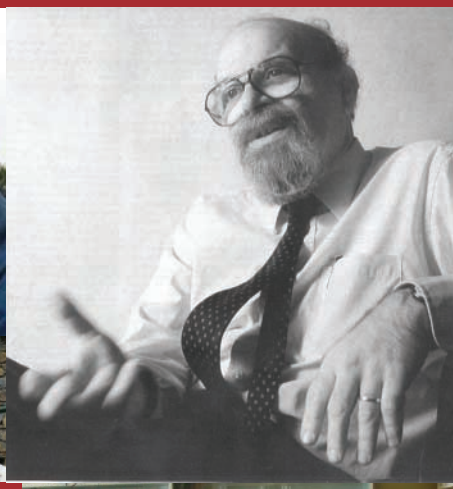
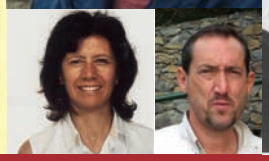
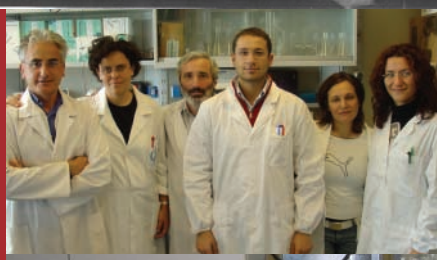
fondazione per la ricerca sulla fibrosi cistica
italian cystic fibrosis research foundation





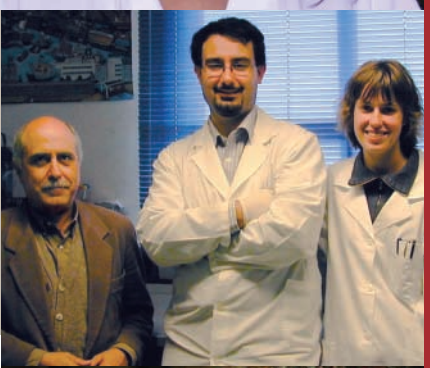
3a CONVENTION D'AUTUNNO DEI RICERCATORI ITALIANI PER LA FIBROSI CISTICA



Verona 18 - 19 novembre 2005

Centro Culturale "G. Marani"
Azienda Ospedaliera di Verona

Presentazione e discussione dello stato di avanzamento dei progetti di ricerca finanziati dalla Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica nel periodo 2002 - 2005



IIIª convention d'autunno dei ricercatori italiani per la fibrosi cistica

Verona 18 – 19 novembre 2005
Centro Culturale "G. Marani" – Azienda Ospedaliera di Verona

Presentazione e discussione dello stato di avanzamento
dei progetti di ricerca
finanziati dalla Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica
nel periodo 2002 – 2005

- **Genetica molecolare**
- **Fisiopatologia CFTR e terapie del difetto di base**
- **Ricerca Clinica ed epidemiologica**
- **Microbiologia e infezione**
- **Infiammazione**

Edizione a cura della Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica
Verona, novembre 2005

Indice dei progetti presentati

LINEE DI RICERCA E GRUPPI DI RICERCA *Pag. 5*

1. GENETICA MOLECOLARE

• G. Novelli, PF. Pignatti, F. Salvatore
"Identificazione di geni modificatori mediante studi di famiglie e analisi 'microarray' " (prog. FFC #4/2003) *Pag. 9*

• F. Pagani
- "Patologia molecolare del 'CFTR pre-mRNA splicing': aspetti diagnostici e terapeutici" (prog. FFC #5/2003)
- "Varianti genomiche che modificano lo splicing: aspetti diagnostici e terapeutici nella fibrosi cistica" (prog. FFC #15/2005) *Pag.10*

• G. Castaldo, C. Castellani, C. Bombieri, F. Sangiuolo
"Screening delle mutazioni di riarrangiamento genomico CFTR in pazienti CF italiani" (prog. FFC #5/2004) *Pag.10*

• M. C. Rosatelli, F. Bricarelli Dagna, A. Bonizzato, M. Seia
"Fibrosi cistica: caratterizzazione delle mutazioni non riconosciute in pazienti italiani e valutazione del loro ruolo patogeno" (prog. FFC #8/2004) *Pag.12*

• R. Strom, S. Quattrucci, F. Mazzilli
"Selezione e caratterizzazione funzionale delle variazioni di sequenza intronica CFTR potenzialmente responsabili di forme atipiche di fibrosi cistica: modulazione dello splicing alternativo di CFTR" (prog. FFC #9/2004) *Pag.13*

• A. Lupo, PF. Pignatti
"Le persone con iperossaluria e ipocitraturia che formano calcoli renali calcarei rappresentano un nuovo disordine correlato alla Fibrosi Cistica?" (prog. FFC #6/2004) *Pag.14*

• R. Gambari
"Strategie innovative per la diagnosi e la terapia della Fibrosi cistica" (prog. FFC #15/2004) *Pag.15*

• L. Cremonesi, G. Restagno, M. Seia, C. Castellani
"Nuovi approcci per la diagnosi prenatale non invasiva di fibrosi cistica mediante analisi del DNA fetale nel plasma materno" (prog. FFC #14/2005) *Pag.16*

2. FISIOPATOLOGIA CFTR E TERAPIE DEL DIFETTO DI BASE

• V. Casavola e M. Zaccolo
"Regolazione del canale CFTR mediante interazione proteina – proteina" (prog. FFC #1/2003)
"Ruolo della proteina di interazione NHERF nella regolazione dell'attività e della espressione della proteina – canale" CFTR (prog. FFC#1/2005) *Pag.17*

• F. Osculati e A. Sbarbati
"Meccanismi di regolazione del canale CFTR e dei fenomeni secretori ad esso correlati" (prog. FFC #2/2004) *Pag.18*

• L. Galietta, M. Mazzei, M. Conese
"Screening di farmaci già approvati per uso umano al fine di identificare nuovi mezzi farmacologici per la fibrosi cistica" (prog. FFC #3/2003) *Pag.18*

• O. Moran, O. Zegarra, V. Martorana
"Attivatori del trasporto ionico: identificazione e modellazione molecolare dei siti leganti" (prog. FFC #2/2003) *Pag.19*

• B. M. Rotoli
"Aminoacidi naturali e sintetici quali chaperoni chimici per promuovere la conformazione di CFTR" (prog. FFC #3/2004) *Pag.20*

• M. Colombatti
"Dissezione di processi di conformazione della proteina CFTR in cellule CFTR normali e con mutazione ΔF508. Uso di tossine disarmate per colpire le molecole 'chaperones' ed assistere la conformazione e l'espressione di DF508-CFTR" (prog. FFC #1/2004) *Pag.21*

• M. Conese, E. Copreni
"Valutazione dell'efficienza, efficacia e sicurezza di vettori lentivirali nel trasferimento del gene CFTR in sistemi modello di epitelio respiratorio con fibrosi cistica" (prog, FFC #2/2002) *Pag.21*

• G. Cabrini
"Vettori lentivirali di nuova generazione per la terapia genica della fibrosi cistica: valutazione del potenziale infiammatorio" (prog. FFC #4/2005) Pag.22
• A. Tamanini
"Ruolo dei recettori di Adenovirus nell'attivazione dei percorsi della protein-chinasi attivata da mitogeni e del fattore nucleare kB nelle cellule epiteliali delle vie respiratorie umane" (prog. FFC #4/2004) Pag.23
• F. Ascenzioni, M. Conese
Valutazione di un polimero cationico, la polietilenimina, per il trasferimento di vettori genomici (minicromosomi) a epiteli respiratori in vitro e in vivo" (prog. FFC #3/2005) Pag.23
• F. Sangiuolo
"Protocolli di terapia genica del gene CFTR in cellule staminali embrionali umane utilizzando la tecnica SFHR (rimpiazzo di piccoli frammenti di DNA omologo)" (prog. FFC #5/2005) Pag.24

3. RICERCA CLINICA ED EPIDEMIOLOGICA

• M. Strazzabosco, C. Spirli
"Patogenesi e trattamento della malattia epatica in fibrosi cistica" (prog. FFC #11/2003) Pag.25
• G. Taccetti
"Eradicazione precoce di Pseudomonas aeruginosa e sua successiva colonizzazione in pazienti con fibrosi cistica" (prog. FFC #18/2004) Pag.26
• C. Colombo, A. Battezzati
"Diabete, intolleranza al glucosio e ipoglicemia in pazienti con fibrosi cistica" (prog. FFC #16/2005) Pag.27
• R. Nobili, G. Apolone, C. Braggion, N. Oprandi, R. Pescini, S. Spina, D. Fazio, M. Intermite
Validazione multicentrica di un questionario sulla qualità di vita specificamente orientato alla fibrosi cistica e centrato sullo stato di salute. (prog. FFC #17/2005) Pag.27
• G. Manno, R. Biassoni, E. Debbia, A. Sangiuolo
Tipizzazione molecolare (studio del DNA) di ceppi di Pseudomonas aeruginosa isolati da pazienti italiani FC e loro comparazione con profili presenti nel "database europeo" di ceppi clinici e ambientali. (prog. FFC #8/2005) Pag.28
• S. Campana, L. Ratclif, L. Cariani, M. Del Pezzo, V. Raia, F. Favari, A. Negri, R. Gagliardini, F. Gioffrè e D. Scuteri, E. Fiscarelli
"Stafilococco aureo multiresistente (MRSA) acquisito nella comunità o acquisito in ospedale in pazienti affetti da fibrosi cistica: studio multicentrico su sensibilità agli antibiotici, epidemiologia, storia naturale e rilevanza clinica.." (prog. FFC #6/2005) Pag.29
• A. Piazza
"Mappa delle mutazioni del gene CFTR in Italia: distribuzione regionale nel contesto europeo" (prog. FFC #7/2004) Pag.30
• A. Bossi
"Aggiornamento e controllo di qualità dei dati del Registro Italiano della fibrosi cistica: un punto di partenza per analizzare i dati clinici e divulgare i risultati" (prog. FFC #19/2004) Pag.31

4. MICROBIOLOGIA E INFEZIONE

• A. Bragonzi, G. Doering
"Regolazione genica e mutazioni adattative di Pseudomonas aeruginosa in un modello di infezione polmonare cronica per la fibrosi cistica" (prog. FFC #8/2003) Pag.32
• G. Bertoni
"Identificazione su tutto il genoma di un target di geni per disegnare antibiotici non convenzionali contro i patogeni correlati alla fibrosi cistica" (prog. FFC #10/2004) Pag.32
• V. Venturi
"Il sistema di regolazione 'Quorum sensing' nel batterio emergente Burkholderia cepacia" (prog. FFC #10/2003)
"Studio dei sistemi di "quorum sensing" di Pseudomonas aeruginosa e Burkholderia cepacia complex." (prog. FFC #9/2005) Pag.33

• A. Bevivino, F. Ascenzioni, A. Bragonzi
"Valutazione della patogenicità di ceppi ambientali e clinici di Burkholderia cepacia complex isolati ed in presenza di Pseudomonas aeruginosa" (prog. FFC #11/2004) Pag. 34 *Pag.34*
• R. Fani, G. Manno, S. Tabacchioni, G. Taccetti
"Sviluppo di un test diagnostico rapido per discriminare le specie e i genomovars di Burkholderia cepacia complex nelle analisi cliniche routinarie che interessano pazienti con fibrosi cistica" (prog. FFC #9/2003) Pag. 35 *Pag.35*
• G. Riccardi, G. Manno
"Resistenza antimicrobica in ceppi di Burkholderia cepacia complex isolati da pazienti fibrocistici: identificazione, caratterizzazione e ruolo dei trasportatori di efflusso nella resistenza intrinseca ed acquisita ai farmaci"(prog. FFC #12/2004) Pag. 36 *Pag.36*
• B. Colonna, M. Sanguinetti, M. Nicoletti, M. Casalino, E. Fiscarelli
"Stenotrophomonas maltophilia, un batterio emergente nei malati di fibrosi cistica: identificazione, caratterizzazione molecolare dei determinanti di virulenza, terapie antimicrobiche alternative, analisi proteomica e genomica comparativa." (prog. FFC #7/2005) Pag. 37 *Pag.37*

5. INFIAMMAZIONE

• F. Zazzeroni
"Infiammazione ed apoptosi nell'epitelio delle vie aeree in fibrosi cistica: ruolo di NF-kB e dei suoi geni bersaglio" (prog. FFC #17/2004) *Pag.38*
• V. Raia, G. Castaldo
"Polipi nasali di pazienti FC come modello ex vivo per studiare l'infiammazione e la sua modulazione attraverso l'inibizione del percorso di p-38 MAP-kinasi: implicazioni per la terapia"(prog. FFC #16/2004) *Pag.39*
• M. C. Dechecchi
"Interazione in vitro tra batteri patogeni della fibrosi cistica e cellule epiteliali che esprimono la proteina CFTR" (prog. FFC #14/2004) *Pag.39*
• A. Pompella
Danno infiammatorio cronico in corso di fibrosi cistica: ruoli protettivi della gamma-glutamiltransferasi e dell'acido ascorbico" (prog. FFC #11/2005) *Pag.40*
• M. Romano, L. Iapichino
"La lipoxina A4 nella fibrosi cistica: biosintesi e trasduzione del segnale." (prog. FFC #12/2005) *Pag.40*
• F. Bazzoni
"Ruolo di SOCS3 nelle cellule infiammatorie in risposta a stimoli di origine batterica" (Prog. FFC #13/2004) *Pag.41*
• P. Melotti, P. Mauri, C. Sorio
"Ruoli non battericidi dell' azitromicina: rilevanza per la terapia della fibrosi cistica" (prog. FFC #3/2002 e FFC #10/2005) *Pag.42*
• E. Giordano
"Effetto degli antibiotici macrolidi sul trasporto ionico attraverso la proteina – canale CFTR" (prog. FFC #2/2005) *Pag.43*
• O. Zegarra, G. Candiano, L. Bini,
"Proteomica del liquido di superficie delle vie aeree: implicazioni per la fibrosi cistica" (prog. FFC #7/2003) *Pag.44*
• R. Biassoni, G. Melioli, G. Candiano
"Identificazione e caratterizzazione biochimica di proteine ad attività antibatterica prodotte nel fluido che bagna la superficie delle vie aeree" (prog. FFC #13/2005) *Pag.45*

PROGETTI ADOTTATI *Pag.47*

Le linee di ricerca promosse dalla Fondazione ed i gruppi italiani di ricerca CF

Presentiamo in questa III Convention una sintesi del percorso di ricerca compiuto dalla Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica, assieme a numerosi ricercatori italiani dal 2002 ad oggi, attraverso il suo sostegno a progetti di ricerca innovativi, selezionati tramite bandi pubblici annuali. E' stata una grande sfida, dettata dalla necessità di evocare le eccellenti energie scientifiche di cui dispone il nostro Paese, per orientarle all'obiettivo ambizioso di contribuire, assieme ad iniziative analoghe di altre nazioni, ad accelerare il raggiungimento del traguardo di cure risolutive per questa malattia. Già si cominciano a registrare i primi risultati di questo grande sforzo ma solo tra un anno saremo in grado di farne un bilancio complessivo, essendo ancora in fase di lavorazione la maggior parte dei progetti selezionati.

Alla sfida hanno risposto con inatteso vigore molti ricercatori italiani. L'aggregazione di un largo interesse di ricerca CF in Italia pare a noi già un grande risultato, suscettibile di futuri sviluppi. Questi ricercatori hanno infatti individuato affinità di competenze e interessi comuni ed avviato nuove collaborazioni nel campo della fibrosi cistica, che hanno portato a preziose integrazioni di ruoli, di tecniche e metodi, espresse anche in progetti multicentrici di largo respiro scientifico. 110 sono stati i progetti presentati alla Fondazione in 4 anni: 53 di essi sono stati sinora selezionati per un finanziamento. Vi sono coinvolti più di 300 ricercatori complessivamente, distribuiti in 71 laboratori o gruppi di ricerca (si veda l'elenco che segue), con 46 responsabili di progetto e 46 partners (alcuni coinvolti contemporaneamente o in successione o come responsabili o come partners in più di un progetto). La Fondazione ha assegnato sinora 42 borse di studio o contratti di ricerca ad altrettanti giovani ricercatori impegnati nei progetti selezionati. Attualmente registriamo 26 pubblicazioni su riviste scientifiche internazionali, mentre parte dei risultati hanno avuto sinora 72 comunicazioni in congressi scientifici, di cui sono stati pubblicati gli abstracts.
La Fondazione ha investito complessivamente per tutto questo 2.350.000 euro: una quota che ha coperto peraltro mediamente solo il 40% dei costi di quei progetti, avendo dovuto fare purtroppo i conti con i limiti delle risorse disponibili.

Ma va detto che la sfida è stata generosamente raccolta anche da una larga schiera di amici e sostenitori, più di 2000 complessivamente, che hanno creduto nella nostra iniziativa e che ne hanno reso possibile la realizzazione. Alcuni sostenitori hanno dato ad essa un impulso notevole tramite l'adozione parziale o totale di ben 27 progetti. Certamente dovremo puntare a raccogliere in futuro maggiori risorse, per non dover sacrificare l'iter di alcuni progetti assai promettenti. E' stato stimato che per dare un impulso più decisivo a questo percorso di ricerca dovremmo mettere insieme nel 2006 almeno 2 milioni di euro.

Fin dall'inizio di questa avventura è stato imperativo guida della Fondazione, del suo Comitato Scientifico e del Consiglio di Amministrazione, quello di puntare alla qualità dei progetti, senza concessioni ad aspetti politici o di convenienza tattica. Questa è stata la condizione condivisa per contribuire ad un salto di qualità nella ricerca italiana CF. Certamente alcuni errori nelle scelte sono inevitabili e forse sono stati commessi, e alcuni ricercatori che non hanno visto premiato il loro sforzo progettuale avranno anche provato qualche delusione. In realtà, il Comitato Scientifico della Fondazione, pur nella sua autonomia decisionale, ha cercato di valersi in larga misura del parere e della valutazione di esperti ben quotati nel panorama scientifico internazionale: più di 100 esperti hanno sinora collaborato in questo processo.

Di seguito esponiamo un quadro riassuntivo delle cinque aree di ricerca in cui si possono includere i 53 progetti sinora selezionati e il panorama geografico dei 71 gruppi di ricerca coinvolti.

Aree di ricerca CF sviluppate dalla Fondazione FFC

A. Fisiopatologia della proteina CFTR e interventi correttivi del difetto di base
In quest'area sono inclusi progetti orientati a conoscere come nasce, come matura e come funziona la proteina CFTR e come interagisce con altre proteine cellulari per assicurare il buon funzionamento delle cellule epiteliali nel loro sistema secretivo e di rapporto con l'ambiente esterno alla cellula. Vi sono inclusi anche gli studi che hanno lo scopo di correggere il malfunzionamento della proteina ma anche quelli finalizzati a correggere o a rimpiazzare il DNA mutato che sta alla base del difetto proteico (terapia genica e genico-cellulare). Sono stati selezionati in quest'area 17 progetti.

B. Batteri emergenti e infezione respiratoria
Questi progetti intendono approfondire la conoscenza di alcuni batteri che con crescente frequenza e intensità determinano infezioni respiratorie nei pazienti FC. Si tratta in genere di batteri che si selezionano per la resistenza ai comuni antibiotici e verso cui è necessario sviluppare strategie alternative di trattamento. 11 progetti sono stati avviati in quest'area.

C. Infiammazione polmonare e prospettive di suo trattamento
Il polmone CF risponde in maniera eccessiva agli stimoli infiammatori ed in particolare all'infezione batterica e questo eccesso di risposta è causa di danno polmonare cronico progressivo per i pazienti. Poco ancora si conosce delle ragioni di questa esaltata risposta e scarsi sono ancora i mezzi terapeutici per contenere l'infiammazione polmonare. 9 progetti sono impegnati nello sviluppo di queste conoscenze e nell'identificazione di nuove strategie antinfiammatorie.

D. Genetica molecolare applicata alla diagnosi ed alla relazione genotipo/fenotipo
Non siamo ancora in grado di identificare con analisi semplici tutte le mutazioni del gene CFTR né conosciamo quali altri geni siano implicati nel modulare la gravità della malattia nel singolo paziente. Questo crea dei limiti per la diagnosi e per una previsione di malattia su base genetica; soprattutto limita la possibilità di uno screening sicuro dei portatori nella popolazione. Per contribuire a dare risposte a queste problematiche l'area di ricerca comprende 11 progetti .

E. Ricerca clinica
E' questo l'ambito in cui si sperimentano nuove strategie terapeutiche e assistenziali, è l'area degli studi epidemiologici su larghi numeri di pazienti, per meglio conoscere l'evoluzione della malattia, l'effetto delle cure, anche quelle tradizionali, è l'area della sperimentazione di approcci diagnostici innovativi. Purtroppo la risposta in quest'area è ancora piuttosto carente: solo 5 progetti. Si avverte la necessità di dare nuovo impulso all'area di ricerca clinica: la Fondazione è impegnata in questo ambito anche attraverso iniziative di formazione di giovani ricercatori clinici (un nuovo percorso formativo con questo scopo partirà nel gennaio 2006).

