di mutazioni nel gene *ALMS1* è basata sul sequenziamento diretto degli esoni 8, 10 e 16 (hot-spots mutazionali) da DNA genomico (gDNA) e sul successivo sequenziamento dell'intero trascritto da cDNA.

Il gDNA è estratto da un prelievo di sangue periferico utilizzando colonnine QIAamp®DNA Mini kit (QIAGEN, GmbH, Hilden, Germany), mentre il cDNA è ottenuto dalla retrotrascrizione dell'mRNA di colture primarie di fibroblasti isolati da una biopsia cutanea del paziente per il quale esista il sospetto di ALMS (vedere paragrafo Materiali e Metodi 5.1)

I primers per l'analisi del gDNA (Tabella 1, Appendice 1) e del cDNA (Tabella 2, Appendice 1) sono stati disegnati facendo riferimento alla sequenza NM_015120.4, depositata presso l'NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>), utilizzando i softwares PRIMER3 (http://cbr-rbc.nrc-cnrc.gc.ca/cgi-bin/promer3_www.cgi) e OLIGOANALYZER (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx>), disponibili gratuitamente online.

Frammenti di circa 1 Kb sono amplificati mediante PCR utilizzando HotStarTaq Master Mix Kit (QIAGEN), secondo le istruzioni della ditta fornitrice. Una aliquota della reazione di PCR viene valutata mediante elettroforesi in gel di agarosio (1.5%) con tampone TBE 1X e visualizzata mediante colorazione con Bromuro di Etidio (SIGMA, Sigma -Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.).

Il prodotto di amplificazione viene purificato utilizzando Exosap (USB, OH, U.S.A.), seguendo le indicazioni della ditta produttrice, quantificato in gel di agarosio utilizzando un marcatore di peso molecolare (DNA Molecular Weight Marker VIII, Roche, Germany) e successivamente sequenziato.

2.2 PCR DI SEQUENZA

La reazione di sequenza viene realizzata utilizzando ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle sequencing Ready Reaction Kits (Applied Biosystems, CA, U.S.A.) (3 ng ogni 100 bp di prodotto purificato), e 1.6 pmoli degli stessi primers

utilizzati per l'amplificazione. Successivamente alla purificazione con una colonna Microcon (MICROCON PCR, Millipore, MA, U.S.A.), il prodotto di reazione viene denaturato a 95°C per 2 min in presenza di HD Formamide (Applied Biosystems) e analizzato utilizzando ABI 3100 Sequencing Analyzer (Applied Biosystems). I cromatigrammi ottenuti vengono analizzate e confrontate con la sequenza depositata presso la Genebank NCBI.

3. COLTURE PRIMARIE DI FIBROBLASTI

3.1 COLTURE BIDIMENSIONALI (2D)

Le colture primarie di fibroblasti sono state ottenute da biopsie cutanee di 4 pazienti affetti da ALMS e di 3 controlli sani.

La biopsia cutanea viene asportata dalla superficie glabra dell'avambraccio, tagliata in piccoli pezzi e seminati in piastre Petri a diretto contatto con la plastica. Ogni pezzo di tessuto viene coperto con una goccia di Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (GIBCO, Invitrogen Corporation, Paisley, Uk), 150 U/ml streptomycina, 200 U/ml penicillina, 2 mM glutammina, 1 mM HEPES (GIBCO) (standard medium, SM), contenente 20% siero bovino fetale (FBS) (GIBCO) (v/v) inattivato al calore. I fibroblasti fuoriescono spontaneamente dal derma aderendo al supporto di coltura, e replicano fino a raggiungere la confluenza. Le cellule vengono successivamente mantenute in coltura in SM al 10% FBS.

Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti dopo sincronizzazione delle colture cellulari, ottenuta al raggiungimento della sub-confluenza. Le colture sincronizzate sono state analizzate al citofluorimetro (FACS Calibur, Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA): non sono state evidenziate variazioni nella distribuzione delle cellule nelle fasi del ciclo cellulare tra fibroblasti ALMS e di controlli sani (dato non riportato).

Le colture primarie sono state utilizzate tra il III° e il XII° passaggio, e gli esperimenti sono stati realizzati utilizzando fibroblasti allo stesso passaggio.

3.2 COLTURE TRIDIMENSIONALI (3D) IN HYAFF11™

Colture primarie di fibroblasti vengono seminate su frammenti (1x1 cm) di HYAFF-11™ (Fidia Advanced Biopolymers, Abano Terme, Padova, Italy), a una

concentrazione di 1×10^6 cellule/cm². Le colture sono mantenute per due settimane in SM al 10% FBS.

Lo HYAFF-11TM è un biomateriale che deriva dalla totale esterificazione dell'acido ialuronico con alcool benzilico. La molecola è sintetizzata a partire da 80-200 kDa di ialuronato di sodio. Il prodotto finale è un polimero lineare con peso molecolare indeterminato, insolubile in solventi acquosi, sebbene idrolizzi spontaneamente nel tempo rilasciando alcool benzilico e acido ialuronico

In queste condizioni, i fibroblasti proliferano all'interno degli interstizi dello scaffold, mantenendo il loro fenotipo originale, e depositando ECM contenente collagene di tipo I, III e IV, e molecole di adesione come laminina e fibronectina [47].

4. ANALISI ISTOLOGICA E MORFOLOGICA

Colture bidimensionali di fibroblasti fissate in formalina e colture tridimensionali fissate in formalina e incluse in paraffina vengono analizzate al microscopio ottico dopo colorazione standard con ematossilina-eosina (SIGMA). La lunghezza cellulare di fibroblasti in 2D viene misurata utilizzando il software Leica IM1000 Image Manager (Leica Microsystem, Heerbrugg Switzerland), in dotazione al microscopio ottico. La superficie di adesione di fibroblasti in 2D durante la fase logaritmica di crescita cellulare viene stimata dividendo matematicamente il numero totale di cellule contate in una fiasca T75, utilizzata come supporto di coltura, e l'area della fiasca T75. Le cellule vengono staccate dal supporto di crescita mediante trattamento con 25% tripsina (v/v) e contate in una camera di Bürker, dopo colorazione con 0.2% tripan blue.

Fibroblasti in sospensione, dopo trattamento con 25% tripsina (v/v), vengono sottoposti a 2 lavaggi in PBS e analizzati per le loro proprietà di forward e side light scatter al citofluorimetro (Becton Dickinson Immunocytometry System) come stima della dimensione e granulosità cellulare [48].

Per l'analisi ultrastrutturale, colture 3D vengono fissate in 2.5% gluteraldeide in buffer fostato pH 7.4 per 3 ore, trattate con 1% di tetrossido di osmio, disidratate con etanolo, e incluse in araldeide (SIGMA). Sezioni ultrafine vengono colorate con acetato di uranile e analizzate al microscopio elettronico (Philips EM400, Philips, Eindhoven, The Netherlands).

5. ANALISI DI ESPRESSIONE GENICA

5.1 ESTRAZIONE DI RNA TOTALE DA FIBROBLASTI

L'RNA totale di colture 2D di fibroblasti è stato estratto utilizzando RNeasy Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany), secondo il protocollo della ditta fornitrice.

Brevemente, il terreno di coltura viene eliminato e i fibroblasti vengono lisati con il buffer RLT. Il lisato cellulare viene conservato a -80°C fino al momento dell'utilizzo. A ogni campione di solubilizzato cellulare viene aggiunto un uguale volume di 70%etanolo (v/v). Ogni campione viene quindi trasferito in una colonna di purificazione RNeasy Spin Column, e centrifugato per 2 minuti a 10000 g a temperatura ambiente. L'RNA, che si lega alla membrana della colonna, viene lavato con due buffer a diversa forza ionica, ed eluito con 40 µl di acqua RNase-free.

L'RNA estratto viene quantificato mediante lettura spettrofotometrica al Nanodrop (Fisher Scientific SAS, Illkirch Cedex, France) e analizzato qualitativamente utilizzando il sistema Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, PaloAlto, USA).

5.2 TRATTAMENTO CON DNasi

L'RNA totale (2 µg) è stato trattato con DNasi, utilizzando il kit DNase Treatment & Removal Reagent (Ambion, Austin, TX, USA), per eliminare la contaminante di DNA genomico.

Brevemente, ciascun campione viene incubato con l'enzima per 30 minuti a 37°C. Successivamente, la reazione viene bloccata aggiungendo un 10% in volume di Inactivation Reagent, e incubando per 2 minuti a temperatura ambiente. Ciascun campione viene centrifugato a 10000 g per 2 minuti, e il surnatante, contenente l'RNA, è trasferito in una nuova provetta e conservato a -80°C.

5.3 DNA MICROARRAY

Il sistema dei microarrays ha cominciato a diffondersi a partire dagli anni '90 e da allora ha avuto un rapido sviluppo. Il grande vantaggio apportato da questo metodo è rappresentato dalla possibilità di analizzare l'espressione di molteplici

geni in due o più condizioni simultaneamente, permettendo di identificare modificazioni legate a intere vie di segnalazione, e consentendo inoltre di formulare ipotesi per direzionare nuovi esperimenti in modo estremamente utile, in particolare quando siano disponibili poche informazioni rispetto al problema in esame.

L'esperimento di microarrays è stato eseguito utilizzando piattaforme di ibridazione a oligonucleotidi (arrays), acquistate presso il CRIBI (Università degli Studi di Padova, <http://www.microcribi.unipd.it>), che consistono in una collezione di 21329 sequenze di settantimeri (Operon 2.0), disegnate su cluster di Unigene Human e corrispondenti alla regione 3' terminale di sequenze genica uniche, depositate in doppio in un supporto di vetro (MICROMAX Glass Slides SuperChip I, PerkinElmer).

Amplificazione dell'RNA

L'RNA totale trattato con DNasi (1.5 µg) è stato amplificato linearmente utilizzando SuperScript™RNA Amplification System (Invitrogen), secondo il protocollo sviluppato da Eberwine *et al.* [49].

Nel passaggio di trascrizione *in vitro* viene incorporato un nucleotide modificato 5-(3-aminoallyl)UTP (SIGMA) che possiede in posizione C5 dell'uracile un gruppo amminico. Il prodotto di amplificazione è un RNA antisenso (aRNA), complementare al messaggero originale, marcato con un gruppo amminoallilico in grado di reagire chimicamente con il gruppo estero di fluorofori (NHS-Cy). L'aRNA amplificato viene quantificato mediante lettura allo spettrofotometro (Nanodrop) e la sua qualità è valutata utilizzando l'applicazione mRNA Nano assay del Bioanalyzer 2100 Agilent.

Marcatura dell'aRNA

L'aRNA (5 µg) di ciascun campione viene marcato con un fluoroforo monouso (Cy™3 o Cy™5) (Amersham Biosciences), purificato dall'eccesso delle cianine utilizzando le colonne fornite dal kit di amplificazione dell'RNA (Invitrogen), ed eluito con 100 µl di H₂O DEPC (diethyl pirocarbonato). L'incorporazione del fluoroforo viene quantificata sulla base del rapporto delle assorbanze a 650nm e 550nm, lette allo spettrofotometro (Spectrometer Lambda 2S, PerkinElmer Life Sciences Inc., Waltham, USA).

Ibridazione

Gli aRNA dei campioni di controllo sono stati riuniti al fine di ridurre la variabilità inter-individuale. L'aRNA di ciascun paziente (PT1, PT2, PT3, PT4) è stato quindi confrontato con il pool di controlli mediante co-ibridazione su piattaforma a oligonucleotidi (array).

Prima di ibridare il campione, gli arrays vengono pre-ibridati per 1 ora a 48°C in un tampone appropriato (SSC 5X, SDS 0.1%, ss-DNA 100ng/μl, Denhardt's solution 5X), per ridurre il segnale aspecifico. I campioni, dopo essere stati concentrati per precipitazione, vengono risospesi in buffer di ibridazione appropriato (SSC 5X, SDS 0.1%, formammide 25%, ss-DNA 50 ng/μl). La sonda così ottenuta viene denaturata a 95°C per 2 minuti, e applicata sull'array. L'ibridazione viene condotta a 48°C per tutta una notte in un sistema di ibridazione automatico (ArrayBooster™, Advalytix), che mantiene la soluzione in continua agitazione. Successivamente vengono eseguiti dei lavaggi seriali con SSC e SDS, per rimuovere l'eccesso di sonda e aumentare la stabilità del legame tra questa e gli oligonucleotidi depositati. Dopo essere stato opportunamente asciugato, il vetrino viene sottoposto a scansione con un sistema laser (ScanArray Lite, PerkinElmer).

Repliche

Ciascuna condizione (PT *versus* pool di controlli) è stata analizzata in duplicato, effettuando l'inversione dei fluorofori: in una replica il campione del PT in esame viene marcato con Cy™3 e il pool di controlli con Cy™5, mentre nel vetrino di replica il primo viene marcato con Cy™5 e il secondo con Cy™3. Questo consente di ridurre dell'errore derivato dalla differenziale efficienza di incorporazione dei fluorofori.

Normalizzazione

I dati grezzi di intensità di fluorescenza ottenuti per ogni esperimento nei due canali sono stati organizzati in unico file, e successivamente normalizzati secondo un metodo LOWESS, in cui gli errori sistematici commessi nella valutazione della media del rapporto di fluorescenza tra i due canali sono corretti per il valore medio locale. Per questa analisi è stato utilizzato il software MIDAS [50], disponibile gratuitamente online (<http://www.tigr.org/>).

Replicati all'interno dello stesso vetrino e nei due canali con un'elevata deviazione standard sono stati esclusi, utilizzando il metodo suggerito da Yang *et al.* [51].

Analisi dei dati: identificazione di geni differenzialmente espressi

Dopo la normalizzazione, per ciascun gene viene identificato un dato di rapporto di espressione, corrispondente al livello di espressione del gene stesso diviso per il valore ottenuto nel controllo. Il logaritmo in base 2 di questo valore consente di identificare un intervallo all'interno del quale geni che possiedono livelli di espressione costanti avranno $\log_2(\text{ratio})$ pari a zero, mentre geni con espressione up- o down- regolata avranno valori rispettivamente superiori o inferiori a un cut-off scelto (nel nostro caso ± 0.7).

I geni che mostrano un significativo fold change (differenzialmente espressi) vengono identificati attraverso un'analisi statistica di tipo SAM [52]. Questo test combina l'assegnazione di un punteggio calcolato attraverso un *t test* ($S = R_g / (c + SE_g)$), dove R_g è la media del rapporto logaritmico dei livelli di espressione per un singolo gene, SE_g è l'errore standard e la costante c è il valore del 90 percentile per SE_g con un'analisi permutazionale e il calcolo del tasso di falsi positivi (FDR) per ciascun gene.

Analisi dei dati: GENE ONTOLOGY e KEGG PATHWAYS

Per correlare con maggior efficienza i dati ottenuti dall'interpretazione degli array dopo l'analisi statistica a un significato biologico, sono state usate due banche dati pubbliche che forniscono informazioni sulle reti di connessione esistenti tra geni: la Gene Ontology [53] (GO, <http://www.geneontology.org/>) e il KEGG database [54] (*Kyoto Encyclopedia of Gene and Genome*, <http://www.genome.jp/kegg/>). Questi sistemi permettono di individuare rapidamente la modulazione di vie di segnale, permettendo la formulazione di ipotesi riguardanti la condizione analizzata.

Il database Gene Ontology rappresenta attualmente lo standard internazionale per l'annotazione genica. Questo sistema permette di collocare le numerose informazioni ottenute da esperimenti di microarrays all'interno di strutture classificate di geni, che rappresentano i termini di Gene Ontology, consentendo l'identificazione di alcuni processi biologici modulati in un ampio set di dati. A ciascun termine evidenziato è associato un valore statistico *p-value*, che

fornisce una stima della rilevanza dei geni in analisi nelle liste di classificazione fornite dalla Gene Ontology. Tanto più basso è questo valore, tanto più le informazioni ottenute risultano essere specifiche. All'interno della Gene Ontology, i geni vengono raggruppati in 3 categorie principali, *processi biologici*, *componenti cellulari* e *funzioni molecolari*, sulla base delle informazioni note per ciascun gene.

L'utilizzo della banca dati KEGG consente di ordinare geni differenzialmente espressi in mappe, che rappresentano le numerose vie di segnale note nella maggior parte delle cellule. L'utilizzo di questi diagrammi consente di visualizzare in modo immediato la posizione con cui i geni si inseriscono all'interno di un *pathway*, in termini di aumento o diminuzione dell'espressione genica. Vie di segnale in cui sono rappresentati molti geni differenzialmente espressi risulteranno maggiormente informative nella valutazione della condizione in esame.

5.4 RT-REAL TIME PCR

Retrotrascrizione dell'RNA in cDNA

Prima di essere retrotrascritto in cDNA, l'RNA totale trattato con DNasi viene denaturato a 70 °C per 5 minuti, in presenza di 150 ng di random primer (Promega Corporation, Madison, WI, USA).

L'RNA denaturato viene retrotrascritto in cDNA per 1 ora a 37°C, aggiungendo alla miscela di reazione 200U M-MLV Reverse Transcriptase (*Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*), 0.5 mM dNTPs (desossinucleotidi trifosfato) e 20U RNAsin Ribonuclease Inibitor (inibitore di RNAsi purificato da placenta umana), in M-MLV RT Buffer (Promega), in un volume finale di reazione di 50 µl. L'enzima di retrotrascrizione viene successivamente inattivato a 95°C per 2 minuti. Il cDNA sintetizzato viene conservato a -20°C.

Real-Time PCR

L'espressione dell'RNA messaggero di geni per alcune componenti della ECM (*POSTN*, *ACTA2*, *COL1A1*, *COL3A1*, *COL4A1*, *COL5A1*, *COL5A2*, *COL8A1*, *COL11A1*, *COL12A1*, *COL15A1*) è stata quantificata utilizzando la tecnica della Real-time PCR.

La tecnica permette la quantificazione di una sequenza bersaglio all'interno di una miscela eterogenea di molecole di DNA o cDNA, in base al fatto che esiste una relazione tra la quantità di template di partenza e il prodotto di PCR corrispondente. In questo lavoro, l'analisi quantitativa è stata realizzata utilizzando il SYBR Green I (SYBR Green PCR Master Mix, Invitrogen), una molecola fluorescente che lega covalentemente il DNA a doppia elica a livello del solco maggiore. All'aumentare del prodotto di PCR a ogni ciclo di amplificazione si verifica un proporzionale aumento di fluorescenza, dovuto al legame del SYBR Green I alle molecole a doppia elica di DNA, monitorato dal sistema Real Time PCR.

Il cDNA (5ng) è stato amplificato utilizzando lo strumento DNA Engine OpticonTM 2 Continuous Fluorescence Detection System (MJ Research, Waltham, MA, USA).

La curva di reazione è presentata come un diagramma sigmoide di amplificazione, in cui l'intensità di fluorescenza è espressa in funzione del numero di cicli di amplificazione. Il ciclo in cui si verifica un aumento di fluorescenza che interseca la soglia, calcolata sulla base dell'intensità media di fluorescenza dei primi cicli (rumore di fondo), è detto ciclo soglia (Ct, Cycle threshold). L'analisi dei dati e la definizione del valore Ct è effettuata utilizzando il "Metodo della Derivata Seconda", algoritmo fornito dal software in dotazione allo strumento.

È stata realizzata una quantificazione relativa dell'espressione del gene in analisi sulla base del confronto con diluizioni seriali 1:10 di un campione positivo, che definiscono una curva standard di riferimento. La curva standard è una retta in cui vengono messe in relazione le diverse concentrazioni, espresse in forma logaritmica, con il valore Ct. La pendenza della retta è indice dell'efficienza della reazione: essa deve tendere a -0.3 che corrisponde all'efficienza teorica della PCR, che a ogni ciclo duplica il numero di molecole di template ($\log_2=0.3$). Il confronto del Ct di un campione a concentrazione ignota con la curva standard permette di definire la quantità iniziale di template nel campione in analisi.

Per verificare che i prodotti ottenuti non siano degli aspecifici e che non si siano formati dimeri di primer, che potrebbero compromettere la quantificazione del prodotto amplificato, al termine dell'amplificazione si esegue un'analisi della curva di dissociazione (Melting Curve), che permette di individuare la

temperatura di fusione (T_m) specifica per ogni amplificato esaminato. Come ulteriore controllo, i campioni sono analizzati in gel d'agarosio al 2% dopo corsa elettroforetica.

La quantità del trascritto del gene d'interesse è stata normalizzata rispetto alla quantità del trascritto di un gene housekeeping, l'*HMBS* (idrossimetilbilan-sintasi).

Ciascun campione è stato analizzato in duplicato e in ogni reazione sono stati inclusi almeno 2 controlli negativi in cui non è stato aggiunto alcun cDNA.

Le sequenze dei primers utilizzati sono state scelte utilizzando il programma PRIMER3. Le sequenze oligonucleotidiche e le condizioni di reazione sono riportate in Tabella 4, Appendice 1.

