



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI
ROMA
"TOR VERGATA"**

FACOLTA' DI SCIENZE MATEMATICHE FISICHE E
NATURALI

DOTTORATO DI RICERCA IN IMMUNOLOGIA

XX CICLO

**Caratteristiche cliniche, ultrastrutturali e meccanismo
molecolare del deficit congenito delle proteine del
surfattante polmonare.**

Candidata: Dott.ssa Donatella Peca

Relatore: Dott. Olivier Danhaive

Coordinatore: Prof. Paolo Rossi

ABSTRACT

Il surfattante polmonare è una miscela di fosfolipidi e proteine strutturali sintetizzati dagli pneumociti di tipo II. Riveste come una sottile pellicola la parete interna degli alveoli e svolge il ruolo fondamentale di ridurre la tensione superficiale all'interfaccia aria-liquido, prevenendo così il collasso alveolare nella fase di espirazione del ciclo respiratorio. Il deficit di surfattante rappresenta la maggiore causa di sindrome da stress respiratorio (RDS) nei neonati. In molti casi la RDS è transitoria ed è legata all'imaturità del polmone, invece un'insufficienza respiratoria progressiva in neonati a termine e vicini al termine, potrebbe essere causata da difetti nei geni delle proteine correlate al surfattante. In particolare due proteine svolgono un ruolo critico per le proprietà tensioattive del surfattante, le proteine del surfattante B (SP-B), e C (SP-C), che rappresentano circa il 4% del surfattante e sono codificate rispettivamente dai geni *SFTPB* e *SFTPC*. Mutazioni sui geni codificanti per queste proteine sono la causa di insufficienza respiratoria neonatale acuta e interstiziopatia polmonare nel lattante e nel bambino. Recentemente, mutazioni sul gene "ATP binding cassette A3" (*ABCA3*) che codifica una proteina trasportatrice di fosfolipidi espressa specificatamente negli pneumociti di tipo II, sono state associate anch'esse a sindrome

di distress respiratorio letale e polmonite interstiziale infantile idiopatica nel neonato a termine e nel bambino.

Obiettivo di questo lavoro è l'identificazione di alterazioni genetiche associate a deficit del surfattante nei neonati e lattanti affetti da malattie respiratorie progressive ed inspiegate, e lo studio dei meccanismi molecolari ad esse correlati.

Un gruppo di 15 pazienti con tale quadro clinico è stato sottoposto allo studio genetico per i geni correlati al surfattante e, per quei pazienti per i quali era disponibile la biopsia polmonare, ad analisi istopatologica e ultrastrutturale del polmone. Lo studio del tessuto al microscopio ottico è risultato in parte aspecifico, mentre l'analisi al microscopio elettronico ha consentito di selezionare i casi in cui la patologia era causata da deficit del surfattante. In questi, lo studio ultrastrutturale del tessuto ha evidenziato la presenza costante di anomalie dei corpi lamellari, gli organelli contenenti il surfattante intracellulare.

L'analisi della sequenza genetica delle proteine del surfattante e dell'ABCA3 ha portato all'individuazione di alcune nuove mutazioni sul gene *ABCA3*. In nessuno dei casi analizzati sono state riscontrate mutazioni sui geni codificanti le proteine strutturali del surfattante. La presenza di mutazioni su entrambi gli alleli dell'*ABCA3* era associata ad un quadro di distress respiratorio letale. Gran parte dei pazienti con un decorso clinico più tardivo e progressivo presentavano invece una singola mutazione in eterozigosi. Nei casi omozigoti o con due mutazioni in eterozigosi,

l'assetto genetico influiva sul fenotipo attraverso diversi meccanismi: deficit totale o parziale dell'espressione della proteina, sintesi di proteina non funzionale o localizzazione aberrante della proteina all'interno dello pneumocita. Gli eterozigoti presentavano una riduzione parziale dell'espressione della proteina, ma poiché il genotipo era identico a quello dei parenti portatori sani, il meccanismo responsabile della malattia non è chiaro. I difetti genici dell'ABCA3 appaiono in questo studio come la causa principale di malattia parenchimale polmonare inspiegata nei neonati e lattanti. Da questi risultati si deduce l'importanza della combinazione dello studio genetico con l'analisi ultrastrutturale per eseguire la diagnosi completa di queste malattie rare e ancora in gran parte sconosciute.

ABBREVIAZIONI

ABCA3 ATP binding cassette protein A3
ARDS sindrome da distress respiratorio nell'adulto
DIP polmonite interstiziale desquamativa
ECD dominio extracellulare
NBD dominio di legame con nucleotidi
PA proteinosi alveolare
PILD malattia polmonare interstiziale pediatrica
RDS Sindrome da distress respiratorio
SP-A proteina A del surfattante
SP-B proteina B del surfattante
SP-C proteina C del surfattante
SP-D proteina D del surfattante
URDS indrome da distress respiratorio inspiegata
UTR regione non tradotta

INDICE

-	ABSTRACT	
-	ABBREVIAZIONI	
-	1 INTRODUZIONE.....	8
-	1.1 Il surfattante polmonare.....	8
-	1.2 Sindrome da Distress Respiratorio neonatale.....	12
-	1.3 Malattia polmonare cronica dell'infanzia e polmonite interstiziale infantile.....	14
-	1.4 Fattori genetici nella RDS e nel "chronic lung disease"	16
-	1.5 Struttura e funzione delle proteine correlate al surfattante.....	18
-	1.5.1 Le proteine idrofiliche del surfattante: SP-A e SP-D.....	18
-	1.5.2 Le proteine idrofobiche del surfattante: SP-B e SP-C.....	20
-	1.5.3 L'ABCA3.....	26
-	1.6 Modificazioni genetiche dei geni correlati al surfattante...30	
-	1.6.1 Effetto di mutazioni sul gene codificante la SP-B.....	30
-	1.6.2 Effetto di mutazioni sul gene codificante la SP-C.....	32
-	1.6.3 Effetto di mutazioni sul gene codificante l'ABCA3.....	33
-	1.6.4 Polimorfismi sui geni correlati al surfattante e rischio di RDS.....	36
-	2 MATERIALI E METODI.....	38
-	2.1 Reclutamento dei pazienti.....	38
-	2.2 Analisi istologica e ultrastrutturale.....	40
-	2.3 Analisi di espressione dell'ABCA3 al microscopio elettronico.....	41
-	2.4 Estrazione di DNA e sequenziamento.....	42
-	2.5 Estrazione di RNA e sintesi di cDNA.....	45
-	2.6 Controllo delle mutazioni introniche.....	46
-	2.7 Immunofluorescenza.....	48
-	2.8 Western Blot.....	49
-	2.9 Real Time-PCR.....	50
-	3 RISULTATI.....	51
-	3.1 Analisi istologica e ultrastrutturale.....	51
-	3.2 Screening delle mutazioni sul gene ABCA3.....	57

- 3.3 Analisi di localizzazione ed espressione dell'ABCA3 e delle proteine del surfattante.....	65
- 3.3.1 Immunoistochimica/immunofluorescenza.....	65
- 3.3.2 Immunolabelling dell'ABCA3 in microscopia elettronica.....	72
- 3.3.3 Western Blot.....	74
- 3.4 Analisi dell'espressione genica.....	76
- 4 DISCUSSIONE.....	78
- 5 BIBLIOGRAFIA.....	86

1 INTRODUZIONE

1.1 Il surfattante polmonare

Il surfattante è un fluido prodotto dall'epitelio alveolare dei polmoni e svolge un ruolo essenziale nella dinamica respiratoria. Per il 90% il surfattante è costituito da lipidi, e per il 10% da proteine, in particolare da quattro proteine specifiche: SP-A, SP-B, SP-C e SP-D. I fosfolipidi rappresentano l'80% dei lipidi del surfattante, il Dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) e la sua forma insatura Fosfatidilcolina (PC), sono i fosfolipidi più presenti mentre il fosfatidilglicerolo (PG), il fosfatidilinositolo (PI), il fosfatidiletanolamine (PE) e la fosfatidilserina (PS), rappresentano la parte restante (Batenburg 1998). Il surfattante viene prodotto esclusivamente nelle cellule epiteliali alveolari di tipo II (pneumociti di tipo II). Le proteine SP-B e SP-C vengono sintetizzate nel reticolo endoplasmatico degli pneumociti di tipo II, poi trasferite per la via del Golgi nei corpi lamellari, organelli citoplasmatici peculiari di questo tipo di cellule. All'interno di questi organelli le proteine vengono integrate ai fosfolipidi per formare la struttura pseudomielinica del surfattante. I corpi lamellari maturi, si accumulano al polo apicale degli pneumociti di tipo II, secernono per

esocitosi il surfattante nel lume alveolare, il surfattante si espande sotto forma di mielina tubulare, per poi formare una pellicola monostrato che riveste la cavità alveolare e gli conferisce le sue proprietà tenso-attive (figura 1). Le proteine Sp-A e Sp-D seguono un percorso intracellulare indipendente dai corpi lamellari e si associano agli altri componenti del surfattante nel lume alveolare (Voorthout 1992, Ikegami 1992). La maggior parte dei componenti del surfattante viene infine riciclata dalle cellule di tipo II attraverso endocitosi o eliminata attraverso l'azione dei macrofagi alveolari. Mentre la sintesi dei fosfolipidi del surfattante è stata largamente spiegata, il loro trasporto all'interno della cellula non ha un meccanismo completamente chiaro. Si suppone che il passaggio dei fosfolipidi attraverso le membrane sia facilitato dall'azione di trasportatori specifici, ma l'esatto ruolo di questi trasportatori non è ancora completamente noto. La principale funzione del surfattante è quella di permettere l'espansione ritmica degli alveoli durante la respirazione e prevenirne il collasso in fase di espirazione, tuttavia il surfattante partecipa anche alla risposta degli alveoli ad una grande varietà di attacchi esterni quali infiammazioni, infezioni e stress ossidativi (Crouch 2001, Hawgood 2001).

La sintesi del surfattante è regolata da diversi fattori che variano nel corso dello sviluppo embrionale e fetale. La sua sintesi inizia nel feto intorno al sesto mese di gravidanza per raggiungere i livelli più alti intorno al termine; diversi fattori, tra cui glucocorticoidi, ormoni tiroidei, fattori di crescita, citochine ed altri, possono accelerarne la

sintesi. I disturbi acuti dell'omeostasi del surfattante, sia primari che secondari ad altre patologie, causano gravi alterazioni della funzione respiratoria comunemente designata "Respiratory Distress Syndrome" (RDS).

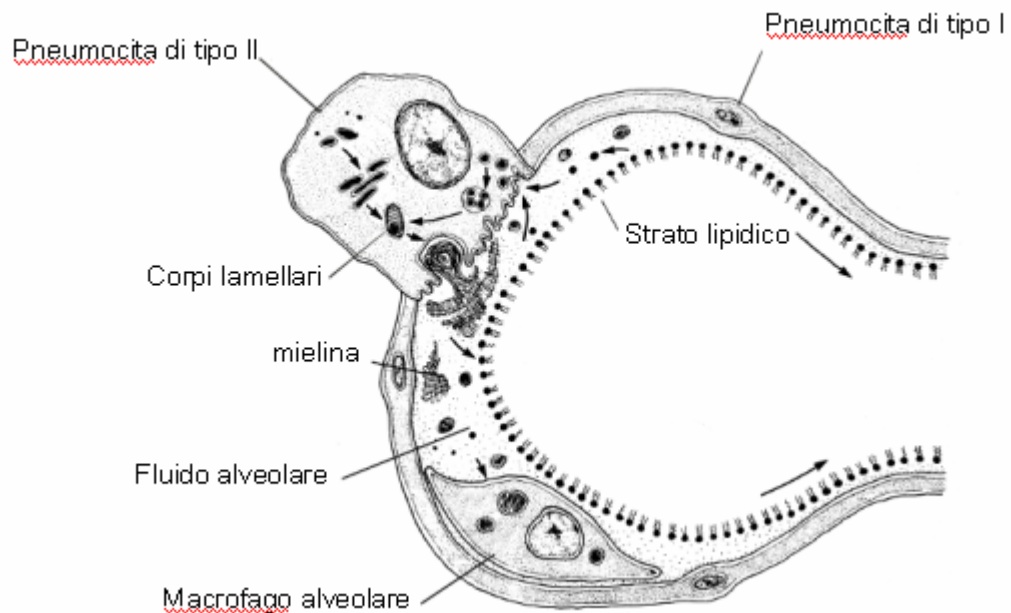


Figura 1

Raffigurazione schematica della cavità alveolare rivestita dal surfattante. All'interno dello pneumocita di tipo II è schematizzato il processo di sintesi ed espulsione dei corpi lamellari che, portati nel lume alveolare attraverso esocitosi, riversano il loro contenuto all'esterno. I lipidi e le proteine si organizzano a produrre la pellicola di surfattante che stabilizza l'alveolo.

(Hawgood & Clements 1990).

1.2 Sindrome da Distress Respiratorio neonatale (RDS)

Il deficit di surfattante può dipendere da varie cause che possono essere schematicamente classificate in primarie e secondarie, oppure in transitorie e permanenti. Numerose patologie e disturbi possono portare ad un deficit secondario del surfattante, tra queste, le infezioni, l'ipossia e l'asfissia, l'ipotermia, l'ipoglicemia e altri disturbi del metabolismo energetico che si riscontrano spesso nel neonato a termine o vicino al termine o anche nell'adulto ("Adult Respiratory Distress Syndrome", ARDS). In queste forme, in genere transitorie, le terapie sostitutive (somministrazione di surfattante esogeno) e di supporto ventilatorio permettono il ripristino dell'omeostasi polmonare con la risoluzione della causa primaria.

La prematurità rappresenta la causa più classica e frequente di deficit primario congenito del surfattante. Durante la maturazione embrionale e poi fetale del polmone, si verifica un'evoluzione sia qualitativa che quantitativa del surfattante. I corpi lamellari appaiono negli pneumociti di tipo II alla 20° settimana di gestazione ed aumentano gradualmente di numero nel progredire della gravidanza (Hallman, 1989); il rapporto tra fosfatidilglicerolo e fosfatidilinositolo aumenta, così come la concentrazione delle proteine del surfattante, fino alla fase matura, intorno alla 35° settimana. Circa il 50% dei neonati prematuri nati sotto 30 settimane

e quasi il 90% sotto 26 settimane, presentano un quadro di RDS. Questa incidenza aumenta in modo inversamente proporzionale all'età gestazionale e costituisce la causa principale di mortalità e morbilità in questo gruppo di pazienti. Il neonato con RDS presenta distress respiratorio (polipnea, rientramenti intercostali), cianosi e ipercapnia ingravescenti nelle prime ore di vita, e spesso letali in assenza di trattamento e di assistenza ventilatoria. Lo stress ormonale del parto e l'avvio della respirazione all'aria, costituiscono potenti stimoli maturativi alla sintesi di surfattante da parte dell'epitelio alveolare, il surfattante aumenta fino a livelli maturi nell'arco di pochi giorni (Hallman, 1994) . Nei casi di deficit importante, il trattamento con surfattante esogeno e ventilazione meccanica determinano il più delle volte la completa risoluzione del quadro acuto. Il trattamento materno prenatale con glucocorticoidi (betametasone) in caso di parto prematuro imminente, mirato ad accelerare la maturazione polmonare e la sintesi di surfattante, ha permesso una significativa riduzione dell'incidenza e della severità della RDS nel prematuro (Crowley 1990).

1.3 Malattia polmonare cronica nell'infanzia e polmonite interstiziale infantile

Dopo la risoluzione della fase acuta della RDS, alcuni neonati non mostrano una normalizzazione completa della funzionalità respiratoria, ma continuano a presentare un fabbisogno di ossigeno persistente per diverse settimane, talvolta accompagnato da ipercapnia e nuova necessità di ventilazione meccanica. Ogni patologia polmonare diffusa persistente dopo RDS neonatale è definita "chronic lung disease", a prescindere dall'eziologia. La causa più frequente di malattia polmonare cronica è la displasia broncopolmonare, tipica dell'ex-prematurato, e caratterizzata da ispessimento bronchiale, fibrosi interstiziale e rimodellamento alveolare e dei vasi polmonari (Baraldi 2007). Tra tutti i meccanismi fisiopatogenici implicati nella genesi di questa patologia, si ritiene che l'azione dell'ossigeno e della ventilazione sul polmone immaturo e povero di surfattante sia la causa maggiore.

La persistenza o l'insorgenza di sintomi respiratori (fabbisogno di ossigeno, rantoli, rientramenti intercostali, ipodiafania polmonare diffusa radiologica) nel lattante nato a termine o vicino al termine avviene più raramente. Escluse cause infettive, ambientali e secondarie a microinalazioni (reflusso gastro-esofageo), ed escluse

forme atipiche di displasia broncopolmonare (danno da ventilazione meccanica, esiti di polmoniti severe, etc.), questo quadro clinico viene definito “polmonite interstiziale infantile” (pediatric interstitial lung disease, PILD). Recentemente, in uno studio retrospettivo su dati anatomopatologici derivati da un’ampia coorte di lattanti con “chronic lung disease”, si è concluso che la PILD è causata da anomalie del surfattante (Deutsch 2007).

1.4 Fattori genetici nella RDS e nel “chronic lung disease”

L'influenza di fattori genetici sulla genesi e il decorso clinico della RDS è evidenziato da diverse considerazioni. E' stato osservato che l'incidenza della patologia è maggiore per i maschi rispetto alle femmine e per i neonati di etnia caucasica rispetto agli afro-americani (Khoury 1985, Hulsey1993). L'incidenza della RDS in neonati gemelli o multipli è più alta negli omozigoti rispetto agli eterozigoti (van Sonderei 2002). Data la loro importanza nell'omeostasi del surfattante, i geni che codificano le proteine strutturali SP sono stati ritenuti i primi candidati, sia come causa di alcune forme atipiche di RDS, sia come modificatori dell'incidenza o del decorso clinico della malattia.

Un quadro clinico acuto simile alla RDS classica si può riscontrare in assenza di cause dimostrabili in alcuni neonati a termine o vicino al termine, che presentano una risposta scarsa o del tutto assente alla somministrazione di surfattante esogeno e tendono ad aggravarsi gradualmente nonostante il supporto ventilatorio; questo quadro clinico particolare è stato identificato in letteratura come “Unexplained Respiratory Distress Syndrome “(URDS). Alcuni di questi pazienti hanno una storia familiare di RDS o di morte in epoca neonatale. Circa 10 anni fa, in alcuni di questi casi, è

stata riscontrata l'assenza di una delle proteine strutturali, la SP-B, nel surfattante raccolto nel liquido di brocolavaggio, e la malattia è stata attribuita ad un deficit congenito di questa proteina (Nogee 1994). E' stato dimostrato che questo deficit ha una base genetica, essendo causato da mutazioni omozigoti nel gene *SFTPB* corrispondente. Nel 2004, un quadro clinico simile è stato riportato in neonati con mutazioni omozigoti o eterozigoti (bi-alleliche) in un altro gene, l'*ABCA3* (Shulenin 2004). Mutazioni eterozigoti del gene codificante la SP-C sono state invece descritte in alcuni pazienti a termine con malattia respiratoria apparentemente idiopatica ad esordio neonatale o nei primi mesi di vita (PILD) (Thomas 2002). Recentemente, in un piccolo numero di casi con PILD, senza mutazioni sui geni della SP-B e della SP-C, sono state riscontrate mutazioni dell'*ABCA3* (Saugstad 2007).