Gruppi di ricerca e laboratori coinvolti nei 53 progetti di ricerca finanziati dalla Fondazione FFC dal 2002 al 2005

ABRUZZO
- Dip. Scienze Biomediche -Università "G. D'Annunzio", Chieti (2 progetti)
- Dip. Medicina Sperimentale-Università dell'Aquila, L'Aquila (1 progetto)

CALABRIA
- Lab. Clinico Patologico -Ospedale di Soverato, Soverato (CZ) (1 progetto)

CAMPANIA
- Dip. di Biochimica e Biotecnologie Mediche-Università Federico II, Napoli (3 progetti)

- Dip. di Pediatria -Università Federico II, Napoli (1 progetto)
- Lab. Microbiologia Funzionale -Università Federico II, Napoli (1 progetto)

EMILIA ROMAGNA
- Plesso bio-tecnologico integrato-Università di Parma, Parma (1 progetto)
- Dip. di Biochimica e Biologia Molecolare -Università di Ferrara, Ferrara (1 progetto)
- Dip. Biochimica - Istituto Nazionale Ricerca Cardiovascolare-Università di Bologna e Cesena (1 progetto)

FRIULI VENEZIA GIULIA
- International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB)-Trieste (2 progetti)
- Dip. di Scienze della Riproduzione e dello Sviluppo - Università di Trieste - I.R.C.C.S. Burlo Garofolo, Trieste (1 progetto)

LAZIO
- Dip. Biologia Cellulare e dello Sviluppo -Università La Sapienza, Roma (3 progetti)
- Dip. di Biopatologia e Diagnostica per Immagini -Università Tor Vergata, Roma (3 progetti)
- Dip. di Biologia -Università Tor Vergata, Roma (1 progetto)
- Dip. Biotecnologie Cellulari ed Ematologia -Università La Sapienza, Roma (2 progetti)
- Istituto di Clinica Pediatrica, Centro Regionale FC -Università Roma 1, Roma (2 progetti)
- Dip.di Fisiopatologia Medica -Università La Sapienza, Roma (1 progetto)
- Dip. di Biotecnologie, protezione della salute e degli ecosistemi - ENEA Casaccia, S. Maria di Galeria, Roma (2 progetti)
- Lab. di Microbiologia-Ospedale Bambin Gesù-Roma (2 progetti)
- Lab. Microbiologia Molecolare -Università La Sapienza, Roma (1 progetto)
- Istituto di Microbiologia-Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma (1 progetto)
- Dip. Microbiologia -Università di Roma 3, Roma (1 progetto)
- Dip. Salute Pubblica e biologia cellulare - Università Tor Vergata, Roma (1 progetto)

LIGURIA
- Istituto di Biofisica –CNR, Genova (1 progetto)
- Dip. di Scienze Farmaceutiche-Università di Genova, Genova (1 progetto)
- Lab. di Fisiopatologia dell'Uremia -Istituto G. Gaslini, Genova (2 progetti)
- Lab. Genetica umana E.O. Ospedali Galliera, Genova (1 progetto)
- Lab. Medicina Molecolare-Istituto G. Gaslini, Genova (4 progetti)
- Lab. Centrale Analisi -Istituto G. Gaslini, Genova (1 progetto)
- Sezione Microbiologia –DISCAT, Genova (1 progetto)
- ARPAL (Agenzia Reg. Protezione Ambiente Ligure), Genova (1 progetto)
- Lab. Diagnostica e Ricerca Malattie Infettive, Dip. Pediatria-Istituto G. Gaslini, Genova (2 progetti)
- Centro Fibrosi Cistica - Istituto G. Gaslini, Genova (1 progetto)

LOMBARDIA
- Istituto Statistica e Biometria-Università di Milano, Milano (2 progetti)
- Istituto per il Trattamento Sperimentale della Fibrosi Cistica– Ospedale S. Raffaele, Milano (5 progetti)
- Dip. Medicina Specialistica e dei Trapianti-Ospedali Riuniti, Bergamo (1 progetto)
- Lab. di Genetica Medica A. O. Istituti Clinici di Perfezionamento, Milano (2 progetti)
- Dip. di Scienze Biomolecolari e Biotecnologie- Università degli Studi di Milano, Milano (1 progetto)
- Dip. di Genetica e Microbiologia -Università di Pavia, Pavia (1 progetto)
- Dip. di Pediatria, Centro Fibrosi Cistica -Fondazione IRCCS, Milano (2 progetti)
- Lab. di Microbiologia,Centro Fibrosi Cistica, Milano (1 progetto)
- Unità di Genomica per Diagnosi di Patologie Umane-Fondazione Centro San Raffaele, Milano (2 progetti)
- Istituto per le Tecnologie Biomediche, CNR, Segrate (MI) (1 progetto)
- Lab. di Ricerca Clinica -Istituto per la Ricerca Farmacologica "M. Negri", Milano (1 progetto)

MARCHE
- Centro Fibrosi Cistica-Ospedale dei Bambini - Centro FC, Ancona (1 progetto)

PIEMONTE
- Centro FC Adulti Divisione Malattie Respiratorie, Dip. di Scienze Biologiche e Cliniche-Università di Torino, Ospedale S. Luigi Gonzaga, Orbassano (TO) (1 progetto)
- Dip. di Genetica, Biologia e Biochimica -Università di Torino,Torino(1 progetto)
- Dip. di Patologia Clinica, S.S. di Diagnostica Molecolare e Test Genetici Integrati, Torino (1 progetto)

PUGLIA
- Dip. Fisiologia Generale ed Ambientatale - Università di Bari, Bari (3 progetti)
- Servizio Fibrosi Cistica-Ospedale di Cerignola, Cerignola (1 progetto)

SARDEGNA
- Dip. di scienze biomediche e biotecnologie -Ospedale Reg. Microcitemie, Cagliari (1 progetto)

SICILIA
- Istituto di Biofisica-CNR, Palermo (1 progetto)
- Centro Fibrosi Cistica-Policlinico, Messina,(1 progetto)
- Centro Regionale FC-Ospedale dei Bambini "G. di Cristina", Palermo (1 progetto)

TOSCANA
- Dip. di Biologia Animale e Genetica-Università di Firenze, Firenze (1 progetto)
- Lab. di Proteomica Funzionale, Dip. di Biologia Molecolare - Università di Pisa, Pisa (1 progetto)
- Dip. di Pediatria-Centro Fibrosi Cistica - Ospedale Meyer, Firenze (3 progetti)
- Servizio Fibrosi Cistica - Ospedale di Livorno, Livorno (1 progetto)
- Dip. Patologia Sperimentale, Biotecnologie Mediche, Infettivologia ed Epidemiologia Università di Pisa, Pisa (1 progetto)

VENETO
- Medicina Interna-Università di Verona, Verona (1 progetto)
- Istituto Veneto Medicina Molecolare, Padova (2 progetti)
- Servizio Clinico di Genetica e Screening Neonatale-Centro Fibrosi Cistica, Verona (2 progetti)
- Dip. di Patologia, Sezione Immunologia-Università di Verona, Verona (1 progetto)
- Sezione di Anatomia ed Istologia, Dip. di Scienze Morfologico-Biomediche -Università di Verona, Verona (1 progetto)
- Lab. Patologia Molecolare-Centro Fibrosi Cistica, Verona (7 progetti)
- Dip. Materno -Infantile, Sezione di Biologia e Genetica-Università di Verona, Verona (4 progetti)
- Dip. Scienze Biomediche e Chirurgiche, Divisione di Nefrologia -Università di Verona, Verona (1 progetto)
- Dip. di Patologia, Sezione Patologia Generale -Università di Verona, Verona (2 progetti)
- Lab. di Microbiologia,Istituti Ospitalieri, Verona (2 progetti)
- Facoltà di Scienze della Formazione-Università di Verona, Verona (1 progetto)

Giuseppe Novelli *(Dipartimento di Biopatologia e Diagnostica per Immagini, sezione di Genetica, Università di Tor Vergata, Roma),* **Pier Franco Pignatti** *(Dipartimento Materno Infantile e di Biologia-Genetica, Sezione di Biologia e Genetica, Università di Verona),* **Franco Salvatore** *(Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università di Napoli Federico II).*

Identificazione di geni modificatori della Fibrosi Cistica mediante studio di famiglie ed analisi con microarray

Giuseppe Novelli (Coordinatore del progetto)

La Fibrosi Cistica (FC) è una malattia monogenica caratterizzata da un'ampia variabilità clinica, dovuta sia al diverso effetto delle mutazioni del gene CFTR, che a fattori ambientali e/o a geni modificatori. Lo scopo di questo progetto è stato quello di caratterizzare i geni modificatori in diversi quadri clinici di FC, mediante l'approccio del gene candidato, ovvero mediante studi di espressione o di associazione di geni coinvolti nei processi fisiologici della proteina CFTR.

Studi di espressione sono stati condotti mediante la tecnologia del "microarray" su un chip (FC-chip) comprendente 144 geni candidati ritenuti potenziali modificatori del fenotipo. Il loro pattern di espressione è stato analizzato in linee cellulari FC provenienti da epitelio bronchiale umano. Queste linee hanno un differente genotipo, CuFi1 è omozigote F508del (due mutazioni di classe II), CuFi3 è eterozigote composta F508del/R553X (una mutazione di classe I ed una di classe II). L'analisi dei dati ha permesso di identificare 38 geni differenzialmente espressi (26,3%); 12 in CuFi1 (8 up and 4 down) e 26 in CuFi3 (25 up and 1 down). Quindi, la presenza di un allele di classe I determina una risposta genomica maggiore rispetto ad un allele di classe II, dimostrando cosi' come la diversa gravità delle mutazioni influenza l'espressione genica della cellula, in particolare di geni coinvolti nella risposta infiammatoria, geni codificanti per canali cellulari e per protein chinasi e fosfatasi.

Studi di associazione fra vari geni candidati e fenotipi polmonare, gastrointestinale ed epatico hanno invece messo in evidenza l'importanza di questi geni in processi come l'infiammazione e la regolazione proteasi-antiproteasi. In particolare, è stata osservata una associazione tra l'allele G di un polimorfismo nel TNFa (Tumor Necrosis Factor Alpha) in posizione -308, con il fenotipo DIOS (Distal Intestinal Obstruction Sindrome). Questo suggerisce un'origine infiammatoria della sindrome e quindi un coinvolgimento del sistema immunitario. Il polimorfismo D386N nel gene SPINK5 (Serin Protease Inhibitor Type 5) è stato invece osservato in associazione alla poliposi nasale, rafforzando così l'ipotesi di un processo infiammatorio, e dunque un coinvolgimento nella patogenesi del polipo.

Inoltre questo studio ha portato alla caratterizzazione di diversi aplotipi del gene MBL (Mannose Binding Lectin), un gene responsabile della risposta immunitaria innata, correlandoli con il ridotto livello di attività di questa proteina, e con la severità del danno polmonare.

Un'altra associazione e' stata riscontrata tra i valori della FEV1, e le varianti Q576R (p=0.014) e S503P nel gene IL-4RA (Interleukin 4 Receptor Alpha). Questi polimorfismi sono importanti per lo sviluppo di malattie allergiche, e sono associati con alterazioni funzionali del recettore.

Questi risultati dimostrano come l'identificazione di geni modificatori possa essere importante per prevedere l'espressione clinica della malattia, e sopratutto quali saranno gli organi coinvolti, migliorando così l'inquadramento clinico e prognostico. Sarà inoltre possibile utilizzare in modo mirato le terapie attualmente disponibili, nonché lo sviluppo di nuovi farmaci, basati sulla conoscenza del funzionamento di questi geni, e progettati per le diverse mutazioni a carico del gene CFTR.

Franco Pagani (responsabile del progetto, primo a destra) e il suo gruppo

Elisa Goina, Marzena Lewandowska, Gabriele Talotti, Erica Bussani e Franco Pagani
(Human Molecular Genetics, ICGEB, Trieste, Italia)

Varianti genomiche che modificano lo splicing: aspetti diagnostici e terapeutici nella fibrosi cistica"

La identificazione dei meccanismi di base implicati nello "splicing" e lo studio delle alterazioni patologiche connesse e' fondamentale per lo sviluppo di nuove strategie diagnostiche e terapeutiche nella Fibrosi Cistica. La corretta regolazione dello splicing del gene CFTR avviene attraverso una complessa interazione tra elementi in cis (Exonic and Intronic Splicing Enhancer/Silencer) con trans-acting factors (fattori dello splicing). Mutazioni introniche e\o esoniche nel gene CFTR possono inaspettatamente modificare lo splicing e causare la malattia. La esclusione dell'esone 9 o 12 dal pre-mRNA (exon skipping) e' stato associato a forme di fibrosi cistica con espressione fenotipica variabile. Mediante l'uso di minigeni ibridi abbiamo identificato sequenze critiche per lo splicing localizzate nell'introne 8 (le varianti polimorfche GTmTn), nell'esone 9 e 12 (Composite Regulatory Elements of Splicing, CERES), e nell'introne 9 (Polypyrimidine-rich Controlling Element, PCE e Intronic Splicing Silencer, ISS). Mediante mutagenesi sito specifica abbiamo dimostrato che inaspettamente mutazioni sinonime nei CERES influiscono negativamente sullo splicing: circa il 25 % delle mutazioni sinonime causava exon skipping con un calo significativo della pecentuale di inclusione dell'esone 12. Tale risultato indica che le mutationi sinonime possono causare la Fibrosi Cistica agendo sullo splicing e pertanto dovrebbero essere considerate potenzialmente patogene negli screening genetici che considerano l'analisi solo sul DNA. Lo studio dell'esone 9 ha portato inoltre alla identificazione di numerosi fattori di splicing coinvolti nella sua regolazione. In particolare abbiamo identificato un nuovo bersaglio terapeutico, la proteina TDP43 che e' implicata nei difetti di splicing del gene CFTR. Tale proteina e' stata selezionata tra numerose proteine regolatorie precedentemente identificate per le sue particolari caratteristiche inibitorie sullo splicing. Si e' dimostrato che la riduzione di TDP43, ottenuta mediante "RNA interference" e' in grado di correggere il difetto di splicing. Tale recupero dello splicing ha una azione dominante nei confronti delle altre regioni e/o sulle interazioni con i rispettivi trans acting elements. La metodica dell'RNA interference viene inoltre esplorata per studiare il ruolo (inibitorio o attivatori) dei vari fattori di splicing precedentemente identificati quali le hnRNPs.

Giuseppe Castaldo (Coordinatore del progetto, quarto da sinistra) con il suo Gruppo di ricerca

Giuseppe Castaldo, Carlo Castellani, Cristina Bombieri, Federica Sangiuolo
(GEINGE-Biotecnologie Avanzate, Università Federico II, Napoli; Centro Fibrosi Cistica, Verona; Dip. Materno-Infantile e di Biologia-Genetica, Sezione di Biologia e Genetica, Università di Verona;Sezione di genetica, Università di Roma-Tor Vergata)

Screening delle mutazioni CFTR di riarrangiamento genomico in pazienti CF italiani.

Fino ad oggi, sono state identificate oltre 1300 mutazioni diverse nel gene CFTR, gene malattia della Fibrosi Cistica (CF), alcune delle quali diffuse ubiquitariamente (es. F508del, N1303K); altre specifiche di alcuni ambiti etnico-geografici, e la maggior parte "private", cioè confinate a ristretti gruppi geografici o familiari. Per la diagnostica molecolare routinaria della CF, la maggior parte dei laboratori utilizza kit del commercio oppure "home-made" che testano 30-40 mutazioni, tra cui quelle più frequenti e quelle più diffuse nel proprio bacino di utenza. Questi pannelli permettono di identificare mutazioni in circa il 70-80% degli alleli da pazienti CF (Tomaiuolo R., et al. Molecular diagnosis of Cystic Fibrosis: comparison of four analytical procedures. Clin Chem Lab Med 2003; 41:26-32), ma questa ridotta "detection rate" non costituisce un grosso limite diagnostico, giacché la diagnosi della malattia nei pazienti affetti non è basata sull'analisi molecolare, ma poggia piuttosto su criteri clinici e sul test del sudore e, più di recente, sullo screening neonatale. Conoscere l'epidemiologia delle mutazioni responsabili della Fibrosi Cistica (CF) in una determinata popolazione è di fondamentale importanza ai fini della diagnosi molecolare e della consulenza genetica, in quanto rende possibile calcolare il rischio residuo, per una coppia, di generare un figlio affetto e quindi l'analisi molecolare ha un ruolo importante nella diagnosi dei portatori e nella diagnosi prenatale della malattia. Inoltre, la conoscenza delle mutazioni del gene CFTR ha importanti implicazioni: sicuramente contribuisce a migliorare le conoscenze sulla patogenesi della malattia; in alcuni casi permette la previsione dell'espressione clinica della malattia (correlazione genotipo-fenotipo); infine può contribuire alla diagnosi delle forme "atipiche" di CF (in cui l'espressione clinica è sfumata e il test del sudore è spesso negativo o "borderline").

Tuttavia, anche se si effettua l'analisi dell'intera regione codificante del gene CFTR, in circa il 10% degli alleli CF non vengono identificate mutazioni. Recentemente sono state descritte macrodelezioni del gene CFTR, che se presenti in eterozigosi, non sono evidenziabili con le comuni tecniche di analisi molecolare (Audrezet MP, et al. Genomic rearrangements in the CFTR gene: extensive allelic heterogeneity and diverse mutational mechanisms. Hum Mutat. 2004), e quindi queste mutazioni potrebbero essere presenti in una percentuali di alleli CF negativi alla ricerca di mutazioni. Gli scopi del nostro progetto sono: a) sviluppare e confrontare procedure per l'identificazione delle macrodelezioni del gene CFTR; b) di definire la frequenza ed il tipo delle macrodelezioni del gene CFTR in un ampio gruppo di pazienti CF italiani.

Abbiamo quindi studiato pazienti CF non consanguinei, in cui una o entrambe le mutazioni del gene CFTR non risultavano note dopo l'analisi di scanning dell'intero gene CFTR. In particolare sono stati studiati: a) 46 pazienti selezionati dal Centro CF delle regioni Campania e Basilicata; b) 34 pazienti selezionati dal Centro CF del Lazio; b) 24 pazienti dal Centro CF della regione Veneto.
I campioni di DNA ottenuti dai pazienti su descritti sono stati analizzati usando: i) un nuovo protocollo di analisi quantitativa con rivelazione in DHPLC messo a punto nel laboratorio di Napoli; ii) un kit commerciale, basato su PCR quantitativa seguita da elettroforesi capillare (MLPA SALSA kit, MRC-Holland, The Netherlands); iii) un protocollo di analisi in PCR semiquantitativa (QMPSF).

Questi metodi si basano sul confronto tra i risultati ottenuti nel campione del soggetto da analizzare e nei campioni di controllo; in particolare, la presenza di una macrodelezione comporta una riduzione del 35-50% dell'area del picco relativa al prodotto di amplificazione della campione da analizzare. I dati ottenuti sono confrontati con quelli di un campione noto in cui è presente una macrodelezione del gene CFTR, di un campione sano per CF ed, infine, di un controllo negativo (senza DNA).

Lo studio ha permesso di identificare sei diverse macrodelezioni del gene CFTR (dele1; dele 2-3, dele 14b-17b, dele 17a-17b-18, dele 22-23 e dele 22-23-24). La presenza delle macrodelezioni è stata confermata mediante l'analisi dei breakpoint (punti di rottura) effettuata con sequenziamento diretto del gene. Inoltre mediante lo studio dei polimorfismi associati al gene CFTR è stato confermato che le macrodelezioni identificate non hanno origine ricorrente. La frequenza totale delle sei macrodelezioni negli alleli con mutazioni non note è del 25% circa. Considerando che gli alleli non noti rappresentano circa il 10% di tutti gli alleli CF, l'incidenza di macrodelezioni nei pazienti CF italiani è di circa il 2.5% di tutte le mutazioni CF.

Questi dati sono preliminari, in quanto nel secondo anno di progetto lo studio sarà esteso ad altri campioni, ma già emerge che l'analisi delle macrodelezioni del gene CFTR fa aumentare significativamente la "detection rate" della diagnosi molecolare per CF, e potrebbe essere quindi

routinariamente impiegata nei casi in cui occorre aumentare la sensibilità diagnostica dell'analisi molecolare (es. partner di soggetti portatori di una mutazione CF).
Nel secondo anno, oltre a confermare i dati già ottenuti su casistiche più ampie, saranno confrontati i diversi metodi di analisi sinora impiegati per la ricerca delle macrodelezioni, e saranno sviluppate procedure di analisi in PCR dei breakpoints, per rendere la ricerca delle macrodelezioni più rapida, e potenzialmente disponibile a tutti i laboratori di diagnostica molecolare.

Maria Cristina Rosatelli, Franca Dagna Bricarelli, Alberto Bonizzato, Emanuela Seia, Antonio Amoroso
(Dip. Scienze Biomediche e Biotecnologie, Università di Caglairi; Lab Genetica, Osp. Galliera Genova; Lab. Patologia Molecolare, Centro Fibrosi Cistica Verona; Lab Genetica, Ist Clinici Perfezionamento Milano; Ist. Genetica Umana, Università di Trieste)

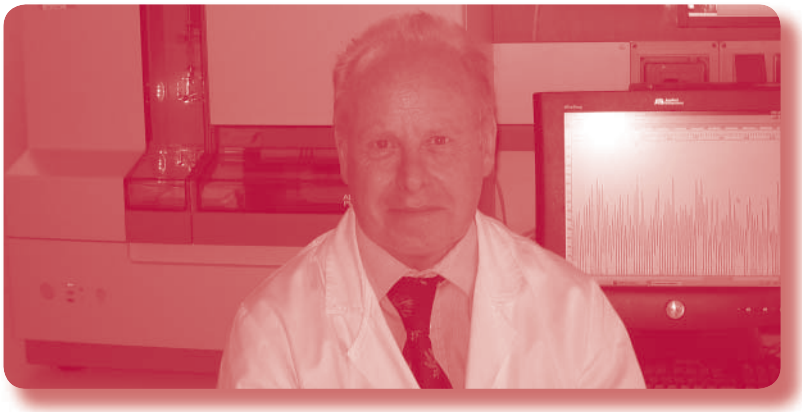
Fibrosi cistica: caratterizzazione delle mutazioni sconosciute in pazienti italiani ed approccio al loro ruolo patogenetico.

Maria Cristina Rosatelli (Coordinatrice del progetto)

Il progetto ha lo scopo di definire i difetti molecolari rari o sconosciuti del gene della Fibrosi Cistica (FC) in pazienti italiani e di studiarne eventuali nuovi meccanismi di espressione. Sono stati selezionati 244 pazienti affetti da una forma classica di CF che avevano una o entrambe le mutazioni del gene CFTR (per un totale 143 alleli non caratterizzati) non definite allo screening molecolare di primo livello per le mutazioni più frequenti nella popolazione italiana, eseguito con kit commerciali basati su protocolli OLA o RDB. I pazienti selezionati sono stati avviati a uno screening di secondo livello che prevede l'analisi DHPLC e/o il sequenziamento del gene CFTR. Abbiamo così definito 84/143 alleli e caratterizzato tre nuove mutazioni: 1249-1G>A, 2368-69del11bp, 4428delC. La mutazione 1249-1G>A è localizzata nell'ultimo nucleotide dell'introne 7 e causa un difetto nel processo di splicing. Lo studio dell'mRNA del paziente, ottenuto mediante brushing nasale, ha infatti mostrato la perdita dell'esone 8. La mutazione 2368-69del11bp, nell'esone 13, e la mutazione 4428delC, nell'esone 24, sono mutazioni frameshift che creano un codone di stop generando una proteina non funzionale. I 59 alleli non definiti dopo l'analisi di secondo livello sono stati inseriti nel protocollo che comprende l'analisi dell'RNA messaggero estratto da cellule dell'epitelio nasale e, più recentemente l'analisi MLPA, per la ricerca di estesi riarrangiamenti o difetti di splicing del gene. Fino ad ora abbiamo caratterizzato 16/33 alleli e identificato 5 estesi riarrangiamenti del gene CFTR: la delezione CFTRdele2,3 è stata identificata in 2 pazienti, la 3120+1kbdel8,6kb in 3 pazienti, la delezione degli esoni 22,23,24 (IVS21-3890_Stop+3143del9454ins5) in un paziente e la delezione degli esoni 22 e 23 (IVS21-78_IVS23+577del1532bp) in un paziente. Su 6 pazienti di origine sarda è stata identificata una nuova delezione. Si tratta di un riarrangiamento complesso che consiste in una delezione-inserzione di un tratto del gene. La delezione comprende l'esone 2 e parte delle sequenze introniche fiancheggianti. La sequenza inserita corrisponde a una porzione dell'introne 3, inserita in senso inverso. Per poter eseguire uno screening rapido ed economico mediante PCR del riarrangiamento, abbiamo disegnato una coppia di primers che ne delimitano il break-point. Questo nuovo difetto ha una frequenza del 3,4% in Sardegna. Il test per l'identificazione della delezione è già stato inserito nello screening della CF in Sardegna, dove il potere predittivo del test molecolare è ormai del 92%.
Il riarrangiamento complesso è stato successivamente trovato anche su tre alleli non sardi. E' in corso una valutazione della sua frequenza nella popolazione italiana.
Il progetto, svolto nell'arco di un anno, ci ha consentito di caratterizzare 100/143 alleli CF rari o sconosciuti che causano una forma di fibrosi cistica di tipo classico; 84 presentavano mutazioni puntiformi, 3 delle quali mai descritte, mentre 16 presentavano estese delezioni del gene CFTR. I risultati ottenuti dimostrano che l'approccio molecolare prescelto è estremamente efficace e sarebbe auspicabile la sua estensione a tutti i pazienti CF

italiani non caratterizzati. Conoscere il genotipo dei pazienti è di enorme importanza per la prevenzione della malattia in quanto consente di diagnosticare tutti i parenti portatori sani e di evidenziare eventuali coppie a rischio. Estendere le conoscenze sulla patologia molecolare della malattia consentirebbe inoltre di delineare meglio lo spettro mutazionale in Italia e aumentare in maniera consistente il potere predittivo dei test molecolari.