6. SAGGI FUNZIONALI

6.1 SAGGIO DI INCORPORAZIONE DI $^3\text{[H]}$ -PROLINA

La sintesi e la secrezione di collagene è stata determinata mediante saggio di incorporazione di idrossiprolina triziata originariamente sviluppato da Peterkofsky e Diegelmann [55].

2×10^4 cellule vengono piastrate in piastre da 24 pozzetti e coltivate per 24 ore in SM al 10% FBS, e successivamente per 24 ore in SM al 0.1% FBS. A ciascun pozzetto, vengono aggiunti $0.5 \mu\text{Ci } ^3\text{[H]}$ -prolina (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, USA) in SM al 0.1% FBS. Dopo 72 ore di incubazione, le cellule vengono lisate con 10% SDS, mentre il terreno di coltura viene incubato per 30 min a 4°C con un ugual volume di 20% acido tricloroacetico (TCA) e centrifugato ($13000g$ per 15 minuti) per determinare la precipitazione delle proteine. Il pellet proteico viene lavato con 10% TCA e risospeso in $200 \mu\text{l}$ di 0.3 M NaOH , 0.3% SDS. La radioattività del lisato cellulare e del terreno di coltura viene quantificata mediante lettura al β -couter (PerkinElmer). L'incorporazione di $^3\text{[H]}$ -prolina viene normalizzata rispetto al contenuto di DNA, stimato misurando la densità ottica del campione a 260 nm . Ciascun campione è stato valutato in duplicato e analizzato in tre esperimenti indipendenti.

6.2 STIMA DELLA LUNGHEZZA DEL CICLO CELLULARE E SAGGIO DI PROLIFERAZIONE

La proliferazione di fibroblasti ALMS e di fibroblasti di controllo è stata valutata utilizzando il kit CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega Corporation, Madison, USA), che permette di determinare il numero di cellule vitali in coltura sulla base della quantificazione dell'ATP presente, in quanto indice di cellule metabolicamente attive.

Le cellule sono mantenute in SM al 10% FBS, e sincronizzate mediante raggiungimento di una confluenza dell'80%. 2.5×10^3 cellule sono piastrate in piastre da 96 pozzetti in SM al 10% FBS o in SM al 2% FBS. In un secondo set di esperimenti, fibroblasti sub-confluenti vengono mantenuti in assenza di siero per 48 ore e quindi piastrati in piastre da 96 pozzetti alla stessa densità in SM al 10% FBS. Al tempo 0 e dopo 72 ore, il numero di cellule viene determinato utilizzando il kit, secondo le istruzioni fornite dalla ditta fornitrice. Brevemente, la piastra viene equilibrata a temperatura ambiente per 30 minuti; al medium di coltura di ciascun pozzetto viene aggiunto in rapporto 1:1 il reagente CellTiter-Glo®. La piastra viene incubata a temperatura ambiente per 10 minuti per stabilizzare il segnale di luminescenza, prima della lettura al luminometro (Victor™, PerkinElmer). Ciascun campione è stato valutato in triplicato e analizzato in tre esperimenti indipendenti.

Il tempo di proliferazione cellulare viene stimato utilizzando la seguente equazione:

$$g = 72 \text{ h} \times \frac{\log 2}{\log (N_{72h}/N_{0h})}$$

in cui g è il tempo di generazione durante la fase logaritmica della curva di crescita, N_{72h} è il numero di cellule a 72 ore e N_{0h} è il numero di cellule al tempo 0.

La proliferazione in risposta a stimolazione è stata valutata dopo trattamento con 10 ng/ml TGF- β , o 100 ng/ml CTGF, o 10 ng/ml FGF2 (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA) in SM al 2% FBS per 72 ore e espressa come percentuale di incremento del numero di cellule rispetto alle colture non stimolate.

6.3 SAGGIO DI VITALITA' CELLULARE

La risposta di colture di fibroblasti al trattamento con stimoli apoptotici è stata valutata utilizzando il saggio di vitalità MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]2,5-diphenyltetrazolium bromide, SIGMA) [56], che permette di valutare la presenza di cellule vitali in basa alla loro capacità di metabolizzare sali di tetrazolio in un composto insolubile, il formazano, che si accumula nelle cellule in forma di granuli colorati.

1×10^4 cellule sono seminate in pozzetti di una piastra da 96 pozzetti in SM al 10% FBS e trattate con 100 nM taspigargina (THAP), 100 nM staurosporina (STP), 100 ng/ml TNF- α per 48 ore, o con 100 μ g/ml cicloesimide (CX) o 100 μ M C₂-ceramide (C₂-C) (SIGMA) per 24 ore. Al termine del tempo di incubazione, a ciascun pozzetto viene aggiunta una soluzione di MTT in PBS (0,4 mg/ml) e la piastra è incubata per 3 ore a 37°C. Il terreno di coltura viene quindi rimosso e i cristalli di formazano vengono solubilizzati in 150 μ l/pozzetto di DMSO. La piastra viene lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 30-45 minuti. La densità ottica, proporzionale al numero di cellule vitali, viene determinata mediante lettura allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 550 nm, ed è stata espressa come percentuale dell'assorbanza rispetto alle cellule non trattate. Ciascun campione è stato valutato in triplicato e analizzato in tre esperimenti indipendenti.

6.4 ANALISI DEL CICLO CELLULARE

La distribuzione nelle diverse fasi del ciclo cellulare di colture di fibroblasti ALMS e di controllo in condizioni basali e dopo trattamento con stimoli apoptotici è stata valutata mediante analisi al citofluorimetro, utilizzando il metodo descritto da Nicoletti *et al.* [57].

1×10^6 cellule vengono lavate con PBS, fissate con 70% (v/v) etanolo freddo per 30 minuti a 4°C, centrifugate (300 g per 8 minuti) e lavate nuovamente con PBS. Il contenuto di DNA di ciascuna cellula viene evidenziato mediante colorazione con 50 mg/ml ioduro di propidio, in presenza di 0,5 mg/ml RNase A (SIGMA) a 4°C al buio per 30 minuti, e successiva analisi al citofluorimetro (Becton Dickinson Immunocytometry System).

6.5 SAGGIO TUNEL

La frammentazione del DNA, considerata un'impronta biochimica dell'apoptosi, è stata analizzata mediante saggio TUNEL utilizzando il kit DeatEnd™ Fluorimetric TUNEL System (PROMEGA), in cellule adese mediante microscopia a fluorescenza, e in sospensione mediante analisi citofluorimetrica. Brevemente, i fibroblasti vengono piastrati su vetrini a una densità di 2×10^4 cellule/cm², e trattate con stimoli apoptotici come descritto precedentemente. Le cellule sono fissate in 4% paraformaldeide in PBS e permeabilizzate in 0.2% Triton X-100 in PBS a temperatura ambiente per 5 minuti. Il DNA viene marcato con fluoresceina-12-dUTP utilizzando l'enzima deosinucleotil terminal transferasi (rTdT) per 1 minuto a 37°C in ambiente umidificato. La reazione viene bloccata con 300 mM cloruro di sodio, 30 mM sodio citrato a temperatura ambiente per 15 minuti. I nuclei vengono contro-colorati con 4,6-diamidino-2-fenilindolo (DAPI, Vectashield® , Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). I vetrini vengono analizzati al microscopio (Leica DM LB2, Leica Microsystem).

I nuclei positivi alla marcatura sono stati quantificati mediante analisi al citofluorimetro. Dopo trattamento con stimoli apoptotici, i fibroblasti vengono staccati dal supporto di plastica utilizzando 25% tripsina (v/v) e 2×10^6 cellule vengono fissate in 1% paraformaldeide in PBS per 20 minuti a 4°C e permeabilizzate con 70% (v/v) etanolo freddo a -20°C per almeno 4 ore. Il DNA viene marcato come precedentemente descritto e la reazione viene bloccata mediante aggiunta di 20 mM EDTA. Le cellule sono colorate con 50 mg/ml ioduro di propidio, in presenza di 0,5 mg/ml RNase A (SIGMA) a 4°C al buio per 30 minuti, e successivamente analizzate al citofluorimetro (Becton Dickinson Immunocytometry System). Linfomonociti isolati da controlli sani e trattati per 48 ore con 1 µM dexamethasone [58] sono stati utilizzati come controllo positivo, ottenendo un 30% di cellule positive alla marcatura con il TUNEL (dato non riportato).

7. STATISTICA

Tutti i risultati sono espressi come media \pm errore standard della media (SEM). L'analisi statistica tra 2 set di dati è stata effettuata utilizzando il test *t* di Student (2 code) o il test di Mann Whitney (2 code) sulla base della distribuzione e della

dimensione dei campioni. Le differenze sono state considerate statisticamente significative con valori $P < 0.05$.

IV. Risultati

1. IL TEST GENETICO

Il ruolo e l'utilità dell'analisi genetica per la ricerca di mutazioni in pazienti ALMS o in familiari è ancora dibattuto. La disponibilità di un test genetico diagnostico apre inoltre numerosi nuovi interrogativi, che riguardano principalmente gli aspetti legati a una corretta informazione (consulenza genetica), soprattutto nel caso di gravidanze a rischio, sulla natura, l'ereditarietà e le implicazioni della malattia genetica [59].

Dal 2006 è possibile effettuare presso i laboratori della Clinica Medica 3 un test genetico per la ricerca di mutazioni del gene *ALMS1*, erogabile come prestazione di nicchia a soggetti provenienti da tutto il territorio nazionale.

L'analisi genetica disponibile è basata sul sequenziamento diretto del gene *ALMS1* in soggetti che presentano un elevato sospetto clinico di essere affetti da ALMS.

I pazienti vengono caratterizzati per la presenza di variazioni negli esoni 8, 10 e 16, in cui sono state identificate la maggior parte delle mutazioni note, nel gDNA ottenuto da un prelievo di sangue periferico. Nel caso questa prima analisi non permetta di identificare alcuna mutazione, o evidenzi la presenza di un singolo allele mutato, la ricerca di mutazioni procede con il sequenziamento completo dell'intera ORF del gene *ALMS1*, mediante analisi del cDNA ottenuto dalla retrotrascrizione dell'mRNA estratto da colture primarie di fibroblasti isolati da una biopsia cutanea del paziente per il quale esista il sospetto di ALMS.

Nel biennio 2006-2008, sono stati analizzati 23 casi sospetti di ALMS, di cui 12 (52%) seguiti presso strutture afferenti l'Azienda Ospedaliera di Padova, 10 provenienti da altri centri italiani e 1 soggetto macedone.

La ricerca di mutazioni su gDNA è stato eseguito nell'83% dei casi, mentre solo in 3 soggetti (17%) è stata eseguita l'analisi completa del trascritto.

Il test genetico è stato richiesto nella maggior parte dei casi (79%) sulla base di un elevato sospetto clinico di ALMS. Il 16% delle richieste è invece pervenuto da familiari di pazienti ALMS, in particolare nel caso di gravidanze. L'indagine è stata inoltre eseguita in un paziente deceduto, sospettato a posteriori essere affetto da ALMS. Infine, 2 pazienti, precedentemente diagnosticati da parte del Jackson Laboratory, nel contesto di un progetto di ricerca, necessitavano di una diagnosi di conferma per ragioni medico-legali.

Tra i 21 soggetti analizzati per la ricerca di mutazioni del gene *ALMS1* sulla base di un elevato sospetto clinico, 16 (79%) sono risultati positivi per la presenza di mutazioni, mentre in 5 individui non sono state identificate variazioni della sequenza genica.

L'analisi genetica ha permesso di identificare 5 nuove varianti del gene *ALMS1* associate alla patologia, non precedentemente descritte in letteratura (Figura 2). Si tratta di una inserzione nell'esone 16 (c.[10830_10831insC]), di una sostituzione nucleotidica nell'esone 10 (c.[8039G>A]), di due delezioni nell'esone 8 (c.[3020_3021delG]; c.[5283_5384delA]) e di una inserzione (c.[1568_1569insT]) che rappresenta la variazione nota più precoce nell'esone 8.

Sulla base dei risultati ottenuti possiamo concludere che l'associazione di un'accurata diagnosi clinica e del test genetico reso disponibile sembra permettere

la formulazione di una diagnosi conclusiva di ALMS in circa l'80% dei casi sospetti.

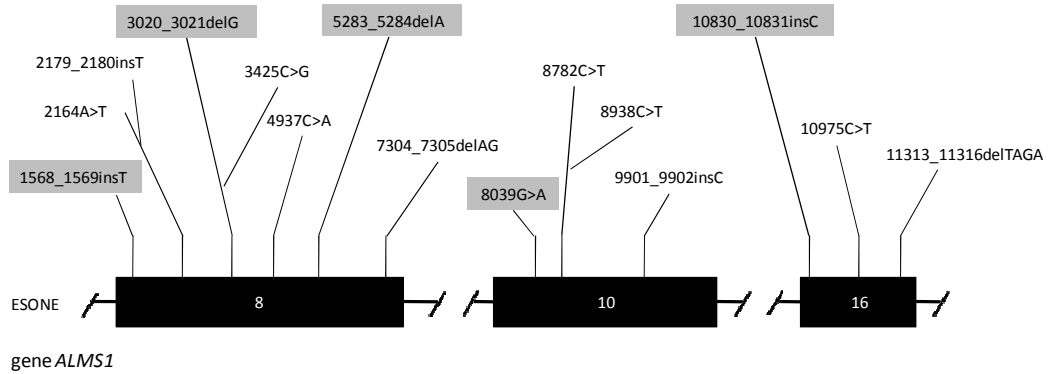


Figura 2. Rappresentazione schematica degli esoni 8, 10 e 16 del gene *ALMS1* in cui sono riportate le posizioni delle mutazioni identificate nei pazienti analizzati presso la Clinica Medica 3. In grigio sono evidenziate le 5 nuove varianti identificate dalla nostra analisi genetica, non descritte precedentemente in letteratura.

L'analisi delle mutazioni su cDNA offre numerosi vantaggi per la possibilità di evidenziare sia mutazioni che non localizzano a livello degli esoni 8, 10 e 16, sia eventuali mutazioni a livello delle giunzioni introne-esone o a livello di sequenze regolatorie, che possono dare luogo a eventi di splicing non corretti, e che non potrebbero essere evidenziabili se l'analisi fosse eseguita solo a livello genomico. Nonostante l'elevata efficienza di questo tipo di analisi, l'invasività della biopsia cutanea per il paziente, necessaria per l'isolamento dei fibroblasti da cui ottenere il cDNA, solleva la necessità di sviluppare nuove strategie diagnostiche.

A questo scopo stiamo sviluppando un nuovo test diagnostico basato sul sequenziamento dell'intero trascritto da cDNA ottenuto da linfomonociti isolati da sangue periferico, che abbiamo dimostrato esprimere a livelli rilevabili il gene *ALMS1*. I linfomonociti rappresentano un sistema cellulare facilmente accessibile

e isolabile rispetto ai fibroblasti del derma, e il loro utilizzo permetterebbe inoltre di ovviare alle problematiche intrinseche legate alla stabilizzazione di colture primarie.

Allo scopo di minimizzare i costi e i tempi di realizzazione del test, stiamo inoltre cercando di ottimizzare le condizioni di amplificazione del cDNA, progettando per esempio set di coppie di primers che permettano di ridurre il numero di reazioni di PCR, ottenendo la maggiore informatività dall'analisi di sequenza.

2. STUDI DI ESPRESSIONE GENICA E FUNZIONALI IN FIBROBLASTI ALMS

2.1 CARATTERIZZAZIONE MORFOLOGICA DEI FIBROBLASTI ALMS

I fibroblasti isolati dai pazienti ALMS (PT1-PT4) e dai soggetti di controllo (C1-C3) sono stati come prima cosa caratterizzati morfologicamente.

L'analisi delle colture bidimensionali dopo colorazione con ematossilina-eosina ha permesso di evidenziare nei fibroblasti ALMS una forma più allungata e la presenza di estensioni citoplasmatiche che non si osservano nei fibroblasti di controllo (Figura 3a, b). La lunghezza cellulare media dei fibroblasti adesi, stimata utilizzando il software in dotazione al microscopio ottico, è risultata infatti significativamente maggiore nei fibroblasti ALMS (Figura 3c), che sembrano inoltre aderire occupando una superficie più estesa, rispetto alle cellule di controllo (Figura 3d).

I fibroblasti ALMS e di controllo in sospensione, staccati dopo trattamento con tripsina e analizzati al citofluorimetro per le caratteristiche di forward scatter (FSC), sono invece risultati simili in dimensioni (Figura 3e). L'analisi citofluorimetrica delle proprietà di side scatter (SSC) ha evidenziato una maggiore complessità intracitoplasmatica nei fibroblasti ALMS (Figura 3f), in particolare confrontando i fibroblasti del controllo 1 (C1) e del paziente 1 (PT1) (Figure 3g).

Le colture di fibroblasti sono state coltivate in supporti tridimensionali di acido ialuronico (colture 3D), allo scopo di mimare condizioni di stress dinamico che stimolano la sintesi di molecole tipiche della ECM. Lo staining con ematossilina-eosina ha evidenziato una ridotta motilità nei fibroblasti ALMS, che

non penetrano all'interno della struttura di biomateriale (Figura 3i), a differenza dei fibroblasti di controllo che mostrano una crescita normale all'interno della matrice tridimensionale (Figura 3h). L'incapacità dei fibroblasti ALMS di colonizzare gli strati più interni della struttura 3D, rimanendo tuttavia vitali, si traduce in una pluristratificazione delle cellule a livello della superficie più esterna del biomateriale (Figura 3i).

I fibroblasti di controllo, analizzati al microscopio elettronico, presentano una morfologia normale, tipicamente bipolare e occasionalmente tripolare (Figura 3l), e un nucleo ovoidale con due - cinque nucleoli. Il citoplasma è caratterizzato dalla presenza di un reticolo endoplasmatico ruvido e liscio sviluppati, numerosi mitocondri e alcuni lisosomi. In prossimità della membrana plasmatica è possibile osservare numerosi microfilamenti che risultano riarrangiati perpendicolarmente fra loro e rispetto l'orientamento del nucleo (Figura 3n). La presenza di vescicole di pinocitosi nello spazio perimembranario e di fibre collagene nella regione extracellulare indica una normale attività di secrezione di materiale fibroso che andrà a costituire la ECM (Figure 3p).

I fibroblasti ALMS mostrano invece nuclei allungati e la presenza di estroflessioni citoplasmatiche, che appaiono strettamente ancorate alle cellule adiacenti negli spazi extracellulari (Figura 3m). Il citoplasma presenta numerosi mitocondri, lisosomi, e microfilamenti che appaiono organizzati in un'unica direzione, parallela alla polarità della cellula (Figura 3o). La presenza di molte vescicole di esocitosi e di numerose fibre collagene, sia all'interno, sia all'esterno della cellula, suggerisce una aumentata secrezione di ECM (Figura 3q).