Un'altra fonte di evidenza del ruolo dei fattori genetici nelle malattie respiratorie neonatali deriva da studi delle variazioni alleliche nei geni correlati al surfattante (polimorfismi) su larghe popolazioni (Hallman 2006).

1.5 Struttura e funzione delle proteine correlate al surfattante

1.5.1 Le proteine idrofiliche del surfattante: SP-A e SP-D

Le proteine del surfattante sono prevalentemente sintetizzate e secrete dagli pneumociti di tipo II. SP-A e SP-D sono le proteine del surfattante a più alto peso molecolare e idrofiliche, sono glicoproteine appartenenti alla categoria delle lectine di tipo C, chiamate anche collectine. La SP-A ha un ruolo attivo nell'immunità innata del polmone (Crouch 2001), funziona come opsonina, è in grado di favorire il legame alle cellule fagocitiche di una grande quantità di patogeni inclusi virus, batteri, lieviti e funghi, determinandone l'eliminazione (Korfhagen 1998, Mc Neely 1993). E' stato ipotizzato per la SP-A anche un ruolo nella riutilizzazione dei componenti del surfattante (Wright 1990), sarebbe in grado di promuovere l'endocitosi e il riciclo dei lipidi attraverso il legame su specifici recettori ad alta affinità presenti sulla membrana degli pneumociti di tipo II. Nel genoma umano per la SP-A esistono due trascritti simili e uno pseudogene non funzionale localizzati sul cromosoma 10 (Floros 1998). L' *SFTPA1* e l' *SFTPA2* sono entrambi formati da 4 esoni tradotti e un esone non tradotto al 5'. La proteina

SP-A si trova nello spazio alveolare sotto forma di trimero costituito da due SP-A1 e una SP-A2 (Voss 1991).

Anche la proteina SP-D partecipa al meccanismo di difesa del polmone da patogeni esterni legandosi a glicoconiugati di superficie espressi da un gran numero di microrganismi, batteri gram-positivi, gram-negativi, virus e funghi, in seguito a questa interazione i microrganismi vengono agglutinati, fagocitati ed eliminati (Crouch 2000, Ikegami 2000, Hartshon 1996). La SP-D ha anche un ruolo rilevante nel metabolismo e omeostasi del surfattante (Korfhagen 1998 a). Il gene *SFTPD* è localizzato sul cromosoma 10 sullo stesso locus dei geni *SFTPA1* e *SFTPA*. E' un gene di 11kb ed è costituito da 7 esoni tradotti. La proteina SP-D è presente nel lume alveolare sotto forma di monomero di 43kDa o sottoforma di trimero che collegandosi con altre triplette forma una struttura caratteristica a forma di croce. Nel broncolavaggio alveolare è stato individuato un monomero di SP-D di 50kDa, probabilmente prodotto da una glicosilazione post-traduzionale (Mason 1998).

1.5.2 Le proteine idrofobiche del surfattante: SP-B e SP-C

SP-B e SP-C sono le proteine del surfattante più piccole e idrofobiche. Il loro peso molecolare è molto basso, 9 kDa e 4 kDa. L'individuazione di due proteine piccole e idrofobiche nel surfattante del polmone di topi risale al 1979 (Phizackerley 1979).

La SP-B è codificata da un singolo gene di 9,5kb, *SFTPB* costituito da 11 esoni localizzato sul cromosoma 2p12-p11.2, il gene è trascritto in un mRNA di circa 2000 paia di basi (Vamvakopoulos 1995, Pilot-Matias 1989). La SP-B matura è codificata dagli esoni 6 e 7. La regione 5' del gene contiene sequenze importanti per la traslocazione della proteina matura nella sede corretta all'interno della cellula, nella regione 3' il gene contiene una porzione non tradotta di circa 823 nucleotidi con probabile funzione regolatoria (Yang 2003). La proteina SP-B è associata ai lipidi del surfattante, è sintetizzata come precursore di 381 aminoacidi (pre-proSP-B) che in seguito va incontro a modificazioni post-traduzionali, indispensabili per lo spostamento della SP-B matura all'interno della cellula e il suo inserimento nei corpi lamellari (Lin 1996).

La pre-pro-SPB è costituita da un propeptide N-terminale, dalla parte che costituirà la SP-B matura e da un propeptide C-terminale. In una prima fase del processo di taglio è eliminata una porzione del propeptide N-terminale (pro-SP-B), in seguito viene tagliato il propeptide C-terminale e infine viene eliminata la restante parte del

propeptide N-terminale, il risultato è la SP-B matura di 79 aminoacidi il 52% dei quali ha natura idrofobia (figura 2). Queste modifiche post-traduzionali dipendono principalmente da due enzimi: Napsina e Catepsina H (Ueno 2004). La proteina SP-B è presente nell'alveolo sotto forma di dimero, le due catene proteiche sono legate da ponti disolfuro (Weaver 2001, Noguee 2004). Interagendo direttamente con i fosfolipidi, la SP-B ne favorisce l'integrazione all'interno del surfattante (Haagsman 2001), inoltre, insieme con la SP-C, accelera il riciclo dei fosfolipidi da parte degli pneumociti di tipo II, regolando così l'omeostasi del surfattante.

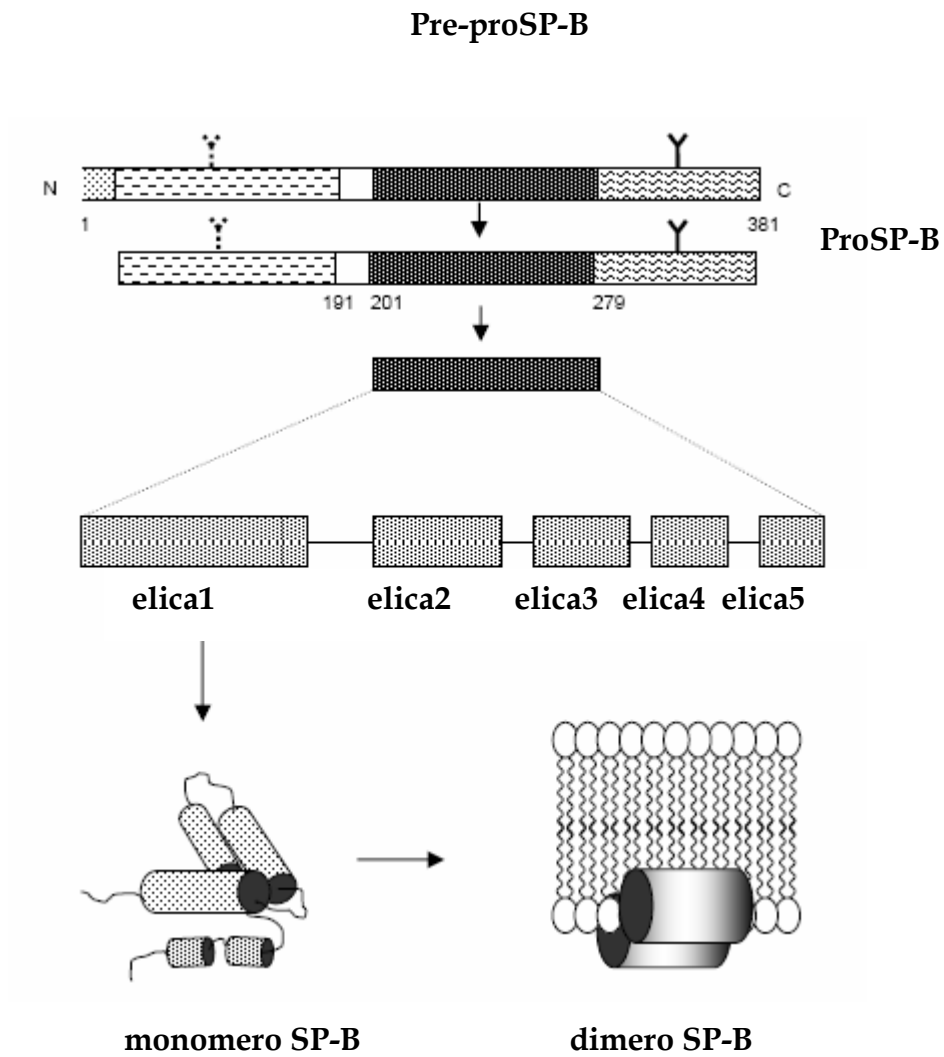


Figura 2
 Modello di struttura della SP-B matura
 (Weaver and Conkright 2001)

La SP-C umana è codificata da un singolo gene di 3,5kb (*SFTP2*) presente sul cromosoma 8p21. Il gene è composto di 6 esoni, l'ultimo dei quali non è completamente tradotto. Il gene è trascritto in un mRNA di circa 900 paia di basi che successivamente viene tradotto in una proteina di 22kDa. La SP-C matura è codificata dall'esone 2, è una proteina composta da 35 aminoacidi dei quali il 69% idrofobici. E' una delle proteine più idrofobiche presenti in natura. La proteina SP-C è inizialmente sintetizzata come precursore di 191 o 197 aminoacidi (Warr 1987, Glasser 1988), l'eliminazione dei pro peptidi N-terminale e C-terminale è necessaria per la traslocazione intracellulare e la secrezione della proteina matura (Keller 1992, Conkright 2001). Le modifiche post-trascrizionali che portano alla formazione della SP-C matura, avvengono principalmente per opera degli stessi enzimi coinvolti nel processamento della pro-SP-B, la Napsina e la Catepsina H (Brash 2002). La SP-C matura ha una struttura ad α -elica rigida associata alla membrana (Weaver 2001) (figura 3). In tutte le specie in cui la SP-C è stata descritta, le cisteine della proteina matura sono associate all'acido palmitico che probabilmente svolge una funzione nella fase di attacco della SP-C alla membrana (Linder 1993).

Analogamente alla SP-B, la proteina SP-C svolge un ruolo importante nell'omeostasi del surfattante, inoltre la SP-C sembra avere un ruolo

decisivo nella stabilizzazione delle proprietà tensioattive del surfattante anche nel caso di aumento del contenuto di acqua a livello alveolare (Horowitz 1992, Johansson 1995, Weaver 2001).

ProSP-C

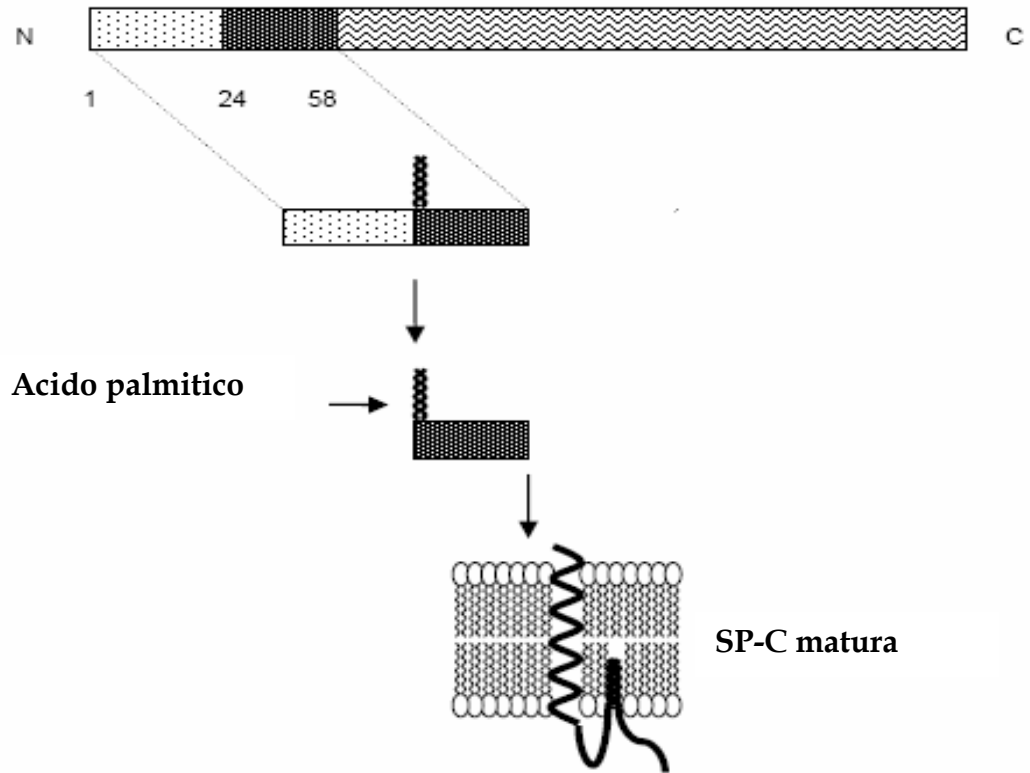


Figura 3
Modello di struttura della SP-C matura
(Haagsman e Diesel 2001).

1.5.3 L'ABCA3

L' ABCA3 fa parte di una famiglia di proteine transmembrana designata "adenosine triphosphate-binding cassette proteins" (ABC). Fanno parte di questa famiglia proteine altamente conservate localizzate sulla membrana di diverse cellule, sia procariotiche che eucariotiche (Dean M. 2005). La caratteristica che accomuna le proteine ABC è la capacità di legare e idrolizzare l'ATP e utilizzare l'energia ottenuta per traslocare una grande varietà di substrati altamente specifici attraverso le membrane (Dean M. 2005, Schmitz 2004). I trasportatori ABC sono sempre localizzati sulla membrana plasmatica o sulle membrane di organelli cellulari. Nel genoma umano sono stati identificati 48 geni codificanti proteine ABC funzionali. Sembra che tutte queste proteine abbiano una struttura molecolare simile. Tutte possiedono due siti attivi di legame con l'ATP (NBD) e un complesso di domini transmembrana (Higgins 1992). In base ad omologie strutturali e al tipo di molecola trasportata, le proteine della famiglia ABC sono comunemente suddivise in 7 subclassi, la ABCA3 fa parte della subclasse ABC-A (Kaminski 2006). Analisi filogenetiche suggeriscono una derivazione comune di tutti i geni codificanti le proteine appartenenti a questa subclasse (Piehler 2002, Annilo 2003). L'interesse per questi trasportatori deriva dalla loro associazione con patologie gravi di cui spesso rappresentano la causa primaria (Kaminski 2006). L'ABCA1,

l'ABCA4 e l'ABCA12 sono solo alcune delle proteine della subclasse ABC-A e sono quelle che presentano una maggiore omologia di sequenza con l'ABCA3. Mutazioni sull'ABCA1 determinano alterazioni nel trasporto di colesterolo e conseguente deficit del colesterolo HDL (Bodzioch 1999). L'ABCA4 invece è localizzata sulla retina, mutazioni su questo gene sono state associate a diverse forme di distrofia della retina (Rozet 1998). L'ABCA12 è il trasportatore dei lipidi della pelle, necessari per formare la barriera di permeabilità all'acqua dell'epidermide, mutazioni su questo gene determinano gravi forme di ischitiosi (Lefevre 2003).

La proteina ABCA3 è codificata da un unico gene localizzato sul cromosoma 16, contiene 33 esoni di cui i primi tre non tradotti. Il gene *ABCA3* contiene circa 80.000 nucleotidi, è trascritto in un mRNA di 6500 paia di basi che viene tradotto in una proteina di 1704 aminoacidi (Klugbauer 1996, Nagata 2004). Anche se l'ABCA3 fu originariamente individuata nella tiroide ed è espressa a bassi livelli in diversi tessuti, il polmone rappresenta l'organo in cui la proteina ha la sua massima espressione. L'ABCA3 nel polmone è localizzata esclusivamente negli pneumociti di tipo II, in particolare sulla membrana dei corpi lamellari, organelli peculiari per questo tipo cellulare che hanno la funzione di contenere e trasportare il surfattante (Cheong 2006). La struttura di questa proteina non è ancora completamente nota. Basandosi sull'omologia di sequenza dell'ABCA3 con le altre proteine della stessa famiglia, si è

ipotizzato per questa proteina una struttura organizzata in due regioni transmembrana organizzate in dodici domini, due domini extracellulari (ECD) e due domini di legame con l'ATP (NBD) (Figura 4) (Bruder 2007, Brash 2006). La funzione dell'ABCA3 è stata recentemente accertata attraverso studi in vivo e *in vitro*. Mutazioni sul gene *ABCA3* sono state riscontrate in neonati con deficit di surfattante nei quali l'analisi ultrastrutturale eseguita sul tessuto polmonare, ha evidenziato la presenza di corpi lamellari alterati. In questi soggetti, i corpi lamellari sono più piccoli e presentano una composizione interna immatura. È ipotizzabile che l'ABCA3 aberrante possa determinare alterazioni nella formazione dei corpi lamellari e nella traslocazione dei lipidi dai corpi lamellari al lume alveolare (Nagata 2004, Yamano 2001, Mulugeta 2002, Shulenin 2004). Questa tesi è dimostrata anche dai risultati degli studi effettuati in cellule renali (HEK-293) in cui in seguito all'induzione dell'espressione del gene *ABCA3* si formano vescicole con morfologia simile ai corpi lamellari, contenenti lipidi (Nagata 2004).

L'espressione dell'ABCA3 è regolata nel corso dello sviluppo fetale ed è modulabile ormonalmente in modo analogo alle proteine strutturali del surfattante (Mulugeta 2002).

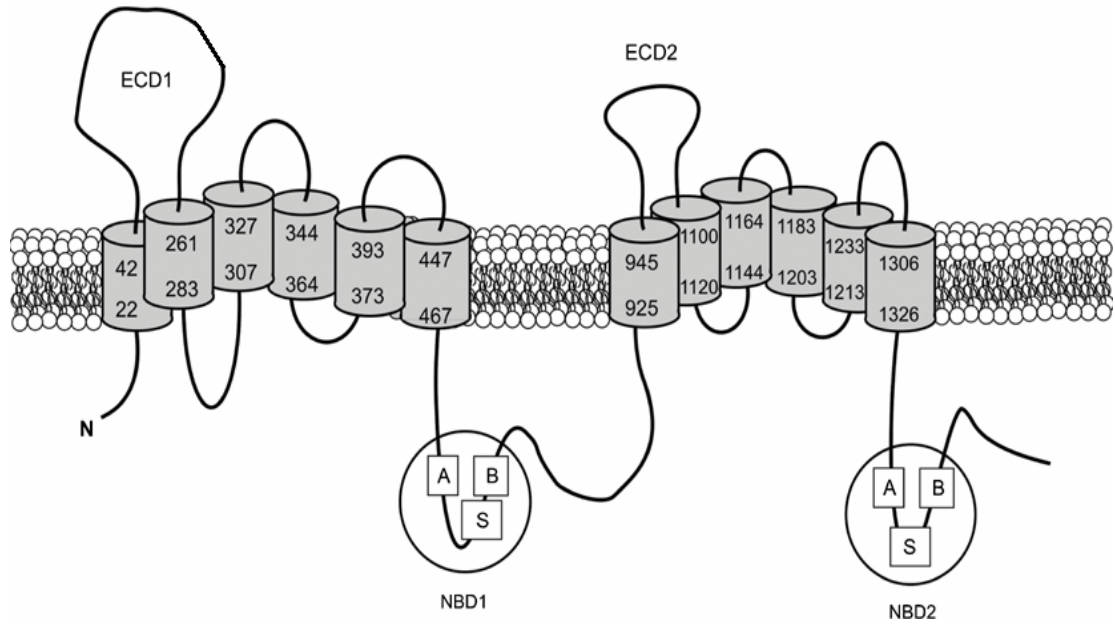


Figura 4
Modello di struttura dell'ABCA3. (Bruder E. et al 2007).