Roberto Strom (Coordinatore del progetto)



[1,a] Roberto Strom, [2,b] Serena Quattrucci, [3,b] Fernando Mazzilli, [1,c] Marco Lucarelli, [2,c] Lorena Narzi, [3,c] Tiziana Rossi, [1,c] Giampiero Ferraguti, [1,c] Rita Piergentili, [2,c] Fabiana Narzi, [1,c] Silvia Pierandrei, [2,c] Antonella Stamato
([1]Dip. Biotecnologie Cellulari ed Ematologia; [2]Centro FC Regione Lazio, Dip. Pediatria; [3]Dip. Fisiopatologia Medica - Università di Roma "La Sapienza" aCoordinatore; [b] Partner; [c]Collaboratore)

Selezione e caratterizzazione funzionale di variazioni di sequenza del CFTR potenzialmente responsabili di forme atipiche di Fibrosi Cistica: modulazione dello splicing alternativo del CFTR?

Razionale. Variazioni di sequenza del DNA del CFTR si trovano in forme atipiche (CFTR-correlate) di malattia fibrocistica (FC), limitate ad alcuni sintomi spesso "sfumati". Uno studio approfondito di queste varianti genomiche (GV) è però necessario per la definizione diagnostica dei casi dubbi, per una previsione dell'evoluzione della malattia e per una scelta opportuna della terapia. Obiettivo generale del progetto è la caratterizzazione di possibili forme atipiche di FC mediante l'individuazione di mutazioni (ad effetto patologico accertato) e di GV (ad effetto patologico da accertare) del gene CFTR, con successivo studio delle loro eventuali conseguenze funzionali.

Disegno sperimentale relativo all'anno di progetto finanziato. Sono state studiate, mediante un'estesa indagine mutazione del gene CFTR, mirata soprattutto alle GV introniche ed a quelle esoniche che non si traducono in cambiamenti di aminoacidi, le seguenti popolazioni "target" con possibile FC atipica: 1) neonati con ipertripsinemia alla nascita e diagnosi incerta; 2) maschi infertili, azoospermici per agenesia dei deferenti; 3) maschi infertili per iperviscosità idiomatica, resistente ai farmaci, del liquido seminale. Sono stati inoltre studiati gruppi di: a) soggetti con forma tipica di FC; b) soggetti della popolazione generale; c) maschi normospermici (queste ultime 2 popolazioni in qualità di controlli negativi).

Sintesi dei principali risultati conseguiti nell'anno finanziato. Nelle popolazioni "target" esaminate, mentre le mutazioni "classiche" gravi del CFTR sono presenti ad una frequenza significativamente minore di quella riscontrata nelle forme tipiche di FC, altre mutazioni con effetto più lieve e svariate GV sono invece rinvenute con elevata frequenza.

Abbiamo sino ad ora individuato 29 GV (19 già note, 10 mai precedentemente descritte) con significato funzionale da definire. Effettuando su 11 di esse un'analisi di frequenza, 6 sono risultate avere una frequenza nelle popolazioni "target" significativamente maggiore rispetto sia ai controlli negativi che ai soggetti con forme tipiche di FC. Lo studio funzionale di una particolare GV, la sequenza ripetuta (GATT)6, ha escluso per essa lo splicing anomalo dell'esone immediatamente adiacente, dimostrando invece un probabile splicing anomalo (o una delezione) degli esoni 12, 13 e 14a del gene CFTR.

La maggiore frequenza di alcune GV del gene CFTR e la dimostrazione di un loro probabile effetto funzionale induce a ritenere che le popolazioni "target" da noi esaminate siano affette da forme atipiche di FC. La selezione di ulteriori GV e studi funzionali dettagliati potranno definire i meccanismi molecolari coinvolti, contribuendo ad una migliore definizione del rapporto tra le alterazioni geniche (genotipo) e l'aspetto clinico (fenotipo) nelle diverse forme di FC.

Antonio Lupo (Coordinatore del progetto)

Giovanni Gambaro, Angelo Fabris, Cristina Bombieri, Pierfranco Pignatti, Antonio Lupo
(Dip. Scienze Biomediche e Chirurgiche, Dip. Biologia e Genetica, Università di Verona)

E' possibile che le persone con iperossaluria e ipocitraturia che formano calcoli renali calcici rappresentino un nuovo disordine correlato alla fibrosi cistica ?

L'ipotesi di partenza di questo progetto è che i pazienti con calcolosi renale primitive (ICN) con iperossaluria e ipocitraturia presentino una forma lieve di fibrosi cistica (FC).

Pazienti

Ventitre pazienti non consanguinei affetti da ICN che all'esame delle urine avevano eccessiva escrezione di ossalato (iperossaluria) e ridotta di citrato (ipocitraturia) sono stati individuati da un archivio della Rete Italiana per lo studio della Genetica della Calcolosi Renale (Gruppo A).

Altri 110 pazienti non consanguinei affetti da ICN sono stati individuate consecutivamente press oil nostro ambulatorio (Gruppo B). Tutti questi pazienti dovevano rispondere ad un questionario rivolto a individuare nella loro storia sintomi o disturbi della FC o di patologie correlate. Da ciascuno di essi si raccoglievano campioni di sangue e urine che erano conservati a -80°C. Il dosaggio della citraturia e dell'ossaluria in questi pazienti è in corso.

Analisi del DNA

E' stato estratto DNA genomico con un kit commerciale partendo da sangue intero. Gli esoni e le regioni vicine del gene CFTR sono state analizzate alla ricerca di mutazioni con la tecnica PCR e DGGE utilizzando sonde e protocolli descritti, con modalità multiplex quando ciò era possibile. Era previsto che eventuali mutazioni individuate per l'anomalia del profilo DGGE sarebbero state identificate sequenziando il DNA.

Risultati

L'analisi dei dati clinici ottenuti con il questionario ha dimostrato che non vi sono elementi suggestive di FC o di patologie correlate nella storia dei pazienti dei gruppi A e B.

Attualmente l'analisi DGGE è stata effettuata per gli esoni 3, 12, 14a, 15, 20, e 23 del gene CFTR nei 23 pazienti ICN del Gruppo A, e in 41 pazienti del Gruppo B. E' attualmente in corso l'analisi dell'esone 10 nei pazienti di entrambi i gruppi.

Sono stati individuati due polimorfismi (2694T/G e M470V) e due varianti di sequenza.

Polimorfismo - 2694 T/G (esone 14a):

L'allele G è stato riscontrato in 12/46 cromosomi (26%) di 23 pazienti ICN Gruppo A, e in 18/82 cromosomi (22%) di 41 pazienti ICN Gruppo B. Questi dati non sono diversi dalla frequenza osservata nei controlli sani della nostra regione.

I dati genotipici degli alleli 2694T/G nei pazienti ICN sono in equilibrio di Hardy-Weinberg.

Polimorfismo - M470V (esone 10):

L'allele M è stato trovato in 29/82 cromosomi (35%) di 41 pazienti ICN Group B. Riguardo ai 23 pazienti ICN Gruppo A, solo di 9 sono disponibili attualmente i risultati: l'allele M è stato trovato in 8/18 (44%) cromosomi. Questi dati non sono diversi dalla frequenza osservata nei controlli sani della nostra regione.

I dati genotipici degli alleli M470V nei pazienti ICN sono in equilibrio di Hardy-Weinberg.

Infine, 2 varianti di sequenza sono state individuate in 2 su 41pazienti del Gruppo B:

- variante R75Q nell'esone 3 riscontrata in una donna;
- una variante di sequenza nell'esone 15 riscontrata in una donna; il sequenziamento del DNA è in corso per caratterizzare queste varianti.

Conclusioni

Il progetto si concluderà con la caratterizzazione biochimica dei pazienti del Gruppo B (in ipocitraturici e iperossalurici), e con l'analisi del DNA per gli esoni del gene CFTR 3, 12, 14a, 15, 20 and 23 nei pazienti del Gruppo B non ancora studiati; e con l'analisi del DNA per l'esone 10 del gene CFTR nei pazienti del Gruppo A e B.

La conclusione preliminare sembra tuttavia essere che i pazienti affetti da calcolosi urinaria iperossalurica-ipocitraturica non sembrano costituire un bacino a rischio di FC.

Roberto Gambari
(Dipartimento di Biochimica e Biologia Molecolare, Sezione Biologia Molecolare, Università di Ferrara)

Strategie innovative nella diagnosi e terapia della fibrosi cistica

Il primo obiettivo del Progetto di ricerca era verificare se bersagliare il fattore di trascrizione NF-kB (coinvolto nella fibrosi cistica, CF) comportasse alterazione dell'espressione di geni caratteristici del processo infiammatorio. Abbiamo interferito con NF-kB con due strategie: (a) utilizzando corte sequenze di DNA a doppia elica contenenti il sito NF-kB (molecole "decoy") e in grado di sequestrare NF-kB (Gambari, Drug Design Reviews, 2005) e (b) estratti da piante medicinali provenienti da Bangladesh, Pakistan, Libano, Egitto (Lampronti et al., Medicinal Chemistry, 2005). Gli esperimenti sono stati eseguiti sulla linea di fibrosi cistica IB-3. Quantificando l'accumulo di mRNA con RT-PCR, abbiamo dimostrato che oligonucleotidi decoy per NF-kB interferiscono con l'espressione del gene codificante per IL-8 senza comportare induzione di apoptosi ed alterazione dell'espressione di geni ad essa correlati (ad esempio caspasi-3). Esperimenti eseguiti in collaborazione con il Dr. Giulio Cabrini (Centro Fibrosi Cistica, Verona) hanno permesso di confermare questa osservazione anche in cellule IB-3 indotte all'espressione di IL-8 con Pseudomonas aeruginosa. Abbiamo inoltre analizzato più di trenta estratti di piante medicinali, identificandone almeno 12 in grado di interferire con l'interazione tra NF-kB e DNA (tra i più attivi gli estratti di Hemidesmus indicus, Polyalthia longifolia, Terminalia arjuna, Aphanamixis polystachya, Rumex maritimus, Saraca asoka, Vernonia anthelmintica, Emblica officinalis e Satureja hortensis). Di questi, gli estratti da T.arjuna e A.polystachya sono risultati molto attivi nell'inibire l'accumulo di ICAM-1.

Roberto Gambari (Responsabile del progetto, al centro), e il suo gruppo di ricerca

Inoltre, estratti da T.arjuna sono anche attivi nell'inibire l'accumulo di mRNA per IL-8 e IL-6. L'inibizione di IL-8 è stata anche confermata quantificando il livello di proteina secreta dalle cellule IB-3. Questi dati sono di grande interesse per l'identificazione di principi attivi presenti in questi estratti e di possibile applicazione nella terapia della CF.

Il secondo obiettivo del Progetto di ricerca riguardava la diagnostica prenatale non invasiva eseguita utilizzando un Lab-on-a-chip basato sulla dielettroforesi (denominato DEP-array). Tale ricerca è stata condotta in collaborazione con il Prof. Roberto Guerrieri (ARCES, Università di Bologna). Abbiamo eseguito tutti gli esperimenti di fattibilità ottenendo i seguenti risultati: (a) l'interazione tra l'anticorpo MEM-G9 (specifico per HLA-G) e cellule LCL 721.221 HLA-G può avvenire in modo efficiente in presenza di mannitolo (DEP-buffer); (b) usando il DEP-array possiamo identificare cellule LCL 721.221 HLA-G alle quali si sono legate immunosfere MEM-G9; (c) tali cellule possono essere movimentate ed isolate singolarmente, anche se rappresentano una popolazione molto esigua (esperimento non fattibile usando sorting con FACS). Questi risultati suggeriscono che il DEP-array può essere utilizzato con successo in protocolli finalizzati alla diagnostica prenatale non invasiva.

Laura Cremonesi[1] , Silvia Galbiati[1], A. Torri[1], Barbara Foglieni[1], Gabriella Restagno[2], L. Sbaiz[2], Manuela Seia[3], M.Travi[3], Carlo Castellani[4], M. Chiari[5], Maurizio Ferrari[1,6,7].

([1] Unità di Genomica per la Diagnostica delle Patologie Umane, [6] Università Vita-Salute, H. San Raffaele, Milano. [2] Dipartimento di Patologia Clinica, A.O.O.I.R.M.-S. Anna, Torino. [3] Ospedale Maggiore Policlinico Mangiagalli e Regina Elena, Milano. [4] Centro Fibrosi Cistica, Azienda Ospedaliera Verona, Verona. [5] Istituto di Chimica del Riconoscimento Molecolare CNR, Milano. [7] Diagnostica e Ricerca San Raffaele SpA, Milano.

Laura Cremonesi (Coordinatrice del progetto, terza in alto da sinistra) e il suo gruppo di ricerca

Nuovi approcci per la diagnosi prenatale non invasiva di fibrosi cistica mediante analisi del DNA fetale nel plasma materno

Recentemente è stata dimostrata la presenza di DNA fetale libero nel plasma materno, che costituisce una fonte di materiale genetico ottenibile senza rischi per il feto. L'attività da noi svolta finora è stata mirata a determinare i parametri di riferimento relativi alla concentrazione di DNA fetale nel plasma materno in un'ampia casistica di donne con gravidanza fisiologica e ad esaminare i fattori fisiopatologici che possono alterare tali valori.

Il nostro obiettivo è mettere a punto delle strategie avanzate per la diagnosi prenatale non invasiva di mutazioni fetali ereditate per via paterna. Stiamo valutando due metodologie, i microchip basati su ibridazione del prodotto amplificato con sonde fluorescenti, e il pyrosequencing che si basa sull'incorporazione di nucleotidi in una reazione di 'primer extension' mediata dalla polimerasi. Abbiamo già dimostrato che entrambe le tecnologie sono sufficientemente sensibili da permettere l'identificazione di un numero limitato di copie di un allele minoritario mutato in presenza di un eccesso di DNA normale. Inoltre, per aumentare la sensibilità dei saggi, stiamo impiegando una strategia di arricchimento dell'allele mutato minoritario mediante amplificazione in presenza di peptide nucleic acids (PNAs) complementari alla sequenza normale per inibire l'amplificazione dell'allele normale e favorire quella dell'allele mutato.

Come modello, abbiamo sviluppato dei saggi per identificare le mutazioni che causano beta-talassemia. Stiamo quindi applicando tale sistema all'analisi di campioni di plasma di donne gravide, eterozigoti per una mutazione che causa beta-talassemia differente da quella del partner, prima che si sottopongano a prelievo di villi coriali o amniocentesi. I dati preliminari sembrano promettenti e indicano che tale approccio, se ottimizzato, potrebbe essere usato in combinazione con le tecnologie dei microchips ed il pyrosequencing. Questo costituirà la base per lo sviluppo di ulteriori saggi per l'identificazione di sequenze polimorfiche che consentano di analizzare anche le coppie in cui entrambi i genitori sono portatori della stessa mutazione.

Per quanto riguarda la fibrosi cistica, sono già state disegnate le sonde e i PNA per 6 mutazioni (deltaF508, N1303K, G542X, 2183AA->G, 1717-1G->A e W1282X) e 4 polimorfismi (M470V, 4006-200G->A, 4521G->A e T854T) nel gene CFTR. Saranno inoltre ottimizzate le condizioni di estrazione del DNA fetale da plasma materno mediante la comparazione di vari kit commerciali attualmente disponibili e saranno valutati dei protocolli di arricchimento del DNA fetale rispetto a quello materno per favorirne ulteriormente l'amplificazione. A tale scopo saranno valutate varie condizioni analitiche che consentano di identificare la combinazione ottimale DNA/PNA per inibire l'allele materno per le mutazioni e i polimorfismi di interesse.

2. FISIOPATOLOGIA CFTR E TERAPIE DEL DIFETTO DI BASE

Valeria Casavola *(Dipartimento di Fisiologia Generale ed Ambientale, Università degli Studi di Bar)*; **Mauela Zaccolo** *(Venetian Institute of Molecular Medicine Padova)*

- Regolazione del canale CFTR mediante interazione proteina-proteina
- Ruolo della proteina di interazione NHERF nella regolazione dell'attività e della espressione della proteina-canale CFTR

Le proteine a domini PDZ, fra cui NHERF, sono coinvolte nella regolazione della localizzazione e dell'attività del CFTR mediante la formazione di complessi multiproteici. Abbiamo studiato il ruolo di NHERF nella regolazione del CFTR in cellule respiratorie polarizzate analizzando l'attività ed il trafficking del CFTR in due linee cellulari bronchiali umane: le 16HBE14o- derivate da un soggetto sano ed esprimenti CFTR wild-type e le CFBE41o- derivate da un individuo CF omozigote per la mutazione DF508.

Abbiamo osservato che entrambi i domini PDZ ed il dominio ERM di NHERF sono coinvolti nell'espressione polarizzata del CFTR e nella regolazione dell'efflusso di cloro CFTR-dipendente. Inoltre l'over-espressione di NHERF stimola l'efflusso di cloro CFTR-dipendente attraverso un aumento dell'espressione apicale del CFTR nelle cellule normali 16HBE14o- e, interessantemente, induce una ridistribuzione del CFTR dal citoplasma alla membrana plasmatica e un ripristino dell'attività del CFTR nelle CFBE41o-.

Per comprendere come CFTR con NHERF interagiscano, misureremo in tempo reale la cinetica della loro interazione in cellule 16HBE14o- e CFBE41o- "in vivo" usando la tecnica della microscopia FRET (Fluoresence Resonance Energy Transfer). Abbiamo già costruito una sonda in cui il C-terminus del CFTR è legato alla variante gialla della GFP (YFP) e una sonda in cui l'N-terminale di NHERF è legato alla variante ciano (CFP).

L'interazione CFTR-NHERF sarà valutata nelle cellule prima e dopo stimolazione della produzione di AMPc indotta da forskolin (FSK), un attivatore specifico dell'adenilato ciclasi. In più, poiché è stato dimostrato che la PDE4 è un componente critico della via di segnalazione AMPc-PKA, studieremo il suo ruolo nell'interazione tra il CFTR e NHERF in monolayers polarizzati di cellule 16HBE14o- utilizzando inibitori specifici (es. rolipram).

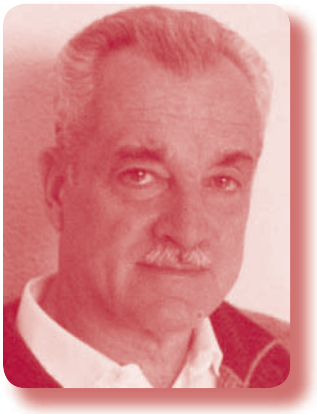
Valeria Casavola (Coordinatrice del progetto, terza da sinistra in alto), con il suo gruppo di ricerca di Bari

Per monitorare le dinamiche dell'AMPc in singole cellule epiteliali polarizzate, abbiamo messo a punto un sistema di espressione inducibile attraverso il clonaggio di un sensore per l'AMPc derivante dalla fusione delle due subunità della PKA con la CFP e con la YFP (RII-CFP and C-YFP). Cellule così trasfettate sono state studiate mediante microscopia confocale a due fotoni sotto stimolazione apicale o basolaterale con FSK e IBMX registrando un incremento di AMPc intracellulare di circa il 10%. Questi risultati dimostrano che la visualizzazione in tempo reale dei cambiamenti di AMPc in singole cellule epiteliali polarizzate e una stimolazione locale sono realizzabili.

Con il suddetto sensore è, però, difficile registrare in modo riproducibile i cambiamenti di AMPc generati dall'applicazione di agonisti selettivi in assenza di inibitori delle PDE. Per risolvere questo problema abbiamo progettato una variante del nostro sensore in cui la subunità regolatoria della PKA è stata modificata per incrementare la sua affinità per l'AMPc e quindi la sensibilità del sensore. Infatti, il sensore modificato mostra una Ka= 5 nM: il sensore originale aveva una Ka= 500 nM.

In ultimo, poiché un'ottimale organizzazione del citoscheletro di actina è richiesta per l'attivazione AMPc-dipendente del CFTR, misureremo l'effetto dell'over-espressione di NHERF1 sulla quantità di F-actina nelle cellule CFBE41o- mediante il dosaggio di polimerizzazione dell'actina e sulla sua organizzazione attraverso la visualizzazione del citoscheletro mediante analisi in microscopia fluorescente di cellule marcate con falloidina-FITC.

Francesco Osculati (Responsabile del progetto)



Francesco Osculati, Andrea Sbarbati, Flavia Merigo, Donatella Benati, Elena Nicolato, Pasquina Marzola
(Dipartimento di Scienze Morfologico-Biomediche, Sez. Anatomia e Istologia, Università degli Studi di Verona)

Meccanismi di regolazione del canale CFTR e dei fenomeni secretori ad esso correlati

Con il nostro lavoro abbiamo cercato di capire quali siano i meccanismi molecolari che regolano le cellule che esprimono CFTR (la proteina alterata nei pazienti affetti da fibrosi cistica). Abbiamo utilizzato a questo scopo un marcaggio immunocitochimico al microscopio confocale laser e tecniche di biologia molecolare.

La prima conclusione cui siamo giunti è che queste cellule esprimano anche molecole tipiche degli elementi chemorecettoriali ad esempio la PLC_2 e la _Gustducin. Inoltre abbiamo dimostrato che le cellule CFTR positive presentano anche alcune molecole (CC10 e CC26) che ne dimostrano la capacità di secernere il liquido che ricopre le vie aeree (ASL o airway surface liquid). Questi dati suggeriscono che tali cellule possano essere in grado di valutare sostanze chimiche presenti nell'aria e sulla base delle informazioni ottenute possano anche regolare la propria secrezione.

Per verificare tali ipotesi abbiamo utilizzato metodologie di risonanza magnetica funzionale con la quale abbiamo dimostrato come sia possibile regolare le secrezioni delle vie aeree mediante l'uso di sostanze di origine naturale in grado di agire su recettori chimici. Un importante risultato del lavoro è stata la dimostrazione che le sostanze chimiche usate dai batteri per comunicare tra loro, quali gli acil-omoserin lattoni, possono modificare l'airway surface liquid. L'azione di tali composti sulle vie aeree è stata inoltre studiata mediante microscopia elettronica.

I risultati di queste ricerche permettono pertanto di ipotizzare che si possa in un prossimo futuro, nei pazienti affetti da fibrosi cistica e da altre patologie respiratorie, arrivare a regolarizzare la secrezione agendo sulle capacità chemorecettoriali di queste cellule.

Nel corso della ricerca abbiamo inoltre dimostrato come il CFTR sia normalmente espresso anche in numerosi tessuti in cui il ruolo di questo canale non è stato sino ad ora studiato in dettaglio. Tra gli altri tessuti che esprimono CFTR, l'esame al microscopio confocale laser ha dimostrato una positività nei vasi del sistema nervoso e del muscolo striato. Inoltre il CFTR è espresso in altri chemocettori quali i calici gustativi e l'organo vomeronasale. Ulteriori studi sembrano necessari per capire se un malfunzionamento di tali organi possa modificare il quadro patologico del paziente con fibrosi cistica.