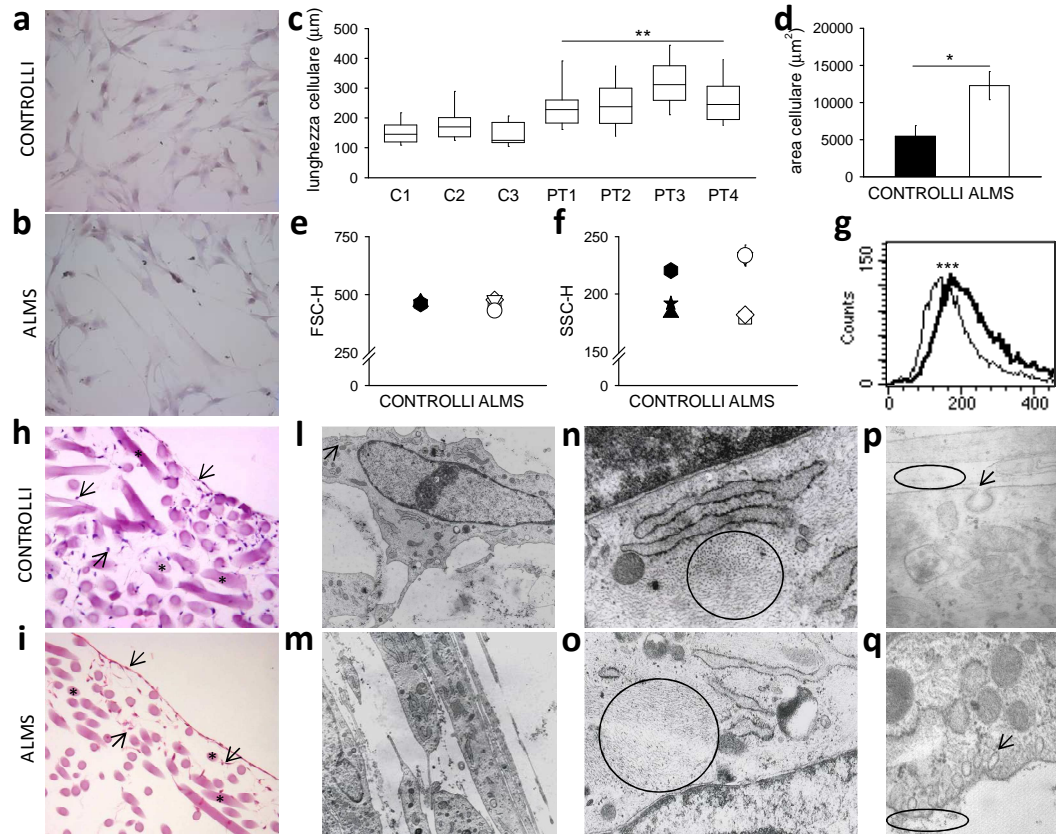


Figura 3. Analisi morfologica dei fibroblasti ALMS. Colture bidimensionali di (a) fibroblasti di controllo e (b) di pazienti ALMS sono state colorate con ematossilina-eosina (20X). (c) La lunghezza longitudinale di 40 cellule per ciascuna linea è stata misurando utilizzando il software in dotazione al microscopio ottico. I limiti superiore e inferiore del plot indicano rispettivamente il 75° e il 25° percentile, le linee verticali indicano il 90° e il 10° percentile, mentre la linea orizzontale indica la media delle lunghezze. $**P < 0.01$ lunghezza media dei fibroblasti ALMS *versus* lunghezza media dei controlli. (d) La superficie di adesione dei fibroblasti durante la fase logaritmica di crescita è stata stimata sulla base del rapporto tra il numero di cellule contate in una fiasca T75 e l'area della fiasca stessa. Il risultato è espresso come media \pm SEM. $*P < 0.05$. I fibroblasti ALMS sono stati confrontati con i fibroblasti di controllo attraverso analisi citofluorimetrica: sono riportati i valori medi di intensità di (e) forward (FSC) e (f) side (SSC) light scatter di ciascun campione. Controlli: C1, triangolo nero; C2, stella nera; C3, diamante nero; Pazienti: PT1, cerchio bianco; PT2, quadrato bianco; PT3, triangolo bianco; PT4, rombo bianco (vedere Tabella 1). Il pannello g riporta la distribuzione della popolazione cellulare del C1 (linea nera) e del PT1 (linea grigia) analizzata per le proprietà di SSC, ed evidenzia uno spostamento altamente significativo ($***P < 0.001$, analisi statistica di Kolmogorov-Smirnov, realizzata con il software Macintosh CELLQuest in dotazione al citofluorimetro, Becton Dicknson). Colture tridimensionali di (h) fibroblasti di controllo e (i) di pazienti ALMS sono state colorate con ematossilina-eosina (5X; * fibre di biomateriale; \rightarrow fibroblasti). Colture tridimensionali di (l-n-p) fibroblasti di controllo e (m-o-p) di pazienti ALMS sono state analizzate al microscopio

elettronico. Fibroblasti di controllo presentano una morfologia normale, tipicamente bipolare (l), un citoplasma ricco in microfilamenti orientati perpendicolarmente tra loro (n, cerchio) e una normale secrezione di ECM, confermata dalla presenza di vescicole di pinocitosi (l, freccia e p) e di fibre collagene nello spazio extracellulare (p, cerchio). Fibroblasti ALMS risultano invece allungati e strettamente aderenti l'uno all'altro, mostrando la presenza di lunghe estroflessioni citoplasmatiche (m). Le fibre del citoscheletro (o, cerchio) appaiono distribuite preferenzialmente in un'unica direzione, parallela all'asse longitudinale della cellula. La presenza di molte vescicole di esocitosi e di fibre collagene (q, freccia e cerchio, rispettivamente) suggerisce vi sia una secrezione di ECM aumentata. Ingrandimenti: l=2500X; m=100X; n-o=25000X; p=22000X; q=20000X.

2.2 GENI DIFFERENZIALMENTE ESPRESSI NEI FIBROBLASTI ALMS

Al fine di evidenziare differenze tra il profilo di espressione genica di fibroblasti ALMS e di controllo, legate alla presenza del trascritto mutato del gene *ALMS1*, abbiamo eseguito un esperimento di DNA microarrays.

L'analisi statistica dei dati ottenuti ha permesso di identificare tra i circa 21500 oligonucleotidi depositati, ciascuno corrispondente a una sequenza genica unica, un totale di 560 geni differenzialmente espressi tra i fibroblasti ALMS e i fibroblasti di controllo, di cui 188 geni sono risultati up-regolati e 372 down-regolati nei fibroblasti ALMS.

Per correlare i dati ottenuti dall'interpretazione degli arrays dopo l'analisi statistica a un significato biologico, abbiamo utilizzato due banche dati pubbliche, la Gene Ontology [53] (Gene Ontology, <http://www.geneontology.org/>) e il KEGG database [54] (Kyoto Encyclopedia of Gene and Genome, <http://www.genome.jp/kegg/>), e analizzato la letteratura disponibile per ciascun gene modulato (approccio *gene by gene*).

L'analisi effettuata con Gene Ontology ha permesso di identificare nella categoria *processi biologici* la modulazione di numerosi messaggeri che svolgono funzioni

correlate con la proliferazione, il metabolismo cellulare, in particolare quello di purine e pirimidine, e l'organizzazione del citoscheletro. All'interno della categoria delle *componenti cellulari*, sono risultati modulati messaggeri di proteine collagene e della matrice extracellulare, proteine coinvolte nella replicazione cellulare, componenti dei microtubuli e dei filamenti intermedi (Tabella 2).

L'analisi dei diagrammi del KEGG database ha indicato la modulazione nei fibroblasti ALMS dei seguenti *pathways*: *cell cycle*, *cell communication*, *ECM (extracellular matrix) receptor interaction* (Appendice 2).

L'integrazione delle informazioni evidenziate dall'utilizzo delle banche dati e dall'analisi *gene by gene* ha permesso di classificare i geni differenzialmente espressi nei fibroblasti ALMS nelle seguenti categorie: 'ciclo cellulare', 'componenti della ECM/regolazione della fibrosi', 'adesione/motilità cellulare' e 'apoptosi' (Figura 4). In appendice 1 è riportata la descrizione dei geni modulati all'interno di ciascuna categoria, e il loro fold change d'espressione (Tabella 3).

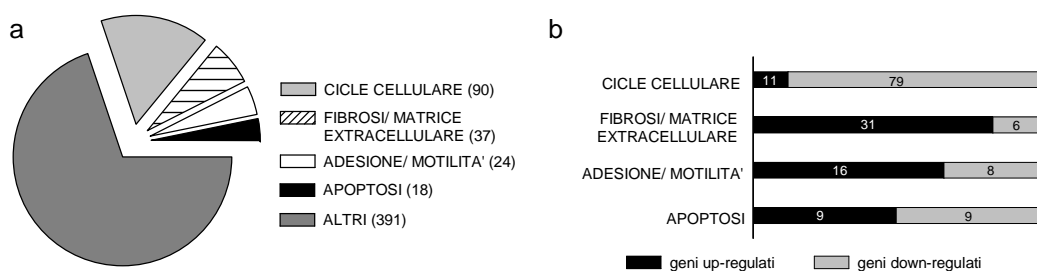


Figura 4. Distribuzione dei geni differenzialmente espressi nei fibroblasti ALMS. Il profilo d'espressione genica di fibroblasti ALMS e di controllo è stato analizzato eseguendo un esperimento di DNA microarrays. (a) Il grafico a torta riporta la percentuale dei geni differenzialmente espressi nei fibroblasti ALMS (n=560) ordinati nelle seguenti categorie: ciclo cellulare (n=90), componenti della ECM/regolazione della fibrosi (n=37), adesione/motilità cellulare (n=24) e apoptosi (n=18). (b) Il grafico a barre riporta il numero e la distribuzione dei geni up- (nero) e down- (grigio) regolati di ciascuna categoria.

TABELLA 2. Distribuzione nella Gene Ontology dei geni differenzialmente espressi nei fibroblasti ALMS.

PROCESSI BIOLOGICI	GO ID	P-Value Changed genes	COMPONENTI CELLULARI	GO ID	P-Value Changed genes	FUNCTIONI MOLECOLARI	GO ID	P-Value Changed genes			
Cell Cycle	7049	0	Collagen	5581	0	Growth Factor Binding	5520	0			
	75	0		5583	0		19838	0			
	87	0		5588	0.0072	Binding to Extracellular Matrix Constituent	5540	0.0015			
	278	0		5598	0.0498		5518	0.0041			
	279	0		5595	0.0498		5521	0.0072			
	7067	0		5591	0.0498		5539	0.009			
	51301	0	5586	0.0498	30247		0.0099				
	7088	0.0002	5582	0.0498	1871		0.0127				
	7093	0.0002	Microfibril	1527	0.0001	Extracellular Matrix Constituent	5201	0.002			
	74	0.0015		Fibril	43205	0.0005	DNA-Dependent ATPase Activity	8094	0.0022		
	51726	0.0015	DNA Primase Activity				3896	0.0025			
	51325	0.0049	Extracellular Matrix				5578	0.0057	DNA-Methyltransferase Activity	9008	0.0324
	51329	0.0049					31012	0.0059	3886	0.0223	
	82	0.0129	DNA Polymerase Complex	5660	0	ss DNA Binding	3697	0.0333			
	7094	0.0139		5659	0	DNA Polymerase Activity	30337	0.0498			
	16043	0.0238		5658	0.0001	3887	0.0428				
	8283	0.0248		42575	0.0002	RR Activity	4748	0.0139			
	7346	0.0422		5662	0.0072	Nucleotidyltransferase Activity	16779	0.0447			
	7089	0.0439		5663	0.0139	Adenosine Deaminase Activity	4000	0.0139			
	7064	0.0498	Replisome	30894	0	Microtubule Motor Activity	3777	0.0152			
7095	0.0498	5657		0	Motor Activity	3774	0.0393				
31572	0.0498	RR complex	43601	0	Nuclear Chromosome	5971	0.0498				
31576	0.0498		43596	0				228	0		
1558	0.0001	Nuclear Chromosome	5694	0	Chromosome Region	775	0.0001				
40008	0.0002		794	0.0053				Cohesin Core Heterodimer	8280	0.0498	
16049	0.0003		793	0.0155	Kinetochore	776	0				
Regulation of Cell Growth	79		0.0008	5819	0.0001	Spindle	5816	0.0072			
Regulation of cdk Activity	7051	0	Microtubule Cytoskeleton	15630	0.0097	Polar Microtubule	5827	0.0498			
Spindle Organization and Biogenesis	31577	0.0139		Contractile Ring	5826		0.0498	Intermediate Filament Cytoskeleton	45111	0.0102	
DNA Replication	212	0.0498	Kinesin Complex		5871	0.015	Nucleus		5634	0.0285	
	6260	0		Eukaryotic Translation Initiation Factor 2B Complex	5851	0.0498		5635	0.0447		
	6270	0.0008	Nucleus		5634	5635	5634	0.0285			
	6269	0.0072		Microtubule Cytoskeleton					15630	0.0097	
	6273	0.0072	Polar Microtubule		5827	0.0498					
	6275	0.0113		Contractile Ring			5826	0.0498			
8156	0.0139	Intermediate Filament Cytoskeleton	45111		0.0102						
DNA Metabolism	6259			0		Kinesin Complex	5871	0.015			
Microtubule Cytoskeleton Organization and Biogenesis	51052	0.0007	Nucleus	5634	5635				5634	0.0285	
	51053	0.0011				Eukaryotic Translation Initiation Factor 2B Complex	5851	0.0498			
	9221	0.0025	Microtubule Cytoskeleton	15630	0.0097						
	9263	0.0072				Polar Microtubule	5827	0.0498			
	226	0	Contractile Ring	5826	0.0498						
	7017	0.0001				Intermediate Filament Cytoskeleton	45111	0.0102			
	7018	0.0387	Kinesin Complex	5871	0.015						
	72	0.0498				Nucleus	5634	5635	5634	0.0285	
	9186	0.0139	Eukaryotic Translation Initiation Factor 2B Complex	5851	0.0498						
	9219	0.0139				Microtubule Cytoskeleton	15630	0.0097			
	9132	0.0324	Polar Microtubule	5827	0.0498						
	6221	0.0422				Contractile Ring	5826	0.0498			
	9124	0.0495	Intermediate Filament Cytoskeleton	45111	0.0102						
	9123	0.0495				Kinesin Complex	5871	0.015			
	6231	0.0498	Nucleus	5634	5635				5634	0.0285	
	6233	0.0498				Eukaryotic Translation Initiation Factor 2B Complex	5851	0.0498			
6235	0.0498	Microtubule Cytoskeleton	15630	0.0097							
9139	0.0498				Polar Microtubule	5827	0.0498				
9148	0.0498	Contractile Ring	5826	0.0498							
9157	0.0498				Intermediate Filament Cytoskeleton	45111	0.0102				
9162	0.0498	Kinesin Complex	5871	0.015							

I geni identificati differenzialmente espressi nei fibroblasti ALMS dall'analisi statistica dei dati di microarrays sono stati ordinati nella 3 categorie principali della Gene Ontology, utilizzando il software GoMiner. Per ciascuna categoria è riportato il significato statistico (p-value changed gene) e il numero di accesso dei relativi geni (GO ID).

Geni del ciclo cellulare sono down-regolati nei fibroblasti ALMS

L'analisi comparativa del profilo d'espressione ha evidenziato nei fibroblasti ALMS la modulazione di molti geni coinvolti nel controllo del ciclo cellulare, che suggerisce un rallentamento della progressione attraverso le fasi del ciclo.

La maggior parte dei geni sono risultati down-regolati nei fibroblasti ALMS e codifica per proteine direttamente coinvolte nella progressione del ciclo cellulare, nella replicazione, nell'assemblaggio e nella regolazione del centrosoma/cinetocoro.

Tra i geni che mostrano una riduzione dei loro livelli di espressione genica è possibile identificare molte cicline e chinasi dipendenti da cicline (*CKS2*, *CCNE2*, *CDC2*, *CCNB1*, *CDC20*, *CCNA2*, *CDC6*), la cui associazione guida normalmente la progressione attraverso le fasi del ciclo cellulare. Inoltre, è stata osservata la down-regolazione di geni coinvolti nella duplicazione del DNA, fra cui geni per componenti del complesso MCM (*MCM2*, *MCM3*, *MCM4*, *MCM6*), per proteine coinvolte nella formazione dell'apparato di replicazione del DNA, come *RFC3*, *RFC4*, *RFC5*, e per le 2 subunità dell'enzima DNA primasi (*PRIM2A* e *PRIM1*). Sono risultati down-regolati messaggeri che codificano enzimi direttamente coinvolti nella sintesi dei deossinucleotidi (*RRM1*, *RRM2* e *DTYMK*), che suggeriscono possa esservi una riduzione nella disponibilità di substrati per la sintesi del DNA.

L'analisi dei geni differenzialmente espressi ha inoltre sottolineato la riduzione dell'espressione di geni implicati nella mitosi, la maggior parte dei quali risulta coinvolta nell'assemblaggio e nella regolazione dei centrosomi. In particolare, abbiamo osservato la modulazione di geni implicati nella polimerizzazione dei microtubuli, nell'organizzazione del fuso mitotico (*STK6*, *MAD2*, *MAD2L1*,

RCC1, CDCA8, STMN1) e del complesso centrosoma/cinetocoro (*SPBC25, OIP5, C20orf129, CEP55, CENPM, H2AFZ, CENPF*), che nel loro insieme regolano la segregazione dei cromatidi fratelli.

Geni associati alla matrice extracellulare, alla fibrosi, all'adesione e alla motilità cellulare sono up-regolati nei fibroblasti ALMS

L'analisi dei dati di microarrays ha permesso di sottolineare una importante up-regolazione di geni che codificano per componenti della ECM nei fibroblasti ALMS, tra cui si osservano trascritti che codificano per diverse isoforme collagene (*COL1A1, COL3A1, COL4A1, COL5A1, COL5A2, COL8A1, COL11A1, COL12A1, COL15A1*) e per proteine coinvolte nel loro assemblaggio in catene (*P4HA1, LEPRE1* e *SERPINH1*). Abbiamo inoltre osservato un aumento nei livelli di espressione di messaggeri per proteoglicani (*CSPG2, LUM, SDC2, ASPN*) e per enzimi coinvolti nella loro sintesi e regolazione.

Sono risultati up-regolati geni per proteine coinvolti nella formazione di strutture di adesione focale (*TNS* e *LIMS2*) e del complesso distrofina-glicoproteina (*SGCD*), che sono generalmente implicati nella regolazione delle interazioni tra citoscheletro e ECM. Analogamente, l'over-espressione dei geni *ITGA11, ITGB5, LIMS2, LGALS3BP* (noto anche come *M2BP*), *MFAP2* e *MFAP4* suggerisce vi sia un legame cellulare molto stretto alla ECM.

L'analisi d'espressione genica ha evidenziato la modulazione di geni che sono stati associati alla fibrosi. È stata osservata l'up-regolazione di *POSTN, IGFBP3, IGFBP5*, e la modulazione di 4 dei 6 membri della famiglia delle proteine CCN (dal nome dei tre membri: *CYR61, CTGF, NOV*). In particolare, *CTGF, WISP1* e *CYR61* mostrano un aumento nei loro livelli di espressione,

mentre *NOV*, per il quale recentemente è stato proposto un ruolo come inibitore del processo di fibrosi, è risultato down-regolato. Infine, abbiamo osservato l'aumento dell'espressione genica di *ACTA2* (*α-SMA*), noto come marker di attivazione di fibroblasti in miofibroblasti.

L'insieme dei dati di espressione suggerisce che i fibroblasti ALMS possiedano un fenotipo pro-fibrotico e possano produrre un eccesso di componenti della ECM, alla quale sembrano aderire strettamente.

Geni associati all'apoptosi sono modulati nei fibroblasti ALMS

L'utilizzo della Gene Ontology [53] ha permesso di identificare tra i geni differenzialmente espressi solo tre trascritti direttamente associati all'apoptosi (*IL24*, *GULP1*, *NALP1*). Diversamente, l'approccio *gene by gene* ha evidenziato la modulazione di diversi geni coinvolti nella regolazione dell'apoptosi, suggerendo che i fibroblasti ALMS possiedano un fenotipo 'di sopravvivenza'. In particolare, sono risultati up-regolati trascritti coinvolti nel controllo della morte cellulare indotta da stress, come *EDIL3*, *MEF2C* e *POSTN* che mostra il più alto fold change tra i fibroblasti ALMS e di controllo. Abbiamo osservato la riduzione dell'espressione di *IL24*, *SALL2* e *MAF* che sono implicati nel mantenimento dell'equilibrio all'interno della famiglia dei geni *BCL-2*. Sono infine risultati down-regolati geni che interagiscono con le caspasi e ne regolano la funzione, come *NALP1*, *GULP1* e *GUGBP2*.

2.3 I FIBROBLASTI ALMS MOSTRANO UN'AUMENTATA ESPRESSIONE E SINTESI DI COMPONENTI DELLA ECM

L'espressione differenziale di diversi geni per componenti della ECM, evidenziata dall'analisi comparativa del profilo d'espressione genica dei fibroblasti ALMS e di controllo, è stata confermata in un set indipendente di colture di fibroblasti mediante qPCR, metodica considerata gold-standard per l'analisi quantitativa di espressione genica. Come mostrato in Figura 5a, tutti i trascritti analizzati (*POSTN*, *ACTA2*, collagene) sono risultati up-regolati nei fibroblasti ALMS (incremento compreso tra 1.5 e 151 volte). La variazione di espressione dei geni *ACTA2* e collagene evidenziata mediante qPCR ha mostrato una correlazione altamente significativa tra i dati di espressione ottenuti mediante l'esperimento di microarrays (coefficiente di Pearson= 0.8; coefficiente di determinazione, $R^2=$ 0.65; coefficiente angolare, $m=$ 0.42), confermando l'andamento e l'intensità del cambiamento di espressione genica fra i fibroblasti ALMS e di controllo (Figura 5b). Tra il gruppo dei geni collagene, il *COL8A1* e il *COL15A1* presentano la differenza maggiore nel loro livello di espressione genica tra le cellule di controllo e dei pazienti ALMS. Inoltre, il livello d'espressione del gene *COL15A1* risulta fra più bassi dei geni per le diverse forme di collagene analizzati (Figura 1, Appendice 1).

Al fine di confermare i dati di espressione dei geni collagene, fibroblasti ALMS e di controllo sono stati analizzati per la loro capacità di incorporazione di $^3\text{[H]}$ -prolina. La $^3\text{[H]}$ -prolina è uno dei 3 aminoacidi principali che costituiscono le catene polipeptidiche delle proteine collagene, e la quantificazione della sua incorporazione mediante utilizzo di analoghi radiomarcanti è utilizzata come indice della sintesi proteica di collagene [55]. L'analisi ha evidenziato nei fibroblasti

ALMS un aumento della sintesi di collagene di due volte rispetto ai fibroblasti di controllo, nelle proteine presenti all'interno sia del lisato cellulare (produzione), sia del mezzo di coltura (secrezione) (Figura 5.3c).