1.6 Modificazioni genetiche dei geni correlati al surfattante

1.6.1 effetto di mutazioni sul gene codificante la SP-B

Per comprendere il ruolo della proteina SP-B nella funzione polmonare, sono stati generati topi knock-out per il gene *SFTPB* tramite ricombinazione omologa in cellule staminali embrionali di topo. Mentre i topi eterozigoti *SFTPB*^{+/-} sopravvivono, i topi *SFTPB*^{-/-} muoiono subito dopo la nascita per insufficienza respiratoria.

Nei polmoni dei topi *SFTPB*^{-/-} gli pneumociti di tipo II non contengono corpi lamellari maturi e non sono presenti le strutture tubulari mieliniche del surfattante; si osserva una normale espressione dei geni per le proteine SP-A ed SP-C, ma la proteina SP-C matura è espressa a livelli inferiori. Questi risultati dimostrano il ruolo critico della SP-B nel funzionamento del polmone e nel trasporto e assemblamento dei componenti del surfattante all'interno degli pneumociti di tipo II (JC Clark 1995).

Nell'uomo il deficit congenito di SP-B è stato individuato per la prima volta in neonati a termine che presentavano distress respiratorio inspiegato subito dopo la nascita (Nogee 1994). Il deficit di SP-B ha basi genetiche, è una patologia autosomica recessiva rara causata da mutazioni sul gene *SFTPB*. Sono state individuate più di

25 mutazioni, nonsense, missenso e introniche. In conseguenza alle mutazioni sul gene, si può osservare produzione di proteina aberrante o totale deficit, alterazione nel trasporto dei lipidi e inoltre, avendo la SP-B un ruolo importante nella regolazione dell'espressione della proteina SP-C, deficit di SP-B può determinare anche assenza di SP-C (Nogee 2004).

La più diffusa tra le mutazioni dell'*SFTPB* è localizzata sull'esone 4 e riguarda un'inserzione in posizione 121. Questa mutazione è stata riscontrata nel 50-60% di pazienti che presentavano deficit congenito di surfattante associato ad SP-B (Nogee 2004).

I sintomi caratteristici del danno polmonare dovuto ad alterazione della SP-B, sono normalmente evidenti già 12 h dopo la nascita del neonato e sono assimilabili a quelli di una RDS dovuta a prematurità. I pazienti presentano evidenti difficoltà respiratorie che rendono necessario il supporto ventilatorio esterno, vanno incontro a collasso alveolare e soprattutto non rispondono ai trattamenti, come la somministrazione di surfattante esogeno. Nella maggior parte dei casi il decesso sopraggiunge dopo poche settimane. La diagnosi definitiva è effettuata attraverso il sequenziamento per l'individuazione delle mutazioni sull'*SFTPB*. L'unico trattamento efficace per prolungare la vita del paziente è il trapianto di polmone (Hamvas 1997).

Deficit parziale della SP-B è stato osservato in pazienti in cui la mutazione è presente su un solo allele (Ballare 1995).

1.6.2 Effetto di mutazioni sul gene codificante la SP-C

Un modello di topo knock-out per il gene *SFTPC* è stato prodotto allo scopo di comprendere il ruolo della proteina SP-C nella funzione polmonare. È stato dimostrato che i topi *SFTPC*^{-/-} sopravvivono normalmente, hanno pneumociti di tipo II con corpi lamellari maturi e presentano la normale struttura tubulare mielinica del surfattante. A differenza dei topi wild type, i topi *SFTPC*^{-/-} presentano una diminuzione della proprietà tenso-attiva del surfattante, e ciò determina una minore stabilità dell'alveolo durante la fase di espirazione. Da ciò si deduce che la funzione principale della proteina SP-C riguarda la stabilizzazione del surfattante (Glasser 2001).

Mutazioni sul gene codificante la SP-C determinano nell'uomo malattie polmonari acute e croniche. Nel 2001 è stata descritta la prima famiglia i cui membri erano affetti da un'importante alterazione della funzione polmonare dovuta a deficit di SP-C e diminuzione della pro-SP-C (Amin 2001). Mutazioni sul gene *SFTPC* sono associate a malattie interstiziali polmonari nel neonato, caratterizzate da quadri istologici eterogenei associabili a polmonite cronica, polmonite interstiziale non-specifica o DIP (polmonite desquamativa interstiziale). Le mutazioni hanno un effetto sempre dominante sul fenotipo, anche nei casi in cui la mutazione è presente su un solo allele si ha deficit totale di SP-C matura. Le caratteristiche

cliniche e l'importanza della patologia associata a mutazioni su *SFTPC* sono molto variabili, questa variabilità è associata al tipo di mutazioni e alla localizzazione sul gene, a fattori ambientali, all'età dei pazienti e ad altre modificazioni su altri geni che possono influenzare il decorso della malattia.

La patogenesi delle malattie polmonari associate a mutazioni del gene della SP-C non è ancora completamente conosciuta e possibili terapie definitive non sono ancora note. Il trapianto del polmone rimane ad oggi l'unico trattamento efficace.

1.6.3 Effetto di mutazioni sul gene codificante la ABCA3

L'ABCA3 è stata recentemente identificata come proteina implicata in processi di sintesi e di surfattante. È stato dimostrato che topi knock-out per il gene *ABCA3* muoiono subito dopo la nascita, mentre gli eterozigoti *ABCA3*^{+/-} sopravvivono. Il polmone dei topi *ABCA3*^{-/-} è meno maturo di quello dei topi wt. Gli pneumociti di tipo II nel polmone dei topi *ABCA3*^{-/-} non contengono corpi lamellari e sono evidenti alterazioni anche nell'espressione della proteina SP-B. Questi risultati suggeriscono che l'ABCA3 è necessaria per la biogenesi dei corpi lamellari, per il processamento della proteina SP-B e per la maturazione del polmone (Cheong 2007, Fitzgerald 2007).

Nell'uomo, il deficit di ABCA3 è stato identificato in neonati a termine con RDS inspiegata di probabile origine genetica, privi di mutazioni dell'*SFTP-B* (Shulenin 2004).

Il quadro clinico più comune di neonati con ABCA3 aberrante è caratterizzato da distress respiratorio più o meno severo e da infiammazione polmonare diffusa. Spesso la patologia è progressiva e diventa fatale entro i primi tre mesi di vita. Le caratteristiche istopatologiche dei polmoni di pazienti con il gene ABCA3 mutato includono iperplasia degli pneumociti di tipo II e accumulo di macrofagi e di materiale proteico nello spazio alveolare, caratteristiche di DIP o proteinosi alveolare polmonare (PAP) (Doan 2007, Kunig 2007). Esiste una grande eterogeneità nelle caratteristiche delle malattie associate ad alterazioni nel gene *ABCA3*, in alcuni casi il quadro clinico e le caratteristiche istopatologiche dei pazienti sono molto simili a quelli relativi ad alterazioni dei geni delle proteine del surfattante *SFTPB* e *SFTPC*. L'analisi al microscopio elettronico di tessuto polmonare ha permesso di individuare un marker specifico che consenta di discriminare i casi di alterazioni dell'*ABCA3* da quelli dovuti a deficit di SP-B o SP-C. Negli pneumociti di tipo II di pazienti con mutazioni sul gene *ABCA3* i corpi lamellari presentano una specifica struttura denominata "fried egg", sono più piccoli dei corpi lamellari normali, privi della struttura interna a lamelle concentriche e presentano un corpo denso centrale o marginale (Bruder 2007).

La patologia polmonare in neonati con deficit di surfattante associato ad alterazioni dell'ABCA3 è spesso simile a quella riscontrata in bambini più grandi con forme di ILD ("interstitial lung disease"), suggerendo che mutazioni sul gene *ABCA3* potrebbero determinare malattie polmonari non fatali, con un fenotipo associabile a ILD. A supporto di questo, diversi studi genetici sono stati eseguiti su bambini con infiammazioni polmonari di media entità (Brash 2006). In molti casi i pazienti risultavano portatori di mutazioni del gene *ABCA3* presenti a volte su un unico allele (Brash 2006, Yokota 2007). Diversi tipi di mutazioni sono state riscontrate nel corso degli studi genetici sull'ABCA3, queste includono mutazioni nonsense e delezioni importanti che normalmente compromettono la produzione della proteina e portano ad un fenotipo di deficit di surfattante severo. Altre mutazioni, missenso o delezioni in-frame possono portare a produzione della proteina, ma a rapida degradazione della stessa o a localizzazione alterata dell'ABCA3. Infine altre mutazioni su siti specifici della proteina potrebbero portare a produzione e localizzazione normale dell'ABCA3, ma perdita di funzione della proteina. La scoperta che la completa perdita di funzione dell'ABCA3 porta ad un severo deficit di surfattante mentre alcune mutazioni sul gene portano a malattie polmonari di più lieve entità con un deficit di surfattante non fatale, suggerisce che l'ABCA3 potrebbe essere un gene candidato per altre malattie polmonari più comuni e di minore entità come il distress respiratorio nei neonati prematuri.

1.6.4 Polimorfismi sui geni correlati al surfattante e rischio di RDS

La RDS è una patologia multifattoriale, caratterizzata dall'immaturità del polmone legata a fattori ambientali, costituzionali o genetici. Sembra che alcuni polimorfismi delle proteine del surfattante rappresentino un fattore di rischio di RDS. L'interazione gene-gene e gene-ambiente non permettono di effettuare una stima sui reali effetti di queste variazioni alleliche.

Polimorfismi dei geni codificanti le proteine SP-A, SP-B, SP-C e ABCA3 sono associati a RDS in particolari categorie di rischio come i neonati molto prematuri (Garmany 2008).

La proteina SP-A è codificata da due geni *SP-A1* e *SP-A2* presenti in diversi aplotipi di cui il più frequente (55-57%) è il 6A2/1A0 che è associato a rischio di RDS in neonati pretermine mentre l'aplotipo 6A3/1A1 rappresenta un fattore protettivo al danno polmonare in neonati a termine (Kala 1998, Ramet 2000, Haataja 2001).

Due polimorfismi noti sulla SP-B sembrano aumentare il rischio di RDS. Il più diffuso riguarda la sostituzione aminoacidica ile131thr che porta alla formazione di un sito di glicosilazione sulla porzione N-terminale della proteina (Wang 2003). Il secondo polimorfismo riguarda la variazione di lunghezza dell'introne 4 dovuta ad inserzione o delezione di porzioni di nucleotidi ricchi in CA (Floros 1995). Sulla SP-C sono stati individuati tre polimorfismi, nell'esone 1 (P14P), 4 (N138T) e 5 (N186S). Nei neonati gravemente prematuri,

queste variazioni sono associate a rischio di RDS. (Lahti 2004). Sembra che esista una correlazione tra il polimorfismo ile131thr della SP-B e i polimorfismi della SP-A, la presenza di entrambe le variazioni dei due geni è stata correlata ad una concentrazione inferiore di surfattante presente alla nascita in neonati prematuri (Floros 2001).

Alcuni studi genetici sui polimorfismi delle proteine del surfattante suggeriscono una correlazione anche ad altre patologie polmonari come la fibrosi polmonare idiomatica (Selman 2003) o la tubercolosi (Floros 2000) . Recentemente studi sull'impatto dei polimorfismi dell'ABCA3 hanno evidenziato che anche alcune mutazioni su questo gene possono essere associate a rischio di RDS in neonati prematuri (Karjalainen 2008).

2 MATERIALI E METODI

2.1 Reclutamento dei pazienti

Questo studio è stato effettuato su pazienti ricoverati presso le unità di terapia intensiva neonatale, patologia neonatale e broncopneumologia dell'ospedale Bambino Gesù, e su alcuni pazienti ricoverati presso ospedali esterni, per i quali è stato inviato materiale biologico per le analisi ultrastrutturali e genetiche. I criteri di reclutamento erano i seguenti:

- A. Sindrome da distress respiratorio comparso nelle prime 72 ore di vita, caratterizzato da ipossiemia rispondente all'ossigenoterapia, associata ad ipodiafania diffusa a trama fine ("a vetro smerigliato") dei campi polmonari, persistente o ingravescente nonostante trattamento ripetuto con surfattante esogeno e all'esclusione delle cause note di ipossiemia neonatale e/o di distress respiratorio, quali prematurità <32 settimane, cardiopatia congenita con shunt destro-sinistro o con iperafflusso polmonare evidente, persistenza del circolo fetale, infezione batterica, "atipica (ureaplasma, chlamydia), o virale delle basse vie aeree, anomalie anatomiche delle vie aeree o del parenchima polmonare. Tale quadro verrà designato in seguito

“sindrome da distress respiratorio inspiegata” (unexplained respiratory distress syndrome, URDS).

- B. Età ≥ 30 giorni ed età postconcezionale ≥ 35 settimane, oppure età ≥ 3 mesi per i prematuri, con diagnosi di malattia polmonare interstiziale (“pediatric interstitial lung disease, PILD) basata su almeno 2 dei criteri seguenti: tachipnea, tosse cronica, rientramenti intercostali, rantoli all’auscultazione e radiografia e/o TAC toracica con anomalie diffuse del parenchima polmonare (bullard ajrcm), e con gli stessi criteri di esclusione citati sopra.

Nei bambini con queste caratteristiche, l’approccio clinico prevede nel nostro centro una biopsia polmonare chirurgica “a cielo aperto” per motivi diagnostici. In questi bambini, nel contesto dello studio presente, il sequenziamento esonico diretto dei geni *SFTPF-B*, *SFTP-C* e *ABCA3* è stato effettuato su DNA genomico da sangue circolante dopo consenso informato da parte dei genitori; le anomalie eventualmente riscontrate erano poi ricercate nei genitori stessi e, se possibile, negli altri parenti di 1° grado.

Da 15 bambini con URDS/PILD, la biopsia polmonare è stata effettuata in 10. Lo studio ultrastrutturale ha dimostrato anomalie dei corpi lamellari indicative di un deficit primario del sistema

del surfattante in 9 di questi, che saranno designati “pazienti” nelle sezioni successive.

Per controllo negativo, sono stati utilizzati, dopo consenso informato, 5 bambini nati a termine, di età compresa tra 1 settimana e 2 mesi, portatori di malformazione adenoide cistica del polmone, un’anomalia focale dello sviluppo polmonare embrionale, e sottoposti a lobectomia polmonare elettiva per motivi terapeutici.

2.2 Analisi istologica e ultrastrutturale

Per l’analisi istopatologica del tessuto polmonare, sezioni di 5 µm di campioni fissati in formalina e inclusi in paraffina, prelevati da biopsie polmonari o autopsie, sono state colorate con Ematossilina-Eosina, Acido Periodico-Shiff (PAS) e Masson Trichrome (TM). Le sezioni sono state osservate al microscopio ottico per l’analisi istopatologica standard. Su sezioni analoghe sono stati eseguiti saggi di immunistochemical con anticorpi anti CD45 (M0855, DakoCytomation, Glostrup, Denmark) e CD68 (M0876, Dako), SP-B matura (MS1300, Neomarkers, Labvision, Fremont, CA), SP-C (AB3428, Chemicon, Temecula, CA).

Per l'analisi ultrastrutturale, i campioni di tessuto polmonare sono stati fissati in una soluzione al 2,5% glutaraldeide in buffer cacodilato 0,1M (PH 7,2), post-fissate con 1% di tetrossido di osmio (OsO₄) poi deidratate con etanolo assoluto e inserite in EMbed-812. Le microsezioni sono state trattate con uranil acetato e piombo citrato e osservate con il microscopio elettronico a trasmissione Zeiss EM 10C. Tessuto polmonare di controllo è stato reperito da neonati a termine sottoposti a lobectomia polmonare per una malformazione adenoide cistica congenita.

2.3 Analisi di espressione dell'ABCA3 al Microscopio Elettronico

Per valutare l'espressione dell'ABCA3 attraverso l'osservazione al microscopio elettronico, i campioni di tessuto polmonare sono stati fissati in una soluzione di formaldeide al 4% in PBS 0,1M per 4 ore a 4°C, poi incubati in una soluzione di saccarosio al 30% in PBS freddo a 4°C o.n., congelati con isopentano e mantenuti a -70°C. Criosezioni seriali di 20µm sono state poste su vetrini polilisinati, post fissate in tetrossido di osmio (OsO₄) per 1 ora, disidratate con etanolo in percentuale crescente, incluse in capsule di gelatina ed inserite in EMbed-812 (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA). Le sezioni sono state poi trattate con H₂O₂ al 3%, preincubate con siero di capra

(NGS) al 5% in TBS (Tris-HCl 0,1M (pH 7,6), NaCl 0,15 M e BSA 0,1%), incubate o.n con l'anticorpo rabbit anti ABCA3 diluito 1:50 in TBS, lavate accuratamente in TBS e poi incubate con l'anticorpo 15nm gold-conjugated goat anti rabbit IgG (GAR, Amersham Biosciences, UK) diluito in TBS 0,02M per 1ora a temperatura ambiente. L'incubazione dei campioni con solo anticorpo secondario è stato effettuata per controllo.

2.4 Estrazione di DNA e sequenziamento

Il DNA è stato estratto da sangue intero utilizzando il QIAamp DNA blood minikit (QIAGEN) seguendo il protocollo standard. Per alcuni pazienti per i quali il prelievo non era più disponibile il DNA è stato estratto da tessuti conservati in paraffina. Si è proceduto eliminando la paraffina mediante trattamento con xilene e reidratazione del tessuto con etanolo a concentrazioni decrescenti (100%, 90% e 75%); il tessuto è stato poi digerito incubandolo con un buffer di lisi (proteinasasi K 0,5 mg/ml, Tris Cl 50mM, EDTA 1mM, TWEEN20 0,5%). Si è proceduto all'isolamento del DNA con fenolo-cloroformio-isotiocianato secondo il protocollo di Jackson et al. (Jackson D.P. et al. 1990).

Il DNA ottenuto dal sangue intero o dai campioni di tessuto è stato utilizzato per eseguire reazioni di PCR in condizioni standard

utilizzando la macchina PTC 200 Peltier thermal cycler (MJ research, watertown, MA, USA).