Luis Galietta (Coordinatore del progetto, quarto da sinistra) e il suo Gruppo

Nicoletta Pedemonte [1], Olga Zegarra-Moran [1], Tullia Diena [1], Emanuela Caci [1], Raffaella Melani [1], Antonella Caputo [1], Erika Nieddu [2], Mauro Mazzei [2], Salvatore Carrabino [3], Massimo Conese [3], Luis J.V. Galietta [1]
([1]Laboratorio di Genetica Molecolare, Istituto Giannina Gaslini, Genova; [2] Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università di Genova; [3] Istituto per la Terapia Sperimentale della Fibrosi Cistica, H.S. Raffaele, Milano)

"Screening di farmaci già approvati per uso umano al fine di identificare nuovi mezzi farmacologici per la fibrosi cistica"

Molte delle mutazioni responsabili della fibrosi cistica (FC) alterano il trasporto di cloruro nelle cellule epiteliali attraverso due tipi di meccanismi. Un tipo di mutazioni impedisce alla proteina CFTR di raggiungere la membrana plasmatica (difetto di "trafficking" o di maturazione). Un

altro tipo riduce invece la capacita' della proteina CFTR di trasportare ioni cloruro (difetto di "gating"). La mutazione più frequente nei pazienti FC, la delezione della fenilalanina in posizione 508 (deltaF508), causa entrambi i difetti.
La correzione del difetto di base nella FC può essere ottenuta in teoria mediante l'uso di composti chimici che ristabiliscano il funzionamento della proteina CFTR mutata o che stimolino l'attività di canali del cloruro alternativi. A questo scopo abbiamo effettuato un'indagine su una raccolta 2.000 sostanze, molte delle quali corrispondenti a principi attivi di farmaci già utilizzati per il trattamento di altre malattie. Questo approccio possiede un particolare interesse perché l'identificazione, tra i farmaci già in uso sull'uomo, di un composto attivo sulla proteina CFTR potrebbe portare più velocemente alla sperimentazione su pazienti FC. Lo screening ha identificato una famiglia di farmaci, le 1,4-diidropiridine, in grado di stimolare il canale CFTR quando questo è già presente sulla membrana cellulare e quindi di correggere il difetto di attività (gating) causato dalle mutazioni quali deltaF508, G551D, G1349D e D1152H. Il recupero di funzione del canale CFTR causato dalle 1,4-diidropiridine, misurato anche su cellule epiteliali di pazienti FC, è apparso molto significativo. Le concentrazioni necessarie per osservare l'effetto sono comunque superiori a quelle normalmente utilizzate nell'uomo. Per risolvere questo problema, sono in corso studi per migliorare l'efficacia e la selettività delle 1,4-diidropiridine sulla proteina CFTR attraverso la modificazione della struttura chimica. Il nostro screening ha anche evidenziato molecole che sembrano correggere il difetto di maturazione del canale CFTR con la mutazione deltaF508, riportando quindi la proteina mutata nella giusta posizione cellulare. Questi composti sono ora in fase di valutazione per la conferma dell'attività con varie tecniche di studio. Infine, è stato messo a punto un saggio cellulare che potrebbe essere utilizzato per trovare nuovi farmaci con azione antinfiammatoria.

Oscar Moran[*], Vincenzo Martorana[§], Chiara Pincin[*], Loretta Ferrera[*], Patrizia Guida[*¶], Rosina Noto[§] e Olga Zegarra-Moran[¶]
([*]Istituto di Biofisica, CNR, Genova, [¶]Laboratorio di Genetica Molecolare, Istituto G. Gaslini, Genova, e [§] Istituto di Biofisica, CNR, Sezione di Palermo)

Attivatori del trasporto ionico della CFTR: identificazione e modellazione molecolare dei siti leganti

Oscar Moran (Responsabile di progetto)

L'identificazione di un insieme di composti, denominati potenziatori, capaci di aumentare il trasporto di cloruro in cellule che esprimono la CFTR con mutazioni a "funzione ridotta", ha portato alla proposta dello sviluppo di terapie farmacologiche per alcune forme di fibrosi cistica (FC). Sulla base di evidenze che indicano i domini di legame dei nucleotidi (NBD) della CFTR come sito di unione dei potenziatori, abbiamo sviluppato un modello molecolare dei NBD al calcolatore, in modo di prevedere le proprietà di legame di queste sostanze. Mediante tecniche avanzate di dinamica molecolare, abbiamo proposto che, sia il legame delle due molecole di ATP (che favoriscono la dimerizzazione dei domini iniziando il ciclo di attività del canale al cloruro), che l'energia d'interazione tra il NBD1 e il NBD2 è seriamente compromessa a causa di alcune mutazioni patologiche. Utilizzando questo modello, abbiamo previsto il sito di legame dei potenziatori nell'interfaccia tra i due NBD, dove il ligando interagirebbe con ambedue domini. L'energia di legame stimata dal modello ha una buona correlazione con la dose effettiva media per una serie di 18 potenziatori, e prevede i cambiamenti di affinità a due mutazioni che producono la FC. Su questa base abbiamo formulato un'ipotesi sul meccanismo d'azione dei potenziatori della CFTR, che prevede anche l'inibizione del flusso del cloro che avviene quando queste sostanze sono applicate a concentrazioni relativamente alte. Lo schema cinetico derivante è stato utilizzato con successo per analizzare le curve dose-risposta ottenute con diversi tipi di potenziatori. In questo modello, l'effetto attivante sarebbe dovuto alla stabilizzazione della conformazione dimerica dei NBD quando il potenziatore è legato

nell'interfaccia tra i domini. Al contrario, quando la concentrazione del ligando è alta, questo si legherebbe ad ambedue i NBD prima della dimerizzazione, costituendo un impedimento sterico all'interazione tra il NBD1 e il NBD2. Questo meccanismo d'azione e perfettamente compatibile con le registrazioni di correnti di singolo canale ottenute alla presenza di diversi tipi di potenziatore. Attualmente stiamo analizzando le proprietà di due nuove serie di potenziatori recentemente descritti, utilizzando il modello molecolare per prevedere le loro proprietà di legame alla CFTR, cosi come lo schema d'azione derivante per interpretare i risultati sperimentali dello studio. Questi risultati ci porteranno a descrivere un insieme di proprietà che permetterà di avere i criteri necessari per il disegno di nuove molecole con più potenza e specificità.

Bianca Maria Rotoli (Responsabile di progetto, quarta da sinistra) e il suo Gruppo di ricerca

Bianca Maria Rotoli
(Dip. Medicina Sperimentale, Università di Parma)

Impiego di aminoacidi, sintetici o naturali, quali "chemical chaperones" per la correzione fenotipica della proteina CFTR

Quando le cellule sono sottoposte a condizioni di stress, esse tendono ad accumulare alcune sostanze che stabilizzano le proteine cellulari, rallentandone la degradazione. Tra queste sostanze, che vengono definite in inglese "chemical chaperones", figurano alcuni aminoacidi neutri e loro derivati. Questa proprietà ci è sembrata di particolare interesse per la fibrosi cistica. Infatti, nella maggior parte dei pazienti affetti dalla malattia, le cellule esprimono almeno un gene CF che codifica per una proteina mutata denominata DF508CFTR. La proteina mutata, avendo una conformazione anomala, viene degradata troppo rapidamente all'interno della cellula senza raggiungere la superficie e, di conseguenza, le cellule che l'esprimono non presentano la normale funzione di CFTR. Il progetto ha lo scopo di valutare se aminoacidi neutri o loro derivati rallentano la degradazione di DF508CFTR, consentendone l'espressione sulla membrana cellulare. In questo caso, mentre il gene resterebbe mutato, la funzione della proteina CFTR verrebbe ad essere corretta e, presumibilmente, le cellule che la esprimono non presenterebbero più le alterazioni tipiche della fibrosi cistica (correzione funzionale o fenotipica). Ci siamo concentrati su aminoacidi che fossero trasportati dai sistemi di trasporto A (glutamina, prolina, glicina, alanina, acido a-metilaminoisoburrico (MeAIB)) e TAUT (taurina, ipotaurina, b-alanina, aminoiminometil-b-alanina) in quanto queste sostanze sono spontaneamente accumulate all'interno delle cellule. Inoltre, questi composti presentano una tossicità estremamente ridotta, qualità di grande rilievo per possibili impieghi terapeutici. Sono stati utilizzati due protocolli. Il primo (trattamento acuto) consisteva nell'incubare cellule in cui, tramite metodiche di ingegneria genetica, è stato fatto esprimere il gene mutato (C127 DF508CFTR) in presenza di concentrazioni molto elevate (10 o 30 mM) di aminoacidi. Il secondo (trattamento cronico) comportava l'incubazione per tempi prolungati (almeno 8 settimane) delle stesse cellule in presenza di dosi più ridotte (1 mM). La correzione funzionale delle cellule è stata valutata mediante la comparsa di un efflusso di 36Cl cAMP-dipendente e confrontata con l'effetto dell'incubazione a bassa temperatura (27°C), una condizione che notoriamente promuove l'espressione della proteina mutata sulla membrana di cellule in coltura. Oltre al test di correzione fenotipica, i parametri controllati nelle diverse condizioni sperimentali consistevano nella misura della vitalità cellulare, della concentrazione intracellulare raggiunta dai vari composti e del volume cellulare. Tra i composti esaminati, risultati positivi sono stati ottenuti con taurina, MeAIB, glicina, glutamina. In particolare, il trattamento acuto con taurina 30 mM è in grado di provocare la comparsa di un efflusso di cloro cAMP-dipendente comparabile a quello osservato dopo trattamento a bassa temperatura. Una parziale correzione fenotipica è stata ottenuta anche con trattamenti cronici con MeAIB e taurina. I prossimi obiettivi consistono nell'ottenere la dimostrazione che il trattamento con aminoacidi è in grado di indurre l'espressione di membrana di CFTRDF508, tramite analisi Western Blot, e nel verificare i risultati dei protocolli più promettenti in modelli cellulari ottenuti da pazienti affetti da fibrosi cistica.

Matteo Pasetto, Giuseppe Bellisola, Lynne Roberts*, Marco Colombatti
*(Sezione di Immunologia Dipt. di Patologia, Università di Verona e *Dept. of Biological Sciences, University of Warwick, UK)*

Dissezione dei processi di folding/defolding della proteina CFTR in cellule CFTR normali e con mutazione DF508. Uso di tossine "disarmate" per colpire molecule "chaperones" e facilitare il folding e l'espressione di DF508-CFTR.

Marco Colombatti (Responsabile del progetto)

La mutazione _F508 nel canale di membrana responsabile del trasporto di ioni cloro, il Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator (CFTR), è riscontrabile nella maggior parte dei casi di Fibrosi Cistica (FC). Tale mutazione comporta difetti nel ripiegamento della molecola, nel suo traffico intracellulare e nella sua funzione di membrana, che è tuttavia parzialmente conservata. Un insieme di composti chimici e farmacologici ("correttori") possono influenzare l'espressione del CFTR difettoso. Tali sostanze per essere efficaci in vitro ed in vivo richiedono dosaggi che possono produrre degli effetti collaterali, limitandone fortemente l'efficacia e le possibilità di applicazione.

Per permettere un più pratico utilizzo di tali farmaci, questi possono essere trasportati nella cellula da speciali proteine che superano le barriere delle membrane cellulari. Grazie a queste proteine i composti "correttori" possono essere indirizzati in compartimenti cruciali della cellula in concentrazioni farmacologicamente rilevanti.
Risultati preliminari ottenuti in vitro permettono di concludere che sostanze farmacologiche opportunamente modificate e legate a proteine trasportatrici sembrano svolgere la funzione desiderata. Sono in corso ulteriori sperimentazioni per studiarne ed ottimizzarne gli effetti.

Massimo Conese, Lucia Palmieri, Stefano Castellani, Elena Copreni
(Institute for the Experimental Treatment of Cystic Fibrosis, H. S. Raffaele, Milano).

Valutazione dell'efficienza, efficacia e sicurezza di vettori lentivirali nel trasferimento del gene CFTR in sistemi modello di epitelio respiratorio con fibrosi cistica

Massimo Conese (Responsabile di progetto, primo a sinistra) e il suo Gruppo di ricerca

I lentivirus (LV) sono vettori integranti e dovrebbero permettere una prolungata espressione genica nelle vie respiratorie dei pazienti FC. Il nostro studio ha valutato l'efficienza e la biosicurezza di un LV di ultima generazione in modelli di epitelio respiratorio in vitro e in vivo. Il LV si è dimostrato essere molto efficiente in vitro su cellule respiratorie in coltura, sia in linea continua che primarie ottenute da bronchi e da polipi di pazienti FC. Si ottiene una trasduzione pari all' 80-90% in cellule bronchiali o nasali con un inoculo pari a 2000-4000 particelle virali per cellula respiratoria.
L'instillazione intratracheale del lentivirus, recante il gene marcatore Green Fluorescence Protein (GFP), dimostra che esso trasduce l'epitelio respiratorio del polmone a due settimane. L'espressione della GFP non si osserva ad un mese dalla somministrazione mentre ricompare dopo tre mesi. Questi risultati indicano che, sebbene ci possa essere uno "spegnimento" dell'espressione genica a tempi lunghi, questa possa ricomparire, forse in seguito a trasduzione di un compartimento "staminale/progenitore". L'analisi istologica della struttura dell'epitelio dimostra che il tessuto non presenta segni di danneggiamento in seguito a infezione e indica quindi che il lentivirus non è citotossico in vivo. Abbiamo valutato la risposta infiammatoria indotta nel polmone murino in seguito a instillazione intratracheale del vettore nel topo. I risultati indicano che infiltrati di linfociti T CD4+ e

CD8+ sono presenti a livello peribronchiale, sia nel polmone di topo infettato sia nel polmone di controllo non trasdotto, senza differenze significative. Al fine di confermare questi dati in maniera quantitativa, abbiamo prodotto un vettore lentivirale che reca il gene della luciferasi, un enzima che permette la quantificazione del segnale nelle cellule positivamente trasdotte. Infine, è in corso la produzione di un vettore che esprime la CFTR, in previsione di un suo uso in cellule e modelli animali FC.
In conclusione, il lentivirus che stiamo utilizzando trasduce in maniera molto efficiente l'epitelio respiratorio ex-vivo ed in vivo e presenta un potenziale infiammatorio ridotto. Questo vettore lentivirale potrebbe essere molto promettente per la terapia genica per il trattamento della Fibrosi Cistica e di altre patologie polmonari.

Anna Tamanini (Responsabile del progetto)

Anna Tamanini, Elena Nicolis, Federica Quiri, Elena Copreni*, Lucia Palmieri*, Stefano Castellani*, Massimo Conese* e Giulio Cabrini
*(Laboratorio Patologia Molecolare, Centro Fibrosi Cistica, Azienda Ospedaliera-Universitaria di Verona, e *Institute for Experimental Treatment of Cystic Fibrosis, H. S. Raffaele, Milano)*

Vettori lentivirali di nuova generazione: valutazione del potenziale infiammatorio in cellule respiratorie umane

La sperimentazione clinica di terapie innovative per la malattia polmonare dei pazienti affetti da fibrosi cistica basate sul trasferimento del gene CFTR direttamente nelle cellule delle vie respiratorie, utilizzando vettori di origine virale oppure sintetici, ha mostrato che veicolare il gene corretto nelle vie respiratorie è possibile, ma i benefici clinici sono ancora distanti da raggiungere. L'espressione del gene CFTR corretto è risultata ridotta e transitoria, principalmente per il mancato inserimento nel patrimonio della cellula respiratoria da correggere e per la lisi delle stesse cellule ove il gene CFTR era stato trasferito ad opera della risposta immunitaria citotossica dell'ospite. Tra i vettori in grado di fare inserire stabilmente il gene correttivo nelle cellule respiratorie, sono stati recentemente proposti lentivirus (LV) di nuova generazione con modificazione delle strutture di superficie (pseudotipizzazione) in grado di permettere il trasferimento del gene di interesse anche in cellule respiratorie. Svariati aspetti della sicurezza di vettori LV, quali l'inserzione del gene di interesse nel genoma della cellula bersaglio, la purezza del vettore prodotto da proteine contaminanti, l'espressione regolata del transgene, la risposta immunitaria per somministrazione sistemica oppure organo-specifica, sono attualmente in studio in diversi laboratori. Per quanto riguarda la sicurezza con somministrazione nelle vie aeree, risultati preliminari nel topo e nel coniglio sono incoraggianti, nondimeno l'esperienza raccolta con vettori del gene CFTR di prima generazione ha insegnato a studiare approfonditamente questi aspetti in modelli sperimentali di laboratorio, prima di avviare qualsiasi sperimentazione clinica sul paziente. In questo progetto pilota intendiamo verificare se vettori LV pseudotipizzati con proteina G del virus della stomatite vescicolare (VSV-G LV) inducano una risposta infiammatoria in modelli respiratori umani in vitro. Segnali intracellulari precoci (MAP Kinasi ERK1/2), un fattore di trascrizione nucleare centrale nella risposta immunitaria (NF-kB) e geni pro-infiammatori (ICAM-1 e IL-8), frequentemente modulati da virus completi a tropismo respiratorio e da vettori virali difettivi per la replicazione, saranno analizzati in cellule epiteliali respiratorie umane esposte a VSV-G LV, anche in comparazione con vettori di derivazione adenovirale. I risultati di questo progetto intendono contribuire a definire alcuni aspetti del profilo di sicurezza di vettori VSV-G LV, da utilizzare per indirizzare il gene CFTR corretto nelle vie aeree di pazienti affetti da fibrosi cistica.

AnnaTamanini, Paola Melotti, Attilio Bonizzato, Elena Nicolis, C. Cigana, Barouk M. Assael e Giulio Cabrini.
(Laboratorio Patologia Molecolare, Centro Fibrosi Cistica, Azienda Ospedaliera-Universitaria di Verona)

Ruolo dei recettori adenovirali nell'attivazione di segnali intracellulari coinvolti nella risposta infiammatoria precoce, in cellule di origine epiteliale

Giulio Cabrini (Responsabile del progetto)

Uno dei principali ostacoli alla applicazione della terapia genica della FC riguarda l'induzione di una risposta immunitaria indesiderata. I vettori adenovirali (Ad) rappresentano un importante mezzo di studio per comprendere e risolvere questo aspetto. Abbiamo precedentemente evidenziato che cellule respiratorie esposte ad Ad resi incapaci di trascrivere geni vettoriali sono comunque in grado di indurre segnali pro-infiammatori. Obiettivo del progetto è stato di identificare quali componenti del vettore (esone, base pentonica, fibra) e quali recettori cellulari (CAR, eparan solfati, integrine) sono responsabili della fase iniziale della risposta immunitaria. Nella prima fase del progetto sono state preparate e purificate le diverse componenti del vettore e la parte extracellulare del recettore CAR. Nella seconda fase del progetto, sono state studiate le principali vie di trasmissione del segnale intracellulare (MAPKs) ed un fattore chiave per la regolazione della trascrizione di geni coinvolti nella risposta infiammatoria (NF-kB). I risultati hanno evidenziato che la fibra del vettore induce segnali pro-infiammatori, precoci ed indipendenti dalla espressione di geni vettoriali, tramite il legame al recettore CAR, mentre questo non avviene per gli altri componenti e recettori. Questi risultati sono utilizzabili sia per disegnare nuovi vettori sia per studiare differenti vettori che utilizzano gli stessi recettori cellulari degli Ad, allo scopo di correggere il difetto genetico nella FC ottimizzando il rapporto tra efficienza e sicurezza.

Fiorentina Ascenzioni, Massimo Conese, Luisa Pirone, Sante Di Gioia
(Dipartimento di Biologia Cellulare e dello Sviluppo, University of Rome 'La Sapienza': Institute for Experimental Treatment of Cystic Fibrosis, H.S. Raffaele)

Valutazione di un polimero cationico, la polietilenimina (PEI-albumin) per il trasferimento di vettori cromosomici a epiteli respiratori in vitro e in vivo.

Fiorentina Ascenzioni (Coordinatrice del progetto, seconda da sinistra) e il suo Gruppo di ricerca di Roma

I soggetti affetti da FC presentano una severa compromissione della funzionalità dell'epitelio delle vie respiratorie. Un trattamento definitivo della FC è rappresentato dal trasferimento del gene CFTR "corretto" all'interno delle cellule dell'epitelio respiratorio "malato". Questo trattamento, definito terapia genica, è attualmente ostacolato da una serie di problemi sia di natura fisiologica, ad esempio la barriera di muco viscoso che bagna le vie aeree dei pazienti FC, che di natura molecolare, la mancata identificazione di sequenze di DNA di regolazione per espressione regolata nel tempo e nello spazio del gene introdotto. La possibilità di usare geni terapeutici opportunamente regolati esisterebbe qualora si usassero frammenti di DNA abbastanza grandi da contenere gli elementi di regolazione propri. Questi frammenti possono essere clonati in opportuni vettori cromosomali procariotici e/o eucariotici, ma non disponiamo di adeguati sistemi per il loro trasferimento nelle sequenze bersaglio. Lo scopo primario di questo progetto è lo sviluppo di un efficiente sistema di trasferimento genico per vettori cromosomali basato su complessi polietilenimmina/albumina serica umana (PEI/HBSA) che in studi preliminari si è dimostrata in grado di aumento significativamente l'efficienza di trasferimento genico del PEI mediante la formazione di complessi contenenti l'albumina serica umana. Nel nostro progetto verranno utilizzati dei Vettori di Contesto Genomico (GVC),

contenenti il gene CFTR e tutti i suoi elementi di regolazione. Il progetto proposto prevede di testare i vettori PEI-albumina-GVC in modelli in vitro ed in vivo di epitelio respiratorio caratterizzati da una crescente complessità anatomica e funzionale. In questo primo anno di attività potremmo focalizzarci sui modelli in vitro, usando cellule in coltura ed epiteli polarizzati in vitro. Successivamente le migliori formulazioni potranno essere testate in modelli più complessi e più simili all'uomo. Uno dei modelli attualmente più accreditato per lo studio della fibrosi cistica è senza dubbio il modello ovino e per tale ragione abbiamo intrapreso una collaborazione con il gruppo del Dr. Boyd (Edimburgo) che ha sviluppato questo modello.
Il progetto sarà sviluppato come segue:
1) Assemblaggio di vettori cromosomali YAC e BAC, purificazione e preparazione dei complessi PEI/HSA/DNA; 2) Caratterizzazione delle grandezza e carica dei complessi; 3) Uso dei complessi in esperimenti di trasfezione in vitro su cellule non differenziate e successivamente su epiteli polarizzati in vitro.

Federica Sangiuolo (Coordinatrice del progetto, seconda da destra) e il suo Gruppo di ricerca

Federica Sangiuolo, Massimo De Felici, Lorenzo Guerra, Marco Lucarelli
(Università Tor Vergata, Roma; Università di Bari; Università "La Sapienza", Roma)

Protocolli di terapia genica del gene CFTR in cellule staminali embrionali umane con l'utilizzo della tecnica SFHR (Small Fragment Homologous Replacement)

La Fibrosi Cistica (FC) è una malattia monogenica autosomica recessiva causata da mutazioni nel gene CFTR. Ad oggi non esiste una terapia risolutiva per la FC. Per questo motivo è auspicabile lo sviluppo di un programma di terapia genica efficace e innovativo che si avvalga di un approccio non virale e che sia in grado di modificare stabilmente il locus CFTR mantenendo nello stesso tempo inalterati i rapporti tra la sequenza nucleotidica "corretta" e le sequenze regolatrici del gene. Questi approcci basati sul riparo genico in situ, come la tecnica SFHR, sono già stati applicati con successo a diverse patologie ereditarie, quali la Distrofia Muscolare di Duchenne, l'Atrofia Muscolare Spinale e la _-talassemia.
Le cellule staminali embrionali (ES) per le loro peculiari caratteristiche rappresentano sicuramente il vettore più appropriato per questi protocolli, grazie alle loro enormi potenzialità differenziative e alla possibilità di manipolazione genica in vitro.
Lo scopo principale di questo progetto è quello di modificare in vitro una linea cellulare staminale embrionale umana, omozigote per la mutazione _F508, utilizzando la tecnica SFHR. Verranno a tal scopo utilizzati protocolli cellulari, biochimici, elettrofisiologici e molecolari finalizzati a verificare la funzionalità della tecnica e quindi un "ripristino" di funzione del canale CFTR nelle cellule trasfettate. Le cellule corrette verranno selezionate e indotte a differenziare in vitro in epitelio respiratorio, la cui funzionalità a livello di canale CFTR sarà ulteriormente verificata, valutando il passaggio del Cloro transmembrana. Parallelamente sarà valutata l'influenza che il grado di metilazione dei frammenti introdotti all'interno delle cellule può esercitare sull'efficacia di integrazione del frammento stesso.
Le molteplici capacità differenziative delle cellule staminali embrionali e l'impiego della tecnica SFHR in tali cellule potrebbero portare alla risoluzione dei problemi ad oggi esistenti nei protocolli sperimentali di terapia genica, tra cui quello del target cellulare da modificare,della scelta di un vettore appropriato per l'epitelio respiratorio, e dei protocolli di somministrazione dell'agente terapeutico. Inoltre le cellule staminali possono essere considerate dei vettori utili a "veicolare" le cellule corrette all'interno dell'organismo lì dove è più necessario.