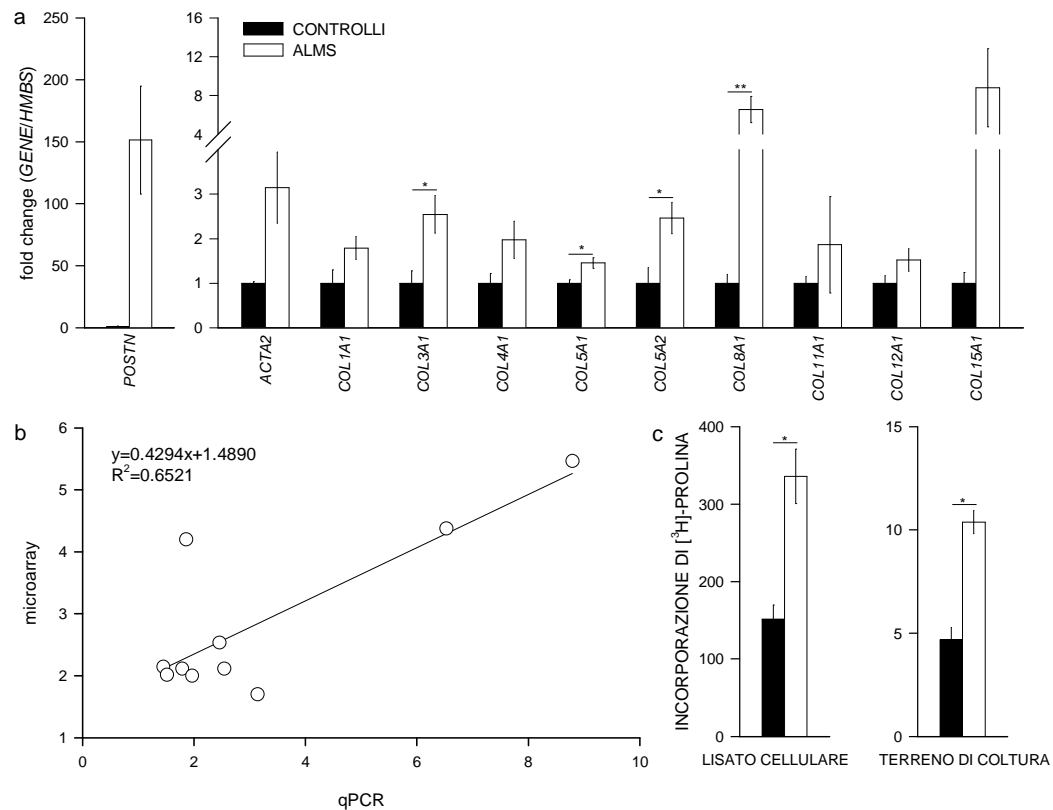


Figura 5. Aumento dell'espressione e della sintesi di componenti della ECM nei fibroblasti ALMS. (a) L'espressione dei trascritti *POSTN*, *ACTA2*, *COL1A1*, *COL3A1*, *COL4A1*, *COL5A1*, *COL5A2*, *COL8A1*, *COL11A1*, *COL12A1*, *COL15A1* è stata quantificata nei fibroblasti dei controlli sani (CONTROLLI) e dei pazienti ALMS (ALMS) mediante qPCR e normalizzata rispetto alla quantità del trascritto del gene *HMBS*. La media dell'espressione del gene analizzato nei fibroblasti ALMS è stata espressa rispetto alla media dei controlli, posta arbitrariamente uguale a 1. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ fibroblasti ALMS *versus* controlli. (b) Il fold change tra fibroblasti ALMS e di controllo osservata dall'analisi dei dati di arrays è stato confrontato con il fold change ottenuto mediante qPCR. È stata osservata una correlazione significativa tra i set di dati ottenuti con le due tecniche. Coefficiente di correlazione di Pearson= 0.8. (c) La sintesi e la secrezione di proteine collagene è stata determinata mediante saggio di incorporazione di ^3H -prolina, ed è espressa come conte per minuto normalizzate rispetto il contenuto di DNA. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ fibroblasti ALMS *versus* controlli. Le barre nere corrispondono ai controlli e le barre bianche ai fibroblasti ALMS.

2.4 I FIBROBLASTI ALMS HANNO UN CICLO CELLULARE PIÙ LUNGO RISPETTO AI FIBROBLASTI DI CONTROLLO

L'analisi della durata del ciclo cellulare durante la fase logaritmica di crescita ha evidenziato un tasso di proliferazione ridotto nei fibroblasti ALMS, rispetto ai fibroblasti di controllo, in tutte le condizioni di colture analizzate: crescita in presenza di concentrazione normale di siero (10% FBS), di bassa concentrazione di siero (2% FBS) e crescita in deprivazione di siero (48 ore in deprivazione di siero seguite da crescita in 10% FBS) (Figura 6).

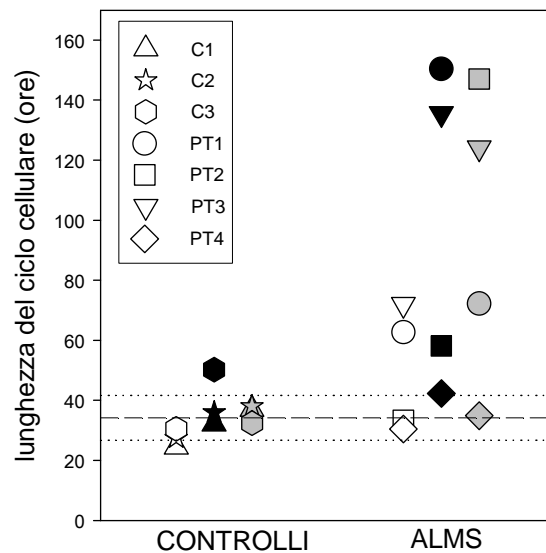


Figura 6. I fibroblasti ALMS hanno un ciclo cellulare più lungo rispetto ai fibroblasti di controllo. La lunghezza del ciclo cellulare dei fibroblasti di controllo (CONTROLLI) e dei fibroblasti ALMS (ALMS) è stata stimata in colture mantenute in SM al 10% FBS (simboli bianchi), in SM al 2% FBS (simboli grigi), e dopo deprivazione di siero per 48 ore, seguite da crescita in SM al 10% FBS (simboli neri), sulla base del confronto del numero di cellule vitali al tempo 0 e dopo 72 ore di crescita, utilizzando il kit CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega). La linea tratteggiata indica il valore medio della lunghezza del ciclo cellulare dei controlli nelle tre condizioni di coltura, mentre le linee punteggiate rappresentano il valore medio \pm una deviazione standard.

I fibroblasti di controllo e del PT4 presentano un ciclo cellulare più breve (compreso tra 24 e 45 ore) rispetto ai fibroblasti degli altri 3 pazienti. Inoltre, i

fibroblasti ALMS sono risultati più sensibili ai cambiamenti delle normali condizioni di coltura, aumentando ulteriormente la durata del loro ciclo cellulare quando coltivati in presenza di bassa concentrazione di siero. In assenza di siero per 48 ore, sia i fibroblasti di controllo, sia i fibroblasti ALMS sopravvivono. Quando le normali condizioni di coltura sono ripristinate, si osserva nei fibroblasti di controllo un modesto incremento nel numero di cellule, a differenza dei fibroblasti ALMS che, a eccezione del PT4, mostrano un marcato incremento nella durata del loro tempo di duplicazione cellulare.

2.5 FATTORI PRO-FIBROTICI AUMENTANO L'ESPRESSIONE DI COLLAGENE E LA PROLIFERAZIONE NEI FIBROBLASTI ALMS

Abbiamo valutato la responsività dei fibroblasti ALMS a fattori pro-fibrotici, in termini di modulazione dell'espressione di collagene e della proliferazione.

Culture primarie di fibroblasti ALMS e di controllo sono state stimulate con TGF- β per 24 e 48 ore, e, a seguito del trattamento, è stata analizzata mediante qPCR l'espressione del gene *COL1A1* (figura 7a). Il trattamento determina un aumento significativo dell'espressione genica sia nei fibroblasti ALMS, sia nei fibroblasti di controllo. L'up-regolazione del trascritto risulta tuttavia maggiore nei fibroblasti ALMS dopo 48 ore di stimolazione rispetto ai controlli.

L'espressione di *COL1A1* risulta significativamente aumentata nei fibroblasti ALMS rispetto ai controlli in tutte le condizioni analizzate (0, 24, 48 ore di trattamento), ed è necessario stimolare per 48 ore i fibroblasti di controllo per osservare lo stesso livello di espressione genica dei fibroblasti ALMS in condizioni basali.

È stata inoltre valutata la risposta proliferativa dei fibroblasti ALMS e di controllo al trattamento con TGF- β , CTGF e FGF2 per 72 ore. La proliferazione sia dei fibroblasti di controllo, sia dei fibroblasti ALMS, stimata come % di cellule vitali dopo trattamento per 72 ore, non risulta influenzata dalla stimolazione con TGF- β o con CTGF. Il trattamento con FGF2 determina invece un modesto, ma significativo, aumento della proliferazione dei fibroblasti ALMS non osservabile nei fibroblasti di controllo (Figura 7b).

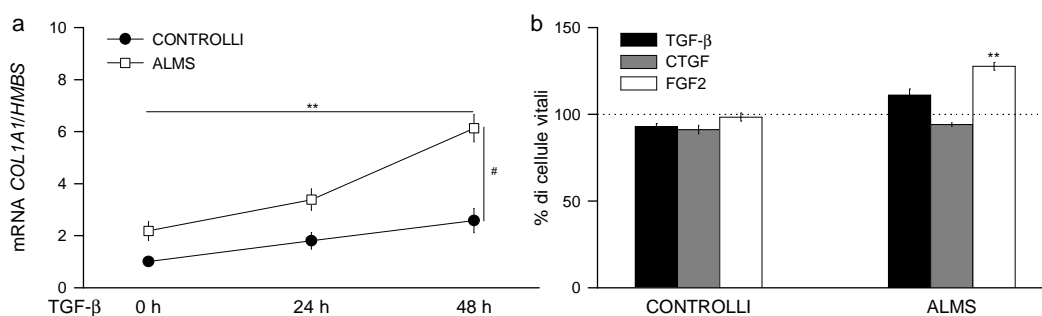


Figura 7. Fattori pro-fibrotici aumentano l'espressione di collagene e la proliferazione nei fibroblasti ALMS. (a) Fibroblasti di controlli sani (CONTROLLI) e di pazienti ALMS (ALMS) sono stati stimolati con TGF- β (10 ng/ml per 24 e 48 ore) in SM al 5% FBS. L'espressione del gene *COL1A1* è stata quantificata mediante qPCR e normalizzata rispetto alla quantità di trascritto di *HMBS*. I risultati sono indicati come media \pm SEM e riportati come fold change espresso rispetto alla media dei fibroblasti di controllo non trattati, indicata come 1. ** $P < 0.01$ fibroblasti stimolati (48 h) versus non stimolati (0 h); # $P < 0.05$ fibroblasti ALMS stimolati versus fibroblasti di controllo stimolati (48 h). (b) La risposta proliferativa di fibroblasti ALMS e di controllo al trattamento con TGF- β (10 ng/ml), CTGF (100 ng/ml) e FGF2 (10 ng/ml) in SM al 2% FBS per 72 ore è stata valutata utilizzando il kit CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega). I risultati sono riportati come % di cellule vitali dopo trattamento espressa rispetto alle cellule non trattate, indicate come 100%. *** $P < 0.001$ fibroblasti ALMS trattati con FGF2 versus non stimolati.

2.6 I FIBROBLASTI ALMS SONO RESISTENTI ALLA MORTE CELLULARE INDOTTA DA STIMOLI APOPTOTICI

I fibroblasti ALMS e di controlli sono stati trattati con diversi induttori di apoptosi.

La risposta al trattamento è stata inizialmente valutata utilizzando il saggio MTT, che permette di quantificare il numero di cellule vitali in base alla capacità di metabolizzare sali di tetrazolio. Per ciascuna sostanza utilizzata, è stata valutata la curva dose-risposta al trattamento (Figura 2, Appendice 1), definendo la concentrazioni di ciascun farmaco a cui si associano le differenze più significative di vitalità cellulare tra i fibroblasti ALMS e di controllo (Figura 8a). I fibroblasti ALMS sono risultati più resistenti al trattamento con taspigargina (THAP), C₂-ceramide (C2-C), e cicloesimide (CX) rispetto ai fibroblasti di controllo. Il trattamento con staurosporina (ST) determina invece una perdita di vitalità confrontabile fra fibroblasti ALMS e di controlli, mentre la stimolazione con TNF- α sembra non influenzare la sopravvivenza cellulare.

Al fine di verificare se la riduzione di vitalità osservata nei controlli a seguito dei diversi trattamenti coinvolga meccanismi di apoptosi, è stata eseguita una analisi citofluorimetrica del contenuto di DNA (Figura 8b). Il protocollo prevede la colorazione del DNA con PI, successiva alla permeabilizzazione delle cellule. Durante questa procedura, cellule in apoptosi perdono frammenti di DNA di dimensioni dell'ordine di 180 bp (equivalente al DNA compreso tra 2 nucleosomi adiacenti) in cui il genoma nucleare viene degradato a seguito dell'attivazione di endonucleasi, mostrando quindi un contenuto in DNA ridotto rispetto alle cellule vitali, che può essere evidenziato mediante analisi al citofluorimetro. Il trattamento con THAP non determina una riduzione del

contenuto di DNA nei fibroblasti ALMS, che mostrano una distribuzione normale nelle diverse fasi del ciclo cellulare, sovrapponibile a quella osservata nei fibroblasti non trattati. Diversamente, l'11.4% dell'intera popolazione delle cellule di controllo si distribuisce, a seguito del trattamento con THAP, in un picco con un contenuto di DNA ridotto (regione M1) rispetto al normale contenuto diploide delle cellule in fase G_1/G_0 .

La degradazione del DNA nucleare è stata inoltre analizzata mediante saggio TUNEL. La metodica consente la marcatura fluorescente selettiva delle estremità 3'-OH libere dei frammenti di DNA che vengono generati a seguito dell'attivazione dei meccanismi di apoptosi, discriminandoli dal DNA degradato di cellule in necrosi. L'analisi al microscopio fluorescente (Figura 8c) non ha evidenziato la presenza di nuclei morfologicamente definibili come apoptotici e positivi allo staining nei fibroblasti ALMS trattati con CX e THAP. Nei fibroblasti di controllo è stato possibile invece osservare la presenza di alcuni nuclei chiaramente in apoptosi a seguito del trattamento. I risultati sono stati confermati e quantificati mediante analisi al citofluorimetro. Come mostrato in figura 8d, il trattamento con THAP per 48 e 72 ore determina nei fibroblasti di controllo un aumento dell'8.8% e del 13.9% della popolazione positiva alla marcatura con TUNEL, non osservabile invece nei fibroblasti ALMS, che sembrano non andare incontro ad apoptosi a seguito della stimolazione.

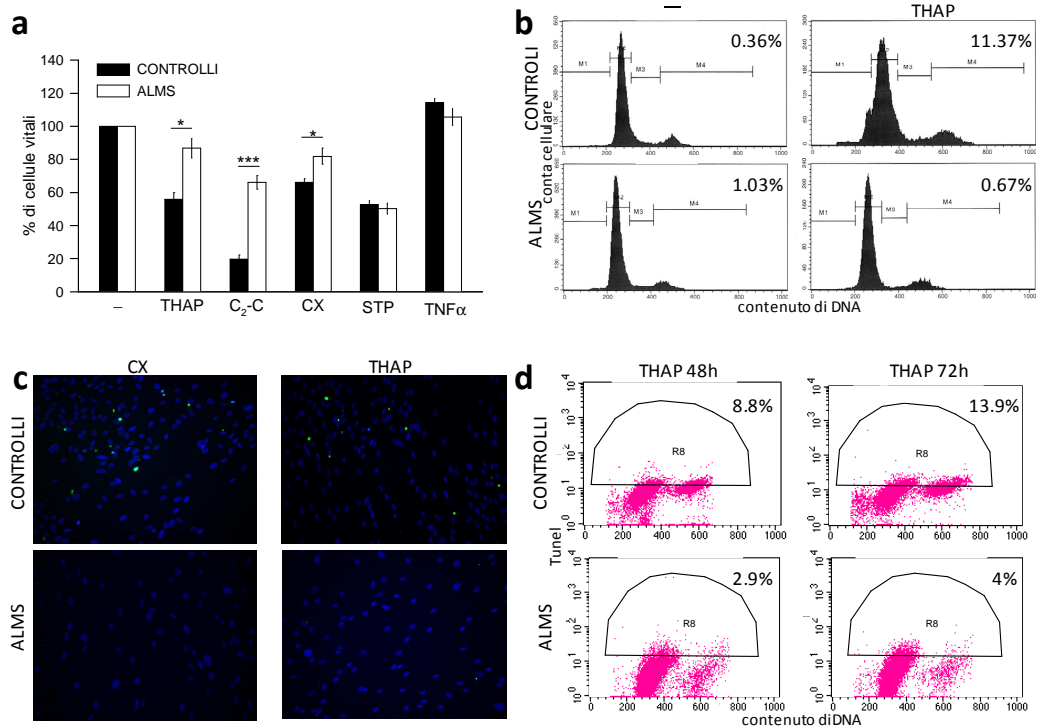


Figura 8. I fibroblasti ALMS sono resistenti alla morte cellulare indotta da stimoli apoptotici. (a) Fibroblasti di controllo (CONTROLLI) e di pazienti ALMS (ALMS) sono stati stimolati con taspigargina (THAP, 100 nM per 48 ore), C₂-ceramide (C₂-C, 100 μ M per 48 ore), cicloesimide (CX, 100 μ g/ml per 48 ore), staurosporina (ST, 100 nM per 24 ore) e TNF α (100 ng/ml per 24 ore) in SM al 10% FBS. La % di cellule vitali è stata determinata mediante saggio MTT ed è riportata come valore medio \pm SEM espresso rispetto alla cellule non stimolate (-) indicate come 100%. * P <0.05, *** P <0.001 vitalità cellulare dei fibroblasti ALMS *versus* fibroblasti di controllo. (b) Fibroblasti ALMS e di controllo sono stati trattati con THAP (100 nM per 48 ore), colorati con PI e analizzati al citofluorimetro. I risultati sono espressi come istogrammi della distribuzione della cellule nelle fasi del ciclo cellulare e come % dell'aumento della sub-popolazione G₁/G₀ (regione M1). (c) Fibroblasti ALMS e di controllo sono stati coltivati su vetrini e trattati con CX (100 μ g/ml per 48 ore) e THAP (100 nM per 48 ore). Le cellule sono state fissate e le estremità 3'-OH del DNA sono state marcate *in situ* con fluoresceina-12-dUTP (TUNEL) (nuclei verdi); i nuclei sono stati contro-colorati con DAPI (nuclei blu) (20X). (d) I fibroblasti ALMS e di controllo sono stati trattati con THAP (100 nM per 48 e per 72 ore), marcati mediante saggio TUNEL e con PI e analizzate al citofluorimetro. Ciascun istogramma riporta la positività delle cellule alla marcatura con TUNEL espressa rispetto al contenuto in DNA, dopo trattamento con THAP (100 nM per 48 e per 72 ore). I pannelli b, c, d riportano un controllo e un paziente rappresentativi.

V. Discussione

La Sindrome di Alström (ALMS) è una patologia rara a trasmissione autosomica recessiva, causata da mutazioni del gene *ALMS1*, e caratterizzata da un ampio pleomorfismo fenotipico con compromissione funzionale multiorgano [3].

La Sindrome viene diagnosticata sulla base delle caratteristiche cliniche osservate. L'ampia variabilità fenotipica e il ritardo con cui alcune caratteristiche insorgono rendono tuttavia la diagnosi molto difficile. La disponibilità di un test genetico per la ricerca di mutazioni nel gene *ALMS1* permette una diagnosi più agevole, in particolare quando l'anamnesi del paziente evidenzia la presenza solo di alcuni segni clinici non patognomonicamente.

Dal 2006, è possibile effettuare presso i laboratori della Clinica Medica 3 un test genetico per la ALMS.

La valutazione dell'utilità e del ruolo di questo servizio ha evidenziato come l'associazione di un'accurata diagnosi clinica e del test genetico consentano la formulazione di una diagnosi conclusiva di ALMS in circa l'80% dei casi sospetti. Inoltre, l'analisi di sequenza ha permesso non solo di identificare mutazioni già descritte, ma anche di descrivere nuove varianti del gene *ALMS1* associate alla patologia, contribuendo così alla ricerca sulla ALMS.