Per amplificare i 30 esoni tradotti del gene *ABCA3* sono stati utilizzati primers posizionati sugli introni nella zona immediatamente a monte e a valle rispetto agli estremi degli esoni stessi (Tabella 1), per i geni codificanti le proteine del surfattante sono stati utilizzati i primers riportati da Tredano (Tredano et al 2003). I frammenti amplificati sono stati purificati e direttamente sequenziati usando il CEQ DTCS QUICK START KIT (Bekman Coulter) incubando i campioni per 35 cicli a 96° per 30 secondi, 55° per 30 secondi 60° per 4 minuti, per concludere poi con un'incubazione di 7 minuti a 60°. I primers di sequenza sono gli stessi utilizzati per le reazioni di amplificazione. Il prodotto del sequenziamento è stato infine analizzato sul sequenziatore CEQ200XL (Bekman Coulter). Lo screening delle mutazioni è stato effettuato confrontando le sequenze ottenute dal DNA dei pazienti con quelle pubblicate (NM_001089.1), le mutazioni sono state confermate sui parenti di primo grado. Il controllo su 50 DNA di individui sani è stato effettuato per escludere che le mutazioni fossero polimorfismi.

esone	Oligo Forward	Oligo Revers
4	CACTCTGCGTGTTTCTATTGC	GCATGCAGACAGCCCTTCC
5	GGAAGGGCTGTCTGCATGC	CAGGTTGAAGTAGTGATGCG
6	AGTGACCTGAACCACGCAG	GACCCAAAGGAGTGACTGC
7	TCCCACTCCACCCTGTTG	CGGCACTATTCACAACAGC
8	CGAGAGCAGCTCCTCGAG	GGCAGAGCTTGCAGTGAG
9	CCTGGCACATGCCATCATG	GACATTGACAGCTCCTCTC
10	GAGAGGAGCTGTCAATGTC	CTTCCGATCACAGCCTCTG
11	GTGTAGATGGCAAGTGCCAG	GATGCTGCTGCCTTCAGTG
12	GTCAAATGTGCACACGTGTGC	GCCACTCCCTGTGCACAG
13	TGGTTGTTGCTTTGCTCGTC	CTGGAGATGTGGTCTGTGC
14	GCTTGGTTCCTTCTGAGACG	GCTGAGGTGCATCTCCTGC
15	GGTGCTGACGAGCAGGATC	GAGGTTCTGGTGAGAGGAAC
16	CAGCTACGTCAAGGAGAGG	GCTTGAGTCCTCCAAGGATG
17	CATCCTTGGAGGACTCAAGC	CCACCCAGAGGCAACAGAC
18	GTGGGCATGAAGAGACCTG	CAGATTCATCTGGGCTGATG
19	GGGGTGATGCTTTAGGAAC	GGCAGGAGAATCTCTTGAAC
20	CAGTGCCTCTAACCATAGTC	TCTGCATGGGCTTACATGAG
21	ACAGAACAGCACCTGCCG	GGGATGCTGCTGAACCTC
22	CATGCTCAGGTGGCAGGG	CTGCTGTCACAGGGAGTTG
23	CTGCTGCCCTGCATGCCTTG	CCATGCATGGAGGGTAAAG
24	GTCTGAGGACCTCCAAATG	CCACCAGTCATGGCTAGC
25	CGGATAAGGCCCTGTGC	CTCTGCAGTGACCACGTC
26	GAGGGGACATTGTTACAGG	GGCCCAAGCAGAGACGTCG
27	GACCTCCCACATCCACC	GGACAGCCAGGTAGTCAG
28	AGGCTCAGACTGCTCTGC	CTTGTCTCGCTCTCCAGAG
29	GCACCTCAAGGGTAGTCC	GAGCTACCTGGGTCACAC
30	GCCTCCACTGGGGACATG	GGCTCTCCGATCAGGCTG
31	CCTTCCIGTCTGCACAAGC	GCACAGCAGATGGGAGAG
32	CTCCAGTGCTGAGCACC	CAAACCAGCACGTATCAGG
33	CAGAGGACTCCAGGTC	GAGAGAGGATGTAAGATGGG

Tabella 1

2.5 Estrazione di RNA e sintesi di cDNA

L'estrazione dell'RNA da tessuto polmonare è stata eseguita solo per i casi in cui è stato possibile lavorare su campioni di tessuto polmonare trattati in modo da prevenire la degradazione dell'acido nucleico. L'RNA è stato estratto con Trizol (Invitrogen) seguendo il protocollo standard. La concentrazione di RNA ottenuto dai singoli campioni è stata calcolata con lo spettrofotometro e l'integrità dell'RNA è stata valutata mediante corsa su gel di agarosio. Per eliminare eventuali residui di DNA, i campioni di RNA sono stati trattati con DNase I RNase-Free (USB Corporation, Cleveland, USA). 2mg di RNA per ciascun campione, sono stati utilizzati per la sintesi di cDNA mediante reazione di retrotrascrizione.

L'RNA è stato incubato prima per 5 minuti a 65°C con 1µl di random primers (50ng/ µl) e 1µl dNTPs (10mM), poi messo in ghiaccio per 1 minuto. Alla soluzione è stata aggiunta una miscela di 10x RT buffer (200 mM Tris-HCl PH 8,4, KCl 500mM), MgCl₂ 25mM, 0,1 M DTT, 40 unità di Rnase OUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor e 50 unità di SuperScript II RT, il tutto è stato incubato a 25° per 12 minuti, a 42°C per 50 minuti e a 70° per 15 minuti, dopo un passaggio in ghiaccio ogni campione è stato trattato con 2 unità di Rnase H e incubato a 37°C per 20 minuti. Il cDNA è stato conservato in freezer a -20°C fino ad utilizzo.

2.6 Controllo delle mutazioni introniche

Per verificare la possibilità che le mutazioni introniche riscontrate sull' *ABCA3* di alcuni dei pazienti potessero avere delle implicazioni sul meccanismo di splicing, 2µg dell' RNA estratto dai pazienti in questione, è stato retrotrascritto utilizzando un oligo specifico disegnato con una sequenza complementare ad una parte dell'ultimo esone del gene *ABCA3*. Il cDNA ottenuto è stato sequenziato utilizzando primers esonici specifici (Tabella 2). Confrontando la sequenza ottenuta con quella pubblicata (NM_001089.1) è stato possibile verificare la presenza di introni o porzioni di essi nella sequenza del cDNA.

PRIMERS ESONICI

4Fw	ATGGCTGTGCTCAGGCAGC	20Rev	AGTGTTGAGCTTGACAGCG
7Rev	CAGGTTCTCCGCCATCAGG	19Fw	GCATCCATCACCACCATGG
6Fw	CCGAGAAGGACTTTGAGGA	23Rev	CCAAGAATGCCATGGCGAA
11Rev	CAGAGCTTCTGGCTCAGAG	22Fw	TTCTGTTCAAGCTGCTGTGC
10Fw	TGGTCAGCACCTTCTTCAGC	26Rev	TGAGTCTCTGAAGCAGGTT
14Rev	TGTGAGCATGGAGAGGGTG	25Fw	G
13Fw	TTGGTGTGGGAAGCCAAGG	28Rev	AACCCTGGATCACGTGTTC
16Rev	TTGGAGCCTGCGATGAGG	27Fw	C
15Fw	CAGTGGACGGGCATACATC	30Rev	CAGAAGTGAGGCTCTCCTC
18rev	CAGCGTCATGTGATAGCCG	29Fw	CCCTGCTCCACACACCTC
17Fw	TCCTCGCTGTTCCCTCAAGC	33Rev	GGAGGTGATGATGATGGC TTGATGCCTTGCTGGACCAC CTCGCTCACGGAGTAGTC

Tabella2

2.7 Immunofluorescenza

Sezioni seriali di tessuto polmonare congelato (5 μ m) sono state fissate in acetone per 10 minuti, lavate in PBS, bloccate per 30 minuti in una soluzione di PBS e 5% FCS (fetal calf serum) e 1% BSA ("bovine serum albumin"), permeabilizzate per 5 minuti in una soluzione di PBS 0,05% tween20, e incubate con i seguenti anticorpi: monoclonale anti-SP-B (Labvision, Ferment CA), ABCA3 (clone 13-H2-57, Seven Hills Bioreagents), SP-D (Abcam, Cambridge, MA), diluiti in PBS contenente l'1% BSA. Dopo alcuni lavaggi in PBS, i vetrini sono stati incubati con l'anticorpo secondario goat anti-mouse Alexa Fluor 488-conjugated (Molecular Probes, Eugene, OR). Doppie colorazioni sono state eseguite utilizzando uno dei seguenti anticorpi policlonali: rabbit: anti ABCA3 (diluito 1:500 gentilmente ottenuto dal prof. Nobuya Inagaky), anti pro-SP-B (Chemicon), anti pro-SP-C (Chemicon), rilevati tutti con l'anticorpo secondario goat anti-rabbit coniugato con Alexa Fluor 555 (Molecular Probes). Il controllo negativo è stato eseguito incubando i campioni con PBS/BSA senza anticorpo primario. Le sezioni sono state montate in una soluzione di PBS e glicerolo al 50% ed esaminate utilizzando il microscopio invertito equipaggiato con epifluorescenza ottica Olympus IX81.

2.8 Western Blot

Estratti proteici di campioni di tessuto polmonare sono stati preparati seguendo la procedura già descritta (Yamano et al. 2001), la concentrazione delle proteine è stata calcolata con il metodo della BCA (Pierce), e 30µg di proteine sono state caricate su un gel di SDS-poliacrilammide all'8%, separate elettroforeticamente a 90V e poi trasferite su filtro di nitrocellulosa (Amersham Biosciences) per 2 ore a 70V. I siti di legame aspecifici delle proteine sono stati bloccati incubando la membrana per 1 ora a temperatura ambiente in una soluzione di TBS contenente il 5% di latte privo di grassi. La membrana è stata poi incubata con l'anticorpo primario anti-ABCA3 diluito 1:1000 in una soluzione di TBS contenente latte al 2,5% per 2 ore. Dopo 3 lavaggi da 15 minuti ciascuno con TBS, la membrana è stata incubata con l'anticorpo secondario goat anti-mouse-HRP (Santa Cruz Biotechnology) diluito 1:5000 in una soluzione di TBS/latte per 1 ora. Dopo tre lavaggi in TBS la proteina è stata osservata con il sistema a chemiluminescenza (ECL, Amersham Biosciences). La stessa membrana è stata in seguito lavata e trattata con l'anticorpo primario anti-βactina (Santa Cruz Biotechnology) diluito 1:5000 in TBS/latte, rilevato con l'anticorpo secondario anti rabbit-HRP (Santa Cruz Biotechnology) diluito 1:5000 in TBS/latte.

2.9 Real Time-PCR

Per l'analisi quantitativa dell'espressione dell'*ABCA3* e dei geni delle proteine del surfattante, i campioni di cDNA sono stati impiegati per effettuare saggi di Real-Time-PCR, utilizzando una macchina ABI PRISM 7000 (Applied Biosystem). Sono stati scelti primers specifici TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystem) per *ABCA3* (Hs00184543_m1), *SFTPB* (Hs00167036_m1), *SFTPC*(Hs00161628_m1), *β -actin*(Hs99999903_m1).

Il cDNA diluito è stato messo in soluzione con i primers e con la Taq Man Universal PCR Master Mix (Applied Biosystem) in un volume di 40 μ l. La reazione di Real Time-PCR è stata eseguita con una prima incubazione dei campioni a 95°C per 10 minuti, seguita da 40 cicli a 95° per 15 minuti e 60° per 1 minuto.

I dati ottenuti sono stati normalizzati con il valore relativo alla *β -actin*. La differenza tra la media dei valori di CT dell'*ABCA3*, *SFTPB* e *SFTPC* e quelli della *β -actin* sono stati calcolati nei campioni come $\Delta CT_{\text{sample}} = CT_{ABCA3, Sp-b, Sp-C} - CT_{\beta\text{-actin}}$ e quelli di ΔCT per il controllo sano $\Delta CT_{\text{calibrator}} = CT_{ABCA3, Sp-b, Sp-C} - CT_{\beta\text{-actin}}$. Il risultato finale viene espresso come n-volte di differenza di espressione dei geni in esame tra campione e controllo sano utilizzando la formula $n = 2^{-(\Delta CT_{\text{sample}} - \Delta CT_{\text{calibrator}})}$.

3 RISULTATI

Il gruppo di pazienti analizzato comprendeva 15 neonati con quadro clinico di PILD o RDS. Per tutti è stata effettuata l'analisi genetica su DNA estratto da sangue intero dopo consenso informato dei genitori. La biopsia polmonare, eseguita soltanto se ritenuta indicata dal punto di vista diagnostico-terapeutico, e dopo consenso informato, è stata eseguita in 10 dei pazienti.

3.1 Analisi istologica e ultrastrutturale

. L'osservazione del tessuto polmonare al microscopio ottico (Figura 5) nei 10 pazienti sottoposti a biopsia, ha messo in evidenza un danno polmonare diffuso caratterizzato da iperplasia degli pneumociti di tipo II (metaplasia cuboidale dell'epitelio alveolare), proliferazione dei fibroblasti, deposito di fibre di collagene (fibrosi interstiziale) ed infiltrato linfocitario nell'interstizio, un quadro designato polmonite interstiziale desquamativa (desquamative interstitial pneumonitis, DIP); inoltre si riscontrano accumuli focali di cellule epiteliali, macrofagi alveolari e materiale amorfo proteico nel lume alveolare, caratteristico di proteinosi alveolare polmonare (PAP) (Figura 7). Il referto di DIP/PAP, considerato in numerosi

studi aspecifico ed idiopatico, è stato recentemente riconosciuto come strettamente indicativo di malattie congenite del sistema del surfattante, di causa genetica conosciuta o no (Deutsh 2007); tuttavia, eccetto nel caso di deficit di SP-B con assenza completa della proteina, le tecniche microscopiche ottiche ed immunoistochimiche standard non permettono di discriminare fra le diverse eziologie genetiche.

L'analisi al microscopio elettronico mostra in tutti i casi alterazioni a livello ultrastrutturale. In particolare gli pneumociti di tipo II dei pazienti, contengono corpi lamellari con evidenti alterazioni rispetto agli organelli normali (figura 6). I corpi lamellari normali hanno una forma circolare, un diametro di 2-3 μ , e sono caratterizzati da strisce concentriche di fosfolipidi che corrispondono alla forma di stoccaggio intracellulare del surfattante chiamata "pseudomieline" (figura 7a) . Quelli osservati nei pazienti, invece, erano di diametro inferiore, erano riempiti di materiale amorfo o talvolta pseudocristallino (immagine reticolata), di strisce abbozzate e disorganizzate, e di una o più inclusioni dense centrali o marginali, una morfologia designata "fried egg" (figura 7b). Nei 5 pazienti con quadro di URDS (1, 2, 3, 4, 6), erano presenti esclusivamente corpi lamellari di questo tipo. Nel paziente 5 sono anche presenti corpi lamellari di diametro uguale o superiore alla norma, privi o quasi di strisce concentriche o di corpi densi, ma contenenti vescicole di vario calibro, un aspetto designato "corpo multivescicolare" che può

rappresentare una forma immatura di corpo lamellare, ma che è anche stato riportato nel deficit della proteina del surfattante SP-B (Edwards 2005) (figura 7c). In due pazienti (5, 7, 8), insieme ai corpi lamellari aberranti sono visibili nelle stesse cellule anche alcuni corpi lamellari con struttura normale (figura 6 f, h, i). Anche nel paziente 9 sono evidenti corpi lamellari fried egg (figura 6 l).

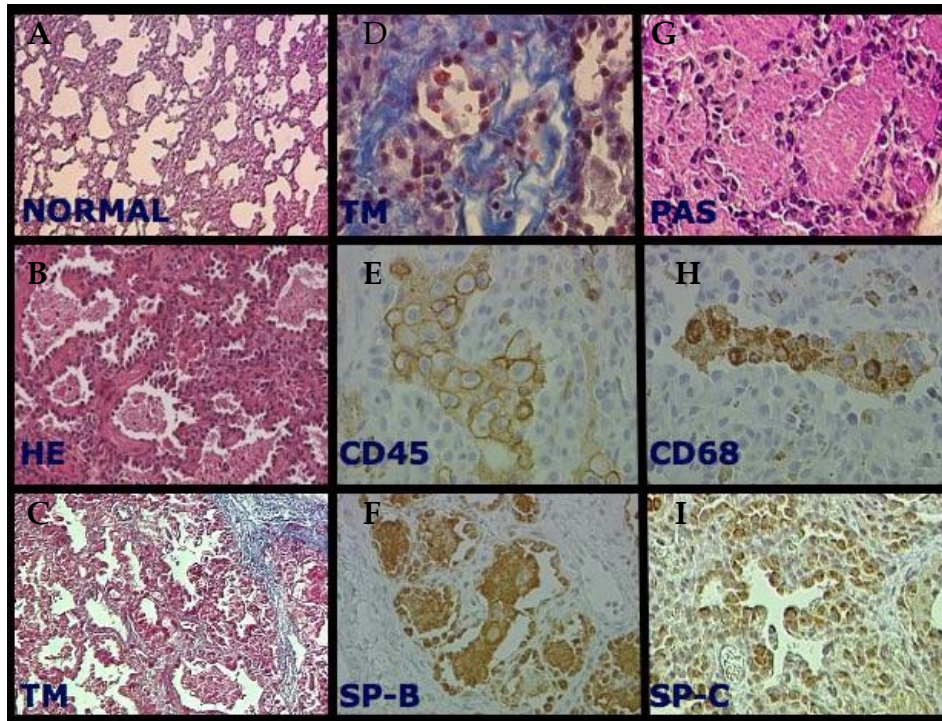


Figura 5:

Sezione di tessuto polmonare normale (A) e in paziente con deficit congenito del surfattante (B), emotossilina-eosina, 20X: si evidenzia ispessimento marcato dei setti interalveolari con proliferazione cellulare interstiziale, metaplasia cuboidale dell'epitelio alveolare, riempimento del lume alveolare con materiale in parte cellulare e in parte amorfo. La colorazione Tricromica di Masson (C: 20X, D: 40X) evidenzia nel paziente la fibrosi interstiziale (fibre collagene in blu). La marcatura con anticorpo anti-CD45 (E) evidenzia la presenza di leucociti nel materiale intra-alveolare e nell'interstizio (60X); il CD68 (H) identifica le cellule intra-alveolari come macrofagi (60X). La colorazione Periodic Acid Schiff (PAS) (G) evidenzia la componente di proteinosi alveolare nel materiale intra-alveolare (20X) Le colorazioni con anticorpo anti-SP-B (F) e anti-SP-C (I) (40X) evidenziano la proliferazione degli pneumociti di tipo II nell'epitelio alveolare.