Gli obiettivi di questo progetto sono
Nel corso del I anno:
• caratterizzare in termini quantitativi e qualitativi l'espressione della proteina CFTR nelle linee cellulari staminali.

• Produrre frammento corrispondente al locus CFTR umano selvatico
• Ottimizzare i protocolli di nucleofezione
• Effettuare analisi molecolari finalizzate a verificare l'integrazione del frammento e l'efficienza di tale processo
• Valutare lo status di metilazione del frammento terapeutico e del DNA genomico prima e dopo gli esperimenti di trasfezione

Nel corso del II anno:
• Sviluppare protocolli finalizzati a identificare quei cloni cellulari che hanno con successo integrato il frammento nel loro genoma, mediante l'uso di tecniche fluorimetriche capaci di valutare l'attività del canale CFTR
• Indurre differenziamento delle cellule staminali "corrette" in un epitelio funzionale

3. RICERCA CLINICA ED EPIDEMIOLOGICA

Mario Strazzabosco, R. Fiorotto, Carlo Spirlì.
(U.O. Gastroenterologia, Ospedali Riuniti di Bergamo; Istituto Veneto di Medicina Molecolare VIMM, Padova).

Patogenesi e trattamento della patologia epatica correlata alla fibrosi cistica.

Mario Strazzabosco (Responsabile di progetto)

Le manifestazioni cliniche a livello epatico sono presenti nel 30% dei pazienti con fibrosi cistica e ne compromettono la sopravvivenza e la qualità di vita. La terapia farmacologica per le complicanze epatiche in corso di fibrosi cistica è attualmente limitata alla somministrazione di acido Ursodeossicolico (UDCA), del quale sono ancora poco noti i meccanismi di azione. Il nostro progetto ha lo scopo, utilizzando dei modelli in vitro, di mettere a punto nuovi approcci terapeutici per trattare le patologie epatiche correlate alla fibrosi cistica. Una strategia che potrebbe rivelarsi molto utile è quella di stimolare la secrezione biliare sfruttando vie secretorie alternative a quella del CFTR. A tal proposito è stato appena pubblicato uno studio che illustra i meccanismi molecolari alla base degli effetti coleretici della Glibenclamide, un composto della famiglia delle sulfoniluree abitualmente utilizzato nella terapia del diabete. I nostri risultati dimostrano come la glibenclamide stimoli il flusso biliare a livello dei dotti biliari tramite un peculiare meccanismo di trasporto vescicolare. Ma soprattutto, che questo meccanismo era in grado di correggere il difetto di secrezione di bile in topi portatori del difetto genetico della fibrosi cistica.In un altro studio stiamo cercando di chiarire quali siano i meccanismi molecolari alla base dell'effetto terapeutico dell'UDCA. I risultati di questo studio dimostrano che l'UDCA stimola la secrezione di fluidi nelle cellule dei dotti biliari di topo con un meccanismo dipendente dal CFTR e tramite il coinvolgimento di alcune isoforme della protein chinasi C. Questo effetto non è però mantenuto nelle cellule isolate da topi knock-out per il CFTR, suggerendo che l'azione terapeutica dell'UDCA in fibrosi cistica dipenda da diverso meccanismo, che è attualmente oggetto dei nostri studi.

Giovanni Taccetti (Responsabile di progetto)

Giovanni Taccetti
(Centro Toscano Fibrosi Cistica, Osp. Meyer, Firenze)

Eradicazione precoce di Pseudomonas aeruginosa e successive colonizzazioni in pazienti affetti da fibrosi cistica

Le infezioni polmonari rappresentano una della caratteristiche principali dei pazienti FC e costituiscono la principale causa di morbilità e mortalità; il 29% dei pazienti tra 2 e 5 anni e l'81% dei pazienti tra i 26 e i 30 anni sono colonizzati da Pseudomonas aeruginosa (Pa). La colonizzazione cronica da Pa è associata ad un incremento delle secrezioni bronchiali e ad un lento ma progressivo decremento della funzionalità polmonare. L'eradicazione del germe è possibile solo con un trattamento antibiotico precoce, tuttavia i pazienti sottoposti a terapia eradicante possono essere nuovamente colonizzati da Pa. L'eradicazione precoce e il seguente periodo di tempo libero dal germe sono di particolare rilevanza clinica poiché la colonizzazione cronica è associata ad una diminuzione della funzionalità polmonare e la vita del paziente è pesantemente condizionata da trattamenti antibiotici più aggressivi.

Scopi principali:

- determinare il periodo durante il quale il paziente, sottoposto con successo a trattamento antibiotico eradicante, rimane libero da Pa.
- studio delle successive colonizzazioni da Pa in pazienti sottoposti a terapia eradicante per chiarire se gli isolati batterici rappresentano ceppi nuovamente acquisiti o crescita di ceppi preesistenti non eradicati

Scopi secondari:

- monitorare la funzionalità polmonare in pazienti eradicati in relazione ad un gruppo di pazienti cronici per valutare l'efficacia della terapia antibiotica precoce;
- confrontare la resistenza antibiotica di ceppi di Pa al momento del primo isolamento con ceppi isolati da pazienti cronici;
- valutare i benefici economici che possono derivare da un'eradicazione precoce nella riduzione dei costi causati dalla somministrazione di ripetuti cicli antibiotici in seguito alla colonizzazione cronica.

Risultati

Tra il 1992 e il 2000 sono stati registrati 79 episodi di nuove colonizzazioni da Pa; il numero medio di nuove colonizzazioni per anno è stato 5.8, con un'età media dei pazienti al momento della prima colonizzazione di 8.5 anni. L'eradicazione è avvenuta in 47 pazienti (81%), ma tra questi 24 (51%) sono stati nuovamente colonizzati da Pa, con un periodo libero medio di 30 mesi. In un sottogruppo di 16 pazienti è stata eseguita una tipizzazione dei ceppi di Pa isolati da episodi di ricolonizzazioni; tale indagine ha rilevato un diverso profilo genetico nel 73% degli episodi successivi, testimoniando l'avvenuta eradicazione.

Il declino medio della funzionalità polmonare si è rivelato più basso in pazienti sottoposti con successo ad eradicazione rispetto al gruppo di pazienti cronici.

Dal confronto dei pattern di resistenza antibiotica di ceppi di Pa isolati da pazienti sottoposti a trattamento antibiotico precoce e da pazienti cronici, è emersa una maggiore percentuale di resistenza nei ceppi provenienti da quest'ultimo gruppo.

Discussione.

La terapia antibiotica eradicante al momento della prima colonizzazione è stata effettuata con successo nella maggior parte dei pazienti trattati (81%), permettendo il raggiungimento di un periodo medio libero dal germe di più di due anni e la veridicità del trattamento eradicante è stata dimostrata dalla negatività dei titoli anticorpali specifici e dalla diversità genetica dei ceppi di Pa isolati al momento della prima colonizzazione e della successiva ricolonizzazione.

In conclusione il presente studio mostra che la terapia antibiotica precoce nei confronti della prima infezione da Pa è un potente regime terapeutico, che potrebbe ridurre l'insorgenza di resistenze antibiotiche e in definitiva migliorare le condizioni cliniche nei pazienti FC.

Carla Colombo, Alberto Battezzati
(Centro Fibrosi Cistica, Fondazione IRCCS, Milano; Fondazione Centro S. Raffaele del Monte Tabor, Milano)

Diabete, intolleranza al glucosio e ipoglicemia in pazienti con fibrosi cistica

Diabete mellito e intolleranza al glucosio sono diventati complicazioni comuni della Fibrosi Cistica con il protrarsi della sopravvivenza. Tali condizioni hanno un effetto negativo sullo stato clinico e possono limitare la spettanza di vita. Per questo motivo, studi diretti a comprendere meglio la patogenesi e l'impatto del diabete secondario a Fibrosi Cistica sono da considerarsi prioritari. Evidenze preliminari suggeriscono che il trattamento insulinico precoce è utile nel diabete secondario a Fibrosi Cistica, ma mancano indicazioni chiare per la selezione dei pazienti e per il tipo di intervento.
La mancanza di alcune informazioni critiche limita la capacità di migliorare il rapporto costi/benefici per ogni opzione terapeutica: la storia naturale del diabete in fibrosi cistica non è nota, il peso relativo di difetti di secrezione insulinica e di resistenza all'azione insulinica non è chiaro, l'effetto del trapianto di polmone e fegato sulla tolleranza al glucosio non è stato studiato. Alcuni pazienti hanno glicemie molto basse a digiuno e questo fatto potrebbe causare ipoglicemia grave in caso di terapia insulinica.
In questo progetto si propone di affrontare queste problematiche 1) attraverso uno studio di storia naturale del diabete in fibrosi cistica in cui tutta la popolazione seguita presso il Centro Fibrosi Cistica di Milano verrà periodicamente sottoposta a carico orale di glucosio e vari parametri clinici e nutrizionali saranno rilevati. 2) Studi specifici per valutare la secrezione e la sensibilità insulinica saranno impiegati per spiegare il motivo per cui alcuni pazienti sviluppano diabete e per conoscere meglio il rapporto tra trapianti e diabete. 3) Studi metabolici per valutare un deficit di difese dall'ipoglicemia saranno eseguiti in soggetti con ipoglicemia a digiuno candidati a terapia insulinica.

Rita Nobili, Giovanni Apolone, Cesare Braggion, Nadia Oprandi, Rita Pescini, Simone Spina, Daniela Fazio, Mariapia Intermite
(Centro Fibrosi Cistica, Fondazione IRCCS Milano; Lab. Ricerca Clinica, Ist. M. Negri Milano; Centro Fibrosi Cistica, Az. Ospedaliera Verona; Società Italiana Fibrosi Cistica; Centro Fibrosi Cistica, Ist. G. Gaslini Genova; Centro Fibrosi Cistica, Osp. S. Luigi, Orbassano Torino; Servizio Fibrosi Cistica, Policlinico Messina; Centro Fibrosi Cistica, Univ. La Sapienza Roma)

Rita Nobili (Coordinatrice del progetto)

Validazione multicentrica di un questionario sulla qualità di vita specificamente orientato alla fibrosi cistica e centrato sullo stato di salute.

Il miglioramento dei trattamenti ha prolungato la vita media delle persone con fibrosi cistica (FC). Efficacia e sicurezza di un nuovo trattamento possono essere verificate utilizzando vari parametri clinici. È però importante considerare anche la percezione soggettiva dei pazienti di "disabilità" e benessere. Ciò significa considerare le variazioni nella qualità della vita (QDV), che intervengono a seguito delle cure. Il concetto di QDV è multidimensionale: comprende aspetti fisici e mentali. Tra i primi si includono il "funzionamento fisico", cioè la presenza o meno di disabilità, sintomi e percezione del proprio stato di salute. La dimensione mentale include vitalità, inserimento sociale, condizione psicologica e salute mentale.
I diversi strumenti di misura della QDV consentono una valutazione complessiva dell'impatto di una malattia sulla vita quotidiana, concepita come insieme di abilità-disabilità, emotività e socialità. Le misure di QDV possono avere un impatto sull'aderenza dei pazienti ad un trattamento medico complesso. Le informazioni raccolte sulla QDV possono essere utilizzate anche per ottimizzare l'organizzazione delle strutture sanitarie. Attualmente ci sono pochi strumenti adatti all'età evolutiva. Uno strumento francese

di misura della QDV specifico per la FC ed utilizzabile con bambini e loro genitori, adolescenti ed adulti, il cosiddetto Questionario per la Fibrosi Cistica (QFC), è stato tradotto e valicato in inglese americano da Quittner e coll. (CFQ-R). si compone di una intervista guidata per bambini tra i 6 e 11 anni di età, e 3 questionari autosomministrati per bambini di 12-13 anni di età, genitori e adolescenti/adulti oltre 14 anni. Include "aree" generiche di QDV (sintomi fisici, emotività, ruolo sociale, vitalità, socialità e percezione della salute) e "aree" specifiche per la FC (immagine corporea, disturbi dell'alimentazione, interferenza delle cure, sintomi respiratori, sintomi digestivi e peso). Per ciascuna "area" sono richieste risposte graduate sulla base dell'intensità, della loro verità-falsità della frequenza o risposte multiple. Questo studio ha gli obiettivi di tradurre e validare il CFQ-R in italiano. A tale scopo la Commissione Ricerca Clinica del Gruppo Italiano per la Fibrosi Cistica – ora Società Italiana di Fibrosi Cistica – ha identificato un team multidisciplinare che conduce questo progetto.

Lo studio è in 2 fasi. 1a fase: traduzione e adattamento in italiano del CFQ-R. Successivamente, test di comprensione linguistica somministrati a 15 soggetti di diversa età. 2a fase: verifica delle caratteristiche psicometriche (attendibilità, validità, sensibilità) dei questionari tradotti. A tale scopo il CFQ-R deve essere somministrato ad almeno 150 soggetti, reclutati in 5 Centri per la FC (Milano, Genova, Orbassano (TO), Roma, Messina). Presso l'Istituto Mario Negri di Milano è predisposto un database specifico per l'input dei dati di validazione da remoto e per l'analisi dei dati circa l'appropriatezza (convergenza, divergenza e coerenza) dei diversi aspetti e relative scale valutative per ciascuna "area".

Il prodotto finale di questo studio sarà la versione italiana del CFQ-R, che sarà a disposizione di medici e ricercatori che hanno interesse ad utilizzare le misure di QDV nel contesto sia clinico sia di ricerca.

Graziana Manno (Responsabile del progetto)

Graziana Manno, Roberto Biassoni, Eugenio Agenore Debbia, Angela Sangiuolo

(Lab. Microbiologia, Ist. G. Gaslini Genova; Lab. Medicina Molecolare, Ist. G. Gaslini Genova;DISCAT, Istituto Microbiologia "C.A. Romanzi", Genova; Agenzia Regionale Protezione Ambientale Ligure, Genova)

Tipizzazione molecolare (studio del DNA) di ceppi di Pseudomonas aeruginosa isolati da pazienti italiani FC e loro comparazione con profili presenti nel "database europeo" di ceppi clinici e ambientali

L'infezione polmonare sostenuta da P. aeruginosa rappresenta il maggiore problema clinico per i pazienti affetti da FC. La fonte iniziale di tale infezione e le modalità di trasmissione non sono state ancora del tutto chiarite. Ci sono tuttavia delle chiare evidenze che alcuni particolari cloni si sono diffusi nella popolazione dei pazienti FC attraverso cross-infezioni con altri pazienti colonizzati. Inoltre, in UK e Australia sono stati descritti dei ceppi epidemici di P. aeruginosa con caratteristiche di multiresistenza agli antibiotici. Perciò, nel tentativo di limitare le cross-infezioni e identificare i ceppi potenzialmente epidemici o altamente trasmissibili, è importante eseguire degli studi molecolari di tipizzazione batterica, condotti sia a livello dei singoli centri FC che a livello nazionale ed internazionale. Nonostante i numerosi studi pubblicati in USA, Canada, Australia e Uk, sull'epidemiologia molecolare di P. aeruginosa in FC, in Italia, sino ad ora sono stati condotti pochi studi, comprendenti un numero limitato di ceppi e pazienti. Presso il laboratorio per la microbiologia della FC di Genova, durante il 2004, è stata allestita prospetticamente una vasta collezione di più di 250 ceppi di P. aeruginosa provenienti da pazienti seguiti in 4 centri italiani FC dislocati in aeree geografiche distinte (Genova, Ancona, Cerignola, Soverato); inoltre sono stati raccolti più di 90 ceppi isolati da pazienti non-FC, da ambiente naturale, domestico ed ospedaliero. Il profilo molecolare di questa collezione di ceppi, sarà determinato con un approccio polifasico che prevede l'utilizzo di tre metodiche molecolari di tipizzazione. La prima, la BOX-PCR, permetterà di analizzare rapidamente tutti i ceppi ed identificare i possibili cloni diffusi isolati sia da FC che da altre origini. Questi profili clonali saranno confermati e comparati tra loro mediante PFGE, metodica attualmente di riferimento, ma costosa e di complicata esecuzione, quindi applicabile ad un

limitato numero di ceppi batterici. Infine, i gruppi clonali maggiori così identificati, saranno sottoposti ad analisi mediante MLST: questa metodica prevede il sequenziamento di specifici geni conservati di P. aeruginosa e permette la comparazione di tali sequenze con un database accessibile "on line", contenente i profili dei cloni maggiori circolanti in Europa.
L'attinenza di questo progetto alla Mission della Fondazione per la Ricerca sulla Fibrosa Cistica è evidenziata dalle seguenti considerazioni:
• l'obbiettivo di delineare l'epidemiologia molecolare di P. aeruginosa da pazienti con FC e da altre origini;
• la possibilità della comparazione tra l'epidemiologia italiana e quella europea;
• l'incremento delle conoscenze riguardanti la diversità genetica tra P.aeruginosa isolati da FC, da altre infezioni e da fonti ambientali:
• il contributo alle misure di controllo delle infezioni nei Centri FC italiani, con il fine di evitare o minimizzare le cross-infezioni causate da possibili ceppi epidemici o altamente trasmissibili;
• la creazione di una ceppoteca nazionale di ceppi caratterizzati geneticamente, disponibili per ulteriori ricerche in ambito microbiologico e clinico.

Silvia Campana *(Centro Fibrosi Cistica - Ospedale A. Meyer, Firenze)*; **Luigi Ratclif** *(Servizio Fibrosi Cistica – Osp. Cerignola)*; **Lisa Cariani** *(Centro Fibrosi Cistica – Clinica Pediatrica, Univ. Parma)*; **Mariassunta Del Pezzo** *(Microbiologia Funzionale, Univ. Federico II – Napoli)*; **Valeria Raia** *(Centro Fibrosi Cistica; Univ. "Federico II", Napoli)*; **Flavio Favari** *(Lab. Microbiologia - Osp. Maggiore, Verona)*; **Amalia Negri** *(Unità Pediatrica – Osp. Livorno)*; **Rolando Gagliardini** *(Centro Fibrosi Cistica, Osp. G. Salesi, Ancona)*; **Fulvia Gioffrè e Donatella Scuteri** *(Laboratorio Clinico Patologico – Osp. Soverato, CZ)*

Silvia Campana (Coordinatrice del progetto)

Studio multicentrico su ceppi di Staphylococcus aureus meticillino-resistenti (MRSA) di origine comunitaria ed ospedaliera in pazienti con fibrosi cistica: storia naturale dell'infezione, suscettibilità antibiotica, epidemiologia e rilevanza clinica

La colonizzazione da S aureus meticillino-resistente (MRSA) è una delle maggiori cause di infezioni ospedaliere e comunitarie, di difficile trattamento a causa della loro resistenza a tutte le principali classi di farmaci. L'acquisizione di MRSA è stata documentata a partire dalla fine degli anni '70 in pazienti ospedalizzati, ma sono state recentemente descritte, con frequenza crescente, infezioni sostenute da ceppi acquisiti in comunità.
Tali infezioni coinvolgono attualmente anche i pazienti con fibrosi cistica (FC). La trasmissione di MRSA fra pazienti con FC è stata documentata sia in ambiente ospedaliero che all'esterno degli ambienti di cura. Vari studi indicano che l'infezione da MRSA può aggravare le condizioni cliniche, contribuendo al declino della funzionalità polmonare; inoltre il trattamento dell'infezione è reso problematico dall'alto grado di resistenza agli antibiotici. Tale tipo di resistenza è dovuta alla presenza del gene mecA, localizzato su un elemento genetico mobile chiamato "staphylococcal cassette chromosome mec" (SCCmec) che si integra nel cromosoma batterico. La presenza del gene mecA conferisce la resistenza agli antibiotici beta-lattamici. Uno specifico approccio molecolare consente attualmente di identificare cinque diversi tipi di cassetta SCCmec. Il tipo IV è il principale responsabile delle infezioni acquisite in comunità, e, come i tipi I e V, porta la resistenza solo ai beta-lattamici. I tipi II e III, responsabili delle infezioni ospedaliere, sono invece caratterizzati da una maggiore variabilità genetica da cui deriva la resistenza a tutte le principali classi di antibiotici.
La caratterizzazione del tipo di cassetta SCCmec è quindi di vitale importanza per chiarire le possibili vie di trasmisssione, attuare una prevenzione specifica ed una terapia antibiotica precoce e mirata.
Il presente studio prevede di analizzare circa 200 ceppi di MRSA, di origine clinica e ambientale, provenienti dagli otto centri partners del progetto. La fase successiva dello studio prevede la raccolta dei dati clinici relativi ai pazienti colonizzati da MRSA al fine di valutare la storia naturale dell'infezione e l'impatto sulle condizioni cliniche dei pazienti.
I fini del nostro studio sono di:
1. Studiare le caratteristiche dei ceppi ricevuti: con-

ferma della meticillino-resistenza con metodi biochimici e molecolari, valutazione della sensibilità agli agenti antimicrobici.
2. Valutare l' epidemiologia molecolare dei ceppi MRSA per evidenziare le vie di trasmissione ed eventuali focolai epidemici all'interno e/o fra i vari centri. Si prevede che i risultati di tale studio permetteranno di ottimizzare le misure di prevenzione, monitoraggio e terapia delle infezioni da MRSA.
3. Effettuare una caratterizzazione preliminare del tipo di cassetta SCCmec presente nei ceppi ricevuti, e valutare una eventuale correlazione con i profili di resistenza agli antibiotici, trasmissibilità e patogenicità. Per la fase preliminare dello studio, si intende concentrare l'attenzione sulla cassetta di tipo IV, in quanto ad oggi principale responsabile di episodi epidemici.
4. Valutare la storia naturale dell'infezione e l'impatto clinico nei pazienti FC colonizzati da MRSA.

Alberto Piazza (Responsabile del progetto)

Alberto Piazza, Francesca Riccardino
(Dipartimento di Genetica, Biologia, Biochimica, Università di Torino)

Lo spettro delle mutazioni del gene CFTR in Italia: distribuzione regionale nel contesto europeo

Molti studi hanno dimostrato come la distribuzione delle mutazioni presenti sul gene CFTR coinvolto nella patologia della Fibrosi Cistica (FC) mostri una grande variabilità geografica tra le popolazioni del mondo (Mateu, 2001; Bobadilla, 2002), dell'Europa (Estivill, 1997) e a livello nazionale . In articolare in Italia Rendine et al. (1997) hanno individuato differenze nella distribuzione delle mutazioni in grado di identificare 4 gruppi di regioni: nord-orientali, nord-occidentali, centro-meridionali e la Sardegna, caratterizzati da una o più mutazioni prevalenti in quell'area o da mutazioni private (per esempio T338I riscontrabile solo in Sardegna).
Lo studio ha lo scopo di aggiornare le frequenze delle mutazioni nelle regioni italiane, e di inserire queste informazioni in uno scenario europeo.
I dati italiani sono stati raccolti in collaborazione con i Centri e i Laboratori di FC ed inseriti in un database, in cui sono riportati i dati delle tipizzazioni dei genitori e i luoghi di nascita di genitori e nonni, per attribuire le origine geografiche dei cromosomi. In particolare si sono considerati solo i cromosomi per cui probandi ed entrambi i nonni sono della stessa regione, per un totale di 5155 cromosomi. I dati europei sono stati messi a disposizione dal Dr. Macek a nome del Consorzio Europeo della Fibrosi Cistica e sono il frutto di una collaborazione che ha permesso di ottenere circa 36000 cromosomi appartenenti a 58 coorti di popolazioni dell'Europa, del Medio Oriente e del Nord Africa. I dati raccolti sono stati analizzati mediante il software statistico SAS e l'uso di programmi di calcolo orientati alla genetica (Phylip vers. 3.62) e alla statistica (R vers. 2.0.1).
Il miglioramento delle tecniche e delle analisi del DNA hanno permesso di aumentare il tasso di identificazione ("detection rate") in Italia e di estendere il numero di mutazioni identificate includendo quelle non ancora riscontrate nel lavoro di Rendine et al. (1997) che sono caratteristiche di aree geografiche ben definite: 2789+5G->A e I507 presenti nel Nord Italia, le mutazioni 3849+10kbC->T, 4382delA, 852del22 e G1244E presenti nel Sud, la mutazione L1065P nel Centro. I raggruppamenti regionali evidenziati nel 1997 sono stati confermati e, inoltre, la distribuzione delle mutazioni più comuni in Italia mima la presenza delle stesse mutazioni in regioni o Paesi europei dai quali verosimilmente provengono le popolazioni storiche. L'eterogeneità che si ricava dalla distribuzione delle frequenze delle mutazioni per la FC a livello europeo è paragonabile a quella ottenuta analizzando marcatori genetici classici (e, con maggiore dettaglio, i marcatori del DNA mitocondriale e del cromosoma Y) da cui si può inferire la presenza di popolazioni storiche provenienti dal Mediterraneo, quali quelle della Grecia e del Medioriente, e popolazioni provenienti dal Nord Europa, quali Celti e Veneti. Rimane perciò confermata e narrata con maggior dettaglio la storia delle popolazioni antiche in Europa anche attraverso lo studio delle frequenze relative delle mutazioni di un gene patologico.