L'analisi istopatologica di reperti autoptici di diversi tessuti di pazienti ALMS ha evidenziato la presenza di una fibrosi generalizzata multiorgano, che si ritiene possa avere un ruolo patogenetico nel danno cardiaco, epatico e renale, influenzando in modo particolare la prognosi e la sopravvivenza dei pazienti [3]. I meccanismi coinvolti nello sviluppo della fibrosi nella ALMS non sono ancora stati analizzati in dettaglio. Non è inoltre chiaro se i cambiamenti fibrotici siano

una conseguenza diretta della mutazione, o se rappresentino una risposta infiammatoria secondaria a un danno cellulare primario dovuto alla perdita di funzione del gene *ALMS1*. La fibrosi a livello epatico e renale potrebbe infatti essere una conseguenza di alterazioni metaboliche legate allo sviluppo di diabete mellito di tipo 2 e obesità nei pazienti ALMS. Risulta tuttavia difficile individuare un danno cellulare alla base della fibrosi che si riscontra a livello polmonare, cardiaco, della vescica, del testicolo e dell'ovaio, suggerendo che la fibrosi nella ALMS rappresenti un difetto primario.

Il nostro lavoro si è quindi focalizzato sull'analisi del ruolo di mutazioni del gene *ALMS1* nello sviluppo della fibrosi, utilizzando colture primarie di fibroblasti di 4 pazienti ALMS isolate da una biopsia cutanea, in una zona esente da fibrosi.

Come controllo sono state utilizzate colture primarie di fibroblasti di soggetti sani ottenute da biopsie cutanee eseguite nella stessa regione anatomica. È infatti descritto che i fibroblasti possiedono una 'memoria posizionale' e mostrano differenze nel loro profilo d'espressione genica, che mantengono *in vitro*, maggiori se isolati da zone anatomiche diverse dello stesso individuo, rispetto a colture cellulari ottenute dalla stessa regione di donatori diversi [60].

Si definisce fibrosi un qualunque eccesso di tessuto fibrotico, ricco in fibre collagene [34]. La fibrosi rappresenta generalmente la risposta dei fibroblasti a una stimolazione di natura infiammatoria, finalizzata alla segregazione di un'area infetta o alla formazione di una cicatrice che ristabilisce la continuità dei tessuti recisi nel processo di guarigione delle ferite. Durante la risposta fibrotizzante, fibroblasti attivati in miofibroblasti proliferano attivamente e producono un eccesso di componenti della ECM, che si organizzano in un tessuto, definito

fibrotico, che possiede caratteristiche strutturali e meccaniche alterate rispetto al tessuto d'origine [34]. Il processo è generalmente autolimitante, e l'equilibrio tra proliferazione ed eliminazione per apoptosi dei miofibroblasti appare fondamentale per il corretto controllo e la risoluzione della risposta fibroproliferativa [38].

Stimoli eccessivi o inappropriati possono indurre lo sviluppo di una fibrosi patologica, caratterizzata da una attivazione amplificata dei fibroblasti in miofibroblasti, che proliferano in modo incontrollato e producono un eccesso di componenti di tessuto fibrotico, che progressivamente rimodella e distrugge la normale architettura tissutale e determina la perdita della funzionalità dell'organo. Questo stato deregolato è mantenuto da fattori profibrotici, come il TGF- β , che inibiscono l'apoptosi e stimolano l'attivazione dei fibroblasti [34, 43, 44].

La valutazione della durata del ciclo cellulare non ha evidenziato nei fibroblasti ALMS una velocità di proliferazione maggiore rispetto ai fibroblasti di controllo (Figura 6). Al contrario, mutazioni del gene *ALMS1* sono risultate associate a una lunghezza del ciclo cellulare aumentata e a una down-regolazione di geni direttamente coinvolti nella progressione del ciclo cellulare, nella replicazione e nell'assemblaggio del complesso centrosoma-cinetocoro. La stimolazione con FGF2 ha determinato un modesto aumento della capacità replicativa solo dei fibroblasti ALMS (Figura 7b), indicando la loro responsività a fattori fibroproliferativi del microambiente. Tuttavia i fibroblasti ALMS proliferano più lentamente rispetto ai controlli anche se stimolati. Conseguentemente, l'aumento della capacità di proliferazione sembra non essere un meccanismo importante nello sviluppo della fibrosi nella ALMS.

La localizzazione della proteina ALMS1 a livello dei centrosomi e dei corpi basali [13, 14], associata alla ridotta capacità di replicazione che abbiamo evidenziato nei fibroblasti ALMS, suggerisce un suo coinvolgimento nella regolazione della progressione del ciclo cellulare. Le cilia primarie sono considerate delle strutture post-mitotiche di cellule quiescenti [16], e, recentemente, è stato ipotizzato siano coinvolte nel controllo della crescita cellulare, regolandone la progressione attraverso le diverse fasi. La ciliogenesi sembra essere infatti finemente coordinata al ciclo cellulare. Inoltre, difetti in vie di trasduzione del segnale che coinvolgono le cilia sono stati associati a disordini fibroproliferativi, come il cancro, patologie cistiche e fibrosi, e geni implicati in queste patologie potrebbero avere un ruolo importante nei pathways di connessione tra cilia e il sistema di regolazione del ciclo cellulare [16, 20]. Anche le proteine BBS, la cui perdita di funzionalità è legata allo sviluppo della Sindrome di Bardet-Biedl (BBS), con cui la ALMS condivide diverse caratteristiche fenotipiche, sembrano avere un ruolo nell'organizzazione dei microtubuli e nella progressione del ciclo cellulare [61]. L'aumento del tempo di generazione che abbiamo osservato nei fibroblasti ALMS rappresenta la prima evidenza che lega la funzione della proteina ALMS1 alla regolazione del ciclo cellulare.

I fibroblasti isolati dal PT4 mostrano una capacità proliferativa sovrapponibile a quella osservata nei fibroblasti di controllo (Figura 6). È interessante osservare come il PT4 differisca dagli altri 3 pazienti ALMS, che portano varianti del gene *ALMS1* predittive di una proteina tronca a livello dell'esone 8 o dell'esone 10, per la presenza di una variante allelica non-senso nell'esone 16 (Tabella 1). Collin *et al.* [11] hanno descritto splicing alternativi del

trascritto *ALMS1* a livello dell'esone 16. Inoltre, Li *et al.* [10] hanno dimostrato che la mutazione troncante nel gene *Alms1* portata dal loro modello murino *Alms1* knockdown determinava la formazione di un mRNA rilevabile e di una proteina parzialmente funzionante, in grado di supportare la formazione delle cilia, analogamente a quanto osservato in topi wild type. Il PT4 potrebbe analogamente esprimere una isoforma di splicing importante per la proliferazione o una proteina *ALMS1* trunca parzialmente funzionante. Tuttavia, la presenza di codoni di STOP in posizioni non canoniche (in assenza di altri segnali) potrebbero determinare la rapida degradazione del trascritto mutato da parte del meccanismo di degradazione degli mRNA non-senso (NMD, non-sense mediated mRNA decay) [62]. Ulteriori studi relativi alla stabilità e alla effettiva traduzione in proteina delle diverse varianti mutate del trascritto del gene *ALMS1* associate all'insorgenza della Sindrome potrebbero essere utili nella comprensione della variabilità fenotipica che si riscontra nei pazienti ALMS.

I risultati riportati in questo lavoro di tesi hanno evidenziato nei fibroblasti ALMS una importante up-regolazione di diversi geni per componenti e proteine regolatrici della ECM, che potrebbe rappresentare un meccanismo centrale nello sviluppo della fibrosi ALMS (Figura 4 e 5a). Diversi studi hanno infatti dimostrato che la deposizione eccessiva di ECM nei processi fibrotici è ampiamente dovuta all'incremento del tasso di trascrizione dei corrispondenti geni [63]. In accordo con i dati di espressione, i fibroblasti ALMS hanno mostrato un aumento della sintesi di collagene (Figura 5c), che è anche suggerita dalla maggiore complessità intracitoplasmatica e dalla presenza di numerose vescicole di esocitosi evidenziata dall'analisi morfologica (Figura 3f e q). Queste osservazioni suggeriscono che i fibroblasti ALMS possiedano un fenotipo

costitutivamente attivato. I fibroblasti di controllo raggiungono infatti lo stesso livello d'espressione di *COL1A1* dei fibroblasti ALMS solo dopo stimolazione con TGF- β per 48 ore (Figura 7a). Anche i fibroblasti ALMS risultano responsivi al trattamento con tale fattore pro-fibrotico, che determina un ulteriore aumento dell'espressione di *COL1A1*, più pronunciato rispetto all'incremento osservato nei fibroblasti di controllo stimolati (Figura 7a).

L'analisi dei dati di array ha sottolineato la modulazione nei fibroblasti ALMS dei messaggeri che codificano per 4 dei 6 fattori di crescita matricellulari che costituiscono la famiglia delle proteine CCN (*CTGF*, *WISPI*, *CYR61*, *NOV*), ciascuna delle quali svolge la funzione di molecola adattatrice nella connessione tra superficie cellulare e ECM. I fattori matricellulari possiedono abilità adesive che controllano l'adesione e la migrazione cellulare, modulano l'attività di altri fattori di crescita e citochine, e regolano molteplici funzioni cellulari, come la mitosi, il differenziamento, la proliferazione, l'apoptosi e la sintesi di componenti della ECM [64]. In pazienti con sclerodermia sistemica, cheloidi o altri disordini fibrotici che interessano la pelle, è stata descritta una espressione costitutivamente aumentata di *CTGF*, che sembra promuovere la proliferazione e la migrazione dei fibroblasti/miofibroblasti, e la produzione di ECM [65]. Una maggiore espressione di *WISPI*, un gene target del signaling del WNT, è stata correlata alla fibrosi idiopatica polmonare, e sembra essere implicata nell'attivazione dei miofibroblasti e nella deposizione di ECM [66].

Abbiamo inoltre osservato un marcato aumento nei fibroblasti ALMS dell'espressione di periostina (*POSTN*), una proteina espressa a livello di tessuti ricchi in collagene, coinvolta nella sintesi dell'ECM e nella regolazione della fibrillogenesi del collagene [67], e recentemente definita una proteina

matricellulare [68]. Le proteine matricellulari, che comprendono la famiglia delle CCN, rappresentano una classe di fattori secreti della ECM che condividono la capacità di influenzare le interazioni tra cellula e matrice [69]. La periostina è stata dimostrata essere coinvolta nella risposta ipertrofica a seguito di infarto del miocardio, in cui sembra influenzare l'interazione tra fibroblasti e miociti e le caratteristiche elastiche del tessuto [70]. La marcata over-espressione di periostina che abbiamo osservato nei fibroblasti ALMS (Figura 5a) risulta particolarmente interessante in associazione al rischio descritto nei pazienti ALMS di sviluppare cardiomiopatia [1], ed è particolarmente suggestiva di un suo ruolo come fattore di regolazione nel rimodellamento cardiaco nella ALMS.

L'identificazione di recettori per componenti della ECM a livello delle cilia primarie [71], assieme all'aumento dell'espressione e della sintesi di proteine della ECM che abbiamo osservato nei fibroblasti ALMS, suggerisce possa esservi un legame tra la localizzazione della proteina ALMS1 e la regolazione della sintesi di collagene. Si ritiene che le cilia primarie siano coinvolte nella definizione dell'orientamento della cellula e nella secrezione della ECM, influenzandone l'organizzazione anisotropica a livello scheletrico e dei tessuti connettivi [72, 73].

Nel loro insieme, queste osservazioni portano a ipotizzare che la deposizione di ECM sia un meccanismo patologico dominante nella fibrosi ALMS, costitutivamente attivo nei fibroblasti con mutazioni a livello del gene *ALMS1*, e che può essere ulteriormente aumentato dalla presenza di fattori pro-fibrotici nel microambiente.

Fibroblasti ALMS coltivati in supporti tridimensionali di biomateriale, che rappresentano un modello interessante per l'analisi *in vitro* dei meccanismi di

interazione reciproca tra cellule e ECM e di come queste relazioni possano influenzare la funzione dei miofibroblasti [37, 74], hanno mostrato una ridotta capacità di migrazione all'interno della struttura 3D (Figura 1i). Questo potrebbe essere legato ad alterazioni nell'organizzazione del citoscheletro, come suggerito anche dalla microscopia elettronica, che ha evidenziato un allineamento preferenziale in un'unica direzione, parallela alla polarità del nucleo, della strutture citocheletriche (Figura 1o). L'analisi morfologica ha inoltre sottolineato la presenza di lunghe estensioni citoplasmatiche che prendono diretto contatto con i fibroblasti adiacenti, suggerendo vi sia una stretta adesione tra cellule vicine e con la ECM (Figura 1m). I dati d'espressione genica mostrano, a sostegno, l'up-regolazione nei fibroblasti ALMS di geni legati alla formazione di strutture di adesione focale, che suggeriscono una stretta connessione con la ECM. La perdita della funzione della proteina ALMS1 potrebbe influenzare il normale riorientamento dei centrosomi, e determinare i difetti di migrazione e le alterazioni morfologiche e strutturali osservate nei fibroblasti ALMS, contribuendo allo sviluppo della fibrosi. Si ritiene infatti che l'orientamento dei centrosomi sia coinvolto nella definizione di una corretta polarità e di una efficiente migrazione cellulare nei processi di cicatrizzazione [75, 76]. Infatti, durante il normale fenomeno di riparazione tissutale, i fibroblasti migrano in prossimità della lesione e rilasciano ECM ricca in collagene. Le fibre collagene e i fibroblasti si allineano quindi parallelamente, secondo l'orientamento della ferita. In questo contesto, si osserva la conversione dei fibroblasti in miofibroblasti, caratterizzati dalla presenza di molte fibre di stress α -SMA e strutture di adesione focale, che connettono attraverso le integrine la ECM e l'actina citoscheletrica [37, 77].

L'analisi comparativa del profilo d'espressione genica ha evidenziato la down-regolazione di diversi geni pro-apoptotici e l'over-espressione di trascritti coinvolti nel controllo della morte cellulare indotta da stress nei fibroblasti ALMS, suggerendo possiedono una maggiore capacità di sopravvivenza. In fibroblasti isolati da aree fibrotiche di pazienti con fibrosi polmonare [42] o con cheloidi [41] è stata descritta una maggiore resistenza all'induzione di apoptosi. I segnali di regolazione dell'apoptosi dei fibroblasti nei disordini fibrotici non sono chiari, ed è stato ipotizzato possano essere coinvolti diversi meccanismi, come uno squilibrio di citochine, cause genetiche, l'attivazione costitutiva di vie di trasduzione del segnale anti-apoptotiche simili ai pathways attivi in cellule cancerose [41, 42, 78], e anche la deposizione di ECM [43]. Fibroblasti ALMS e di controllo sono risultati insensibili al trattamento con $TNF\alpha$, e responsivi alla stimolazione con altri induttori di apoptosi, mostrando una ridotta vitalità cellulare associata alla presenza di nuclei apoptotici (Figura 8). In particolare, il trattamento con staurosporina (ST) ha determinato una perdita di vitalità cellulare analoga nei fibroblasti ALMS e di controllo, a differenza della stimolazione con taspigargina (THAP), C_2 -ceramide (C_2 -C) e cicloesimide (CX) che causano una morte cellulare più marcata nei fibroblasti di controllo rispetto ai fibroblasti ALMS (Figura 8a). La diversa sensibilità dei fibroblasti ALMS ai vari induttori apoptotici suggerisce possano essere alterati specifici pathways di apoptosi. Infatti, THAP, C_2 -C e CX inducono apoptosi determinando stress mitocondriale e del reticolo endoplasmatico in diversi modelli cellulari [79-81]. Diversamente, ST causa l'attivazione di vie del segnale dipendenti e indipendenti dalle caspasi [82-84], mentre $TNF\alpha$ stimola specifici recettori di morte della membrana plasmatica [85].

Questi risultati indicano che i fibroblasti ALMS possiedono un ‘fenotipo pronò alla sopravvivenza’, che potrebbe avere un ruolo importante nella fibrosi, interferendo con il controllo della risposta fibroproliferativa.

I nostri risultati evidenziano una attivazione costitutiva dei fibroblasti ALMS in miofibroblasti α -SMA positivi, che producono un eccesso di componenti della ECM, indipendente dell’influenza di un ambiente pro-fibrotico, e quindi direttamente legata alla presenza del gene *ALMS1* mutato. Molte delle caratteristiche descritte in fibroblasti isolati da lesioni fibrotiche possono essere indotte in fibroblasti normali dal trattamento con TGF- β [37, 40, 86], come osservato anche nei nostri esperimenti di espressione del collagene, sottolineandone il ruolo critico di fattore di regolazione della fibrosi in condizioni fisiologiche e patologiche [87]. L’analisi del profilo d’espressione non ha evidenziato nei fibroblasti ALMS una diretta modulazione di questo pathway, suggerendo che non sia costitutivamente attivo e che altri meccanismi di segnalazione siano coinvolti nell’induzione e/o nel mantenimento del fenotipo ALMS. In questo contesto, potrebbero avere un ruolo importante vie di trasduzione del segnale a valle di integrine e proteine FAK, che sono risultate up-regolate nei fibroblasti ALMS. La loro over-espressione, associata all’aumento della produzione di componenti della matrice, potrebbe causare l’organizzazione di una ECM rigida, come è dimostrato anche dall’elevata adesione dei fibroblasti ALMS alla struttura 3D di biomateriale. L’aumento dello stress meccanico dovuto alla mancanza di flessibilità della ECM potrebbe determinare una maggiore disponibilità di TGF- β , dovuta al suo rilascio in forma attiva dal microambiente extracellulare, dove viene sequestrato in forma inattiva associata alla ECM stessa [88]. Abbiamo inoltre osservato l’up-regolazione di *FGFR2*, uno dei recettori ad

alta affinità di FGF2 [89], che potrebbe conferire una maggiore sensibilità a questo fattore pro-fibrotico nei fibroblasti ALMS, suggerendo un ruolo importante del microambiente nel fenomeno di amplificazione della risposta fibrotica, una volta innescata. L'analisi dei dati di arrays ha evidenziato anche un aumento dell'espressione di alcuni markers di fibrosi, come *IGFBP3* e *IGFBP5*, che sono risultati up-regolati in pazienti con fibrosi idiopatica polmonare e sclerodermia sistemica [90, 91], e sembrano essere coinvolti nella deposizione dei ECM e nel reclutamento di linfociti B e macrofagi/monociti, e quindi nella generazione di uno stato infiammatorio del tessuto [92]. Questi pathways potrebbero essere particolarmente interessanti da approfondire in quanto l'up-regolazione di *IGFBP5* sembra anche prevenire la morte cellulare indotta da diversi stimoli apoptotici [93].

Nel loro insieme, i risultati riportati in questa tesi suggeriscono che la presenza di mutazioni a livello del gene *ALMS1* determini nei fibroblasti un rallentamento del ciclo cellulare e una minore suscettibilità all'apoptosi. Conseguentemente, i fibroblasti ALMS continuano a proliferare in modo incontrollato e producono un eccesso di componenti della ECM, causando lo sviluppo di una condizione fibrotizzante, in cui il tessuto fibrotico rimodella e progressivamente si sostituisce al tessuto normale. Fattori pro-fibrotici presenti nel microambiente tissutale, a cui i fibroblasti ALMS sono risultati responsivi, potrebbero ulteriormente modulare la produzione di ECM, contribuendo al mantenimento e all'amplificazione del fenomeno, mentre sembrano avere un ruolo meno importante come stimoli fibroproliferativi (Figura 7).