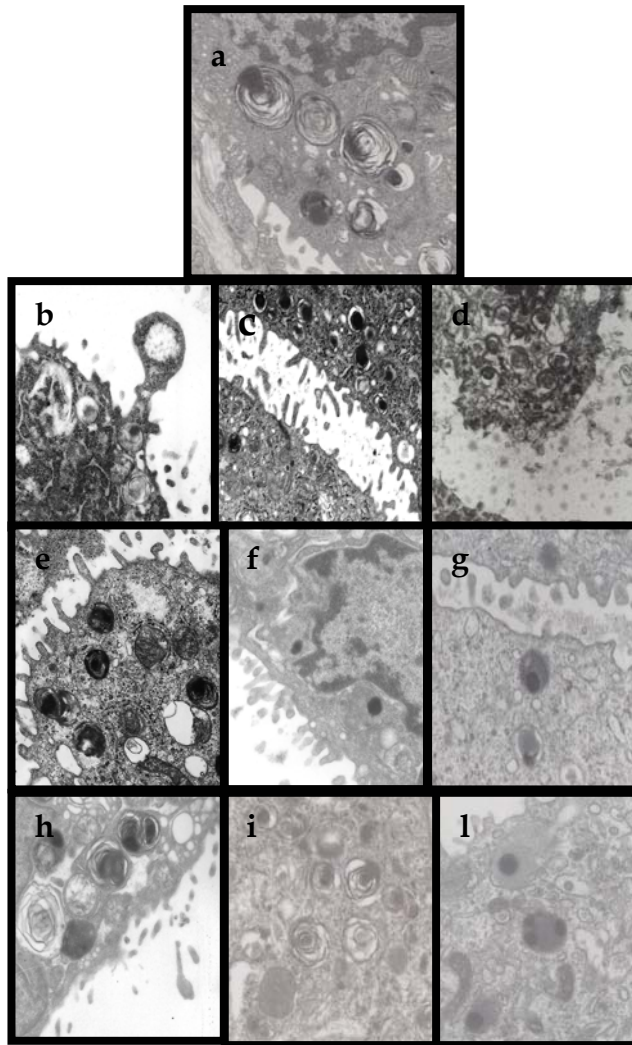


Figura 6
Microscopia elettronica. Analisi ultrastrutturale di sezioni di tessuto polmonare di un controllo (a), del paziente 1 (b), 2 (c), 3 (d), 4 (e), 5(f), 6 (g), 7(h), 8(i), 9 (l). Sono evidenti in tutti i casi alterazioni nella conformazione dei corpi lamellari che presentano la tipica struttura "fried egg". Nei pazienti con RDS sono visibili solo corpi lamellari alterati (b, c, d, e, g), nei pazienti con PILD sono presenti anche corpi lamellari normali (f, h, i, l).

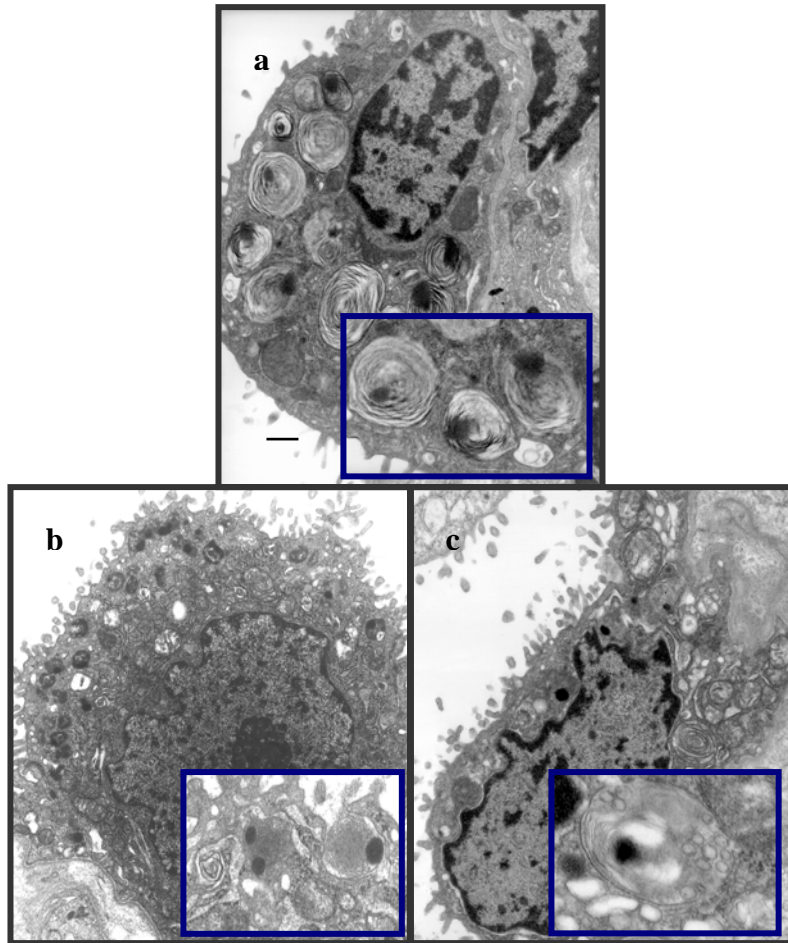


Figura 7: Microscopia elettronica.
Raffigurazione di uno pneumocita di tipo II in un controllo (a), nel paziente 4 (b) e nel paziente 5(c). Sono evidenziati i tre tipi di corpi lamellari riscontrati, grandi e con le tipiche fibre concentriche nel controllo (a), morfologia "fried egg" caratterizzata da organelli più piccoli, con corpo denso e struttura omogenea (b), e con struttura multivescicolare (c). Barra 0,5 μ m.

3.2 Screening delle mutazioni nei geni correlati al surfattante

Per avvalorare l'ipotesi che la sintomatologia clinica e le alterazioni a livello tissutale ed ultrastrutturale del polmone dei pazienti fossero dovute a mutazioni nei geni associati all'omeostasi del sistema del surfattante, sono stati sequenziati tutti gli esoni tradotti e le regioni introniche contenenti i siti di regolazione di splicing dei geni *SFTP-B*, *SFTP-C* e *ABCA3*, nei pazienti e nei parenti di primo grado ove possibile.

In 8 dei pazienti studiati sono state riscontrate mutazioni sul gene *ABCA3* (tabella 3). Nei pazienti 1-4 e 6, che presentavano alla nascita un quadro clinico di URDS con evoluzione letale rapida (entro 6 mesi dalla nascita), erano presenti mutazioni esoniche su entrambi gli alleli: mutazioni frameshift in omozigosi nei pazienti 1 e 6, e doppie mutazioni missenso nei pazienti 2, 3 e 4. Le mutazioni sono state confermate sui parenti eterozigoti. La delezione di due basi AG in posizione 3997 (esone 26) nei pazienti 1 e 6 si ritrova in eterozigoti in entrambi i genitori. I due pazienti, presumibilmente non legati da rapporti di parentela, appartenevano allo stesso gruppo etnico. 3 dei 4 pazienti che si presentavano con un quadro di PILD (5, 7, 8) erano portatori di una singola mutazione esonica, di tipo missenso. Nei pazienti 7 e 8, per i quali non erano ipotizzabili legami di parentela, è stata riscontrata la stessa mutazione: A501E. Il

paziente 9, con un quadro clinico riferibile a PILD e una evidente alterazione nella struttura dei corpi lamellari, non presentava mutazioni sull' ABCA3.

In un ipotetico modello strutturale dell'ABCA3, le mutazioni riscontrate sembrano essere concentrate ai due estremi della proteina (figura 8). Nei casi 1 e 6, la delezione determina lo scorrimento della sequenza nucleotidica portando alla formazione di un codone di stop precoce (esone 27) (figura 9) che porta alla perdita della regione C-terminale della proteina contenente il secondo sito di legame con l'ATP (NBD2). Tutte le mutazioni missenso individuate, sono localizzate in siti molto conservati (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/genesequalignview?db=core;gene=ENSG00000167972), 5 di queste mutazioni sono localizzate all'interno del primo loop extracellulare, il cui ruolo funzionale nella proteina non è conosciuto. Due delle altre mutazioni (T1423I, R1482W) sono localizzate nel secondo dominio di legame con l'ATP e potrebbero essere la causa di alterazioni nell'attività ATPasica della proteina. La mutazione A501E, è invece localizzata in prossimità del primo dominio di legame con l'ATP e potrebbe anch'essa interferire con la funzionalità della proteina.

Lo studio dettagliato del pedigree familiare è stato eseguibile nei casi 1, 4, 5 (figura 10). Nella famiglia del caso 1, entrambi i genitori sono portatori eterozigoti della mutazione frameshift, mentre i due fratelli, nati dopo il caso indice, sono privi di

mutazioni. Entrambi i genitori del paziente mostrano un fenotipo normale e non presentano evidenti problemi a livello respiratorio. Nella famiglia 4, entrambi i genitori ed i fratelli sono portatori di una delle due mutazioni missenso del caso indice. L'analisi sulla funzionalità respiratoria ha evidenziato nella madre e nella sorella del paziente, entrambe portatrici della mutazione sull'esone 6 (P147L), valori di spirometria normali, ma una riduzione modesta della capacità di diffusione del CO (dCO, K-CO) indicativa di una ridotta capacità di scambio gassoso a livello alveolare. Nel caso 5, la mutazione eterozigote risulta trasmessa dalla madre, mentre una mutazione intronica risulta trasmessa dal padre ed è anche presente sul DNA della sorella del paziente. In questo pedigree, anche se entrambi i genitori e la sorella non presentavano sintomi clinici a livello respiratorio, all'analisi spirometrica, la madre presentava una riduzione della capacità di diffusione al CO.

In tutti i pazienti analizzati sono stati sequenziati anche i geni codificanti le proteine del surfattante SP-B e SP-C, per poter escludere che il deficit di surfattante riscontrato potesse essere associato a mutazioni e conseguente deficit delle suddette proteine. In alcuni dei pazienti sono stati riscontrati polimorfismi già noti sulle proteine del surfattante, ma in nessun caso erano presenti mutazioni significative. Nei pazienti 4 e 5 sono state riscontrate mutazioni introniche in una regione che poteva contenere siti di regolazione di

splicing. Il controllo della sequenza del cDNA ha consentito di escludere ritenzione intronica in entrambi i pazienti.

Casi	Età gestazionale	Condizione clinica	genetica	Tipo di mutazione
1	40 w	Dec. 68 giorni	3997delAG 3997delAG	Frameshift omozigote
2	40 w	Dec 48 giorni	R208W T1423I	Doppia mutazione missenso
3	41 w	Dec. 55 giorni	R43L R1482W	Doppia mutazione missenso
4	38,5 w	Dec 7 mesi	P147L R155Q	Doppia mutazione missenso
5	40 w	Dec. 18 mesi	P248L	Eterozigote
6	35 w	Dec 40 giorni	3997delAG 3997delAG	Frameshift omozigote
7	36 w	Dec 12 mesi	A501E	Eterozigote
8	40 w	Dec 18 mesi	A501E E1475E	Una mutazione missenso+ SNP
9	40 w	Dec. 12 mesi	-	?

Tabella 3

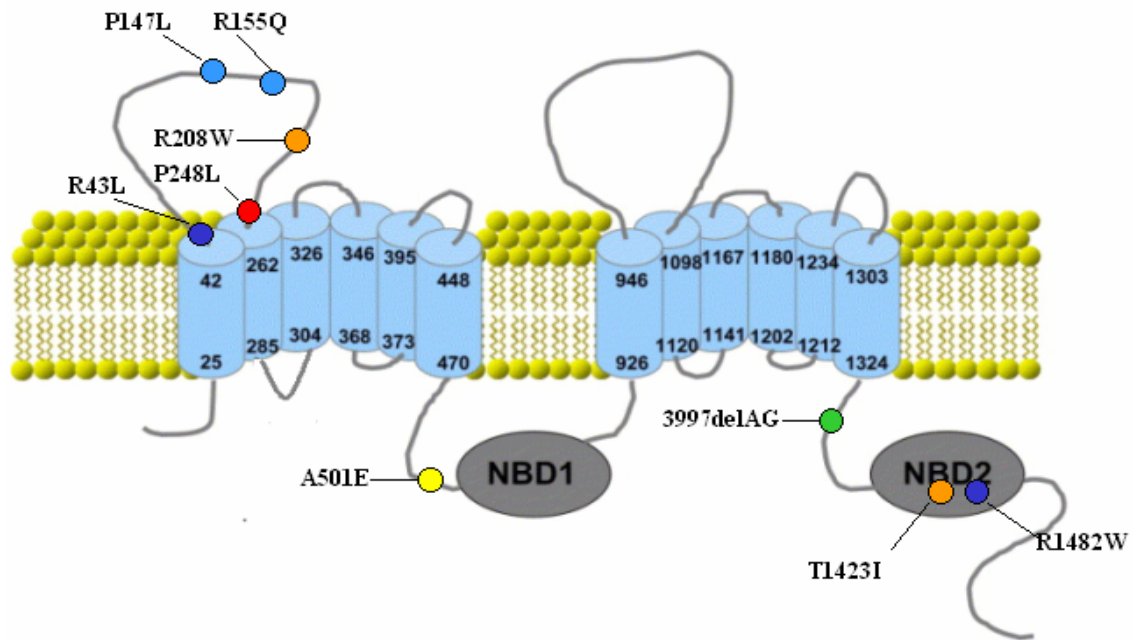


Figura 8:

Sulla ipotetica struttura della proteina ABCA3 sono state indicate le mutazioni riscontrate nei pazienti: paziente 1-6 verde, paziente 2 arancione, paziente 3 blu, paziente 4 azzurro, paziente 5 rosso, paziente 7-8 giallo. La maggior parte delle mutazioni sono concentrate ai due estremi della proteina.

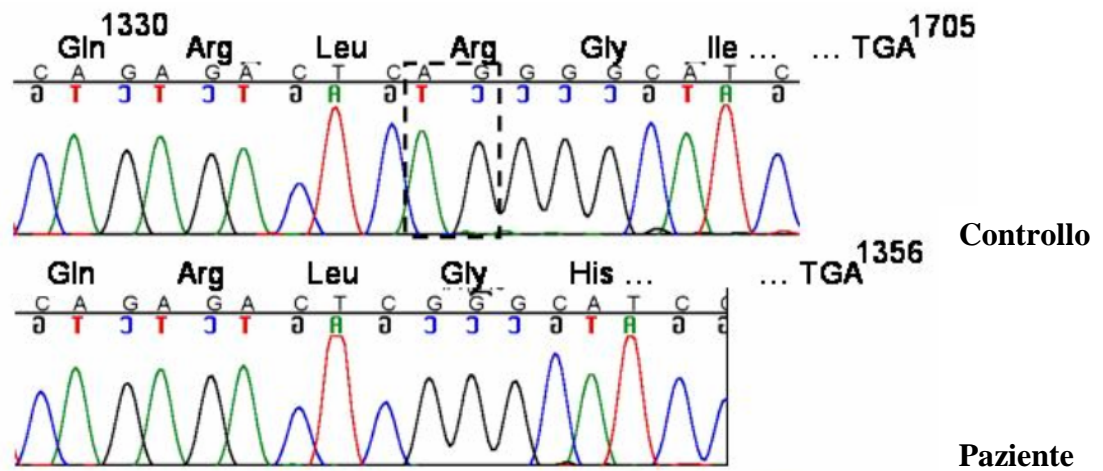
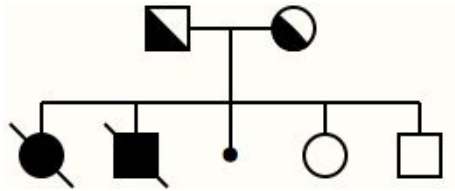
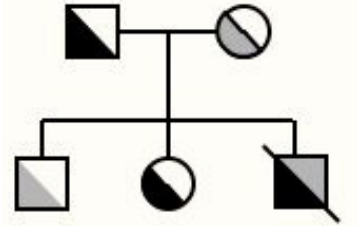


Figura 9:
 Cromatogrammi di sequenziamento del paziente 1 e di un controllo. Sul DNA del paziente mancano i due nucleotidi AG, la mutazione produce un frameshift che determina la formazione di una tripletta di stop TGA in posizione prematura.



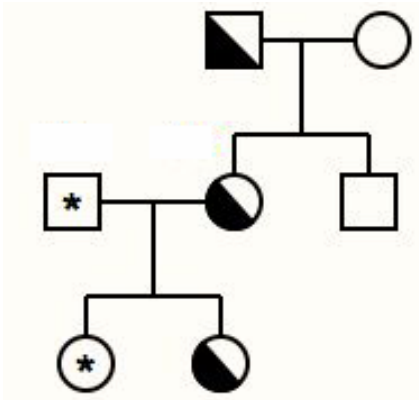
Paziente1: delezione c3997AG
RDS fatale
 Madre: eterozigote-sana
 Padre: eterozigote-sano

Paziente 1



Paziente 4: doppio eterozigote
 P147L-R155Q
RDS fatale
 Madre: eterozigote P147L -**kCO inferiore**
 Padre: eterozigote R155Q -sano
 Sorella: eterozigote P147L-**kCO inferiore**

Paziente 4



Paziente5 : eterozigote P248L-
 mutazione introne 10
PILD grave
 Madre: eterozigote P248L- **kCO inferiore**
 Padre: mutazione introne 10-sano
 Sorella: mutazione introne10-sana

Paziente 5

Figura 10: Schematizzazione dei pedigree familiari di tre pazienti. Sui genitori portatori di una mutazione sull'*ABCA3* è stata effettuata l'analisi spirometrica per valutare eventuali anomalie. Lo scambio gassoso a livello alveolare è misurato come KCO. In individui sani la KCO ha un valore superiore all'80%. Il paziente 1 è portatore di una mutazione in omozigosi, i genitori eterozigoti non presentavano alterazioni della funzione respiratoria. Il paziente 4 è un doppio eterozigote, la madre e la sorella del paziente, portatrici della stessa mutazione presentano un valore di kCO al di sotto del limite. Il paziente 5 possiede una sola mutazione esonica e una intronica. La madre del paziente, portatrice della mutazione esonica ha una kCO lievemente più bassa del limite.

3.3 Analisi di localizzazione ed espressione dell'ABCA3 e delle proteine del surfattante.

3.3.1. Immunoistochimica/immunofluorescenza

Quest'analisi è stata condotta nei pazienti 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9. Per i pazienti 1, 2, 3 per i quali era disponibile soltanto materiale biotico incluso in paraffina, lo studio è stato effettuato mediante immunoistochimica (immunoperossidasi) utilizzando esclusivamente l'anticorpo anti-ABCA3 (figura 11). Per i pazienti per i quali era disponibile tessuto congelato, è stata eseguita l'immunofluorescenza in microscopia confocale, con marcaggio delle proteine proSP-B, SP-B, proSPC, SP-C, ABCA3, SP-D (figura 12-13).

A. Pattern di espressione dell'ABCA3:

Nel paziente 1, l'espressione della proteina è completamente assente. Il paziente 2 mostra una forte espressione dell'ABCA3, che non appare confinata all'apice degli pneumociti di tipo II, come nei controlli, ma diffusa nel citoplasma, compatibilmente ad una ritenzione della proteina a livello del reticolo endoplasmatico. Nel paziente 3 la proteina sembra espressa quantitativamente e qualitativamente allo stesso modo che nei controlli. Il paziente 4 presenta un deficit quasi totale della proteina, mentre nel paziente 5 l'espressione dell'ABCA3 è moderatamente ridotta rispetto al

controllo. Il paziente 6, che possedeva la stessa alterazione genetica del paziente 1, mostra come questo un deficit totale di espressione della proteina ABCA3. Nei pazienti 7 e 9, l'ABCA3 è meno espressa rispetto al controllo.