Anna Bossi, Pietro Piccinini
(Istituto di Biometria e Statistica, Università di Milano)

Controllo di qualità e aggiornamento dei dati di follow-up nel Registro Italiano dei Pazienti con Fibrosi Cistica: un punto di partenza per l'analisi dei dati clinici e per la disseminazione dei risultati.

Anna Bossi (Responsabile di progetto) e Pietro Piccinini (Collaboratore)

Dal 1988 il Registro Italiano Fibrosi Cistica (RIFC) censisce i pazienti in cura presso tutti i Centri Regionali di Riferimento (CRR) e alcuni Servizi di Supporto (SS) per la diagnosi e la cura della Fibrosi Cistica. Da allora il Registro ha archiviato i dati anagrafici, le modalità di diagnosi, la tipizzazione genetica e l'anamnesi degli oltre 4300 pazienti che sono, o sono stati, in cura presso una di tali strutture. Dal 1998 si sono archiviati anche i dati relativi al follow-up clinico dei pazienti (trapianto d'organo, complicanze, spirometria, dati antropometrici e microbiologici); tali informazioni sono però incomplete e non tutte sottoposte ad un attento controllo di qualità e di congruenza. Questo ha reso impossibile il loro uso benché siano relative ad oltre la metà dei pazienti.

Il motivo di uno scarso livello di qualità e, soprattutto, di completezza dei dati è imputabile sia all'aggiunta delle variabili relative al follow-up clinico dei pazienti sia al cambiamento nelle modalità di raccolta ed archiviazione delle informazioni; infatti, il passaggio dal questionario cartaceo a quello informatizzato ha creato alcune difficoltà di carattere tecnico che in alcuni casi hanno ritardato l'aggiornamento dei dati.

Per favorire la risoluzione di questi problemi e consentire la divulgazione di informazioni attendibili, si è intrapreso il presente progetto con l'obiettivo di eseguire l'aggiornamento e il controllo di qualità dei dati archiviati nel RIFC. Per svolgere questo compito si è affiancato al personale dei CRR/SS incaricato della raccolta dati un "data manager" che ha coordinato il loro lavoro.

L'attività del Monitor ha permesso di rivedere le modalità di raccolta ed inserimento dati adottate in ogni CRR/SS, di correggere e recuperare le informazioni essenziali ma, soprattutto, di condividere con i Responsabili della raccolta ed invio dati il lavoro necessario per aggiornare annualmente il RIFC. Questa esperienza è stata estremamente importante perché ha evidenziato, oltre ai problemi "tipici" di ogni CRR/SS, le differenze esistenti nell'interpretazione delle variabili da rilevare e nelle tecniche di rilevazione ed inserimento dati.

Il lavoro svolto ha consentito di aumentare considerevolmente la qualità delle informazioni di carattere demografico e relative alla diagnosi ma non ha permesso di recuperare in pochi mesi tutti i numerosi dati mancanti relativi al follow-up clinico del periodo 2000-2004. Si è deciso allora di procedere "per progetti". Si è cioè individuato un sottoinsieme di pazienti, ritenuti particolarmente interessanti, e solo per questo si è provveduto al completamento e all'aggiornamento dei dati. Il primo sottoinsieme scelto è stato quello costituito dai pazienti diagnosticati in età adulta, che rappresentano il 10% circa del totale dei pazienti censiti dal RIFC. I primi risultati di questo lavoro, hanno confermato che i pazienti diagnosticati in età adulta hanno forme più lievi di malattia rispetto alla popolazione FC totale: minor percentuale di insufficienza pancreatica, di infezioni polmonari, di genotipi "gravi", ed una miglior funzionalità respiratoria. Tuttavia, si può ritenere che almeno nel 7-8% dei pazienti si sia trattato di un ritardo diagnostico. Per confermare tale ipotesi, è stato avviato uno studio per indagare l'iter diagnostico seguito da questi pazienti e valutare quante sono, tra le diagnosi di FC poste in età adulta, le forme tipiche della malattia (Test del sudore >60 mmol/L; insufficienza pancreatica; patologia polmonare; genotipo severe) e dunque i reali ritardi diagnostici.

4. MICROBIOLOGIA E INFEZIONE

Alessandra Bragonzi (Coordinatrice del progetto a sinistra) e Sara Montanari

Sara Montanari, Gerd Doering e Alessandra Bragonzi
(Ist. Terapia Sperimentale della Fibrosi Cistica, Osp. S. Raffaele Milano; Institut fur Allgemeine Hygiene und Umwelthygiene, Universitat Tubingen)

Regolazione genica e mutazioni adattative di Pseudomonas aeruginosa in un modello animale murino ed in pazienti con Fibrosi Cistica.

La colonizzazione batterica delle vie aeree di pazienti FC è caratterizzata da un adattamento di P. aeruginosa a condizioni di stress anaerobico. Queste condizioni favoriscono la crescita di ceppi di P. aeruginosa fenotipicamente e genotipicamente diversi rispetto a quelli inizialmente acquisiti dall'ambiente. La regolazione del profilo dell'espressione genica rappresenta la risposta precoce all'adattamento mentre la selezione di ceppi mutanti avviene dopo una prolungata esposizione delle cellule batteriche a fattori di stress ed è finalizzata ad aumentare la sopravvivenza in condizioni sfavorevoli.
In accordo con questo modello, abbiamo recentemente dimostrato in vitro ed in un modello animale murino di infezione cronica che P. aeruginosa esprime fattori di virulenza, tra cui l'alginato, rapidamente (entro 24 ore) quando è sottoposta a stress anaerobico. Esperimenti di microarray, hanno permesso di definire l'espressione genica globale di P. aeruginosa cresciuta in condizioni di anaerobiosi per 24 ore. I risultati hanno confermato una up-regolazione dei geni coinvolti nell'espressione di alginato (algU/algR/algD, mucA-D) ed una down-regolazione di quelli coinvolti nella formazione del flagello (fleQ/flgB-E/flgD-L//fliK). In aggiunta, abbiamo evidenziato altri 440 geni, corrispondenti all'8% del genoma di P. aeruginosa, differenzialmente espressi in condizioni di anaerobiosi rispetto a condizioni di aerobiosi. Questi risultati indicano che il processo adattativo di P. aeruginosa alle condizioni di stress tipiche degli epiteli respiratori FC è altamente complesso e coinvolge moltissimi fattori di virulenza, alcuni dei quali rimangono da definire.
Al fine di studiare i processi adattativi tardivi di P. aeruginosa, 40 ceppi clinici sono stati isolati dopo 15-18 anni di infezione cronica da 10 pazienti FC ed analizzati per la presenza di mutazioni nei geni (mucA-D) rilevanti per l'espressione di alginato. Mutazioni in geni muc sono state rilevate nella metà di ceppi clinici che colonizzavano le vie aeree indicando una responsabilità parziale di questo processo adattativo nella patogenesi della malattia polmonare FC.
E' stato recentemente dimostrato che l'acquisizione di mutazioni in condizioni di stress è favorita in ceppi batterici ipermutati, caratterizzati da alterazioni nei geni che controllano la riparazione del DNA (mutS, mutL, uvrD).Un ceppo ipermutato ha una frequenza di mutazione almeno 100 volte più alta rispetto ad un ceppo normale e potrebbe acquisire mutazioni favorevoli per la colonizzazione delle vie aeree FC. La nostra collezione di ceppi clinici di P. aeruginosa ha rilevato che il 60% dei pazienti FC erano colonizzati da ceppi ipermutati indicando che questo carattere potrebbe avere un ruolo rilevante nelle infezioni croniche. Il potenziale di virulenza di ceppi ipermutati e la loro capacità di selezionare ceppi mutanti favoriti nella sopravvivenza in condizioni di stress anaerobico è attualmente in corso di studio.

Giovanni Bertoni, Faustino Vidal-Aroca
(Dipartimento di Scienze Biomolecolari e Biotecnologie, Università degli Studi di Milano)

Identificazione su tutto il genoma di geni target per disegnare antibiotici non convenzionali contro i patogeni correlati alla fibrosi cistica

La recente era genomica ha fortemente stimolato la ricerca e l'identificazione di nuovi bersagli per gli antibiotici in vari batteri patogeni. In questo ambito, una nuova tecnologia molto potente per l'identificazione di bersagli batterici è quella che si basa sull'inibizione dell'espressione genica mediata

da RNA antisenso. Oltre a permettere l'identificazione di molti bersagli, questa tecnologia permette di ottenere in modo immediato informazioni per lo sviluppo di nuove molecole antibiotiche. Lo scopo di questo progetto è quello di identificare molecole di RNA antisenso in grado di inibire la crescita di due batteri patogeni opportunisti, Pseudomonas aeruginosa e Burkholderia cepacia, che causano gravi problemi ai malati di fibrosi cistica. La sequenza di questi RNA inibitori sarà il punto di partenza per lo sviluppo di molecole antibatteriche di nuova generazione in grado di eludere i meccanismi che conferiscono a questi due patogeni un'elevata resistenza agli antibiotici convenzionali. L'identificazione degli RNA inibitori passa attraverso la costruzione e lo screening di librerie genomiche batteriche di RNA antisenso. In questo primo anno di attività, dopo il superamento di alcuni problemi tecnici legati all'elevata resistenza intriseca agli antibiotici e alla bassa efficienza di trasformazione, abbiamo costruito e effettuato lo screening di una libreria genomica

Faustino Vidal-Aroca e Giovanni Bertoni (Responsabile del progetto)

antisenso di P. aeruginosa. Questa procedura ci ha portato ad identificare sei sequenze che inibiscono, alcune in modo molto efficiente, la crescita di P. aeruginosa. Le prospettive di questo progetto sono: i) analizzare queste sei sequenze per pianificare esperimenti che ci permetteranno di identificare le sottoregioni responsabili dell'attività inibitoria, ii) effettuare nuovi screenings della libreria antisenso di P. aeruginosa al fine di individuare altre sequenze con attività inibitoria iii) iniziare la costruzione e lo screening di librerie antisenso di Burkholderia cepacia.

Vittorio Venturi
(ICGEB, Padriciano, Trieste).

Studi sul "quorum sensing" di Pseudomonas aeruginosa e Burkholderia cepacia complex

Lo studio condotto e' finalizzato ad indagare i meccanismi di regolazione genica attraverso il sistema Quorum Sensing (QS) nei batteri gram negativi, in particolare negli appartenenti ai generi Burkholderia e Pseudomonas. Questi due generi annoverano specie patogene e non, e tra quelle patogene sono presenti patogeni vegetali, animali e patogeni opportunisti specialmente per i malati di fibrosi cistica.

Il sistema QS permette ai microrganismi di coordinare l'espressione di deteminati geni in base alla densita' cellulare raggiunta dalla loro popolazione. L'importanza di questo sistema di regolazione si intuisce pensando che i fenotipi da esso controllati rendono i batteri piu' aggressivi ed efficenti nella colonizzazione di nuove nicchie, aumentando la loro aggressivita' ed abilita' a rispondere agli stimoli esterni. I geni controllati dal QS, nei diversi microrganismi in cui esso e' stato studiato, sono quelli deputati a formare un biofilm abbondante e maturo, quelli coinvolti nella produzione e secrezione di pigmenti,

Vittorio Venturi (Responsabile di progetto, al centro) e il suo Gruppo di ricerca

di antibiotici, di enzimi degradativi, e di fattori di virulenza. Molti di questi fenotipi hanno significato per il patogeno, ma anche per l'ospite, solo quando sono espressi da tutta la comunita' batterica; capire i meccanismi molecolari che permettono a quest'ultima di coordinare queste attivita'puo'significare capire dove colpire per interrompere questa comunicazione. Molti laboratori di ricerca e compagnie private stanno lavorando per individuare composti che, interferendo con il sistema QS, blocchino questo linguaggio e questa coordinazione. Il progetto di ricerca qui presentato ha permesso l'individuazione ed inattivazione del locus QS di B. cepacia dove sono stati anche individuati 27 geni regolati direttamente dal QS; sia in B. cepacia che in P. putida e P. aeruginosa sono stati poi isolati e mutati tre re-

golatori globali attivi in fase stazionaria. Lo scopo di questo era individuare relazioni gerarchiche fra loro ed il sistema QS; i risultati ottenuti hanno dimostrato che i quattro sistemi di regolazione agiscono coordinandosi e controllandosi a vicenda.
Lo spettro dei batteri del Burkholderia cepacia complex e' purtroppo destinato ad aumentare ed altre specie di Burkholderia sono state isolate dai polmoni di pazienti affetti da fibrosi cistica. Questi batteri possono infettare sia piante che animali utilizzando gli stessi elementi di virulenza ed approfittando di questo stiamo mettendo a punto un progetto per lo studio della virulenza in un modello vegetale coinvolgendo B. glumae, B. plantarii e la pianta Oryza sativa. Questo studio permettera', in maniera efficace ed economica rispetto alle procedure che coinvolgono test su animali, di individuare geni e fattori coinvolti direttamente nella virulenza di un ceppo. I primi risultati hanno dimostrato una forte attenuazione della virulenza nei mutanti QS negativi di B. plantarii dimostrando ancora una volta il forte coinvolgimento di questo sistema nella patogenicita'.

Annamaria Bevivino (Coordinatrice del progetto)

Annamaria Bevivino, Fiorentina Ascenzioni, Alessandra Bragonzi,
(ENEA Casaccia – Dipartimento di Biotecnologie, Protezione della Salute e degli Ecosistemi; Dipartimento di Biologia Cellulare e dello Sviluppo, University of Rome 'La Sapienza'; Institute for Experimental Treatment of Cystic Fibrosis, Department of Biotechnology, H. S. Raffaele Milano)

Valutazione della patogenicità di ceppi ambientali e clinici di *Burkholderia cepacia* complex da soli ed in presenza di *Pseudomonas aeruginosa*

Fin dai primi anni ottanta, i batteri appartenenti al Burkholderia cepacia complex (Bcc) si sono rivelati tra i più importanti patogeni opportunisti nei pazienti affetti da fibrosi cistica (FC). Tra le specie del Bcc, la specie Burkholderia cenocepacia riveste una notevole importanza nell'infezione polmonare dei pazienti FC poiché comprende ceppi epidemici e particolarmente virulenti. Ceppi appartenenti a questa specie sono stati anche isolati in diversi habitat naturali, quali il suolo e la rizosfera di piante di interesse agronomico. B. cenocepacia risulta, inoltre, una specie molto eterogenea poiché al suo interno sono state identificate, attraverso analisi molecolari basate sul polimorfismo del gene recA, 4 linee filogenetiche (denominate IIIA, IIIB, IIIC e IIID) che sembrano avere una diversa diffusione ambientale e clinica. L'ampia diffusione di B. cenocepacia in ambiente naturale solleva la preoccupazione che questa specie possa costituire una riserva di ceppi potenzialmente patogeni. Il progetto si proponeva due obiettivi principali: (a) esplorare la patogenicità di ceppi ambientali e clinici appartenenti alle diverse linee filogenetiche di B. cenocepacia e (b) analizzare l'influenza di Pseudomonas aeruginosa, il principale patogeno per i pazienti FC, sulle capacità di invasione ed infezione dei ceppi presi in esame. Nel corso di questo primo anno di sperimentazione ci siamo focalizzati sul primo obiettivo, utilizzando15 ceppi ambientali e clinici di B. cenocepacia, non correlati geneticamente. Tutti i ceppi sono stati caratterizzati per la resistenza agli antibiotici, la capacità di formare biofilm e la presenza di geni correlati alla virulenza e trasmissibilità, e analizzati per la loro capacità di invadere le cellule epiteliali e di colonizzare i tessuti polmonari murini. Dai risultati ottenuti è emerso che alcuni tratti correlati alla virulenza e patogenicità non sono esclusivi dei ceppi clinici, ma sono presenti anche tra gli isolati di origine ambientale. Gli esperimenti di infezione in modelli in vitro hanno evidenziato una maggiore capacità di internalizzazione dei batteri sia di origine clinica che ambientale nelle cellule FC rispetto alle cellule non-FC, anche se i ceppi clinici hanno mostrato una capacità di internalizzazione significativamente maggiore. Questi risultati sono stati confermati con il modello murino di infezione cronica che ha evidenziato come i ceppi ambientali si siano rivelati in grado di sviluppare un'infezione cronica nel topo, anche se hanno infettato un numero di topi statisticamente inferiore rispetto ai ceppi clinici. Al momento sono in corso studi di localizzazione batterica, nei modelli in vitro e in vivo, dei ceppi più significativi. I risultati ottenuti in questo studio hanno dimostrato il potenziale patogeno dei ceppi ambientali e saranno molto utili per poter valutare l'influenza di P. aeruginosa sulle capacità di invasione ed infezione dei ceppi analizzati.

Renato Fani, Silvia Tabacchioni, Giovanni Taccetti
(Dip. Di Biologia Animale e Genetica, Università di Firenze; ENEA - CRE - CASACCIA -UTS Biotecnologie, Protezione della Salute e degli Ecosistemi- Sez Genetica e Genomica vegetale; Centro Fibrosi Cistica, Osp Meyer Firenze)

Sviluppo di un test diagnostico per la discriminazione di specie e genomovar di burkholderia cepacia complex nella routine clinica

Renato Fani (Coordinatore del progetto, terzo da sinistra) e il suo Gruppo di ricerca

Il *Burkholderia* cepacia complex (Bcc) è un gruppo batterico a cui appartengono ceppi patogeni opportunisti responsabili della grave condizione clinica detta "cepacia syndrome", che affligge i pazienti CF e, in genere, immunodepressi. Questi batteri risultano spesso di difficile trattamento terapeutico in conseguenza dell'elevata trasmissibilità e della resistenza a numerosi antibiotici. Inoltre, la loro identificazione è lunga e difficoltosa a causa della complessità tassonomica del complex, che comprende nove diverse specie e dei metodi analitici attualmente in uso (RFLP o PCR-specie specifiche del gene recA) i cui risultati non sempre sono di facile lettura o esenti da errori.

Scopo del progetto è stato quello di mettere a punto una nuova metodologia, di facile applicazione alla routine clinica, basato sull'analisi SNuPE (Single Nucleotide Primer Extension), che permettesse di discriminare le diverse specie del Bcc in modo semplice e veloce. La tecnica si basa essenzialmente sull'analisi di siti variabili presenti all'interno di uno o più geni batterici. La nostra attenzione è stata rivolta inizialmente verso il gene recA, trattandosi del marcatore molecolare più studiato nei batteri del Bcc. E' stato quindi definito un pannello di oltre 110 ceppi batterici (clinici e ambientali) e rappresentativo di tutto il Bcc comprendente 50 ceppi di cui era nota la sequenza nucleotidica del gene recA ed oltre 60 ceppi la cui sequenza è stata determinata de novo. Il multiallineamento delle oltre 110 sequenze recA ha permesso di identificare, all'interno delle regioni variabili del gene, solo 4 siti polimorfici (SNP) che, inoltre, non consentono di discriminare tutte le specie del Bcc. Pertanto, data la scarsa capacità discriminante del gene recA abbiamo avviato lo studio di un secondo marcatore molecolare: il gene gyrB, spesso utilizzato per l'identificazione di ceppi batterici. Tuttavia, poiché questo marcatore non era stato mai utilizzato per l'analisi di batteri appartenenti al Bcc (solo tre sequenze gyrB erano disponibili nelle banche dati), è stato necessario mettere a punto l'intera metodologia. Inizialmente è stato elaborato un programma di amplificazione per PCR del gene gyrB da batteri del complex, che ha richiesto il disegno ex-novo di primer specifici. In seguito è stato definito un pannello di 69 ceppi di origine sia clinica che ambientale e rappresentativo di tutto il Bcc dal cui DNA è stato amplificato per PCR un frammento del gene gyrB di circa 1850 bp di cui è stata determinata la sequenza nucleotidica. Le sequenze ottenute sono state allineate ed analizzate per verificare la presenza di siti polimorfici; di ognuno degli oltre 400 siti polimorfici identificati è stata valutata la potenzialità sia identificativa che applicativa nella tecnica SNuPE. In tal modo ne sono stati scelti sei per disegnare un set di sette primer da utilizzare nella reazione di SNuPE, grazie alla quale si ottiene un codice a sei lettere specie-specifico capace di identificare i ceppi appartenenti al Bcc. I sette primer sono stati saggiati inizialmente in reazione singola per valutarne l'efficienza, e successivamente in reazione multiplex. Questa è stata condotta su 22 ceppi rappresentativi di tutte le specie del Bcc; i profili SNuPE ottenuti sono perfettamente identici a quelli attesi e permettono la facile identificazione delle diverse specie del Bcc.

I risultati complessivi dimostrano quindi la grande potenzialità della tecnica SNuPE per la identificazione di batteri appartenenti al Bcc.