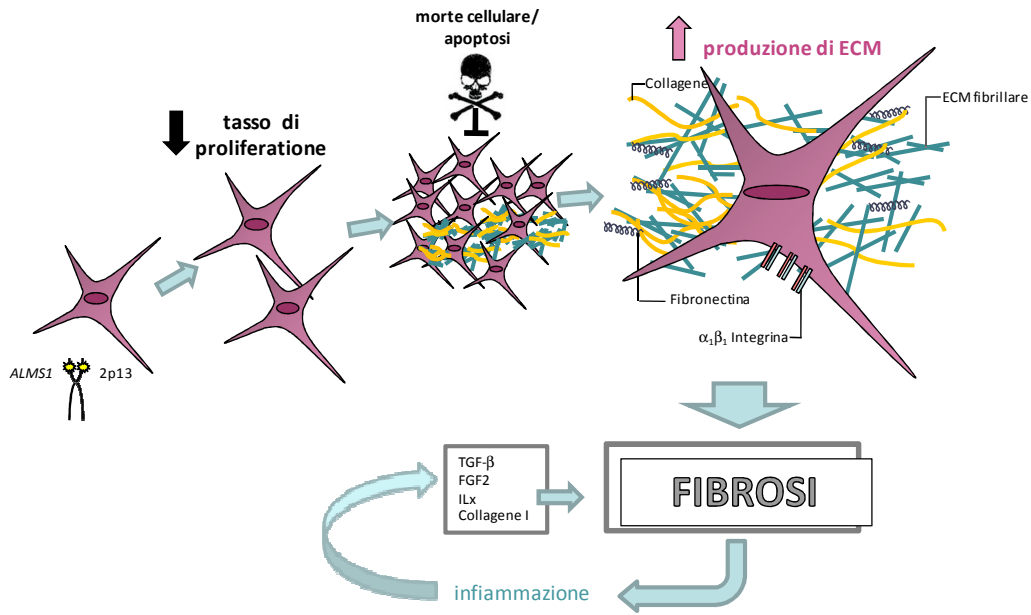


Figura 9. Modello di fibrosi nella Sindrome di Alström. Fibroblasti che portano mutazioni del gene *ALMS1* mostrano una forma allungata, proliferano lentamente, sono responsivi a fattori pro-fibrotici e resistenti alla morte cellulare programmata. Questo suggerisce che la loro proliferazione non sia controllata dall'apoptosi. Conseguentemente, i fibroblasti *ALMS1* mutati persistono nel tessuto, continuano a proliferare e sintetizzano una eccessiva quantità di ECM, responsabile del progressivo rimodellamento tissutale e dello sviluppo di fibrosi. Il microambiente circostante caratterizzato dalla presenza di un eccesso di fattori che promuovono l'acquisizione di un fenotipo pro-fibrotico e di mediatori dell'infiammazione potrebbe stimolare ulteriormente lo sviluppo e il mantenimento della fibrosi.

Le nostre osservazioni permettono di concludere che la fibrosi osservata nei pazienti con Sindrome di Alström sia un difetto primario direttamente causato da mutazioni nel gene *ALMS1*, e rappresenti il risultato dell'eccessiva produzione di ECM e della persistenza di fibroblasti costitutivamente attivati, che non vengono eliminati mediante apoptosi.

Inoltre, i dati ottenuti sottolineano come *ALMS1* sia una proteina multifunzionale, coinvolta nella progressione del ciclo cellulare, nella migrazione, nell'apoptosi e nella produzione di ECM. Ulteriori studi relativi al coinvolgimento di tale proteina in processi intra- ed extra-cellulari saranno necessari per la comprensione

della fisiopatologia della ALMS e per l'identificazione di possibili bersagli terapeutici.

VI. Bibliografia

1. Marshall, J.D., et al., *Alstrom syndrome*. Eur J Hum Genet, 2007. **15**(12): p. 1193-202.
2. Alstrom, C.H., et al., *Retinal degeneration combined with obesity, diabetes mellitus and neurogenous deafness: a specific syndrome (not hitherto described) distinct from the Laurence-Moon-Bardet-Biedl syndrome: a clinical, endocrinological and genetic examination based on a large pedigree*. Acta Psychiatr Neurol Scand Suppl, 1959. **129**: p. 1-35.
3. Marshall, J.D., et al., *New Alstrom syndrome phenotypes based on the evaluation of 182 cases*. Arch Intern Med, 2005. **165**(6): p. 675-83.
4. Millay, R.H., R.G. Weleber, and J.R. Heckenlively, *Ophthalmologic and systemic manifestations of Alstrom's disease*. Am J Ophthalmol, 1986. **102**(4): p. 482-90.
5. Maffei, P., et al., *The Alstrom syndrome: is it a rare or unknown disease?* Ann Ital Med Int, 2002. **17**(4): p. 221-8.
6. Marshall, J.D., et al., *Spectrum of ALMS1 variants and evaluation of genotype-phenotype correlations in Alstrom syndrome*. Hum Mutat, 2007. **28**(11): p. 1114-23.
7. Mendioroz, J., et al., *[Alstrom syndrome: clinical and genetic features, and a diagnostic guide to foresee complications]*. Med Clin (Barc), 2008. **131**(19): p. 741-6.
8. Marshall, J.D., et al., *Genealogy, natural history, and phenotype of Alstrom syndrome in a large Acadian kindred and three additional families*. Am J Med Genet, 1997. **73**(2): p. 150-61.
9. Aldahmesh, M.A., et al., *Allelic heterogeneity in inbred populations: the Saudi experience with Alstrom syndrome as an illustrative example*. Am J Med Genet A, 2009. **149A**(4): p. 662-5.
10. Li, G., et al., *A role for Alstrom syndrome protein, alms1, in kidney ciliogenesis and cellular quiescence*. PLoS Genet, 2007. **3**(1): p. e8.
11. Collin, G.B., et al., *Mutations in ALMS1 cause obesity, type 2 diabetes and neurosensory degeneration in Alstrom syndrome*. Nat Genet, 2002. **31**(1): p. 74-8.
12. Hearn, T., et al., *Mutation of ALMS1, a large gene with a tandem repeat encoding 47 amino acids, causes Alstrom syndrome*. Nat Genet, 2002. **31**(1): p. 79-83.
13. Andersen, J.S., et al., *Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling*. Nature, 2003. **426**(6966): p. 570-4.
14. Hearn, T., et al., *Subcellular localization of ALMS1 supports involvement of centrosome and basal body dysfunction in the pathogenesis of obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes*. Diabetes, 2005. **54**(5): p. 1581-7.
15. Collin, G.B., et al., *Alms1-disrupted mice recapitulate human Alstrom syndrome*. Hum Mol Genet, 2005. **14**(16): p. 2323-33.

16. Gerdes, J.M., E.E. Davis, and N. Katsanis, *The vertebrate primary cilium in development, homeostasis, and disease*. Cell, 2009. **137**(1): p. 32-45.
17. Pazour, G.J. and J.L. Rosenbaum, *Intraflagellar transport and cilia-dependent diseases*. Trends Cell Biol, 2002. **12**(12): p. 551-5.
18. Pazour, G.J. and G.B. Witman, *The vertebrate primary cilium is a sensory organelle*. Curr Opin Cell Biol, 2003. **15**(1): p. 105-10.
19. Ibanez-Tallon, I., N. Heintz, and H. Omran, *To beat or not to beat: roles of cilia in development and disease*. Hum Mol Genet, 2003. **12 Spec No 1**: p. R27-35.
20. Quarumby, L.M. and J.D. Parker, *Cilia and the cell cycle?* J Cell Biol, 2005. **169**(5): p. 707-10.
21. Salisbury, J.L., *Primary cilia: putting sensors together*. Curr Biol, 2004. **14**(18): p. R765-7.
22. Amat, P., et al., *Ultrastructural features of rat arcuate nucleus neurons during pregnancy*. Ital J Anat Embryol, 1998. **103**(4 Suppl 1): p. 311-24.
23. Stepanyan, Z., et al., *Leptin-target neurones of the rat hypothalamus express somatostatin receptors*. J Neuroendocrinol, 2003. **15**(9): p. 822-30.
24. Zhang, Q., et al., *Disruption of IFT results in both exocrine and endocrine abnormalities in the pancreas of Tg737(orpk) mutant mice*. Lab Invest, 2005. **85**(1): p. 45-64.
25. Badano, J.L., et al., *The ciliopathies: an emerging class of human genetic disorders*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2006. **7**: p. 125-48.
26. Tobin, J.L. and P.L. Beales, *Bardet-Biedl syndrome: beyond the cilium*. Pediatr Nephrol, 2007. **22**(7): p. 926-36.
27. Marion, V., et al., *Transient ciliogenesis involving Bardet-Biedl syndrome proteins is a fundamental characteristic of adipogenic differentiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(6): p. 1820-5.
28. Garvey, W.T., et al., *Evidence for defects in the trafficking and translocation of GLUT4 glucose transporters in skeletal muscle as a cause of human insulin resistance*. J Clin Invest, 1998. **101**(11): p. 2377-86.
29. Russell-Eggitt, I.M., et al., *Alstrom syndrome. Report of 22 cases and literature review*. Ophthalmology, 1998. **105**(7): p. 1274-80.
30. Warren, S.E., et al., *Late onset dilated cardiomyopathy in a unique familial syndrome of hypogonadism and metabolic abnormalities*. Am Heart J, 1987. **114**(6): p. 1522-4.
31. Collin, G.B., et al., *Homozygosity mapping at Alstrom syndrome to chromosome 2p*. Hum Mol Genet, 1997. **6**(2): p. 213-9.
32. Macari, F., et al., *Refinement of genetic localization of the Alstrom syndrome on chromosome 2p12-13 by linkage analysis in a North African family*. Hum Genet, 1998. **103**(6): p. 658-61.
33. Laurent, G.J., et al., *Regulation of matrix turnover: fibroblasts, forces, factors and fibrosis*. Biochem Soc Trans, 2007. **35**(Pt 4): p. 647-51.

34. Wynn, T.A., *Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases*. J Clin Invest, 2007. **117**(3): p. 524-9.
35. Darby, I.A. and T.D. Hewitson, *Fibroblast differentiation in wound healing and fibrosis*. Int Rev Cytol, 2007. **257**: p. 143-79.
36. Kalluri, R. and M. Zeisberg, *Fibroblasts in cancer*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(5): p. 392-401.
37. Tomasek, J.J., et al., *Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(5): p. 349-63.
38. Desmouliere, A., et al., *Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar*. Am J Pathol, 1995. **146**(1): p. 56-66.
39. Desmouliere, A., et al., *Apoptosis during wound healing, fibrocontractive diseases and vascular wall injury*. Int J Biochem Cell Biol, 1997. **29**(1): p. 19-30.
40. Desmouliere, A., et al., *Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts*. J Cell Biol, 1993. **122**(1): p. 103-11.
41. Lu, F., et al., *Fas-mediated apoptotic signal transduction in keloid and hypertrophic scar*. Plast Reconstr Surg, 2007. **119**(6): p. 1714-21.
42. Wilson, M.S. and T.A. Wynn, *Pulmonary fibrosis: pathogenesis, etiology and regulation*. Mucosal Immunol, 2009. **2**(2): p. 103-21.
43. Hinz, B., et al., *The myofibroblast: one function, multiple origins*. Am J Pathol, 2007. **170**(6): p. 1807-16.
44. Zhang, H.Y. and S.H. Phan, *Inhibition of myofibroblast apoptosis by transforming growth factor beta(1)*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1999. **21**(6): p. 658-65.
45. Jelaska, A. and J.H. Korn, *Role of apoptosis and transforming growth factor beta1 in fibroblast selection and activation in systemic sclerosis*. Arthritis Rheum, 2000. **43**(10): p. 2230-9.
46. den Dunnen, J.T. and S.E. Antonarakis, *Nomenclature for the description of human sequence variations*. Hum Genet, 2001. **109**(1): p. 121-4.
47. Zavan, B., et al., *Extracellular matrix-enriched polymeric scaffolds as a substrate for hepatocyte cultures: in vitro and in vivo studies*. Biomaterials, 2005. **26**(34): p. 7038-45.
48. Willman, C.L. and C.C. Stewart, *General principles of multiparameter flow cytometric analysis: applications of flow cytometry in the diagnostic pathology laboratory*. Semin Diagn Pathol, 1989. **6**(1): p. 3-12.
49. Van Gelder, R.N., et al., *Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(5): p. 1663-7.
50. Saeed, A.I., et al., *TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis*. Biotechniques, 2003. **34**(2): p. 374-8.
51. Yang, Y.H., et al., *Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(4): p. e15.

52. Tusher, V.G., R. Tibshirani, and G. Chu, *Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(9): p. 5116-21.
53. Zeeberg, B.R., et al., *GoMiner: a resource for biological interpretation of genomic and proteomic data*. Genome Biol, 2003. **4**(4): p. R28.
54. Ogata, H., et al., *KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*. Nucleic Acids Res, 1999. **27**(1): p. 29-34.
55. Peterkofsky, B. and R. Diegelmann, *Use of a mixture of proteinase-free collagenases for the specific assay of radioactive collagen in the presence of other proteins*. Biochemistry, 1971. **10**(6): p. 988-94.
56. Carmichael, J., et al., *Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing*. Cancer Res, 1987. **47**(4): p. 936-42.
57. Nicoletti, I., et al., *A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry*. J Immunol Methods, 1991. **139**(2): p. 271-9.
58. Schmidt, M., et al., *Glucocorticoids induce apoptosis in human monocytes: potential role of IL-1 beta*. J Immunol, 1999. **163**(6): p. 3484-90.
59. Conti, A., P. Delbon, and A. Sirignano, *Informed consent when taking genetic decisions*. Med Law, 2004. **23**(2): p. 337-53.
60. Chang, H.Y., et al., *Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(20): p. 12877-82.
61. Kim, J.C., et al., *The Bardet-Biedl protein BBS4 targets cargo to the pericentriolar region and is required for microtubule anchoring and cell cycle progression*. Nat Genet, 2004. **36**(5): p. 462-70.
62. Behm-Ansmant, I., et al., *mRNA quality control: an ancient machinery recognizes and degrades mRNAs with nonsense codons*. FEBS Lett, 2007. **581**(15): p. 2845-53.
63. Verrecchia, F. and A. Mauviel, *Transforming growth factor-beta and fibrosis*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(22): p. 3056-62.
64. Chen, C.C. and L.F. Lau, *Functions and mechanisms of action of CCN matricellular proteins*. Int J Biochem Cell Biol, 2009. **41**(4): p. 771-83.
65. Igarashi, A., et al., *Connective tissue growth factor gene expression in tissue sections from localized scleroderma, keloid, and other fibrotic skin disorders*. J Invest Dermatol, 1996. **106**(4): p. 729-33.
66. Konigshoff, M., et al., *WNT1-inducible signaling protein-1 mediates pulmonary fibrosis in mice and is upregulated in humans with idiopathic pulmonary fibrosis*. J Clin Invest, 2009. **119**(4): p. 772-87.
67. Norris, R.A., et al., *Periostin regulates collagen fibrillogenesis and the biomechanical properties of connective tissues*. J Cell Biochem, 2007. **101**(3): p. 695-711.
68. Norris, R.A., et al., *Neonatal and adult cardiovascular pathophysiological remodeling and repair: developmental role of periostin*. Ann N Y Acad Sci, 2008. **1123**: p. 30-40.
69. Bornstein, P., *Matricellular proteins: an overview*. Matrix Biol, 2000. **19**(7): p. 555-6.

70. Oka, T., et al., *Genetic manipulation of periostin expression reveals a role in cardiac hypertrophy and ventricular remodeling*. *Circ Res*, 2007. **101**(3): p. 313-21.
71. McGlashan, S.R., C.G. Jensen, and C.A. Poole, *Localization of extracellular matrix receptors on the chondrocyte primary cilium*. *J Histochem Cytochem*, 2006. **54**(9): p. 1005-14.
72. Donnelly, E., M.G. Ascenzi, and C. Farnum, *Primary cilia are highly oriented with respect to collagen direction and long axis of extensor tendon*. *J Orthop Res*. **28**(1): p. 77-82.
73. Donnelly, E., R. Williams, and C. Farnum, *The primary cilium of connective tissue cells: imaging by multiphoton microscopy*. *Anat Rec (Hoboken)*, 2008. **291**(9): p. 1062-73.
74. Grinnell, F., *Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices*. *Trends Cell Biol*, 2003. **13**(5): p. 264-9.
75. Badano, J.L., T.M. Teslovich, and N. Katsanis, *The centrosome in human genetic disease*. *Nat Rev Genet*, 2005. **6**(3): p. 194-205.
76. Yvon, A.M., et al., *Centrosome reorientation in wound-edge cells is cell type specific*. *Mol Biol Cell*, 2002. **13**(6): p. 1871-80.
77. Hinz, B., et al., *Mechanical tension controls granulation tissue contractile activity and myofibroblast differentiation*. *Am J Pathol*, 2001. **159**(3): p. 1009-20.
78. Santiago, B., et al., *Intracellular regulation of Fas-induced apoptosis in human fibroblasts by extracellular factors and cycloheximide*. *J Immunol*, 2004. **172**(1): p. 560-6.
79. Ito, K., et al., *Molecular mechanism investigation of cycloheximide-induced hepatocyte apoptosis in rat livers by morphological and microarray analysis*. *Toxicology*, 2006. **219**(1-3): p. 175-86.
80. Sanvicens, N. and T.G. Cotter, *Ceramide is the key mediator of oxidative stress-induced apoptosis in retinal photoreceptor cells*. *J Neurochem*, 2006. **98**(5): p. 1432-44.
81. Srivastava, R.K., et al., *Bcl-2 and Bcl-X(L) block thapsigargin-induced nitric oxide generation, c-Jun NH(2)-terminal kinase activity, and apoptosis*. *Mol Cell Biol*, 1999. **19**(8): p. 5659-74.
82. Krohn, A.J., E. Preis, and J.H. Prehn, *Staurosporine-induced apoptosis of cultured rat hippocampal neurons involves caspase-1-like proteases as upstream initiators and increased production of superoxide as a main downstream effector*. *J Neurosci*, 1998. **18**(20): p. 8186-97.
83. Norberg, E., et al., *An increase in intracellular Ca²⁺ is required for the activation of mitochondrial calpain to release AIF during cell death*. *Cell Death Differ*, 2008. **15**(12): p. 1857-64.
84. Zhang, X.D., S.K. Gillespie, and P. Hersey, *Staurosporine induces apoptosis of melanoma by both caspase-dependent and -independent apoptotic pathways*. *Mol Cancer Ther*, 2004. **3**(2): p. 187-97.

85. Thomas, L.R., et al., *Direct binding of Fas-associated death domain (FADD) to the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor DR5 is regulated by the death effector domain of FADD*. J Biol Chem, 2004. **279**(31): p. 32780-5.
86. Verrecchia, F., M.L. Chu, and A. Mauviel, *Identification of novel TGF-beta /Smad gene targets in dermal fibroblasts using a combined cDNA microarray/promoter transactivation approach*. J Biol Chem, 2001. **276**(20): p. 17058-62.
87. Pannu, J. and M. Trojanowska, *Recent advances in fibroblast signaling and biology in scleroderma*. Curr Opin Rheumatol, 2004. **16**(6): p. 739-45.
88. Wipff, P.J., et al., *Myofibroblast contraction activates latent TGF-beta1 from the extracellular matrix*. J Cell Biol, 2007. **179**(6): p. 1311-23.
89. Eswarakumar, V.P., I. Lax, and J. Schlessinger, *Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors*. Cytokine Growth Factor Rev, 2005. **16**(2): p. 139-49.
90. Pilewski, J.M., et al., *Insulin-like growth factor binding proteins 3 and 5 are overexpressed in idiopathic pulmonary fibrosis and contribute to extracellular matrix deposition*. Am J Pathol, 2005. **166**(2): p. 399-407.
91. Yasuoka, H., et al., *Insulin-like growth factor binding protein 5 induces skin fibrosis: A novel murine model for dermal fibrosis*. Arthritis Rheum, 2006. **54**(9): p. 3001-10.
92. Yasuoka, H., et al., *Insulin-like growth factor-binding protein-5 induces pulmonary fibrosis and triggers mononuclear cellular infiltration*. Am J Pathol, 2006. **169**(5): p. 1633-42.
93. Perks, C.M., C. McCaig, and J.M. Holly, *Differential insulin-like growth factor (IGF)-independent interactions of IGF binding protein-3 and IGF binding protein-5 on apoptosis in human breast cancer cells. Involvement of the mitochondria*. J Cell Biochem, 2000. **80**(2): p. 248-58.

APPENDICE I FIGURE E TABELLE SUPPLEMENTARI

TABELLA 1. Sequenze oligonucleotidiche dei primers utilizzati per l'analisi di mutazioni del gene *ALMS1* da gDNA.

FRAMMENTO	FORWARD (5'-3')	REVERSE (5'-3')
8a	TTCCTTTGATGGCTGTTTCCTTA	GTATTCCCCTCTTCTGCTCCACT
8a3	CCCAATAGCATTATCCCATCT	GACAGGTCCTCAAGGGACAA
8a6	CAAATCTCTTTTTCTTTAGGAGACA	TGCTAATGTCTTTTGGTTGAGAG
8b	CAACTGGCATGTCAACTC	CTTCGGGTAGATGGCTGTC
8c	GTACCCACAGGACTTAGCA	ACTCCTGTTGATAGAAAATACTGG
8f	GAAAGTTTCACCTGTTCTTG	TGGTCCAGGAGCAGAAGAA
8o	CCTCTTCCACGGGTGTATCTAA	ACCCTCTTCTCCCTGCTATCT
8p	GATCTTGCTTGTATTTTCATTG	GCAATATCAAGCAGCCAAATCT
10a	TTTTGCTTGCTGTGCTCTTTGTC	AGTTCTGAAATGGGGAATGACTT
10a4	ATGGTCTAATCTTAGCGTGGGTA	AGCCAAGGGTCCATCTTTTC
10c	AATGACCAGAGGACGGCAGAAC	TTTTAAATGATGAAGGGGAAGAGG
10e	CCCACGTGCAGATGACCAT	CACTATTCATCCTCGCTTTAGAAG
10f	GCATCTGCATCTACTCCTCTTCA	TTAGCCAGACACAACCTCCACTCA
16a	GCAGGCAGTGAATTTTCTGATA	GTTCTTTCCTGTCACCCAACTC
16b	TGGGAAACAAAGAAGTGATGGATA	CTCTAGGCTTTTAAACCGCTTCTT
16c	AAGGTCACCCCAGAGCAAACAAC	AGAAGTGGTGCCGGAAAGGATG
16d	ATCGAGCTGGGAGGTCTAATCAAA	TCTCACTCTTTTCCAGTTGGTAAG

TABELLA 2. Sequenze oligonucleotidiche dei primers utilizzati per l'analisi di mutazioni del trascritto *ALMS1* da cDNA.