B. Pattern di espressione delle proteine strutturali del surfattante:

Nel paziente 4, i precursori delle proteine del surfattante, pro-SP-B e pro-SP-C, risultano overespressi rispetto al controllo, mentre l'espressione delle proteine mature sembra essere normale. Nel paziente 5, la SP-C ed il suo precursore hanno un'espressione normale, invece la SP-B ha un'evidente alterazione nella localizzazione. All'interno degli pneumociti è espresso soltanto il precursore della proteina (proSP-B), mentre la proteina matura è del tutto assente nel citoplasma delle cellule, ma si ritrova in alta concentrazione nel materiale amorfo che riempie gli alveoli. Nei pazienti 7 e 9 le proteine SP-B e SP-C sembrano non mostrare alcuna anomalia di espressione e localizzazione. E' stata valutata anche l'espressione della proteina del surfattante SP-D che in tutti i casi risultava essere espressa allo stesso modo rispetto al controllo.

C. Marcaggio della napsina e catepsina H nel paziente 5:

Il paziente 5 mostrava un'evidente alterazione nella localizzazione della proteina SP-B. E' noto che questa proteina viene inizialmente sintetizzata come precursore che va poi incontro ad alcune fasi di processamento che ne determinano la giusta localizzazione (Lin 1996). Esclusivamente per questo paziente è stata

fatta un'analisi di espressione dei due enzimi, napsina e catepsina, implicati nel processamento del precursore della SP-B (proSP-B). Non è stata riscontrata alcuna anomalia nell'espressione dei due enzimi (figura 14).

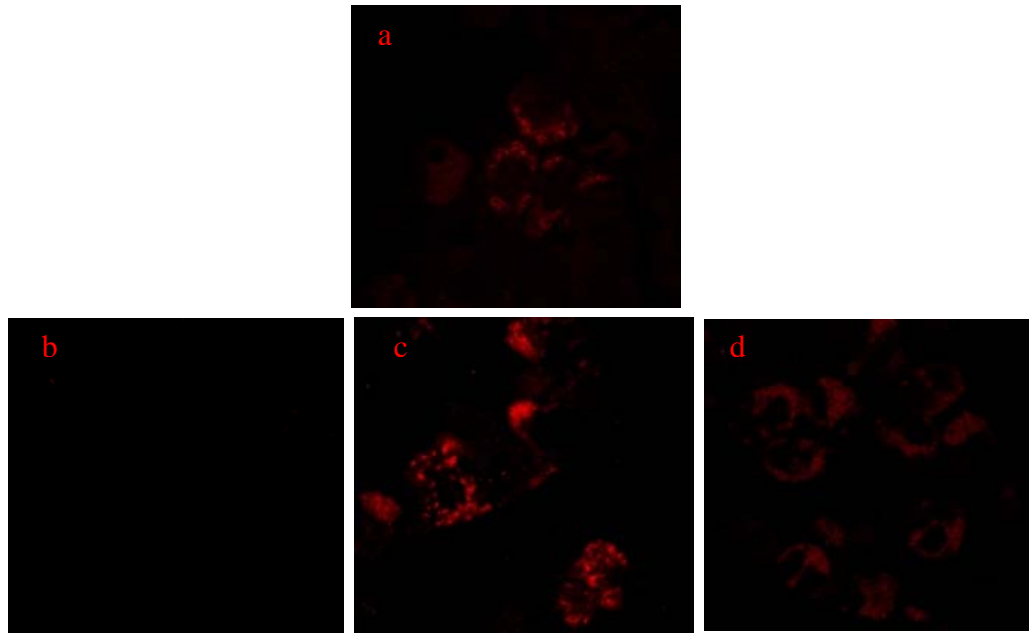


Figura 11: Immunofluorescenza.

Espressione della proteina ABCA3 in campioni di tessuto polmonare inclusi in paraffina. Controllo (a), paziente 1 (b), paziente 2 (c), paziente 3 (d). Nel paziente 1 omozigote per la delezione 3997AG, si ha il deficit della proteina; nel paziente 2 l'ABCA3 sembra avere una espressione maggiore rispetto al controllo, ma una localizzazione alterata, nel paziente 3 la proteina è espressa come nel controllo.

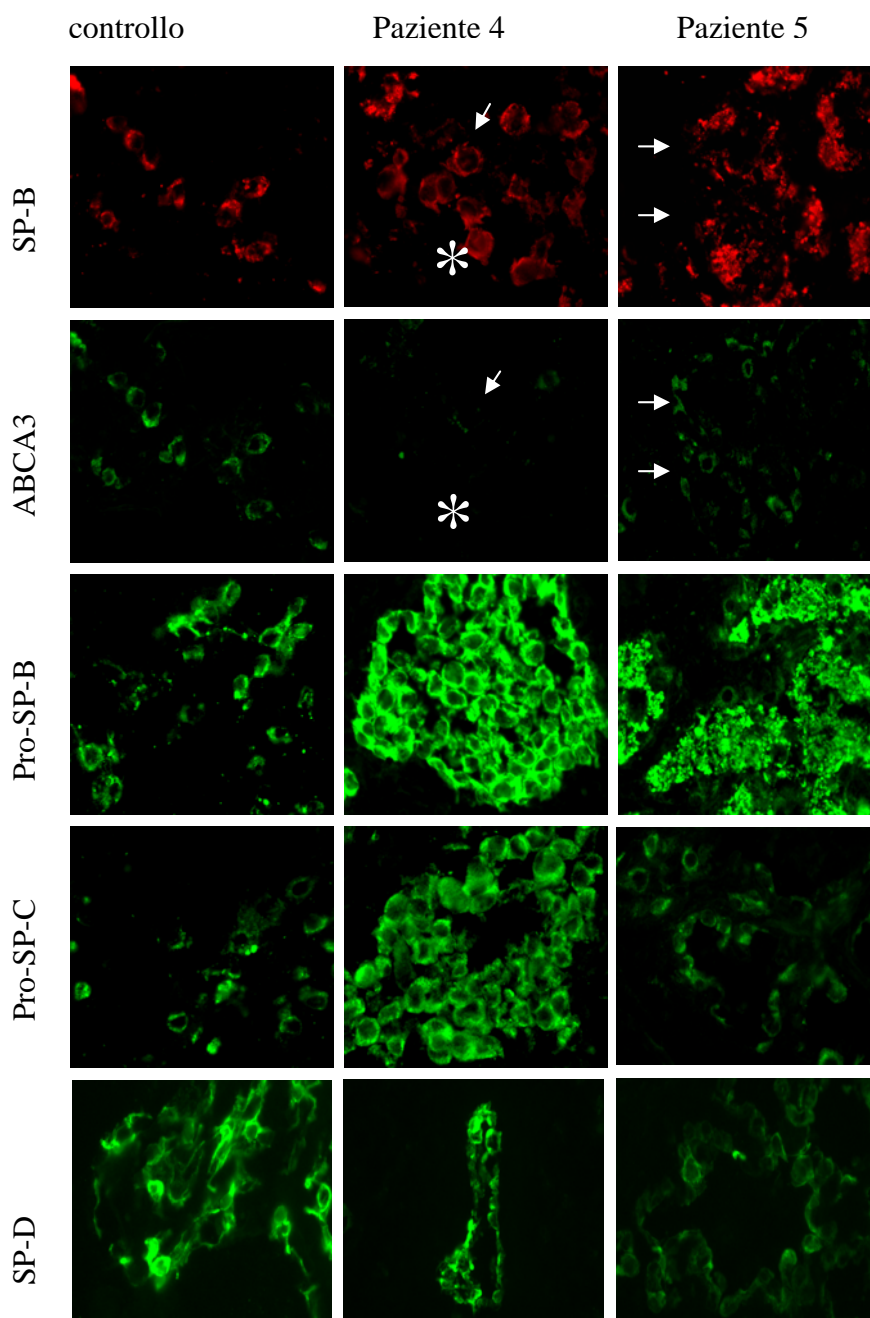


Figura 12: Immunofluorescenza.

Analisi di espressione e localizzazione dell'ABCA3 e delle proteine correlate al surfattante nei pazienti 4, 5 e in un controllo sano.

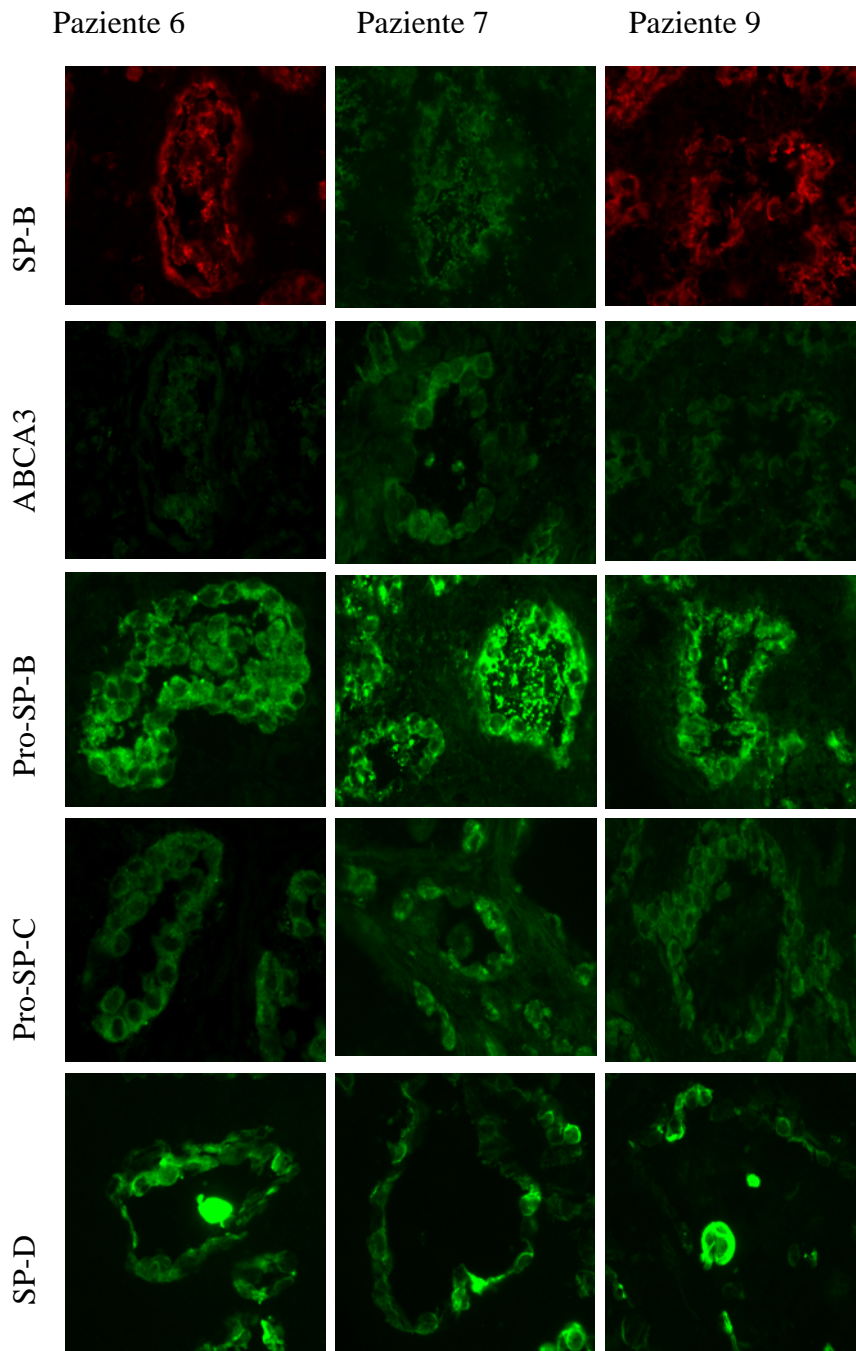
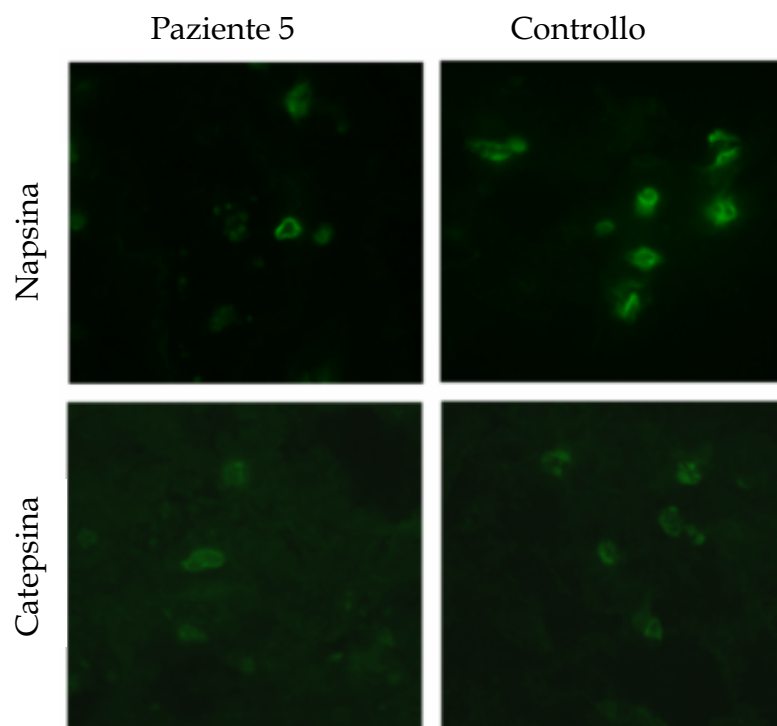


Figura 13: Immunofluorescenza.

Analisi di espressione e localizzazione dell'ABCA3 e delle proteine correlate al surfattante nei pazienti 6, 7 e 9.



Fiura 14: Immunofluorescenza

Nel paziente 5 la SP-B ha una localizzazione alterata. L'analisi mostra l'espressione dei due enzimi responsabili del processamento della proteina. I risultati non rilevano differenze sostanziali tra il paziente e un controllo sano.

3. 3.2. Immunolabelling dell'ABCA3 in microscopia elettronica.

L'osservazione al microscopio elettronico di sezioni di tessuto polmonare sano (controlli) trattate con l'anticorpo anti-ABCA3 rivela una localizzazione della proteina esclusivamente nella zona marginale dei corpi lamellari al polo alveolare dello pneumocita di tipo II (figura 15a), in accordo con la localizzazione descritta negli studi immunohistochimici in vitro e nell'animale, presenti in letteratura (Stalman 2007, Bruder 2007, Somaschini 2007). Questo pattern risulta alterato nei due pazienti sui quali l'analisi immunogold è stata possibile (4, 5). L'ABCA3 è completamente assente nel paziente 4 (figura15b). Nel paziente 5 invece l'anticorpo evidenzia una posizione anomala della proteina, localizzata nella zona più interna dei corpi lamellari (figura 15c) anziché a livello della membrana plasmica.

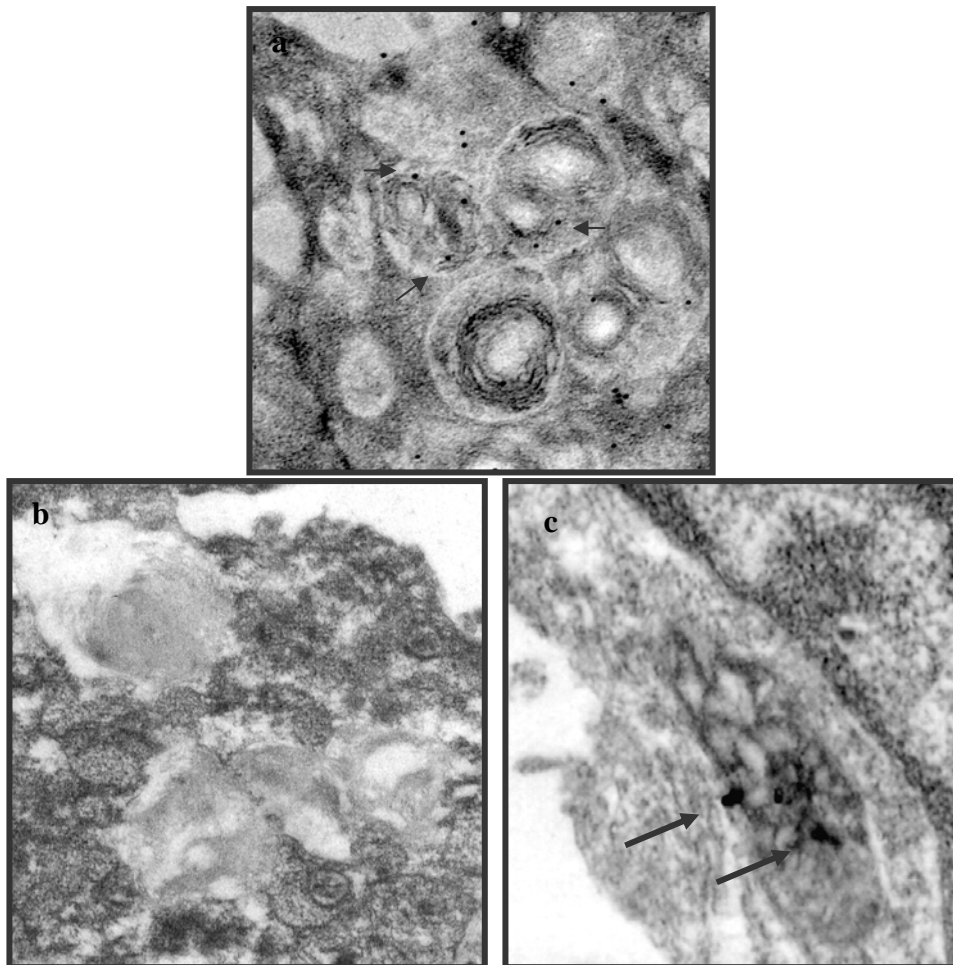


Figura15: Immunogold.

Analisi di espressione dell'ABCA3 con microscopio elettronico. In un tessuto polmonare di controllo la proteina è espressa nella regione marginale dei corpi lamellari (a); Nel paziente 4 affetto da RDS l'ABCA3 sembra completamente assente (b); nel paziente 5 con PILD la proteina è espressa in posizione anomala (c).

3.3.3 Western Blot

Per l'analisi dell'espressione proteica mediante Western Blot, sono stati utilizzati gli stessi anticorpi impiegati per l'immunofluorescenza. Nell'estratto proteico da polmone sano (controllo), l'anticorpo anti-ABCA3 mette in evidenza due bande, una di circa 180kDa e una di 150kDa. Lo stesso metodo applicato al paziente 4, l'unico in cui il materiale idoneo era reperibile, mostra una marcata riduzione dell'espressione dell'ABCA3 (figura 16).

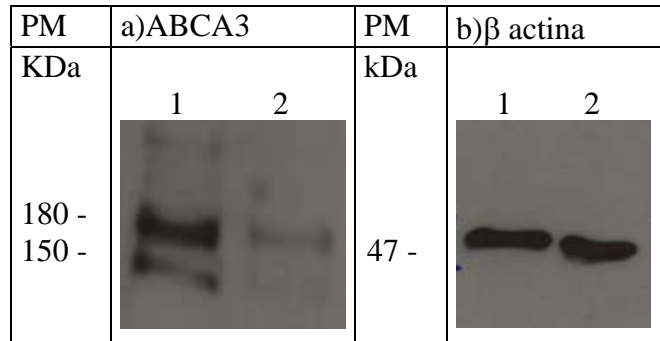


Figura 16: Western Blot.