Giovanna Riccardi, Graziana Manno
(Dip. di Genetica e Microbiologia, Università di Pavia; Lab. Microbiologia, Ist. G. Gaslini Genova)

Resistenza antimicrobica in ceppi di Burkholderia cepacia complex isolati da pazienti fibrocistici: identificazione, caratterizzazione e ruolo dei trasportatori di efflusso nella resistenza intrinseca ed acquisita ai farmaci

Giovanna Riccardi (Coordinatrice del progetto, prima da sinistra in piedi) e il suo Gruppo di ricerca a Pavia

A causa dell'eccessivo uso di antibiotici in terapia, la cura delle infezioni batteriche è spesso complicata dall'insorgenza di una resistenza multipla ai più comuni farmaci. I meccanismi di resistenza sviluppati dai batteri sono diversi: impermeabilità di membrana, che impedisce l'ingresso del farmaco all'interno della cellula; alterazione o iperproduzione del bersaglio; produzione di enzimi che inattivano o modificano l'antibiotico; iperproduzione di pompe di efflusso (proteine di membrana), che espellono il farmaco all'esterno della cellula. Alcune pompe sono specifiche per un substrato, mentre altre possono trasportare una varietà di composti anche non strutturalmente correlati. Tra i trasportatori coinvolti nell'efflusso di antibiotici vi sono proteine appartenenti alle famiglie ABC (ATP Binding Protein), MFS (Major Facilitator Superfamily), RND (Resistance-Nodulation-Cell Division), MATE (Multidrug and Toxic Compound Extrusion) e SMR (Small Multidrug Resistance).
Pompe d'efflusso appartenenti alla famiglia RND sono responsabili della resistenza intrinseca ed acquisita a diversi antibiotici in batteri Gram-negativi, quali Pseudomonas aeruginosa. E' stato inoltre dimostrato che la resistenza agli antibiotici è ridotta con l'utilizzo di inibitori di tali proteine. Un approccio alternativo per curare infezioni batteriche, quindi, potrebbe essere quello di somministrare inibitori di pompe d'efflusso, qualora l'iperespressione di una di queste fosse responsabile della resistenza.
Scopo di questo lavoro è stato studiare il ruolo svolto dalle pompe RND nella multi-resistenza agli antibiotici in B. cenocepacia genomovar III, un batterio Gram-negativo responsabile di gravi infezioni in pazienti affetti da fibrosi cistica. A nostra conoscenza, soltanto un trasportatore RND (CeoAB/OpcM) è stato descritto finora in questo microrganismo.
I geni codificanti i trasportatori appartenenti alla famiglia RND sono stati individuati nel genoma di B. cenocepacia utilizzando metodi bioinformatici. L'analisi del genoma ha evidenziato sia la presenza di operoni che di geni regolatori. Tramite la tecnica dell'RT-PCR è stata analizzata l'espressione dei geni codificanti proteine RND in assenza e in presenza di potenziali induttori di pompe d'efflusso. La determinazione della MIC (Minima Concentrazione Inibente la Crescita) a diversi farmaci del ceppo di B. cenocepacia, coltivato in presenza ed in assenza di inibitori di pompe di efflusso, ha permesso di ipotizzare il loro ruolo nella resistenza a diversi antibiotici. Alcuni geni codificanti proteine RND sono stati clonati in diversi vettori ed è stata analizzata la MIC a diversi antibiotici in differenti ospiti batterici.
I risultati finora conseguiti avvalorano l'ipotesi che le proteine RND potrebbero contribuire alla resistenza intrinseca di B. cenocepacia agli antibiotici e, di conseguenza, l'argomento merita ulteriori approfondimenti.

Un manoscritto dei risultati ottenuti è in preparazione.

Bianca Colonna, Maurizio Sanguinetti, Mauro Nicoletti, Mariassunta Casalino, Ersilia Fiscarelli
(Univ. Cattolica Sacro Cuore, Roma; Univ. Gabriele D'Annunzio, Chieti; Università di Roma 3; Osp. Bambino Gesù, Roma)

Stenotrophomonas *maltophilia*, un patogeno emergente nei malati di fibrosi cistica: identificazione e caratterizzazione molecolare dei determinanti di virulenza come potenziali bersagli per una nuova strategia antimicrobica.

Bianca Colonna (Coordinatrice del progetto)

Tra i microrganismi in grado di infettare i polmoni dei pazienti affetti da fibrosi cistica (FC) sta assumendo un ruolo importante come patogeno emergente Strenotrophomonas maltophilia. I fattori che inducono cambiamenti nella flora microbica nei pazienti affetti da FC non sono ancora completamente chiariti ma è fuori dubbio che tra questi abbia un ruolo fondamentale la forte e ripetuta terapia antibiotica, specialmente rivolta a contrastare infezioni da pseudomonacee. Inoltre i continui progressi della tecnologia medica possono favorire l'aumento del numero di individui ad alto rischio di infezione determinando un progressivo incremento dell'incidenza di S.maltophilia tra i microrganismi patogeni associati alla FC.

Poche sono le informazioni relative ai fattori di virulenza espressi da S.maltophilia e non vi sono dati sulle proteine che sono espresse dal microrganismo appena entrato a contatto con l'ospite. Per molti microrganismi patogeni la differenza di temperatura che incontrano tra l'ambiente esterno e l'ospite costituisce uno dei principali segnali per l'attivazione dei geni di virulenza. Una volta nell'ospite S.maltophilia, come altri patogeni in grado di colonizzare le vie aeree dei pazienti CF, a strato tende a formare una struttura multicellulare a strato nota come biofilm..

Lo scopo di questo progetto di ricerca è l'identificazione dei geni espressi da S.maltophilia alla temperatura dell'ospite per cercare di scoprire quali siano, anche a livello molecolare, i fattori essenziali per l'instaurarsi del processo di patogenicità. Questa fase della ricerca è essenziale se si vuole intraprendere il cammino per lo sviluppo di nuovi composti antimicrobici altamente specifici ed idonei soprattutto per quei microrganismi, come S.maltophilia, altamente resistenti a numerosi antibiotici comunemente in uso.

Il nostro approccio sperimentale sarà basato dapprima sull'analisi delle proteine totali espresse dal batterio (proteomica) effettuato su un ceppi di S.maltophilia associati a FC, in condizioni che mimino il più possibile l'ambiente polmonare dell'ospite, sia dal punto di vista delle temperatura che da quello dello stato di aggregazione (cellule libere o biofilm) dei batteri. Una volta identificate le proteine espresse specificatamente alla temperatura dell'ospite e/o allo stato di biofilm cercheremo di clonare i geni corrispondenti in modo da poter caratterizzarne i livelli di espressione e le strategie di induzione. Inoltre tramite tecniche di mutagenesi ci proponiamo di inattivare i geni codificanti per le proteine espresse esclusivamente alla temperatura dell'ospite e/o in stato di biofilm in modo da poter analizzare eventuali variazioni nel livello di virulenza.

Lo sviluppo di nuove terapie antimicrobiche basate sull'inattivazione di geni di virulenza costituisce un approccio nuovo e potente che può permettere di minimizzare gli effetti tossici sulle cellule dell'ospite e può ritardare il drammatico problema del continuo aumento dello spettro di antibiotico resistenza.

5. INFIAMMAZIONE

Francesca Zazzeroni (Responsabile del progetto)

Francesca Zazzeroni
(Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università de L'Aquila)

Infiammazione ed apoptosi nell'epitelio delle vie aeree in fibrosi cistica: ruolo di NF-kB e dei suoi geni bersaglio

L'infiammazione cronica delle vie respiratorie e le infezioni polmonari ricorrenti sono un tratto caratteristico della fibrosi cistica (FC). Nelle vie respiratorie normali, una valida risposta all'infezione da germi patogeni richiede l'attivazione di una efficace risposta infiammatoria, cui fa seguito la risoluzione e la restitutio ad integrum. Le cellule epiteliali sono capaci di internalizzare i patogeni e di eliminarli dalla superficie mucosa mediante la desquamazione, un processo basato sulla morte cellulare programmata (apoptosi) delle cellule epiteliali. E' stato recentemente dimostrato che le cellule epiteliali mutate per il gene cftr sono meno sensibili all'apoptosi rispetto alle cellule epiteliali normali, lasciando ipotizzare che una ridotta clearance dei germi invasori possa essere, almeno in parte, responsabile delle manifestazioni polmonari in corso di FC.

I fattori di trascrizione della famiglia NF-kB sono importanti regolatori delle risposte infiammatoria ed apoptotica, ed è stato riportato che NF-kB è cronicamente attivo nelle cellule FC. Dato che l'infiammazione gioca un ruolo fondamentale nelle manifestazioni polmonari della FC, terapie immunomodulatorie volte ad inibire NF-kB sono state da tempo proposte. Tuttavia, oltre a regolare le risposte flogistiche, NF-kB coordina anche la risposta immunitaria ed è coinvolto nel controllo della proliferazione cellulare, del differenziamento e dell'apoptosi. Terapie mirate verso specifici geni target di NF-kB possono disaccoppiare queste diverse e fondamentali funzioni. In linea di principio è quindi possibile identificare trattamenti capaci di modulare specifici set di geni attivati da NF-kB nelle cellule FC senza compromettere la funzione della barriera epiteliale o la risposta infiammatoria dell'ospite a tutti i patogeni respiratori. Tuttavia, molti geni regolati da NF-kB nella FC devono ancora essere identificati.

Al fine di valutare il ruolo di NF-kB e dei suoi geni target nel processo apoptotico delle cellule CF e di identificare geni regolati da NF-kB coinvolti nelle risposte infiammatoria ed apoptotica, abbiamo generato un sistema cellulare CF, ed uno WT di controllo, in cui NF-kB viene stabilmente inibito. La linea cellulare IB-3 (DF508/W1282X), una linea di cellule epiteliali bronchiali umane, e la linea cellulare S9, esprimente la forma WT del CFTR, sono state trasdotte con un retrovirus esprimente IkBalfaM, una forma mutata dell'inibitore fisiologico di NF-kB, che non essendo fosforilabile lega stabilmente il fattore di trascrizione e lo sequestra a livello citoplasmatico inibendone la funzione. Queste cellule sono state utilizzate per valutare parametri cellulari e molecolari di apoptosi delle cellule CF rispetto alle cellule che esprimono un CFTR normale, e per determinare se una diversa sensibilità delle cellule CF all'apoptosi fosse dipendente da NF-kB. Inoltre, RNA estratto da queste cellule verrà utilizzato per lo screening di cDNA Array, al fine di identificare e possibilmente caratterizzare nuovi geni regolati da NF-kB importanti nella patogenesi della fibrosi cistica.

Valeria Raia, Giuseppe Castaldo
(Dipartimento di Pediatria,Università Federico II, Napoli; Dip. Biochimica e Biotecnologie, Università Federico II, Napoli)

Valeria Raia (Coordinatrice del progetto)

Polipi nasali di pazienti FC come modello ex vivo per studiare l'infiammazione e la sua modulazione attraverso l'inibizione del percorso di p-38 MAP-kinasi: implicazioni per la terapia

Il controllo dell'infiammazione respiratoria è uno degli obiettivi principali della terapia del paziente con Fibrosi Cistica (FC). I farmaci antinfiammatori "tradizionali" sono largamente impiegati per combattere le esacerbazioni respiratorie, ma il loro uso prolungato è spesso controindicato a causa degli effetti collaterali. Pertanto uno degli obiettivi principali della ricerca in FC è quello di studiare i meccanismi della risposta infiammatoria correlata all'infezione cronica per individuare nuove sostanze in grado di bloccare questa risposta. In questo studio abbiamo caratterizzato le fasi più precoci della risposta infiammatoria ad antigeni batterici (Lipopolisaccaridi di Psendomonas Aeruginosa) utilizzando un nuovo modello, la coltura della mucosa nasale di pazienti che necessitavano di polipectomia. Questo studio ci ha consentito di comprendere il ruolo di alcuni segnali intracellulari che mediano la risposta infiammatoria (MAP-chinasi) e di individuare un inibitore della MAP-chinasi p38 (SB 203580) capace di controllare la risposta infiammatoria (produzione di Interleuchina 8 e migrazione dei neutrofili). La possibilità di utilizzare questi farmaci per via aerosolica, limitando pertanto il rischio di effetti collaterali indesiderati, potrebbe rappresentare una interessante opzione terapeutica per i pazienti con Fibrosi Cistica. Nello stesso tempo, è stata sviluppata una procedura di analisi quantitativa in RT-PCR che sarà impiegata per l'analisi dell'espressione delle beta defensine (peptidi dell'immunità innata) da parte dei tessuti di polipo nasale di pazienti con FC rispetto ai soggetti sani; una diversa espressione (o attività) di queste proteine potrebbe aprire la strada a terapie antibatteriche suppletive nei pazienti affetti da Fibrosi Cistica mediante i peptidi dell'immunità innata.

Maria Cristina Dechecchi (responsabile), Elena Nicolis, Anna Tamanini, Federica Quiri, Barouk M. Assael e Giulio Cabrini.
(Laboratorio Patologia Molecolare, Centro Fibrosi Cistica di Verona)

Maria Cristina Dechecchi (Responsabile del progetto, prima da sinistra) e il suo Gruppo di ricerca

Interazione in vitro tra batteri patogeni della fibrosi cistica e cellule epiteliali che esprimono la proteina CFTR

Nel polmone FC, l'infezione cronica da Pseudomonas aeruginosa (PA) è associata ad accumulo di neutrofili richiamati tramite fattori solubili, quali IL-8, e molecole adesive, quali ICAM-1. Inoltre, l'infezione da PA sembra amplificare uno stato infiammatorio, già presente in FC, dipendente dalla proteina CFTR mutata. Questo progetto intende studiare la relazione tra accumulo di CFTR mutata, difetto funzionale e risposta infiammatoria, mediante i marcatori IL-8 ed ICAM-1. Abbiamo messo a punto il modello sperimentale in una linea cellulare epiteliale murina (C127) che esprime la CFTR normale oppure DF508. Dopo infezione con PA, la risposta infiammatoria è significativamente maggiore nelle cellule esprimenti CFTR DF508. L'estensione dello studio alle linee bronchiali umane derivanti da pazienti FC, denominate IB3 (genotipo DF508/W1282X) e CuFi-1 (genotipo DF508/DF508), ci ha confermato che PA attiva una risposta infiammatoria marcatamente più elevata in presenza di CFTR DF508. Quindi stiamo valutando se molecole in grado di correggere il difetto di maturazione della CFTR DF508 normalizzano questa risposta. Come correttori della CFTR DF508, stiamo utilizzando i composti

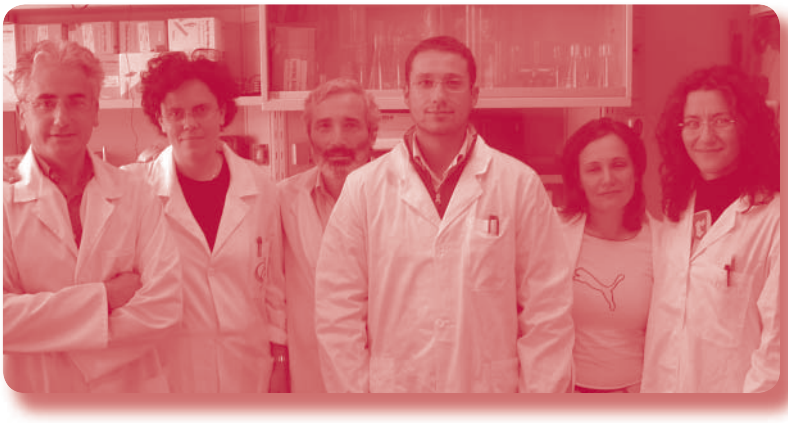
benzochinolizinici (MPB) già descritti dal gruppo di F.Becq dell'Università di Poitiers. Sia in cellule IB3 che in cellule CuFi-1, MPB-07 riduce significativamente l'espressione di mRNA di ICAM-1 e di IL-8, indotta da PAO1 e ripristina la funzione di trasporto del cloro CFTR-dipendente. Indipendentemente dal meccanismo d'azione, MPB-07 ha un effetto anti-infiammatorio nelle cellule FC e, nella prosecuzione di questo studio, verrà utilizzato come strumento per approfondire la relazione tra difetto di maturazione di CFTR DF508 e risposta infiammatoria all'infezione da PA, in cellule respiratorie FC.

Alfonso Pompella (Responsabile del progetto, primo a sinistra) con il suo Gruppo di ricerca

Alfonso Pompella
(Dip. Patologia Sperimentale BMIE, Scuola Medica, Università di Pisa)

Danno infiammatorio cronico in corso di fibrosi cistica: ruoli protettivi della gamma glutamiltransferasi e dell'acido ascorbico

Una parte importante delle alterazioni patologiche che si verificano nei polmoni dei pazienti affetti da fibrosi cistica sono il risultato del ripetersi nel tempo di infezioni, con l'instaurarsi di condizioni di infiammazione cronica. Per far fronte agli agenti patogeni le cellule infiammatorie attivate secernono nel tessuto abbondanti quantità di sostanze tossiche, in primo luogo radicali liberi ad azione fortemente ossidante. Oltre che ai germi responsabili delle infezioni, il tessuto polmonare del paziente viene così ad essere esposto continuamente anche all'azione lesiva di queste sostanze derivanti dal processo infiammatorio. In realtà, il cosiddetto "danno infiammatorio" costituisce forse il principale fattore nell'inesorabile deterioramento delle funzioni polmonari in questi pazienti. E' essenziale dunque che nelle cellule degli epiteli respiratori, come in tutte le cellule dell'organismo, siano garantiti adeguati livelli di sostanze antiossidanti, che gli permettano di difendersi in condizioni di prolungata ed eccessiva attivazione del processo infiammatorio. Due fra le principali di queste sostanze antiossidanti sono il glutatione e la Vitamina C (acido ascorbico). I proponenti del presente progetto hanno recentemente scoperto un nuovo meccanismo con il quale il glutatione e l'enzima gamma-glutamiltransferasi – entrambi presenti, ma a livelli alterati, nei fluidi polmonari dei pazienti FC – potrebbero sinergicamente modulare il rifornimento di Vit. C da parte delle cellule delle vie respiratorie. Gli studi che vengono proposti hanno l'obbiettivo di verificare questa ipotesi, e di definire i dettagli biochimici di questi processi, utilizzando linee cellulari coltivate di origine polmonare umana. Verranno così poste le basi di conoscenza per lo sviluppo di strategie terapeutiche miranti a favorire l'assorbimento di Vit. C nelle cellule polmonari, allo scopo di aumentare la loro resistenza nei confronti del danno infiammatorio cronico.



Mario Romano (Coordinatore del progetto, terzo da sinistra) con il suo Gruppo di ricerca

Mario Romano, Luciana Iapichino
(Università G. D'Annunzio, Chieti; Centro Fibrosi Cistica, Ospedale dei Bambini "G.Di Cristina", Palermo)

La lipoxina A4 nella fibrosi cistica: biosintesi e trasduzione del segnale.

L'infiammazione polmonare rappresenta una causa primaria di mortalità e morbilità in pazienti affetti da fibrosi cistica (FC). L'apparato respiratorio di tali pazienti è affetto da un persistente stato infiammatorio che non evolve verso la risoluzione, anche in assenza di colonizzazione batterica. Questa evidenza suggerisce che nella FC si possa verificare una alterazione dei meccanismi della risoluzione della reazione infiammatoria. Una conferma a questa ipotesi viene da osservazioni recenti che mostrano come i livelli dell'anti-infiammatorio endogeno lipoxina A4, generato attraverso il metabolisno lipossigenasico dell'acido arachidonico, siano ridotti nei fluidi di broncolavaggio alveolare di pazienti con FC. Inoltre, è stato riportato che un'analogo stabile della lipoxina A4 si è dimostrato efficace nel sopprimere l'infiammazione mediata dai polimorfonucleati neutrofili e nel ridurre la severità della malattia in un modello murino di FC. Queste osservazioni indicano che i processi di biosintesi della lipoxina A4 e il signaling di questo eicosanoide attraverso l'attivazione del suo recettore specifico, FPRL1/ALX, possano rappresentare nuovi bersagli molecolari per lo sviluppo di terapie innovatìve per controllare l'infiammazione polmonare nella FC.

Con il presente progetto ci proponiamo di:
1. Analizzare i meccanismi responsabili della ridotta biosintesi di lipoxina A4 nella FC. In particolare, cercheremo di verificare l'ipotesi che la mutazione ΔF508 CFTR possa influenzare livelli di espressione e/o funzione degli enzimi coinvolti nella formazione della lipoxina A4.
2. Determinare se espressione e/o funzione di FPRL1/ALX siano alterati nella FC e se siano influenzabili dalla mutazione ΔF508 CFTR.
3. Valutare l'impatto dell'attivazione di FPRL1/ALX da parte della lipoxina A4 su meccanismi della risposta dell'ospite ad agenti batterici. Sulla base di dati preiliminari focalizzeremo la nostra attenzione sui recettori della famiglia Toll-like.

Per raggiungere tali obiettivi effettueremo valutazioni ex vivo, su campioni biologici e cellule prelevati da pazienti con FC e relativi controlli. In particolare analizzeremo:
a) Livelli urinari di lipoxina A4, utilizzando una metodica messa a punto nel nostro laboratorio.
b) Livelli di espressione di enzimi coinvolti nella biosintesi della lipoxina A4, mediante real-time PCR, western blotting, RP-HPLC.
c) Livelli di espressione e signaling di FPRL1/ALX.
A tale scopo, metteremo a punto una strategia integrata combinando analisi di microarray, proteomica, lipidomica.
Inoltre, impiegheremo linee cellulari di epitelio respiratorio umano normale o con la mutazione ΔF508 CFTR. In queste linee cellulari il gene CFTR verrà overespresso mediante transfezione stabile o silenziato attraverso interferenza a RNA.

Flavia Bazzoni
(Dipartimento di Patologia, sezione Patologia Generale, Università di Verona)

Flavia Bazzoni (Responsabile del progetto)

Ruolo di SOCS3 nelle cellule infiammatorie in risposta a stimoli di origine batterica

Il progressivo declino delle funzioni polmonari, frequente causa di decesso nei pazienti CF, è causato dall'infiammazione precoce, dominata dai granulociti neutrofili, e dall'infezione cronica delle vie aeree. L'accumulo di neutrofili in queste vie è quantitativamente maggiore nei pazienti CF ed è associato ad una eccessiva e prolungata attivazione, a liberazione di citochine proinfiammatorie, di proteasi, di alcune specie di radicali reattivi dell'ossigeno che contribuiscono al danno delle vie aeree e rinforzano l'infiammazione iniziale, perpetuandola.
Mentre lo studio delle vie di attivazione dei PMN hanno portato alla definizione dei meccanismi intracellulari responsabili della sintesi di citochine proinfiammatorie e del prolungamento della sopravvivenza di queste cellule attivate, i meccanismi che controllano l'entità e la durata delle risposte dei PMN a citochine pro-infiammatorie o a stimoli di origine batterica non sono ancora ben definiti. La comprensione di questi meccanismi molecolari aprirebbe la strada a nuove strategie di intervento terapeutico, mirate allo spegnimento dell'infiammazione attraverso il po-

tenziamento dei meccanismi di controllo negativo dell'attivazione dei neutrofili. In questo contesto il nostro progetto di ricerca si pone l'obiettivo di identificare il ruolo ed il meccanismo d'azione della proteina SOCS-3 nelle risposte delle cellule infiammatorie (neutrofili e monociti) a citochine proinfiammatorie e stimoli di origine batterica. SOCS-3 ha suscitato un notevole interesse nell'ambito dei possibili meccanismi coinvolti nel controllo negativo delle risposte infiammatorie per la sua capacità di spegnere le risposte cellulari a diverse citochine e stimoli proinfiammatori. Inoltre, SOCS-3 è l'unico membro della famiglia delle proteine SOCS rapidamente indotto nei PMN in risposta a numerose citochine e a stimoli di origine batterica. Tuttavia non è ancora chiaro quale ruolo svolga nelle risposte cellulari dei PMN, né se la sua espressione modifichi l'entità e la durata dell'attivazione di queste cellule. Abbiamo quindi deciso di definire il ruolo di SOCS-3 attraverso l'analisi delle risposte dei PMN in cui l'espressione di SOCS-3 sia stata silenziata da small interfering RNAs (siRNA) in grado di interferire e bloccare l'espressione di SOCS-3. Allo stato attuale abbiamo portato a termine la prima parte del progetto, generando siRNA in grado di silenziare al 60% l'espressione di SOCS-3. Il secondo presupposto per una buona riuscita di questo approccio sperimentale consiste nella capacità di introdurre queste molecole di RNA a doppio filamento in modo efficiente nei PMN. Nello studio da noi condotto fino ad ora, abbiamo messo a punto le condizioni ottimali per trasfettare in modo efficiente questi siRNA sia in PMN che in monociti primari e abbiamo confermato la capacità di limitare l'espressione della proteina SOCS-3 endogena indotta nei PMN e nei monociti in risposta a diversi stimoli . Siamo ora in grado di analizzare se la produzione di citochine pro- (TNFα, CXCL8, MIP1α) o anti-infiammatorie (IL-1ra) o se la sopravvivenza di queste cellule attivate da prodotti di origine batterica siano modificate in condizioni di ridotta espressione di SOCS-3.