FRAMMENTO	FORWARD (5'-3')	REVERSE (5'-3')
1	AGTCAGGGCTCTCCCCTTC	AGCGGGTGCTGAGATACTACT
2	TCTCTGGAGGAGGGCATATT	CCAATGTCTGAATCAACAGGA
3	ACTGTGCCAAAGGCTCCTAA	TGTCTGCTAAGTCTGTGGGTA
4a	AGTTTCAGCCACTCCTGGAC	TTGGGACAGTCTTCTGGTCA
4b	TATTGGCTGCCAGAAGACT	CTAGGCTTCTCCCTCTGTGG
5	GACCAGAAGACTGTCCCAACA	CCGCTGAAACATTCTTAGCC
6	GAAAGTTTCACCTGTTCTTG	TGGTCCAGGAGCAGAAGAA
7	GAGCAAAGTCTGGCAGTTTC	AGGGCAGGATGTTTATTCCA
8	CGAGAGTTGCCGATTTT	GCTGTTGGTAATACTGTTTTCTGG
9	CAGGAATTGCCAGGTAGTCA	TACTGTCCCACGAGCAGGA
10	CCACGGGTGTATCTAATGGTG	AGGTTGACATGCTTGGCTCT
11	TCCAAGGGTTTACAGAGTCCA	TTGCTACAATTTGCCCTGGT
12	GGAGCATCTGTGGGGGTATT	TGGAAGAAGTCTTGGGACAAA
13	GCATCTGCATCTACTCCTCCTT	CTGAGGCATCTGCATTTTCA
14	ACTTCCCAGCTCAGGTGCTA	CCTTCTGATCCCTTTGTGGA
15	TCAGCATCATCCAGACAAACA	TGCTCCGCTTCTCAAGGTAT
16	GGCTCTGCACGAAAGGAGTA	AGGGTTGCTCTCACAAATGG
17	CCAGGTAGCAAACCATGTGA	TTCCAAGGCTCTGAGGAAAA
18	CAAGCCTATCAGCAAGAAGGA	GCAGAAAGTATTGCTCCCAAA

TABELLA 3. Modulazione dell'espressione genica nei fibroblasti ALMS versus fibroblasti di controllo.

GENI ASSOCIATI AL CICLO CELLULARE

GENE SYMBOL	GENE BANK	UNIGENE	DESCRIPTION	FOLD CHANGE (ALMS vs CONTROL)
cell cycle progression associated genes				
IL7R	NM_002185	237868	Interleukin 7 receptor	-0.98
CKS2	NM_001827	83758	CDC28 protein kinase 2	-0.94
CCNE2	NM_057749	30464	Cyclin E2	-0.92
PBK	NM_018492	104741	T-LAK cell-originated protein kinase	-0.91
E2F7	BC016658	144687	Homo sapiens, Similar to growth accentuating protein 43, mRNA	-0.9
CDC2	NM_001786	334562	Cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M	-0.86
DTL	NM_016448	126774	Denticleless homolog (Drosophila)	-0.77
TMPO	NM_003276	11355	Thymopoietin	-0.73
UBE2C	NM_007019	93002	Ubiquitin-conjugating enzyme E2C	-0.7
CCNA2	NM_001237	85137	Cyclin A2	-0.67
CDC6	NM_001254	69563	CDC6 cell division cycle6 homolog (S.cerevisiae)	-0.62
CCNB1	NM_031966	23960	Cyclin B1	-0.56
NCAPG2	NM_017760	18616	non-SMC condensin II complex, subunit G2	-0.52
replication associated genes				
RRM2	NM_001034	75319	Ribonucleotide reductase M2 polypeptide	-1.42
HELLS	AF155827	203963	Helicase, lymphoid-specific	-1.08
GENS2	NM_016095	108196	GENS complex subunit 2 (Psf2 homolog)	-0.96
RFC4	NM_002916	35120	Replication factor C (activator1) 4 (37kD)	-0.89
PRIM2A	NM_000947	74519	Primase, polypeptide 2A (58kD)	-0.81
PRIM1	NM_000946	82741	Primase, polypeptide 1 (49kD)	-0.77
RFC3	NM_002915	115474	Replication factor C (activator1) 3 (38kD)	-0.75
DTYMK	NM_012145	79006	Deoxythymidylate kinase (thymidylatekinase)	-0.71

MCM2	NM_004526	57101	MCM2 mini chromosome maintenance deficient 2, mitotin(<i>S.cerevisiae</i>)	-0.68
TOP1	NM_003286	317	Topoisomerase (DNA)I	-0.57
MCM5	NM_006739	77171	MCM5 mini chromosome maintenance deficient 3 (<i>S.cerevisiae</i>)	-0.57
MCM3	NM_002388	179565	MCM3 mini chromosome maintenance deficient 3 (<i>S.cerevisiae</i>)	-0.56
MCM4	X74794	154443	MCM4 mini chromosome maintenance deficient 4 (<i>S.cerevisiae</i>)	-0.51
MCM6	NM_005915	155462	MCM6 mini chromosome maintenance deficient 6	-0.5
RPA2	NM_002946	79411	Replication protein A2 (32kD)	-0.48
RRM1	NM_001033	2934	Ribonucleotide reductase M1 polypeptide	-0.47
TIMELESS	NM_003920	118631	Timeless homolog (<i>Drosophila</i>)	-0.47
RPA3	NM_002947	1608	Replication protein A3 (14kD)	-0.45
TOP2A	NM_001067	156346	Topoisomerase (DNA) II alpha (170kD)	-0.43
RFC5	NM_007370	171075	Replication factor C(activator) 5 (36.5kD)	-0.32
centrosome-kinetochore associated genes				
SPBC25	NM_020675	21137	SPC25, NDC80 kinetochore complex component, homolog (<i>S.cerevisiae</i>)	-0.98
AURKA	NM_003158	333116	Aurora kinase A	-0.89
MAD2LI	NM_002358	79078	MAD2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast)	-0.88
RCC1	NM_001269	84746	Regulator of chromosome condensation 1	-0.86
CDCA8	NM_018101	48855	Cell division cycle associated 8	-0.85
STMN1	NM_005563	250811	Stathmin 1/oncoprotein 18	-0.84
OIP5	BC015050	116206	Opa-interacting protein 5	-0.83
BUB1	NM_004336	98658	BUB1 budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog (yeast)	-0.75
FAM83D	AK055793	70704	FAM83D family with sequence similarity 83, member D	-0.74
BLM	NM_000057	36820	Bloom syndrome, RecQ helicase-like	-0.74
CEP55	NM_018131	14559	Centrosomal protein 55kDa	-0.73
CENPM	NM_024053	208912	centromere protein M	-0.73
TMPO	NM_003276	11355	Thymopoietin	-0.73
H2AFZ	NM_002106	119192	H2A histone family, member Z	-0.72
BUB1B	NM_001211	36708	BUB1 budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog beta(yeast)	-0.72

ECT2	NM_018098	122579	Epithelial cell transforming sequence 2 oncogene	-0.71
CDC20	NM_001255	82906	CDC20 cell division cycle 20 homolog (<i>S.cerevisiae</i>)	-0.63
TPX2	NM_012112	9329	TPX2, microtubule-associated, homolog (<i>Xenopus laevis</i>)	-0.62
ANLN	NM_018685	62180	Anillin, actin binding protein (scraps homolog, <i>Drosophila</i>)	-0.61
CENPF	NM_016343	77204	Centromere protein F (350/400kD, mitotin)	-0.6
KIF2C	NM_006845	69360	Kinesin-like 6 (mitotic centromere-associated kinesin)	-0.52
LMNB2	M94362	334709	Lamin B2	-0.51
KIF23	NM_004856	270845	Kinesin-like 5 (mitotic kinesin-like protein 1)	-0.5
KIF20A	NM_005733	73625	RAB6 interacting, kinesin-like (rabkinesin6)	-0.46
CDC25B	NM_021874	153752	Cell division cycle 25B	-0.46
TUBG1	NM_001070	21635	Tubulin, gamma 1	-0.34

GENI ASSOCIATI ALLA MATRICE EXTRACELLULARE/ FIBROSI

GENE SYMBOL	GENE BANK	UNIGENE	DESCRIPTION	FOLD CHANGE (ALMS vs CONTROL)
HAPLN1	NM_001884	2799	Cartilage linking protein 1	3.35
ASPN	NM_017680	10760	Asporin	3.15
PRELP	NM_002725	76494	Proline arginine-rich end leucine-rich repeat protein	0.14
COL15A1	NM_001855	83164	Collagen, type XV, alpha 1	2.45
COL8A1	AL359062	41271	Homo sapiens mRNA full length insert cDNA clone EUROIMAGE1913076	2.13
COL11A1	NM_001854	82772	Collagen, type XI, alpha 1	2.07
FGFR2	NM_023028	278581	Fibroblast growth factor receptor 2	0.09
ITGA11	AF109681	256297	Integrin, alpha11	1.05
SGCD	NM_000337	151899	Sarcoglycan, delta (35kDa dystrophin-associated glycoprotein)	1.43
IGFBP5	NM_000599	3488	IGFBP5 insulin-like growth factor binding protein 5	1.42
DPT	NM_001937	80552	Dermatopontin	1.38
ADAM12	NM_003474	8850	A disintegrin and metalloproteinase domain 12 (meltrin alpha)	1.36
COL5A2	NM_000393	82985	Collagen, type V, alpha 2	1.34
COL5A1	NM_000093	146428	Collagen, type V, alpha 1	1.01
COL3A1	NM_000090	119571	Collagen, type III, alpha 1	1.08
COL1A1	NM_000088	172928	Collagen, type I, alpha 1	1.08
HAS2	NM_005328	159226	Hyaluronan synthase 2	1.04
COL12A1	NM_004370	101302	Collagen, type XII, alpha 1	1.01
COL4A1	NM_001845	119129	Collagen, type IV, alpha 1	1
P4HA1	NM_000917	76768	Procollagen-proline, 2-oxoglutarate4-dioxygenase	0.07
CTGF	NM_001901	75511	Connective tissue growth factor	0.07
ACTA2	NM_001613	195851	Actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	0.06
SDC2	J04621	1501	Syndecan 2	0.06

IGFBP3	M35878	77326	Insulin-like growth factor binding protein 3	0.08
LEPREI	NM_022356	10114	Growth suppressor 1	0.05
LUM	NM_002345	79914	Lumican	0.05
MFAP4	L38486	296049	Microfibrillar-associated protein 4	0.05
MFAP2	NM_017459	83551	Microfibrillar-associated protein 2	0.05
SERPINH1	NM_001235	9930	Serine (or cysteine) proteinase inhibitor, (heat shock protein 47), member 2	0.51
CYR61	NM_001554	8867	Cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	0.51
SPARC	NM_003118	111779	Secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)	0.49
NOV	NM_002514	235935	Nephroblastoma overexpressed gene	-1.34
CD36	NM_000072	75613	CD36 molecule (thrombospondin receptor)	-1.25
CCR2	NM_000647	395	Chemokine(C-Cmotif) receptor2	-0.92
IL7	NM_000880	72927	Interleukin 7	-0.87
LEPREL1	NM_018192	42824	Leprecan-like 1	-0.65

GENI ASSOCIATI ALL'ADESIONE/MOTILITA'

GENE SYMBOL	GENE BANK	UNIGENE	DESCRIPTION	FOLD CHANGE (ALMS vs CONTROL)
POSTN	NM_006475	136348	Osteoblast specific factor 2 (fascin I-like)	4.12
WISP1	AK027294	9812	WNT1 inducible signaling pathway protein 1	2.33
IGFBP5	NM_000599	3488	IGFBP5 insulin-like growth factor binding protein 5	1.42
DPT	NM_001937	80552	Dermatopontin	1.38
CSPG2	U16306	81800	Chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versican)	1.35
ITGB5	NM_002213	149846	Integrin, beta 5	0,061
SCD2	J04621	1501	Syndecan 2	0,056
TNS1	AK057328	9973	Tensin 1	0,052
LUM	NM_002345	79914	Lumican	0,051
LGALS3BP	NM_005567	79339	Lectin, galactoside-binding, soluble, 3 binding protein	0,05
PTK7	NM_002821	90572	PTK7 protein tyrosine kinase 7	0,049
MFAP4	L38486	296049	Microfibrillar-associated protein 4	0,049
MFAP2	NM_017459	83551	Microfibrillar-associated protein 2	0,047
LIMS2	NM_017980	127273	LIM and senescent cell antigen-like domains 2	0,047
AMIGO2	AC004010	121520	adhesion molecule with Ig-like domain 2	-1.11
EDG2	NM_057159	75794	Endothelial differentiation, lysophosphatidic acid G-protein-coupled receptor, 2	-1.08
CD9	NM_001769	1244	CD9 antigen (p24)	-0.86
HMMR	NM_012484	72550	Hyaluronan-mediated motility receptor (RHAMM)	-0.65
EPDR1	A Y027862	46721	Ependymin related protein 1 (zebrafish)	-0.6
TYRO3	NM_006293	301	TYRO3 protein tyrosine kinase	-0.56
GJA7	NM_005497	43761	Gap junction protein, alpha7, 45kD (connexin45)	-0.49

GENI ASSOCIATI ALL'APOPTOSI

GENE SYMBOL	GENE BANK	UNIGENE	DESCRIPTION	FOLD CHANGE (ALMS vs CONTROL)
POSTN	NM_006475	136348	Osteoblast specific factor 2 (fascin I-like)	4.12
WISP1	AK027294	9812	WNT1 inducible signaling pathway protein 1	2.33
IGFBP5	NM_000599	3488	IGFBP5 insulin-like growth factor binding protein 5	1.42
DPT	NM_001937	80552	Dermatopontin	1.38
CSPG2	U16306	81800	Chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versican)	1.35
ITGB5	NM_002213	149846	Integrin, beta 5	0,061
SCD2	J04621	1501	Syndecan 2	0,056
TNS1	AK057328	9973	Tensin 1	0,052
LUM	NM_002345	79914	Lumican	0,051
LGALS3BP	NM_005567	79339	Lectin, galactoside-binding, soluble,3 binding protein	0,05
PTK7	NM_002821	90572	PTK7 protein tyrosine kinase 7	0,049
MFAP4	L38486	296049	Microfibrillar-associated protein 4	0,049
MFAP2	NM_017459	83551	Microfibrillar-associated protein 2	0,047
LIMS2	NM_017980	127273	LIM and senescent cell antigen-like domains 2	0,047
AMIGO2	AC004010	121520	adhesion molecule with Ig-like domain 2	-1.11
EDG2	NM_057159	75794	Endothelial differentiation, lysophosphatidic acid G-protein-coupled receptor,2	-1.08
CD9	NM_001769	1244	CD9 antigen (p24)	-0.86
HMMR	NM_012484	72550	Hyaluronan-mediated motility receptor (RHAMM)	-0.65
EPDR1	AY027862	46721	Ependymin related protein 1 (zebrafish)	-0.6
TYRO3	NM_006293	301	TYRO3 protein tyrosine kinase	-0.56
GJA7	NM_005497	43761	Gap junction protein, alpha7, 45kD(commexin45)	-0.49

I geni differenzialmente espresso, identificati attraverso l'esperimento di DNA microarrays, sono stati analizzati e ordinati in categorie in base alla loro funzione. In tabella sono riportati per ciascuna classe I geni più informativi.

TABELLA 4. Sequenze oligonucleotidiche dei primers e condizioni di amplificazione utilizzate nelle qPCR.

<i>GENE</i>	FORWARD	REVERSE	AMPLIFICATO	[PRIMERS] nmol/l	PARAMETRI di AMPLIFICAZIONE
<i>POSTN</i>	5'-TGG AAA CCA TCG GAG GCA AA-3'	5'- ARG TGA ATC GCA CCG TTT CTC C-3'	115 bp	F=300 R=300	95°C x 15 sec 60°C x 1 min
<i>ACTA2</i>	5'-AAG GCC AAC CGG GAG AAA AT-3'	5'-ATT GTG GGT GAC ACC ATC TCC A-3'	150 bp	F=300 R=300	95°C x 15 sec 60°C x 1 min
<i>COL1A1</i>	5'-CCT GGA TGC CAT CAA AGT CT-3'	5'-TCT TGT CCT TGG GGT TCT TG-3'	116 bp	F=300 R=300	95°C x 15 sec 60°C x 1 min
<i>COL3A1</i>	5'-AAG AAT TTG GTG TGG ACG TTG-3'	5'-TTT TGT CGG TCA CTT GCA CT-3'	136 bp	F=300 R=300	95°C x 15 sec 60°C x 1 min
<i>COL4A1</i>	5'-CCA GGA TTT CAA GGT CCA AA-3'	5'-CTC CCC TTT GAT GAT GTC GT-3'	138 bp	F=100 R=100	95°C x 15 sec 60°C x 30 sec 72°C x 30 sec
<i>COL5A1</i>	5'-CCT GAC CCT GGA CAG TGA AG-3'	5'-GGC TCC TTC CCT CTG TTC TC-3'	110 bp	F=300 R=300	95°C x 15 sec 60°C x 1 min
<i>COL5A2</i>	5'-TCA AAA GAA GCC TCC CAG AA-3'	5'-TCT AAG TCA TTT GCC CCT TTG-3'	116 bp	F=300 R=300	95°C x 15 sec 60°C x 1 min
<i>COL8A1</i>	5'-ACC ACC CCA GGG AGA GTA TC-3'	5'-AAT GCA GGC ATC TCA TAG GC-3'	120 bp	F=300 R=300	95°C x 15 sec 60°C x 30 sec 78°C x 30 sec
<i>COL11A1</i>	5'-GCA TTT TGA TGC TTT ATT CAA GG-3'	5'-CAC ACA TTT CCC TGT CCA AA-3'	123 bp	F=300 R=300	95°C x 15 sec 60°C x 1 min
<i>COL12A1</i>	5'-ACA TGC CGT GTG CCT TTA GT-3'	5'-AAC TGC CCG CTC GAA ATA C-3'	108 bp	F=300 R=300	95°C x 15 sec 60°C x 1 min
<i>COL15A1</i>	5'-AGC AAC CCA CAT CAG CTT CT-3'	5'-ATG CTC GGT AGG TGG ACA AC-3'	172 bp	F=300 R=300	95°C x 15 sec 60°C x 1 min
<i>HMBS</i>	5'-GGC AAT GCG GCT GCAA-3'	5'-GGG TAC CCA CGC GAA TCA C-3'	60 bp	F=300 R=300	95°C x 15 sec 60°C x 1 min

POSTN= periostin; *ACTA*= actin, alpha-2, smooth muscle, aorta; *COL1A1*= collagen, type I, alpha 1; *COL3A1*= collagen, type III, alpha 1; *COL4A1*= collagen, type IV, alpha 1; *COL5A1*= collagen, type V, alpha 1; *COL5A2*= collagen, type V, alpha 2; *COL8A1*= collagen, type VIII, alpha 1; *COL11A1*= collagen, type XI, alpha 1; *COL12A1*= collagen, type XII, alpha 1; *COL15A1*= collagen, type XV, alpha 1; *HMBS*= hydroxymethylbilane synthase

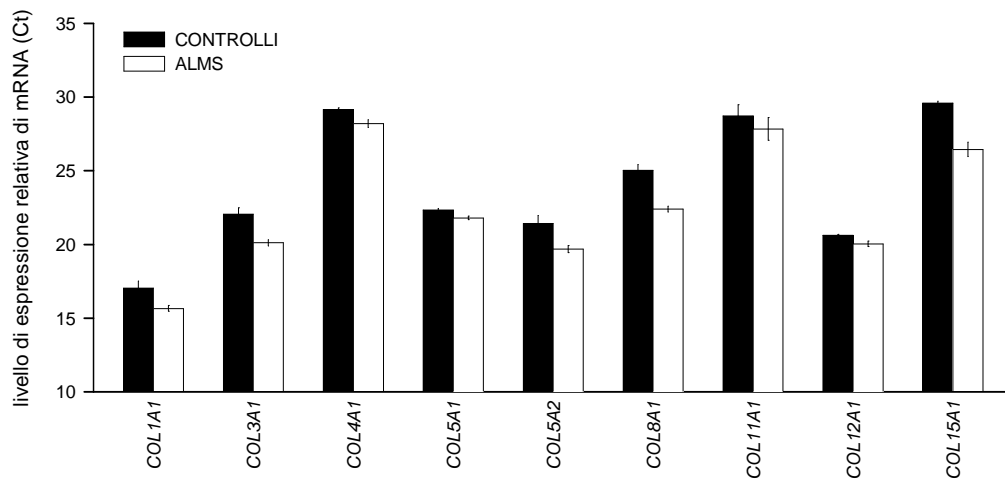


FIGURA 1. Livello di espressione relativa di mRNA di proteine collagene in fibroblasti ALMS. L'espressione dei trascritti *COL1A1*, *COL3A1*, *COL4A1*, *COL5A1*, *COL5A2*, *COL8A1*, *COL11A1*, *COL12A1*, *COL15A1* è stata quantificata mediante qPCR nei fibroblasti dei controlli sani (CONTROLLI) e dei pazienti ALMS (ALMS). I risultati sono ripostati come cicli soglia (Ct) di ciascuna reazione di qPCR ed espressi come valore medio \pm SEM.