Nell'estratto proteico di polmone di controllo l'anticorpo anti-ABCA3 rileva due bande a 180 e 150 kDa (lane 1), il paziente 4 mostra all'analisi un deficit quasi totale della proteina (lane 2). Il trattamento con anticorpo anti β actina conferma l'utilizzo della stessa quantità di proteine per i due campioni.

3.4 Analisi dell'espressione genica

Per alcuni dei pazienti è stato possibile reperire da tessuto biptico RNA integro, indispensabile per effettuare l'analisi quantitativa dell'espressione genica mediante Real-time PCR. Sono stati utilizzati oligonucleotidi specifici per i geni codificanti le proteine del surfattante SP-B e SP-C e per l'ABCA3. Il gene *β actina* è stato utilizzato per la normalizzazione. I valori di espressione dei geni di interesse sono stati espressi in multipli o frazioni del valore medio trovato nei controlli. Nei casi 5, 6, 7, 9 il gene ABCA3 risulta overespresso rispetto al controllo come anche i geni codificanti la SP-B e la SP-C (figura 17).

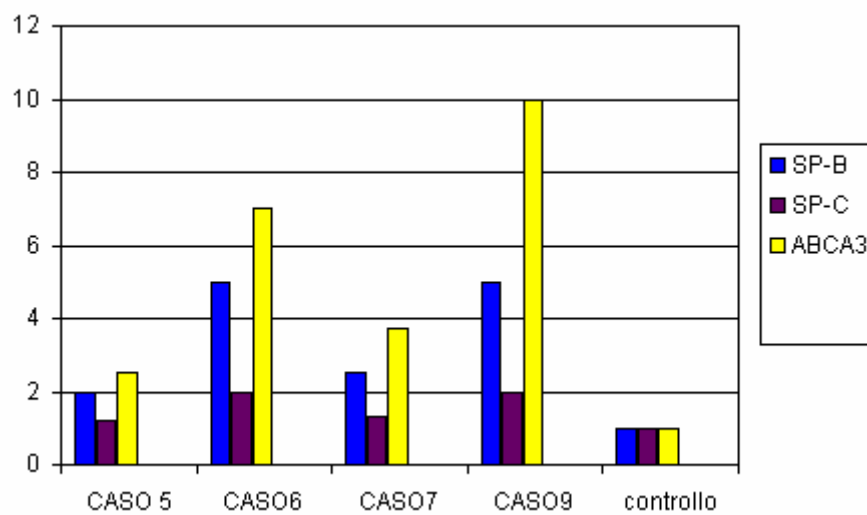


Figura 17: Real Time- PCR.

Il saggio di espressione genica mostra in tutti i pazienti analizzati una overespressione dell' Abca3 e delle proteine correlate al surfattante.

4 DISCUSSIONE

Lo scopo primario di questo studio era di determinare il ruolo delle mutazioni dei geni associati al metabolismo del surfattante e delle alterazioni di espressione delle proteine corrispondenti, nelle malattie polmonari idiopatiche e progressive del neonato e del lattante. Nel corso di questo studio sono stati selezionati 15 pazienti con un quadro clinico riferibile a URDS e PILD. Su tutti è stata effettuata l'analisi genetica per i geni codificanti le proteine del surfattante SP-B e SP-C e per il gene codificante l'ABCA3. Su 10 dei pazienti è stata effettuata biopsia polmonare.

L'osservazione al microscopio ottico nei pazienti selezionati mostrava un quadro misto di DIP e PAP. Queste entità diagnostiche, basate su criteri anatomopatologici, erano considerate non specifiche ed idiopatiche, prima della scoperta delle mutazioni dei geni del surfattante. Studi recenti hanno dimostrato invece che il 30-50% dei casi di URDS (Shulenin 2004) e circa i 2/3 dei casi di PILD (Deutsch 2007), entrambi associati a questo quadro istopatologico, sono causati da mutazioni nei tre geni *SFTPB*, *SFTPC* e *ABCA3*; è probabile che anche i casi rimasti inspiegati siano riconducibili a deficit congeniti del surfattante di eziologia genica ancora sconosciuta. Lo studio anatomopatologico ed immunohistochimico standard non permettono da soli la distinzione tra i diversi tipi genetici.

L'osservazione al microscopio elettronico di sezioni di tessuto polmonare evidenziava in 9 dei 10 pazienti in cui è stata effettuata, alterazioni tipiche dei corpi lamellari che si presentano sotto forma di "fried egg bodies", corpi multivescicolari, o misto di corpi lamellari alterati e corpi lamellari normali. Nessuno dei controlli analizzati presentava simili anomalie. È ormai noto che una simile alterazione dei corpi lamellari rappresenta un marker specifico o sensibile del deficit di surfattante congenito di cause genetiche (Shulenin 2004, Edwards 2005, Brash 2006). Nella nostra serie di casi, si evidenziava una correlazione tra la severità del quadro clinico e il numero e l'apparenza dei corpi lamellari: gli pneumociti dei pazienti omozigoti o doppio-eterozigoti contenevano esclusivamente "fried egg bodies", in numero complessivo tanto minore quanto era severo il deficit di ABCA3 (deficit totale o parziale). Nei soggetti eterozigoti, si riscontrava un misto di corpi lamellari fried egg, di corpi multivescicolari e di corpi lamellari di struttura normale e talvolta di dimensioni ridotte. In questi casi, lo studio ultrastrutturale è stato determinante nel diagnosticare un deficit di surfattante, dato che il genotipo, simile a quello del genitore portatore sano, non aveva da solo un valore diagnostico certo. I corpi multivescicolari sono considerati come una forma "immatura" di corpo lamellare, ma, quando presenti in modo esclusivo, sono associati a deficit della SP-B. Nei nostri pazienti, sono stati sequenziati i geni *SFTP-B* e *SFTPC*, senza tuttavia mostrare mutazioni significative. È possibile che l'ABCA3 abbia anche un ruolo nel metabolismo dell'SP-B e che

alcune mutazioni specifiche sull'*ABCA3* interferiscano, attraverso meccanismi sconosciuti, sulla espressione e le funzioni di questa proteina. Questa affermazione è supportata anche dal caso 5 della nostra serie, nel quale sono state riscontrate anomalie del processamento post-trascrizionale della SP-B.

8 dei 9 pazienti da noi selezionati possedevano mutazioni sul gene *ABCA3*, questi dati sostengono l'ipotesi che mutazioni su questo gene sono da considerarsi la causa maggiore di URDS, in accordo con i risultati presenti in letteratura (Deutsch 2007).

I pazienti con URDS presentavano tutti una doppia mutazione del gene *ABCA3*. Nei pazienti 1 e 6 il frameshift in omozigosi portava al deficit totale della proteina. I genitori portatori della stessa mutazione in eterozigosi non presentavano alcuna alterazione a livello respiratorio, in accordo con l'ipotesi (Brasch 2006) che una aplo-insufficienza di *ABCA3* non determina effetti evidenti a livello del fenotipo. I pazienti 2, 3, 4 erano portatori di due mutazioni eterozigoti collocate su alleli diversi. Lo studio dei pedigree familiari del paziente 4 ha evidenziato in uno dei genitori eterozigote e in un figlio con genotipo identico, una lieve alterazione della capacità di scambio gassoso che si presenta con una costante di scambio gassoso (kCO) lievemente inferiore rispetto ai valori normali. Quest'osservazione suggerisce che ciascuna mutazione può tradursi

in modo diverso, alcune possono alterare l'omeostasi alveolare, in modo non grave, anche se presenti in eterozigosi, attraverso meccanismi ancora non conosciuti.

I pazienti 5, 7 e 8 affetti da PILD, erano portatori di un'unica mutazione esonica, ma comunque mostravano un fenotipo clinico ed ultrastrutturale patologico. In letteratura sono presenti altri casi di eterozigoti per mutazioni sull'*ABCA3* con problemi respiratori evidenti (Yokota 2007, Bullard 2005). Una possibile spiegazione per l'eterogeneità di questi eventi è ricercabile nella differente localizzazione delle mutazioni. Mutazioni diverse presenti in siti diversi sul gene, potrebbero produrre diversi effetti sul fenotipo. Altri fattori genetici, mutazioni su altri siti dei geni in questione, non analizzati con il nostro sistema di sequenziamento (regioni introniche, promotore, siti UTR) o mutazioni su altri geni non ancora conosciuti o non strettamente associati al deficit di surfattante, potrebbero intervenire in aggiunta all'effetto dell'unica mutazione riscontrata. Anche alterazioni epigenetiche e fattori ambientali potrebbero influenzare il decorso della patologia. È stato inoltre dimostrato che la presenza di polimorfismi sulle proteine del surfattante e sull'*ABCA3*, come riscontrato in alcuni pazienti di questa serie, rappresenta un fattore che può determinare un aumento di rischio di malattie polmonari in particolari classi (prematuro) (Floros 1995, Haataja 2001, Wang 2003, Lahti 2004, Garmani 2008).

Il meccanismo attraverso il quale mutazioni sull'*ABCA3* determinano il fenotipo osservato non è completamente noto. Alla luce dei risultati ottenuti con i saggi di espressione genica e proteica è lecito affermare che diverse alterazioni dell'*ABCA3* hanno un effetto diverso sul fenotipo. Nei pazienti 1 e 6 il frameshift, che esclude dalla proteina la parte C-terminale contenente uno dei due siti attivi dell'*ABCA3*, determina un deficit totale della proteina (figura 12-13). Nel paziente 6 è stato possibile effettuare l'analisi quantitativa dell'espressione dell'*ABCA3* da cui si deduce che il gene è overespresso, ma sembra che la proteina non venga sintetizzata, si potrebbe ipotizzare per questo caso un meccanismo compensatorio della trascrizione. Nel paziente 2, portatore di due mutazioni in eterozigosi, era evidente una overespressione dell'*ABCA3* che però non era localizzata, come nel controllo, nella zona marginale della cellula (figura 12), ma era diffusa in altre zone. Si può ipotizzare che l'*ABCA3* rimanga nel RER e che quindi esista un problema di localizzazione cellulare della proteina. In questo paziente una delle due mutazioni è localizzata in un sito attivo e potrebbe interferire con la funzionalità della proteina, l'altra è localizzata nel loop extracellulare, una regione con funzione ancora non conosciuta, presumibilmente importante per il processamento e il trasporto intracellulare della proteina. Il paziente 3 mostrava un'espressione dell'*ABCA3* uguale a quella del controllo (figura 12), in questo caso il quadro patologico si potrebbe spiegare ipotizzando che la proteina prodotta non fosse attiva, e l'alterazione della funzionalità potrebbe

essere dovuta alla mutazione presente sul secondo sito attivo di legame con l'ATP. Il paziente 4 presenta un'espressione diminuita dell'ABCA3 (figure 13-15). Entrambe le mutazioni, in questo caso, sono localizzate sul primo loop extracellulare. La maggior parte delle mutazioni individuate in questo studio e anche in altri lavori pubblicati, sono localizzate in questa zona. Non è ad oggi conosciuta la funzione di questo dominio, ma è noto che è una regione molto conservata tra le proteine ABCA e suscettibile alle alterazioni. Nel gene *ABCA1* mutazioni localizzate in questa zona destabilizzano la proteina alterandone la struttura, interferendo con il traffico dei fosfolipidi (Arowu 2003). Un fenotipo molto particolare è rappresentato dal paziente 5 in cui sul gene *ABCA3* è presente solo una mutazione esonica. L'espressione dell'ABCA3 in questo paziente è inferiore rispetto al controllo e inoltre la SP-B presenta una evidente alterazione di localizzazione. La fase di processamento della pro-SP-B ha un'importanza notevole nel guidare la SP-B matura nella giusta sede. Gli enzimi responsabili del processamento della proteina sono la Napsina e la Catepsina. Ipotizzando un problema inerente al processamento della proteina, è stata effettuata in questo caso l'analisi di espressione dei due enzimi, dal risultato si deduce che l'espressione dei due enzimi è paragonabile a quella del controllo sano (figura 14). Si può pensare che difetti dell'ABCA3 possano determinare alterazioni sulla localizzazione della SP-B. Il legame tra queste due proteine è stato più volte dimostrato, ma il meccanismo con cui interagiscono non è completamente noto (Bullard 2005,

Brasch 2006, Cheong 2007). Nel paziente 9, che sembra avere un quadro ultrastrutturale di deficit di surfattante associabile a difetti dell'ABCA3, non sono state riscontrate mutazioni sul gene. Uno studio di altre regioni del gene non ancora analizzate o l'analisi di altri geni presumibilmente collegati all'ABCA3 potrebbe portarci a spiegare il deficit di surfattante di cui era affetto il paziente in esame.

Dai risultati di questo studio è evidente l'importanza dell'ABCA3 nell'omeostasi del surfattante. Gli effetti delle mutazioni sono altamente eterogenei e dipendono dal sito in cui la mutazione è collocata. Le mutazioni portano sempre ad un'alterazione nella struttura di tutti o di alcuni corpi lamellari, confermando la funzione della proteina nella biosintesi di questi organelli. La combinazione dell'analisi ultrastrutturale al microscopio elettronico con lo studio genetico mediante sequenziamento rappresenta un passo fondamentale nell'elaborazione di una diagnosi precisa per queste malattie polmonari.

Nella maggioranza dei casi di deficit delle proteine del surfattante, l'unica terapia attualmente efficace consiste nel trapianto del polmone. L'identificazione precoce e precisa di una causa genetica nei casi di sindromi respiratorie apparentemente idiopatiche del neonato o del lattante permette di elaborare una diagnosi, di stimare la prognosi e porre l'eventuale indicazione al trapianto. Ci auspichiamo che questo studio abbia contribuito a migliorare le

conoscenze nella patofisiologia estremamente complessa di queste malattie rare, ma ancora sconosciute e sottostimate. L'elaborazione di diagnosi sempre più accurate e veloci è un elemento di grande valore nell'orientamento delle cure nei casi estremi e permette l'attuazione di terapie di supporto efficaci nell'eventualità della scelta della via del trapianto polmonare. Il trapianto polmonare ha offerto una nuova vita a numerosi bambini affetti da malattie polmonari genetiche, ma con un costo elevato in termini di qualità di vita, di morbilità, e talvolta anche di mortalità, "sostituendo una malattia con un'altra". Nuovi approcci terapeutici, come la terapia genica o l'utilizzo di cellule staminali, ancora agli esordi nelle applicazioni cliniche, sono portatori di immense promesse per il trattamento delle malattie genetiche del polmone.

5 BIBLIOGRAFIA

Amin, R.S., Wert, S.E., Baughman, R.P., Tomashefski, J.F., Jr, Noguee, L.M., Brody, A.S., Hull, W.M. and Whitsett, J.A. (2001) Surfactant protein deficiency in familial interstitial lung disease. *J. Pediatr.*, **139**, 85-92

Annilo, T., Z. Q. Chen, S. Shulenin & M. Dean: Evolutionary analysis of a cluster of ATP-binding cassette (ABC) genes. *Mamm Genome*, 14, 7-20 (2003)

Ballard PL, Noguee LM, Beers MF, Ballard RA, Planer BC, Polk L, deMello DE, Moxley MA, Longmore WJ. Partial deficiency of surfactant protein B in an infant with chronic lung disease. *Pediatrics*. 1995 Dec;96(6):1046-52.

Baraldi E, Filippone M. Chronic lung disease after premature birth. *N Engl J Med*. 2007 Nov 8;357(19):1946-55. Review. No abstract available.

Batenburg JJ & Haagsman HP (1998) The lipids of pulmonary surfactant: dynamics and interactions with proteins. *Prog Lipid Res* 37: 235-276.

Bodzioch, M., E. Orso, J. Klucken, T. Langmann, A. Bottcher, W. Diederich, W. Drobnik, S. Barlage, C. Buchler, M. Porsch-Ozcurumez, W. E. Kaminski, H. W. Hahmann, K. Oette, G. Rothe, C. Aslanidis, K. J. Lackner & G. Schmitz: The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat Genet*, 22, 347-51 (1999)

Brasch F, Schimanski S, Mühlfeld C, Barlage S, Langmann T, Aslanidis C, Boettcher A, Dada A, Schrotten H, Mildenerger E, Prueter E, Ballmann M, Ochs M, Johnen G, Griesse M, Schmitz G.

Alteration of the pulmonary surfactant system in full-term infants with hereditary ABCA3 deficiency. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006 Sep 1;174(5):571-80. Epub 2006 May 25.

Brasch F, Ten Brinke A, Johnen G, Ochs M, Kapp N, Müller KM, Beers MF, Fehrenbach H, Richter J, Batenburg JJ, Bühling F. Involvement of cathepsin H in the processing of the hydrophobic surfactant-associated protein C in type II pneumocytes. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002 Jun;26(6):659-70.

Bruder E, Hofmeister J, Aslanidis C, Hammer J, Bubendorf L, Schmitz G, Rufle A, Bühler C. Ultrastructural and molecular analysis in fatal neonatal interstitial pneumonia caused by a novel ABCA3 mutation. *Mod Pathol.* 2007 Oct;20(10):1009-18. Epub 2007 Jul 27.

Bullard, J. E., Wert, S. E., Whitsett, J. A., Dean, M., and Nogee, L. M. (2005) *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **172**, 1026–1031 Rooney SA, Young SL, Mendelson CR. Molecular and cellular processing of lung surfactant. *FASEB J.* 1994;8:957–967.

Cheong N, Zhang H, Madesh M, Zhao M, Yu K, Dodia C, Fisher AB, Savani RC, Shuman H. ABCA3 is critical for lamellar body biogenesis in vivo. *J Biol Chem.* 2007 Aug 17;282(33):23811-7. Epub 2007 May 31.

Cheong, N., M. Madesh, L. W. Gonzales, M. Zhao, K. Yu, P. L. Ballard & H. Shuman: Functional and trafficking defects in ATP binding cassette a3 mutants associated with respiratory distress syndrome. *J Biol Chem*, 281, 9791-800 (2006)

Clark JC, Wert SE, Bachurski CJ, Stahlman MT, Stripp BR, Weaver TE, Whitsett JA. Targeted disruption of the surfactant protein B gene disrupts surfactant homeostasis, causing respiratory failure in newborn mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Aug 15;92(17):7794-8.

Conkright JJ, Bridges JP, Na CL, Voorhout WF, Trapnell B, Glasser SW & Weaver TE (2001) Secretion of surfactant protein C, an integral

membrane protein, requires the N-terminal propeptide. *J Biol Chem* 276: 14658-14664.

Crouch E & Wright JR (2001) Surfactant proteins a and d and pulmonary host defense. *Annu Rev Physiol* 63: 521-554.

Crowley P, Chalmers I & Keirse MJ (1990) The effects of corticosteroid administration before preterm delivery: an overview of the evidence from controlled trials. *Br J Obstet Gynaecol* 97: 11-25.

Dean, M. & T. Annilo: Evolution of the ATP-Binding Cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 6, 123-142 (2005)

Deutsch GH, Young LR, Deterding RR, Fan LL, Dell SD, Bean JA, Brody AS, Nogee LM, Trapnell BC, Langston C; Pathology Cooperative Group, Albright EA, Askin FB, Baker P, Chou PM, Cool CM, Coventry SC, Cutz E, Davis MM, Dishop MK, Galambos C, Patterson K, Travis WD, Wert SE, White FV; ChILD Research Cooperative. Diffuse lung disease in young children: application of a novel classification scheme. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007 Dec 1;176(11):1120-8. Epub 2007 Sep 20.