Paola Melotti^ *(Responsabile)*, **Matteo Pasetto^, Elena Nicolis^, Cristina Cigana^, Cinzia Bersani^, Ugo Pradal^, Valeria Casotti^, Baroukh M. Assael^, Massimo Negrini*, Manuela Ferracin*** *(assistenza tecnica:* **Federica Quiri^, Petra Benedetti^)**

*(^ Centro Fibrosi Cistica di Verona - Az. Osp. di Verona; *Centro Interdipartimentale per la Ricerca sul Cancro - Università di Ferrara Partecipano all'attuale progetto multicentrico: Centro Fibrosi Cistica di Verona - Az. Osp. di Verona: Cristina Cigana, Gabriella Bergamini, Elena Nicolis, Federica Quiri, Baroukh M. Assael; Sez. Patologia Generale - Università di Verona: Claudio Sorio (coordinatore), Marzia Vezzalini, Marco Della Peruta, Andrea Mafficini; Istituto Tecnologie Biomediche, CNR- Segrate (MI): Pierluigi Mauri , Louise Benazzi, Fabrizio Basilico, Enrico Rosti; Istituto per la Terapia Sperimentale della Fibrosi Cistica, Istituti Scientifici San Raffaele, Milano: Alessandra Bragonzi).*

Paola Melotti (Coordinatrice del progetto, prima a sinistra) ed i due partners di progetto, Claudio Sorio e Pierluigi Mauri

Ruoli non battericidi dell'azitromicina: rilevanza per la terapia della fibrosi cistica.

Lo studio è stato finalizzato ad evidenziare come l'azitromicina (AZM) possa essere rilevante per la terapia della fibrosi cistica (FC), in particolare mediante meccanismi distinti da quelli antibatterici, caratteristici di questo antibiotico.

L'AZM è risultata capace di ridurre la produzione di interleuchina 8 (IL-8), un importante mediatore dell'infiammazione in FC. Tali risultati si sono ottenuti in diversi modelli di epitelio delle vie respiratorie con caratteristiche della FC usando distinti metodi in grado di individuare l'espressione di questa molecola a vari livelli. L'effetto antiinfiammatorio è stato ulteriormente approfondito nelle sue modalità, risultando che l'AZM inibisce l'attività di alcuni fattori importanti per la produzione di molecole infiammatorie, tra le quali è in-

clusa l'IL-8, come abbiamo evidenziato in modelli di FC utilizzati in questo studio.
L'analisi su larga scala di geni influenzati dall'AZM ha portato all'identificazione, con diversi metodi, di nove nuovi bersagli dell'AZM, alcuni dei quali potrebbero essere rilevanti per l'attività anti-infiammatoria del farmaco.
Considerando la variabilità della risposta alla terapia con AZM tra i pazienti con FC, si è cercato di individuare eventuali caratteristiche genetiche appropriate per distinguere i pazienti che possono trarre benefici dalla terapia con AZM. I risultati ottenuti a questo proposito non permettono per ora di proporre un'analisi genetica utile allo scopo ma stanno gettando le basi per interessanti collaborazioni.
Per proseguire lo studio si intendono utilizzare sia i modelli cellulari già presi in esame, derivati da epitelio delle vie aeree di pazienti con FC, sia topi le cui vie aeree verranno infettate da Pseudomonas aeruginosa (Pa), un germe presente in maniera caratteristica molti pazienti affetti da FC. In particolare in entrambi i modelli si introdurranno stimoli pro-infiammatori o batterici simili a quelli a cui viene esposto l'epitelio delle vie aeree nei pazienti con FC. Si potranno così analizzare più specificamente gli effetti dell'AZM sulla risposta infiammatoria a diversi stimoli.
Inoltre, per mezzo di tecnologie originali e sofisticate messe a punto da partners coinvolti nello studio multicentrico, si valuterà su larga scala l'effetto dell'AZM sull'espressione di proteine effettuando analisi proteomica.
Poichè l'utilizzo dell'AZM per la terapia della FC è ormai largamente diffuso, pur conoscendo ancora poco sui suoi meccanismi di azione, si considera di particolare interesse la ricerca dei bersagli di questo farmaco. Questa potrebbe consentire l'ottimizzazione dell'uso dell'AZM, una miglior comprensione dei processi che stanno alla base delle manifestazioni della FC e l'eventuale proposta di altre molecole che possano avere effetti simili, possibilmente superiori, a quelli dell'AZM.

Emanuele Giordano
(Istituto Nazionale di Ricerca Cardiovascolare, Università di Bologna/Cesena

Effetto degli antibiotici macrolidi sul trasporto ionico attraverso la proteina-canale CFTR

Nel trattamento della patologia infettiva/infiammatoria che si manifesta in corso di fibrosi cistica, possono essere utilizzati antibiotici macrolidi (p. es. eritromicina, claritromicina, azitromicina e roxitromicina). In alcuni soggetti tali farmaci non riescono a eradicare l'infezione dell'albero bronchiale, tuttavia essi sono in grado di produrre comunque effetti positivi in termini di benessere e di sopravvivenza.
Il meccanismo biochimico implicato in tale fenomeno non è stato ancora chiarito, anche se è ipotizzato un coinvolgimento di questi composti sia nei processi di maturazione della proteina CFTR sia nel trasporto ionico del cloro attraverso il canale che essa forma.
E' noto invece che fra gli effetti collaterali dei macrolidi vi sia la capacità di allungare la durata l'intervallo QT nell'elettrocardiogramma. Non sembra sufficiente a spiegare questo fenomeno la loro descritta interazione con specifiche proteine-canale che regolano il flusso di potassio attraverso la membrana delle cellule muscolari cardiache. Recentemente la presenza della proteina-canale

Emanuele Giordano (Responsabile del progetto, terzo da sinistra) e il suo Gruppo di ricerca

CFTR è stata dimostrata anche in queste cellule, altrimenti dette cardiomiociti, nelle quali essa parteciperebbe alla formazione del potenziale d'azione insieme ad altre conduttanze ioniche determinate da sodio, potassio e calcio.
L'obiettivo del nostro progetto è la verifica dell'effetto dei macrolidi sul potenziale d'azione nei cardiomiociti, valutando l'ipotesi specifica che le correnti del cloro partecipino all'insorgenza di un profilo pro-aritmogeno.
Questo studio verrà condotto attraverso un approccio interdisciplinare che implica l'acquisizione di dati sperimentali relativi (a) ai potenziali elettrici di membrana in cellule muscolari cardiache e (b) alla conduttanza del canale CFTR, naturalmente espresso ovvero ricostituito in vitro in sistemi di espressione eterologhi e/o in doppi strati lipidici planari. Si farà inoltre riferimento alla modellazione degli stessi paramentri al com-

puter (in silico) secondo protocolli ormai standardizzati.
Riteniamo che la definizione delle proprietà farmacologiche alternative alla classica azione antibiotica dei macrolidi possa essere utile alla comprensione dei meccanismi molecolari ai quali ricondurre parte della loro attività terapeutica in corso di fibrosi cistica e a indicare strategie per il disegno razionale di nuovi farmaci per questa patologia.

Olga Zegarra-Moran (Coordinatrice del progetto) ed i due partners di progetto Giovanni Candiano e Luca Bini

Olga Zegarra-Moran[1], Nicoletta Pedemonte[1], Giovanni Candiano[2], Maurizio Bruschi[2], Sabrina Liberatori[3], Luca Bini[3], Luis J.V. Galietta[1]

([1]Laboratorio di Genetica Molecolare e [2]Laboratorio di Nefrologia, Istituto G. Gaslini, Genova. [3]Dipartimento di Biologia Molecolare, Univ. Degli Studi di Siena)

Proteomica del liquido di superficie delle vie aeree: implicazioni per la fibrosi cistica

Ogni volta che l'aria penetra le vie aeree durante la respirazione, porta con sé particelle di polline, cenere, spore, batteri, virus, etc. Questi elementi possono danneggiare il polmone e quindi è necessario che siano eliminati. Le particelle ed i microorganismi vengono, infatti, intrappolati nello strato mucoso che risiede sopra il fluido che ricopre le vie aeree, il fluido periciliare, e convogliati verso l'orofaringe, tramite le cilia, per essere eliminati. Il fluido periciliare è importante per mantenere idratato lo strato mucoso, ma anche perché contiene sostanze, principalmente proteine, coinvolte nei meccanismi di difesa dai batteri. Lo scopo di questo progetto è l'identificazione delle proteine secrete dall'epitelio bronchiale nel fluido periciliare come strategia per definire i fattori coinvolti nel ruolo di barriera dell'epitelio delle vie aeree. Questo è particolarmente importante se s'ipotizza che, nella fibrosi cistica (FC), la perdita o la riduzione di alcuni di questi fattori può avere un ruolo nella colonizzazione batterica. Nel primo anno del progetto sono state identificate svariate proteine mediante spettrometria di massa. Il lavoro è continuato durante il secondo anno portando il livello d'identificazione a 180 spot proteici. Di questi circa la metà è risultata essere modulata da stimoli infiammatori quali TNF-α, interleuchina-1α, interleuchina-4 o interferone-γ. Fra le proteine identificate, risaltano in particolare l'intelectina, la proteina PLUNC e la proteina von Ebner, tutte appartenenti a famiglie di proteine coinvolte nella neutralizzazione dei batteri in altri organi ed identificate, per la prima volta, nel fluido di superficie delle vie aeree. Abbiamo trovato inoltre che il fluido periciliare ha un'attività proteasica indotta dagli stimoli infiammatori. Tramite l'uso d'inibitori specifici e d'anticorpi, abbiamo identificato la proteina responsabile di quest'attività come la metalloproteinasi 2. Abbiamo studiato inoltre il fluido superficiale ottenuto da epiteli di alcuni pazienti FC con fenotipo severo. In questi si riscontra molta variabilità nei livelli di secrezione delle varie proteine. Ciò indica che, come avevamo previsto, le differenze individuali pesano molto sui risultati e che quindi sarà necessario analizzare un numero maggiore di campioni da pazienti per potere stabilire con certezza eventuali differenze dovute al genotipo FC e non alla variabilità individuale. Allo scopo di aumentare la statistica stiamo anche analizzando proteine secrete da epiteli ottenuti da polipi nasali di pazienti FC e da soggetti di controllo.

Roberto Biassoni
(Lab. Medicina Molecolare - Istituto Giannina Gaslini, Genova)

Analisi funzionale e biochimica di proteine antimicrobiche nel liquido di superficie (ASL) delle vie aeree

Fra le proteine identificate mediante proteomica dall'ASL prodotto da colture delle cellule epiteliali della via aeree, la proteina di von Ebner prodotta dalla ghiandola salivare secondaria (VEMSGP) e la Intelectina (hIntL) potrebbero essere caratterizzate da funzioni antibatteriche e svolgere un ruolo come molecole effettrici nell'immunità innata e nel controllo di colonizzazione dei batteri. VEMSGP nota anche come LPLUNC1, appartiene ad una famiglia di proteine dette (PLUNCs) secrete da cellule epiteliali della vie respiratorie (palato, polmone ed epitelio nasale). Queste PLUNC sono strutturalmente simili alla proteina BPI (Bactericidal Permeability Increasing) nota per l'azione battericida, suggerendo che anche queste proteine, fra cui VEMSGP/LPLUNC1 possano avere un ruolo nella risposta immunitaria innata in questi tessuti. Almeno 9 geni, codificanti per proteine simili a BPI, mappano sul cromosoma 20q11.21 vicino al gene per BPI.
L'omologia strutturale con il BPI suggerisce che la funzione antibatterica possa essere conservata anche per PLUNC e che queste proteine possano interagire con LPS, come dimostrato dal fatto che legano superfici rivestite con LPS. Inoltre, osservazioni supplementari indicano che i membri di questa famiglia potrebbero avere un ruolo nella difesa antibatterica dell'ospite. Infatti, le proteine SPLUNC del ratto e PSP (proteina secretiva parotidea) murina, possono interagire con le membrane batteriche, PSP umano (SPLUNC2) e' caratterizzata da effetti batteriostatici o battericidi su Pseudomonas aeruginosa come dimostrato in "colony-forming assay" mentre SPLUNC1 umano è presente nella frazione delle secrezioni nasali umane ad attivita'antimicrobica.
L'Intelectina (hIntL), nota anche come il recettore della lattoferrina, recentemente è stato dimostrata legarsi selettivamente a residui di galactofuranosio dell'arabinogalattano batterico presenti sulla membrana di vari microorganismi come streptococco, micobatteri e nocardia, ma assente su cellule di mammifero.
Il riconoscimento dei carboidrati risulta essere importante nell'induzione delle risposte cellulari e delle reazioni immuni di tipo umorale coinvolte nell'eliminazione degli agenti patogeni. Nella risposta immunitaria innata, differenti lectine sono coinvolte nella fagocitosi mediante l'interazione con recettori cellulari specifici o per agglutinazione ed opsonizzazione ed inducono la cascata dei fattori del complemento lectino-dipendenti. Inoltre, la lattoferrina è una delle proteine più abbondanti presenti nell'ASL a funzione antimicrobica ed e' possibile speculare che il recettore della lattoferrina (hIntL) possa legare lattoferrina e veicolarla al microorganismo per svolgere la funzione antibatterica.
D'altra parte, altri meccanismi di azione della hIntL possono essere possibili e possono dipendere dal legame diretto con LPS e possono avere un ruolo nella risposta antinfiammatoria, come osservato per BPI. Se questa ultima ipotesi fosse dimostrata la funzione del hIntL potrebbe essere favorevole per controllare l'infiammazione cronica delle via aerea tipica dei pazienti con CF.

Roberto Biassoni (Responsabile del progetto) con il suo Gruppo di ricerca

MODERATORI DELLE SESSIONI

1. GENETICA MOLECOLARE

Prof Pierfranco Pignatti

Direttore Sezione di Biologia e Genetica, Dipartimento Materno-Infantile, Università di Verona.

2. FISIOPATOLOGIA CFTR E TERAPIE DEL DIFETTO DI BASE

Prof. Antonio Cao

Direttore Istituto di Neurogenetica e Neurofarmacologia del CNR, Università di Cagliari; Presidente Comitato Scientifico della Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica

3. RICERCA CLINICA ED EPIDEMIOLOGICA

Dr Roberto Buzzetti

Specialistica in Statistica Medica, esperto in Epidemiologia e in EBM; membro del Comitato Scientifico della Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica

4. MICROBIOLOGIA E INFEZIONE

Dr. Vittorio Venturi

Responsabile Laboratorio di Batteriologia dell' International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, Padriciano Trieste

5. INFIAMMAZIONE

Prof Giorgio Berton

Direttore Sezione di Patologia Generale, Dipartimento di Patologia, Università di Verona; membro del Comitato Scientifico della Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica

PROGETTI DI RICERCA ADOTTATI FINO A NOVEMBRE 2005

FFC #1/2002 - Minichromosomes.
Responsabile: Prof. Fiorentina Ascenzioni
(Univ. La Sapienza - Roma);
Adottato totalmente da:
La Bottega delle donne - Delegazione FFC di TV

FFC #3/2003 - Novel pharmacological tools for CF.
Responsabile Dr. Luis Galietta
(Ospedale G. Gaslini, Genova);
Adottato parzialmente da:
Fondazione Cariverona

FFC #8/2003 - Gene regulation and adaptive mutations of Ps aeruginosa.
Responsabile Dr.ssa Alessandra Bragonzi
(Osp. San Raffaele, Milano);
Adottato totalmente da:
Delegazione FFC di Bologna

FFC #11/2003 - Pathogenesis and treatment of CF related liver disease.
Responsabile Dr. Mario Strazzabosco
(Ospedali Riuniti, Bergamo);
Adottato parzialmente da:
Fondazione Cariverona

FFC #1/2004 - Dissection of folding/re-foldig processes in CFTR.
Responsabile Prof. Marco Colombatti
(Dip. Patologia - Univ. Verona);
Adottato parzialmente da:
Liceo Scientifico Messedaglia - VR

FFC #2/2004 - Chemoreceptor mechanism in CFTR expressing cells.
Responsabile Prof. Francesco Osculati
(Dip. Scienze Morfol. Biom. - Univ. Verona);
Adottato parzialmente da:
Istituto "Fermi" VR e Istituto Comprensivo "Santini" - Noventa Padovana

FFC #4/2004 - Role of Adenovirus receptors.
Responsabile Dr.ssa Anna Tamanini
(Centro Fibrosi Cistica - Verona);
Adottato totalmente da:
Associazione Veneta FC

FFC #5/2004 - Screening of CFTR gene rearrangements in Italian CF patients.
Responsabile Prof. Giuseppe Castaldo
(Univ. Federico II - Napoli);
Adottato totalmente da:
Verona Fiere

FFC #6/2004 - Do hyperoxaluric - hypocitraturic calcium renal stone formers represent a new Cf related disorder?
Responsabile Prof. Antonio Lupo
(Dip. Nefrologia - Osp. Maggiore, VR);
Adottato totalmente da:
Fondazione "Zanotto" - VR

FFC #7/2004 - The CF mutation spectra in Italy.
Responsabile Prof. Alberto Piazza
(Dip. Genetica e Biochimica - Univ. Torino);
Adottato parzialmente da:
Delegazione FFC di Belluno

FFC #8/2004 - CF: characterization of the unknown mutations.
Responsabile Prof.ssa Cristina Rosatelli
(Osp. Microcitemici - Cagliari);
Adottato totalmente da:
Gruppo Alimentare Rossetto - VR

FFC #10/2004 - Genome-wide identification of target genes.
Responsabile Dr. Giovanni Bertoni
(Dip. Scienze Biomolec. E Biotecn. - Univ. Milano);
Adottato totalmente da:
Valentino Gruppo Marzotto SpA- MI

FFC #11/2004 - Evaluation of the pathogenicity of environmental and clinical isolates of B. cepacia complex.
Responsabile Dr.ssa Annamaria Bevivino
(ENEA – Casaccia – Roma);
Adottato parzialmente da:
Associazione Laziale e Lombarda FC

FFC #12/2004 - Antimicrobial resistance in B. cepacia complex from CF patients.
Responsabile Dr.ssa Giovanna Riccardi
(Dip. Genetica e Microbiol. - Univ. Pavia);
Adottato totalmente da:
Mauro Furlini e Sigg. Zini in collaborazione con Delegazione FFC Trento in ricordo di "Sara"

FFC #13/2004 - Role of SOCS3 in the imflammatory cells responses.
Responsabile Dr.ssa Flavia Bazzoni
(Dip. Patologia - Univ. Verona);
Adottato parzialmente da:
Liceo Scienze Umane "Montanari" - VR

FFC #14/2004 - Interaction in vitro between CF pathogens and epithelial cells.
Responsabile Dr.ssa Cristina Dechecchi
(Centro Fibrosi Cistica - Verona);
Adottato totalmente da:
Associazione Veneta FC

FFC #16/2004 - Nasal polyps of CF patients as an ex vivo model to study inflammation.
Responsabile:
Dr.ssa Valeria Raia (Univ. Federico II - Napoli);
Adottato totalmente da:
Delegazione FFC di Latina in ricordo di "Saretta"

FFC #17/2004 - Inflammation and apoptosis in CF airway epythelium.
Responsabile Dr.ssa Francesca Zazzeroni
(Dip. Medicina Sperimentale
Univ. Dell'Aquila);
Adottato totalmente da:
Associazione Siciliana FC

FFC #18/2004 - Early eradication of Ps aeruginosa.
Responsabile Dr. Giovanni Taccetti
(Centro Fibrosi Cistica
Osp. A. Meyer, Firenze);
Adottato totalmente da:
Milior S.p.A. - Prato

FFC #19/2004 - Quality control and update of follow-up data in the Italian CF registry.
Responsabile Dr.ssa Anna Bossi
(Istituto di Statistica Medica e Biometria - MI);
Adottato parzialmente da:
Uovador S.p.A. - VR

FFC #5/2005 – Gene correction in human embryonic stem cells mediated by Small Fragment Homologous Replacement (SFHR).
Responsabile Dott.ssa Federica Sangiulo
(Università Tor Vergata, Roma)
Adottato parzialmente da :
Medusa Film S.pA.

FFC #6/2005 – Community-acquired MRSA and hospital acquired MRSA in cystic fibrosis patients: a multicentre study regarding antibiotic susceptibility, epidemiology, natural history and clinical revelance.
Responsabile Dott.ssa Silvia Campana
(Centro Fibrosi Cistica Ospedale A. Meyer, FI)
Adottato totalmente da:
Latteria Montello - TV

FFC #11/2005 – Lipoxin A4 formation and signalling in cystic fibrosis.
Responsbile Dott. Mario Romano
(Università G. D'Anunzio, Chieti)
Adottato totalmente da:
Delegazione FFC di Trento
Associazione Trentina FC

FFC #13/2005 – Functional and Biochemical analysis of anti-microbial proteins in airways surface lining fluid (ASL).
Responsabile Dott. Roberto Biassoni
(Laboratorio Medicina Molecolare – Istituto G. Gaslini , Genova)
Adottato totalmente da:
Mondadori Printing S.p.A.

FFC #15/2005 – Splicing affecting Genomic Variants in CFTR: Diagnostic and Therapeutic Aspects.
Responsabile Dott. Franco Pagani
(Centro Internazionale per l'Ingegneria Genetica e Biotecnologie ICBERG, Trieste)
Adottato totalmente da:
Delegazione FFC "La Bottega delle Donne" Montebelluna (Tv)

FFC #17/2005 – Multicenter Validation of a Disease-Specific Health-Related Quality of Life questionnaire (The Cystic Fibrosis Questionnaire –Cfq-R).
Responsabile Dott.ssa Rita Nobili
(Centro Fibrosi Cistica – Fond. IRCCS, MI)
Adottato totalmente da:
Delegazione FFC di Rovigo a ricordo di Francesca Menin

FFC #14/2005 – New approaches for non invasive prenatal diagnosis of cystic fibrosis by fetal DNA analysis in maternal plasma.
Responsabile Dott.ssa Laura Cremonesi
(Centro San Raffaele – Milano)
Adottato parzialmente da:
Club della Ricerca -Verona

fondazione per la ricerca sulla fibrosi cistica
italian cystic fibrosis research foundation

presso Ospedale Maggiore B.go Trento
P.le A. Stefani, 1 - 37126 Verona

Presidenza e Segreteria:
tel. 045 8073438 - fax 045 8073568
e - mail: fondazione.ricercafc@azosp.vr.it

Direzione Scientifica:
tel. 045/8073567 - cell 347 6287890
e - mail: gianni.mastella@azosp.vr.it
www.fibrosicisticaricerca.it

Presidente: Vittoriano Faganelli
Direttore Scientifico: Gianni Mastella

Comitato di Consulenza Scientifica
Presidente: Antonio Cao
Consiglieri: Giorgio Berton
Roberto Buzzetti
Lucio Luzzatto
Nello Martini

PER DONAZIONI

- *c/c postale nr. 18841379*
- *Bonifico Unicredit Banca: c/c 9465517 - ABI 2008 CAB 11718 - CIN N*
- *Bonifico Banca Popolare di Verona: c/c 48829 - ABI 5188 - CAB 11708 - CIN V*
- *On-line sul sito: www.fibrosicisticaricerca.it*

Le donazioni sono deducibili fino al 10% del reddito complessivo e comunque non oltre 70.000 euro/anno (art. 14 legge n. 80/2005)

Progetto grafico copertina:
Giovanna Dolfini

Progetto grafico struttura interna:
Luca Fantoni

Stampato il 13 novembre 2005
Tipografia Artigiana - S. Giovanni Lupatoto (VR)

fondazione per la ricerca sulla fibrosi cistica
italian cystic fibrosis research foundation

Ospedale Maggiore - Piazzale Stefani, 1 - 37126 VERONA
Tel. 045 8073438 Fax 045 8073568
e-mail: fondazione.ricercafc@azosp.it
www.fibrosicisticaricerca.it