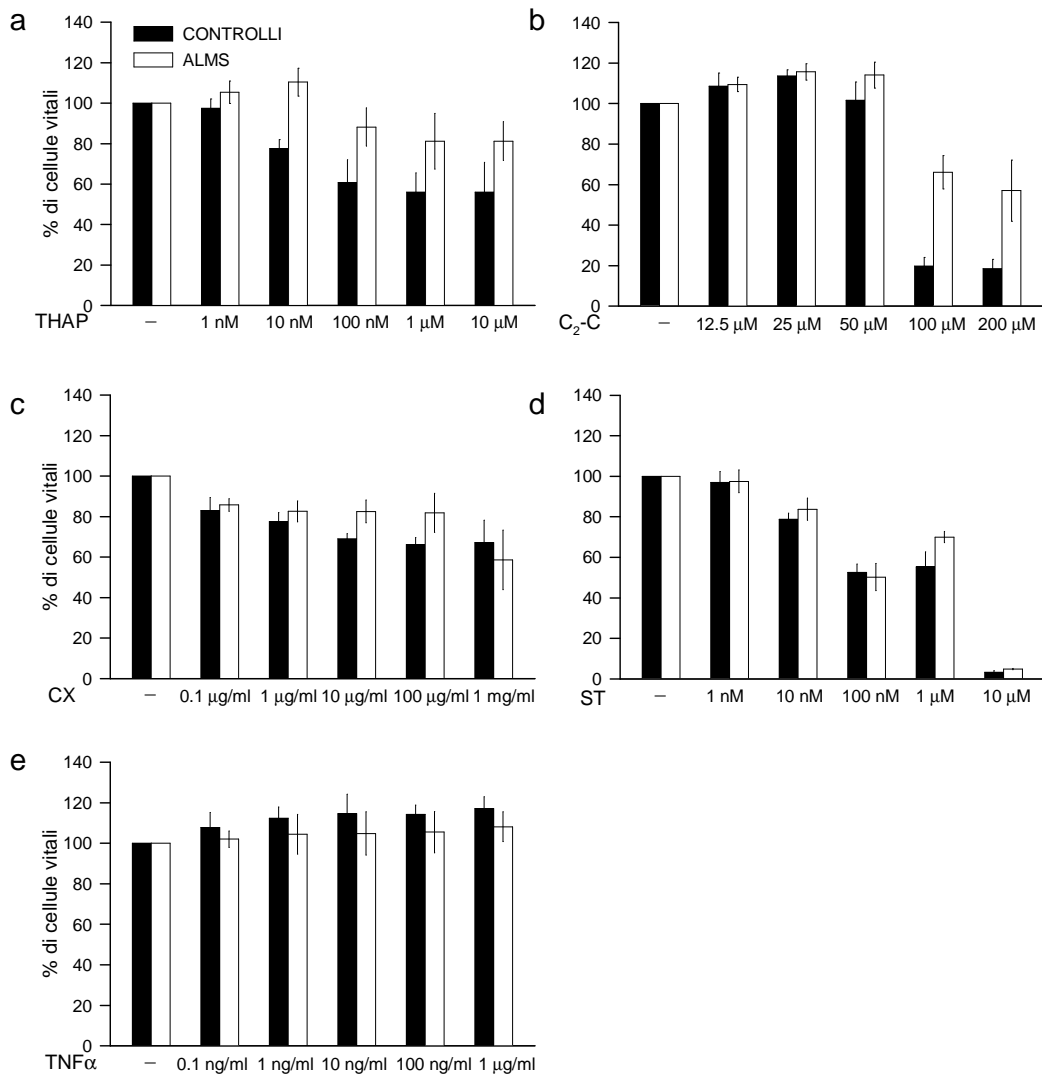
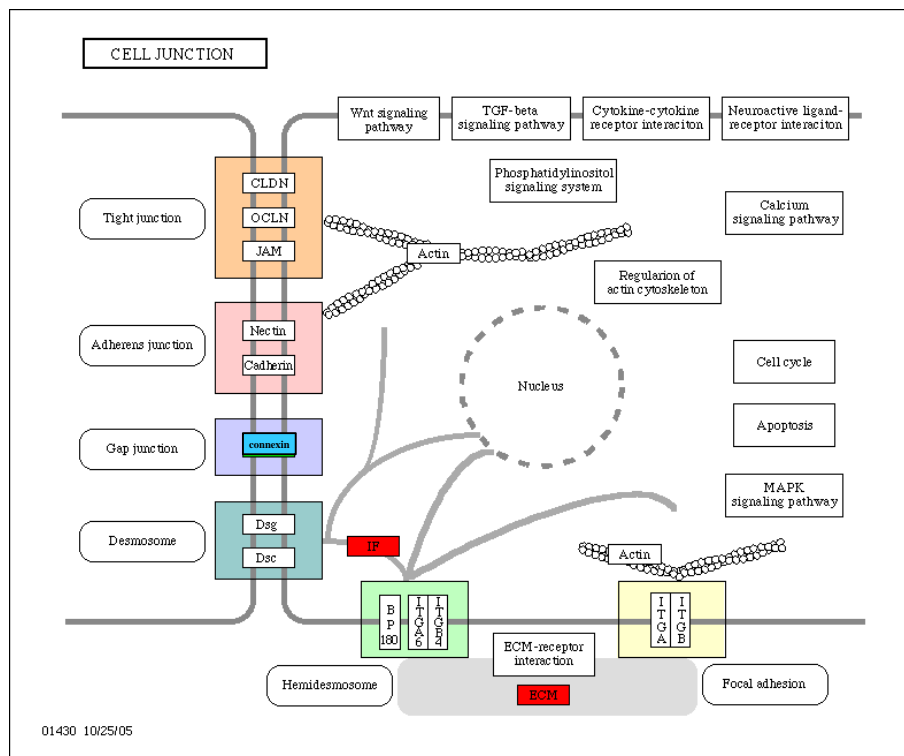
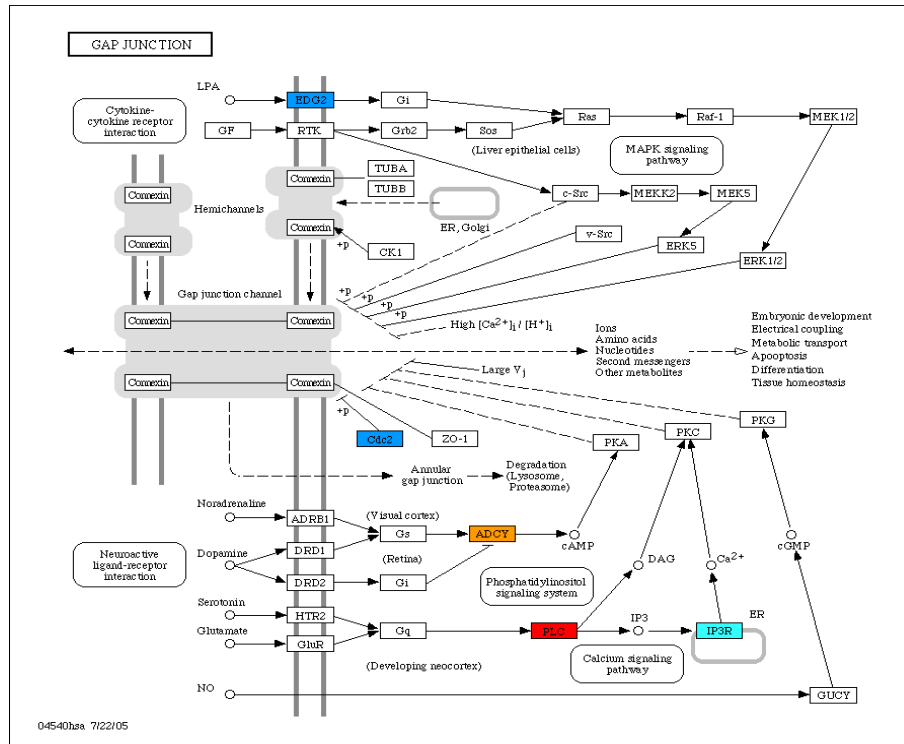
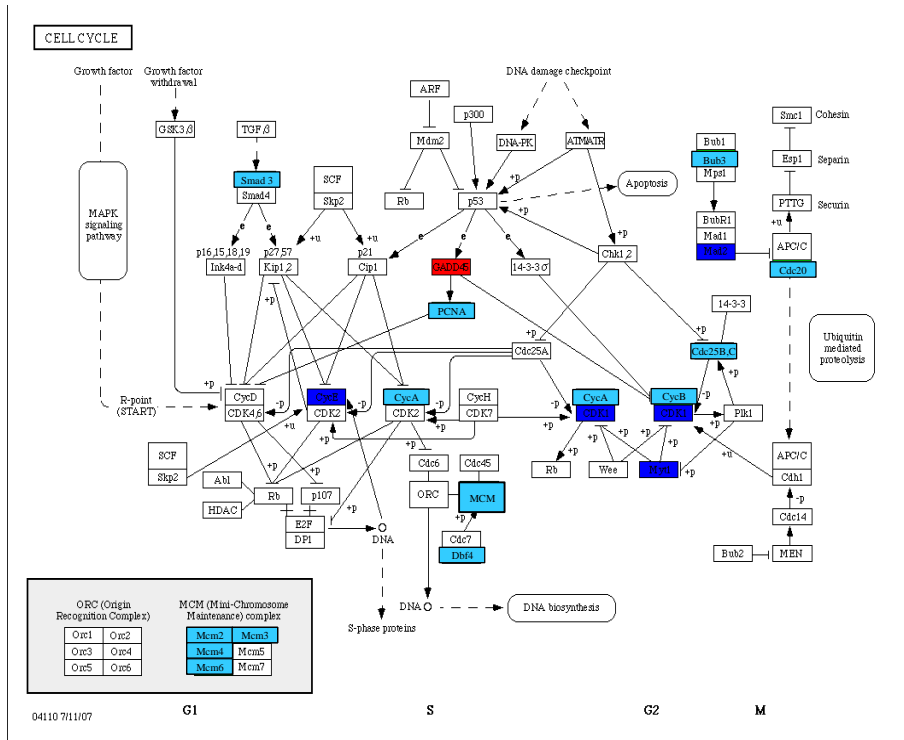


FIGURA 2. Effetto dose-risposta di fibroblasti ALMS al trattamento induttori di apoptosi. Fibroblasti di controllo (CONTROLLI) e di pazienti ALMS (ALMS) sono stati stimolati con concentrazioni crescenti (a) di taspigargina (THAP, concentrazioni crescenti 1:10 per 48 ore), (b) C₂-ceramide (C₂-C, concentrazioni crescenti 1:2 per 48 ore), (c) cicloesimide (CX, concentrazioni crescenti 1:10 per 48 ore), (d) staurosporina (ST, concentrazioni crescenti 1:10 per 24 ore) e (3) TNF α (concentrazioni crescenti 1:10 per 24 ore) in SM al 10% FBS. La % di cellule vitali è stata determinata mediante saggio MTT ed è riportata come valore medio \pm SEM espresso rispetto alla cellule non stimolate (-) indicate come 100%.

APPENDICE 2 KEGG PATHWAYS





Geni risultati differenzialmente espressi in modo significativo dalla valutazione statistica SAM sono stati analizzati utilizzando il database KEGG, per correlare i dati ottenuti dall'esperimento di microarrays a un significato biologico. L'analisi dei diagrammi del KEEG database ha indicato la modulazione nei fibroblasti ALMS dei seguenti *pathways*: *cell cycle*, *cell communication*, *ECM (extracellular matrix) receptor interaction*. Geni risultati up-regolati sono rappresentati in rosso e arancio, mentre geni down-regolati sono rappresentati in blu e celeste. In rosso sono indicati i geni che hanno passato l'analisi statistica e mostrano un log₂ rispettivamente maggiore di 0.7 e minore di -0.7. I geni rappresentati in arancio e celeste hanno superato l'analisi statistica e che mostrano un log₂ compreso rispettivamente tra 0.7 e 0.5 e tra -0.5 e -0.7.

Appendice 3 ABBREVIAZIONI

2D bidimensionale

3D tridimensionale

ACTA2 actin, alpha 2, smooth muscle, aorta (also known as α -SMA, alpha smooth muscle actin)

ASPN asporin

AURKA aurora kinase A (also known as STK6 serine/threonine kinase 6)

BCL-2 B-cell CLL/lymphoma 2

BUN blood urea nitrogen

C controllo

C₂-C C₂-ceramide

CCN acronym for connective tissue growth factor (CTGF), cystein rich protein (CYR61), and nephroblastoma overexpressed gene (NOV)

CCNA2 cyclin A2

CCNB1 cyclin B1

CCNE2 cyclin E2

CDC20 cell division cycle 20 homolog (*S. cerevisiae*)

CDC6 cell division cycle 6 homolog (*S. cerevisiae*)

CDCA8 cell division cycle associated 8

CDK1 cyclin-dependent kinase 1 (also known as CDC2, Cell division cycle 2)

cDNA complementary DNA

CENPF centromere protein F, 350/400ka (mitosin)

CENPM centromere protein M

CEP55 centrosomal protein 55kDa

CKS2 CDC28 protein kinase 2

COL11A1 collagen, type XI, alpha1

COL12A1 collagen, type XII, alpha1

COL15A1 collagen, type XV, alpha1

COL1A1 collagen, type I, alpha1

COL3A1 collagen, type III, alpha1
COL4A1 collagen, type IV, alpha1
COL5A1 collagen, type V, alpha1
COL5A2 collagen, type V, alpha2
COL8A1 collagen, type VIII, alpha1
CTGF connective tissue growth factor
CUGBP2 CUG triplet repeat, RNA binding protein 2
CX cyclohesimide
CYR61 cysteine-rich, angiogenic inducer, 61
DAPI 4',6-diamidino-2-phenylindole
DPT dermatopontin
DTYMK deoxythymidylate kinase (thymidylate kinase)
ECM extracellular matrix
EDIL3 EGF-like repeats and discoidin I-like domains 3
EDTA ethylenediaminetetraacetic acid
FACS fluorescence activated cell sorting
FAM83D family with sequence similarity 83, member D
FBS fetal bovine serum
FDR false discovery rate
FGF2 fibroblast growth factor 2
FSC forward scatter
gDNA DNA genomico
GFR glomerular filtration rate
GO gene ontology
GULP1 GULP, engulfment adaptor PTB domain containing 1 (also known as CED-6 Cell Death abnormality 6)
h ora
H2AFZ H2A histone family member Z

HAPLN1 hyaluronan and proteoglycan link protein 1 (also known as CRTL1, Cartilage linking protein 1)

HAS2 hyaluronan synthase 2

HG high glucose

HMBS hydroxymethylbilane synthase

IGFBP3 insulin-like growth factor binding protein 3

IGFBP5 Insulin-like growth factor binding protein 5

IGT impaired glucose tolerance

IL24 interleuchina 24

ILx interleuchine

ITGA11 integrina, alpha 11

ITGB5 integrina, beta 5

KEGG kyoto encyclopedia of genes and genomes

LEPRE1 leucine proline-enriched proteoglycan (leprecan) 1

LGALS3BP lectin, galactoside-binding, soluble, 3 binding protein (also known as M2BP, Mac-2-binding protein)

LIMS2 LIM and senescent cell antigen-like domains 2

LOWESS locally weighted scatterplot smoothing

LUM Lumican

MAD2L1 MAD2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast)

MAF v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog (avian)

MCM2, *MCM 3*, *MCM 4*, *MCM 5*, *MCM 6* minichromosome maintenance complex component 2, 3, 4, 5, 6

MEF2C myocyte enhancer factor 2C

MFAP2 microfibrillar-associated protein 2

MFAP4 microfibrillar-associated protein 4

M-MLV moloney murine leukemia virus

NALP1 NLR family, pyrin domain containing 1 (also known as CARD7, caspase recruitment domain protein 7)

NOV nephroblastoma overexpressed gene

OIP5 Opa-interacting protein 5
P4HA1 prolyl 4-hydroxylase, alpha polypeptide I
PBS phosphate buffered saline
PCR polymerase chain reaction
PI ioduro di propidio
POSTN periostin, osteoblast specific factor
PRELP proline/arginine-rich end leucine-rich repeat protein
PRIM1 primase, DNA, polypeptide 1 (49kDa)
PRIM2A primase, DNA, polypeptide 2 (58kDa)
PT paziente
RCC1 regulator of chromosome condensation 1
RFC3 replication factor C (activator 1) 3, 38kDa, 4, 5
RFC4 replication factor C (activator 1) 4, 37kDa
RFC5 replication factor C (activator 1) 5, 36.5kDa
RR ridonucleotide reductase
RRM1 ribonucleotide reductase M1
RRM2 ribonucleotide reductase M2
SALL2 sal-like 2 (Drosophila)
SAM significance analysis of microarrays
SDC2 syndecan2
SDS Sodium dodecyl sulphate
SEM errore standard della media
SERPINH1 serpin peptidase inhibitor, clade H (heat shock protein 47), member 1, (collagen binding protein 1)
SGCD sarcoglycan, delta (35kDa dystrophin-associated glycoprotein)
SM medium standard
SPC25 SPC25, NDC80 kinetochore complex component, homolog (*S. cerevisiae*)
ss single strand
SSC side scatter

STMN1 stathmin1

ST staurosporinA

TCA trichloroacetic acid

TEM transmission electron microscopy

TGF- β transforming growth factor, beta

THAP thapsigargin

TNF- α tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)

TNS1 tensin 1

TUNEL terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling

US ultrasographic

v/v volume SU volume

VCAN versican (also known as CSPG2, chondroitin sulfate proteoglycan 2)

WISP1 WNT1 inducible signaling pathway protein 1

Le persone che mi hanno accompagnata in questi 3 anni di Dottorato e che desidero ringraziare sono moltissime.

Ringrazio il Prof. Federspil e il Prof. Vettor per avermi dato la possibilità di lavorare, crescere, imparare nel vostro laboratorio.

Un ringraziamento speciale e infinito è indubbiamente per Gabriella, per avermi sempre incoraggiata, consigliata, aiutata, insegnato con costanza; per l'entusiasmo che riponi in ciò che fai; per aver scelto di condividere con me le tue conoscenze, e soprattutto il tuo tempo; per la tua disponibilità a 360° e soprattutto la tua amicizia ... non basta certo una frase per descrivere quanto mi hai dato e per esprimere la mia riconoscenza.

Grazie a Francesca, per aver condiviso intensamente questo nostro lavoro, per la tua disponibilità e la tua amicizia; per aver adottato i "miei fibroblasti", per aver supportato e sopportato le molteplici conte, i passaggi, gli insuccessi ma soprattutto i successi di questo lavoro.

Grazie a Pietro e a Sara, per le costanti parole di incoraggiamento, per l'entusiasmo che avete dedicato a questo lavoro e lo spirito critico.

Grazie a tutti i ragazzi del laboratorio: Marnie, Chiara, Sonia, Cinzia, Catia, Betty, Riccardo e Alessandra, per aver condiviso questi tre anni, non sempre semplici, ma indubbiamente speciali e che porterò sempre con me.

Un ringraziamento speciale è per chi in tutti questi anni mi è sempre stato vicino.

Enrico, grazie per avermi accompagnata e sostenuta sempre con grande costanza, amore e infinita pazienza, appoggiando ogni scelta in ogni momento. Un ringraziamento di cuore ai miei genitori, per aver sempre creduto in me, per avermi regalato possibilità infinite, per avermi insegnato le vere cose importanti, per il vostro tempo per me, perché questo risultato è tanto mio quanto vostro. Grazie a Riccardo, perché mi sei sempre vicino.