Doan ML, Guillerman RP, Dishop MK, Nogee LM, Langston C, Mallory GB, Sockrider MM, Fan LL. Clinical, radiologic, and pathologic features of ABCA3 mutations in children. *Thorax*. 2007 Nov 16

Edwards V, Cutz E, Viero S, Moore AM, Nogee L. Ultrastructure of lamellar bodies in congenital surfactant deficiency. *Ultrastruct Pathol*. 2005 Nov-Dec;29(6):503-9.

Fitzgerald ML, Xavier R, Haley KJ, Welti R, Goss JL, Brown CE, Zhuang DZ, Bell SA, Lu N, McKee M, Seed B, Freeman MW. ABCA3 inactivation in mice causes respiratory failure, loss of pulmonary surfactant, and depletion of lung phosphatidylglycerol. *J Lipid Res*. 2007 Mar;48(3):621-32. Epub 2006 Dec 1.

Floros J & Hoover RR (1998) Genetics of the hydrophilic surfactant proteins A and D. *Biochim Biophys Acta* 1408: 312-322.

Floros J, Fan R, DiAngelo S, Guo X, Wert J & Luo J (2001) Surfactant protein (SP) B associations and interactions with SP-A in white and black subjects with respiratory distress syndrome. *Pediatr Int* 43: 567-576.

Floros J, Lin HM, Garcia A, Salazar MA, Guo X, DiAngelo S, Montano M, Luo J, Pardo A & Selman M (2000) Surfactant protein genetic marker alleles identify a subgroup of tuberculosis in a Mexican population. *J Infect Dis* 182: 1473-1478.

Floros J, Veletza SV, Kotikalapudi P, Krizkova L, Karinch AM, Friedman C, Buchter S & Marks K (1995) Dinucleotide repeats in the human surfactant protein-B gene and respiratory-distress syndrome. *Biochem J* 305 (Pt 2): 583-590.

Garmany TH, Wambach JA, Heins HB, Watkins-Torry JM, Wegner DJ, Bennet K, An P, Land G, Saugstad OD, Henderson H, Noguee LM, Cole FS, Hamvas A. Population and Disease-based Prevalence of the Common Mutations Associated with Surfactant Deficiency. *Pediatr Res*. 2008 Feb 27;

Glasser SW, Burhans MS, Korfhagen TR, Na CL, Sly PD, Ross GF, Ikegami M, Whitsett JA. Altered stability of pulmonary surfactant in SP-C-deficient mice *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 May 22;98(11):6366-71. Epub 2001 May 8

Glasser SW, Korfhagen TR, Weaver TE, Clark JC, Pilot-Matias T, Meuth J, Fox JL & Whitsett JA (1988) cDNA, deduced polypeptide structure and chromosomal assignment of human pulmonary surfactant proteolipid, SPL(pVal). *J Biol Chem* 263: 9-12.

Haagsman HP & Diemel RV (2001) Surfactant-associated proteins: functions and structural variation. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 129: 91-108.

Haataja R, Marttila R, Uimari P, Löfgren J, Rämet M & Hallman M (2001) Respiratory distress syndrome: evaluation of genetic susceptibility and protection by transmission disequilibrium test. *Hum Genet* 109: 351-355.

Haataja R, Rämet M, Marttila R & Hallman M (2000) Surfactant proteins A and B as interactive genetic determinants of neonatal respiratory distress syndrome. *Hum Mol Genet* 9: 2751-2760.

Hallman M, Arjomaa P, Hoppu K, Teramo K & Akino T (1989) Surfactant proteins in the diagnosis of fetal lung maturity. II. The 35 kd protein and phospholipids in complicated pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 161: 965-969.

Hallman M, Haataja R. Surfactant protein polymorphisms and neonatal lung disease. *Semin Perinatol.* 2006 Dec;30(6):350-61. Review.

Hallman M, Merritt TA & Bry K (1994) The fate of exogenous surfactant in neonates with respiratory distress syndrome. *Clin Pharmacokinet* 26: 215-232.

Hamvas, A., Noguee, L.M., Mallory, G.B., Jr, Spray, T.L., Huddleston, C.B., August, A., Dehner, L.P., deMello, D.E., Moxley, M., Nelson, R. *et al.* (1997) Lung transplantation for treatment of infants with surfactant protein B deficiency. *J. Pediatr.*, **130**, 231-239.

Hartshorn KL, Reid KB, White MR, Jensenius JC, Morris SM, Tauber AI & Crouch E (1996) Neutrophil deactivation by influenza A viruses: mechanisms of protection after viral opsonization with collectins and hemagglutination-inhibiting antibodies. *Blood* 87: 3450-3461.

Hawgood S & Clements JA (1990) Pulmonary surfactant and its apoproteins. *J Clin Invest* 86: 1-6.

Hawgood S & Poulain FR (2001) The pulmonary collectins and surfactant metabolism. *Annu Rev Physiol* 63: 495-519.

Higgins, C. F.: ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol*, 8, 67-113 (1992)

Horowitz AD, Elledge B, Whitsett JA & Baatz JE (1992) Effects of lung surfactant proteolipid SPC on the organization of model membrane lipids: a fluorescence study. *Biochim Biophys Acta* 1107: 44-54.

Hulseley TC, Alexander GR, Robillard PY, Annibale DJ, Keenan A. Hyaline membrane disease: the role of ethnicity and maternal risk characteristics. *Am J Obstet Gynecol*. 1993 Feb;168(2):572-6.

Ikegami M, Lewis JF, Tabor B, Rider ED & Jobe AH (1992) Surfactant protein A metabolism in preterm ventilated lambs. *Am J Physiol* 262: L765-L772.

Ikegami M, Whitsett JA, Jobe A, Ross G, Fisher J & Korfhagen T (2000) Surfactant metabolism in SP-D gene-targeted mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: L468-L476.

Johansson J, Szyperski T & Wuthrich K (1995) Pulmonary surfactant-associated polypeptide SP-C in lipid micelles: CD studies of intact SP-C and NMR secondary structure determination of depalmitoyl-SP-C(1-17). *FEBS Lett* 362: 261-265.

Kala P, Ten Have T, Nielsen H, Dunn M & Floros J (1998) Association of pulmonary surfactant protein A (SP-A) gene and respiratory distress syndrome: interaction with SP-B. *Pediatr Res* 43: 169-177.

Kaminski, W. E., A. Piehler & J. J. Wenzel: ABC A-subfamily transporters: Structure, function and disease. *Biochim Biophys Acta*, 1762, 510-24 (2006)

Karjalainen MK, Haataja R, Hallman M. Haplotype analysis of ABCA3: association with respiratory distress in very premature infants. *Ann Med*. 2008;40(1):56-65.

Keller A, Steinhilber W, Schafer KP & Voss T (1992) The C-terminal domain of the pulmonary surfactant protein C precursor contains signals for intracellular targeting. *Am J Respir Cell Mol Biol* 6: 601-608.

Khoury MJ, Marks JS, Mc Carthy BJ, Zaro SM. Factors affecting the sex differential in neonatal mortality: tharole in respiratory distress syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 1985; 151: 777-82.

Klugbauer, N. & F. Hofmann: Primary structure of a novel ABC transporter with a chromosomal localization on the band encoding the multidrug resistance-associated protein. *FEBS Lett*, 391, 61-5 (1996)

Korfhagen TR, LeVine AM & Whitsett JA (1998a) Surfactant protein A (SP-A) gene targeted mice. *Biochim Biophys Acta* 1408: 296-302.

Korfhagen TR, Sheftelyevich V, Burhans MS, Bruno MD, Ross GF, Wert SE, Stahlman MT, Jobe AH, Ikegami M, Whitsett JA & Fisher JH (1998a) Surfactant protein-D regulates surfactant phospholipid homeostasis in vivo. *J Biol Chem* 273: 28438-28443.

Kunig AM, Parker TA, Nogee LM, Abman SH, Kinsella JP. ABCA3 deficiency presenting as persistent pulmonary hypertension of the newborn. *J Pediatr*. 2007 Sep;151(3):322-4.

Lahti M, Marttila R, Hallman M. Surfactant protein C gene variation in the Finnish population - association with perinatal respiratory disease. *Eur J Hum Genet*. 2004 Apr;12(4):312-20.

Lefevre, C., S. Audebert, F. Jobard, B. Bouadjar, H. Lakhdar, O. Boughdene-Stambouli, C. Blanchet-Bardon, R. Heilig, M. Foglio, J. Weissenbach, M. Lathrop, J. F. Prud'homme & J. Fischer: Mutations in the transporter ABCA12 are associated with lamellar ichthyosis type 2. *Hum Mol Genet*, 12, 2369-78 (2003)

Lin S, Phillips KS, Wilder MR & Weaver TE (1996) Structural requirements for intracellular transport of pulmonary surfactant protein B (SP-B). *Biochim Biophys Acta* 1312: 177-185.

Linder ME, Middleton P, Hepler JR, Taussig R, Gilman AG & Mumby SM (1993) Lipid modifications of G proteins: alpha subunits are palmitoylated. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 3675-3679.

McNeely TB & Coonrod JD (1993) Comparison of the opsonic activity of human surfactant protein A for *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae* with rabbit and human macrophages. *J Infect Dis* 167: 91-97.

Mulugeta, S., J. M. Gray, K. L. Notarfrancesco, L. W. Gonzales, M. Koval, S. I. Feinstein, P. L. Ballard, A. B. Fisher & H. Shuman: Identification of LBM180, a lamellar body limiting membrane protein of alveolar type II cells, as the ABC transporter protein ABCA3. *J Biol Chem*, 277, 22147-55 (2002)

Nagata, K., A. Yamamoto, N. Ban, A. R. Tanaka, M. Matsuo, N. Kioka, N. Inagaki & K. Ueda: Human ABCA3, a product of a responsible gene for abca3 for fatal surfactant deficiency in newborns, exhibits unique ATP hydrolysis activity and generates intracellular multilamellar vesicles. *Biochem Biophys Res Commun*, 324, 262-8 (2004)

Nogee LM (2004) Alterations in SP-B and SP-C expression in neonatal lung disease. *Annu Rev Physiol* 66: 601-623.

Nogee LM, de Mello DE, Dehner LP, Colten HR. Brief report: deficiency of pulmonary surfactant protein B in congenital alveolar proteinosis. *N Engl J Med*. 1993;328:406-410.

Nogee LM, Garnier G, Dietz HC, Singer L, Murphy AM, deMello DE, Colten HR. A mutation in the surfactant protein B gene responsible for fatal neonatal respiratory disease in multiple kindreds. *J Clin Invest*. 1994 Apr;93(4):1860-3.

Nogee, L.M. (2004) Alterations in SP-B and SP-C expression in neonatal lung disease. *Annu. Rev. Physiol.*, **66**, 601-623.

Nogee, L.M., Garnier, G., Dietz, H.C., Singer, L., Murphy, A.M., deMello, D.E. and Colten, H.R. (1994) A mutation in the surfactant protein B gene responsible for fatal neonatal respiratory disease in multiple kindreds. *J. Clin. Invest.*, **93**, 1860-1863.

Phizackerley PJ, Town MH & Newman GE (1979) Hydrophobic proteins of lamellated osmiophilic bodies isolated from pig lung. *Biochem J* 183: 731-736.

Piebler, A., W. E. Kaminski, J. J. Wenzel, T. Langmann & G. Schmitz: Molecular structure of a novel cholesterol-responsive A subclass ABC transporter, ABCA9. *Biochem Biophys Res Commun*, 295, 408-16 (2002)

Pilot-Matias TJ, Kister SE, Fox JL, Kropp K, Glasser SW & Whitsett JA (1989) Structure and organization of the gene encoding human pulmonary surfactant proteolipid SP-B. *DNA* 8: 75-86.

Rämet M, Haataja R, Marttila R, Floros J & Hallman M (2000) Association between the surfactant protein A (SP-A) gene locus and respiratory-distress syndrome in the Finnish population. *Am J Hum Genet* 66: 1569-1579.

Rozet, J. M., S. Gerber, E. Souied, I. Perrault, S. Chatelin, I. Ghazi, C. Leowski, J. L. Dufier, A. Munnich & J. Kaplan: Spectrum of ABCR gene mutations in autosomal recessive macular dystrophies. *Eur J Hum Genet*, 6, 291-5 (1998)

Saugstad OD, Hansen TW, Rønnestad A, Nakstad B, Tølløfsrud PA, Reinholt F, Hamvas A, Coles FS, Dean M, Wert SE, Whitsett JA, Nogee LM. Novel mutations in the gene encoding ATP binding cassette protein member A3 (ABCA3) resulting in fatal neonatal lung disease. *Acta Paediatr.* 2007 Feb;96(2):185-90.

Schmitz, G. & W. E. Kaminski: Phospholipid transporters ABCA1 and ABCA7. In: Membrane Transporter Diseases. Eds: S. Broer & C. A. Wagner. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York (2004)

Selman M, Lin HM, Montano M, Jenkins AL, Estrada A, Lin Z, Wang G, DiAngelo SL, Guo X, Umstead TM, Lang CM, Pardo A, Phelps DS & Floros J (2003) Surfactant protein A and B genetic variants predispose to idiopathic pulmonary fibrosis. *Hum Genet* 113: 542-550.

Shulenin S, Noguee LM, Annilo T, Wert SE, Whitsett JA, Dean M. ABCA3 gene mutations in newborns with fatal surfactant deficiency. *N Engl J Med*. 2004 Mar 25;350(13):1296-303.

Somaschini M, Noguee LM, Sassi I, Danhaive O, Presi S, Boldrini R, Montrasio C, Ferrari M, Wert SE, Carrera P. Unexplained neonatal respiratory distress due to congenital surfactant deficiency. *J Pediatr*. 2007 Jun;150(6):649-53, 653.e1.

Stahlman MT, Besnard V, Wert SE, Weaver TE, Dingle S, Xu Y, von Zychlin K, Olson SJ, Whitsett JA. Expression of ABCA3 in developing lung and other tissues. *J Histochem Cytochem*. 2007 Jan;55(1):71-83. Epub 2006 Sep 18.

Stahlman MT, Gray MP, Falconieri MW, Whitsett JA, Weaver TE. Lamellar body formation in normal and surfactant protein B-deficient fetal mice. *Lab Invest*. 2000;80:395-403.

Thomas AQ, Lane K, Phillips J 3rd, Prince M, Markin C, Speer M, Schwartz DA, Gaddipati R, Marney A, Johnson J, Roberts R, Haines J, Stahlman M, Loyd JE. Heterozygosity for a surfactant protein C gene mutation associated with usual interstitial pneumonitis and cellular nonspecific interstitial pneumonitis in one kindred. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002 May 1;165(9):1322-8.

Ueno T, Linder S, Na CL, Rice WR, Johansson J, Weaver TE. Processing of pulmonary surfactant protein B by napsin and

cathepsin H. *J Biol Chem.* 2004 Apr 16;279(16):16178-84. Epub 2004 Feb 6.

Vamvakopoulos NC, Modi WS & Floros J (1995) Mapping the human pulmonary surfactant-associated protein B gene (SFTP3) to chromosome 2p12-->p11.2. *Cytogenet Cell Genet* 68: 8- 10.

van Sonderen L, Halsema EF, Spiering EJ, Koppe JG. Genetic influences in respiratory distress syndrome: a twin study. *Semin Perinatol.* 2002 Dec;26(6):447-9.

Voorhout WF, Veenendaal T, Kuroki Y, Ogasawara Y, van Golde LM & Geuze HJ (1992) Immunocytochemical localization of surfactant protein D (SP-D) in type II cells, Clara cells, and alveolar macrophages of rat lung. *J Histochem Cytochem* 40: 1589-1597.

Voss T, Melchers K, Scheirle G & Schafer KP (1991) Structural comparison of recombinant pulmonary surfactant protein SP-A derived from two human coding sequences: implications for the chain composition of natural human SP-A. *Am J Respir Cell Mol Biol* 4: 88-94.

Warr RG, Hawgood S, Buckley DI, Crisp TM, Schilling J, Benson BJ, Ballard PL, Clements JA & White RT (1987) Low molecular weight human pulmonary surfactant protein (SP5): isolation, characterization, and cDNA and amino acid sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 7915-7919.

Weaver TE & Conkright JJ (2001) Function of surfactant proteins B and C. *Annu Rev Physiol* 63: 555-578.

Weaver TE, Na CL, Stahlman M. Biogenesis of lamellar bodies, lysosome-related organelles involved in storage and secretion of pulmonary surfactant. *Semin Cell Dev Biol.* 2002;13:263-270.

Wenzel JJ, Piehler A, Kaminski WE. ABC A-subclass proteins: gatekeepers of cellular phospho- and sphingolipid transport. *Front Biosci.* 2007 May 1;12:3177-93.

Wright JR (1990) Clearance and recycling of pulmonary surfactant. *Am J Physiol* 259: L1-12.

Yamano, G., H. Funahashi, O. Kawanami, L. X. Zhao, N. Ban, Y. Uchida, T. Morohoshi, J. Ogawa, S. Shioda & N. Inagaki: ABCA3 is a lamellar body membrane protein in human lung alveolar type II cells. *FEBS Lett*, 508, 221-5 (2001)

Yang L, Naltner A, Kreiner A, Yan D, Cowen A, Du H & Yan C (2003) An enhancer region determines hSP-B gene expression in bronchiolar and ATII epithelial cells in transgenic mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284: L481-L488.

Yokota T, Matsumura Y, Ban N, Matsubayashi T, Inagaki N. Heterozygous ABCA3 mutation associated with non-fatal evolution of respiratory distress. *Eur J Pediatr*. 2007 Jul 6;

TITOLI

1. Danhaive O, Peca D, Boldrini R. ABCA3 mutation and pulmonary hypertension: a link to alveolar capillary dysplasia? *J Pediatr*, in press
2. Danhaive O, Dotta A, Turchetta A, Petrini S, Peca D, Savignoni F, Morini F, Corchia C. Lung function in heterozygote carriers of ABCA3 mutations. European Academy of Pediatrics, Barcelona, Spain, 2006. *Eur J Pediatr* 2006;165S1:32
3. Danhaive O, Peca D, Petrini S, Boldrini R, Rechichi J, Savignoni F, Gallo A, Corchia C. Diagnostic criteria and molecular mechanisms of ABCA3 deficiency. European Academy of Pediatrics, Barcelona, Spain, 2006. *Eur J Pediatr* 2006;165S1:343
4. Danhaive O, Peca D, Petrini S, Dotta A, Savignoni F, nahom A, Boldrini R, Corchia C. Clinical, morphological and molecular features of genetic surfactant deficiencies. 48th Annual Scientific Meeting of the European Society for Paediatric Research, Prague, Czech Republic, 2007. *Acta Paediatrica* 2007;96(s456):246-259.
5. Danhaive O, Peca D, Petrini S, Dotta A, Corchia A, Boldrini R. Clinical, morphological and molecular features of congenital surfactant deficiencies. 22nd international workshop in surfactant replacement, Ancona, Italy, 2007

