Bollettino quadrimestrale della Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica - Spedizione in Abbonamento Postale – D.L. 353/2003 (conv. in L. 27/02/2004 n. 46) art. 1, comma 2, DCB VERONA

Notiziario FFC

FONDAZIONE PER LA RICERCA SULLA FIBROSI CISTICA - ONLUS
Italian Cystic Fibrosis Research Foundation
Presso Ospedale Maggiore, Piazzale Stefani, 1 - 37126 Verona

N. 13 - AGOSTO 2005

3ª Settimana della Ricerca Italiana Fibrosi Cistica

24/30 ottobre 2005

Unisciti a noi: organizza un evento nella tua città!

Appuntamenti Autunno 2005

9-10 Settembre, Trieste
Le molte facce della fibrosi cistica: confronto tra specialisti (congressi@quickline.it)

15-16 Ottobre, Gualdo Tadino (PG)
Attualità in tema di fibrosi cistica (Angelo.cosimi@libero.it)

20-23 Ottobre, Baltimora (USA)
19° Conferenza nordamericana sulla fibrosi cistica (nacf@cff.org)

24-30 Ottobre
III Settimana della Ricerca Italiana per la Fibrosi Cistica (fondazione.ricercafc@azosp.vr.it)

29 Ottobre, Monza
Cosa di nuovo insegna il gene della fibrosi cistica (g.vegetti@hsgerardo.org)

11 Novembre, Verona
Investire in Ricerca e Comunicazione d'impresa: incontro di Aziende interessate al mondo della Ricerca CF (fondazione.ricercafc@azozp.vr.it)

18-19 Novembre, Verona
III Convention dei Ricercatori Italiani CF (fondazione.ricercafc@azosp.vr.it)

1-3 Dicembre, Roma
I° Congresso della Società Italiana Fibrosi Cistica (p.massimi@ideacpa.com)

Visitate il sito della Fondazione FC
www.fibrosicisticaricerca.it

IN QUESTO NUMERO

- **Editoriale:** le linee di ricerca finanziate dalla Fondazione ed i Gruppi di Ricerca CF . . . Pag. 2
- I nuovi progetti di ricerca 2005 e l'offerta di nuove adozioni . . . Pag. 5
- I progetti adottati dal 2002 al 2004 e gli adottanti . . . Pag. 9
- Dal III Seminario di Primavera . . . Pag. 10
- Reports dal Congresso Europeo sulla Fibrosi Cistica: Creta . . . Pag. 19

Domande significative dal sito della Ricerca CF . . . Pag. 23

Eventi FFC
- III Settimana della Ricerca Italiana CF . . . Pag. 26
- Investire in Ricerca e Comunicazione d'Impresa (convegno) . . . Pag. 27
- 10 Amici per la Ricerca CF . . . Pag. 27
- Estate 2005: eventi significativi . . . Pag. 28
- Riunione del Consiglio di Amministrazione della Fondazione . . . Pag. 31

Inserto
Stato di avanzamento e risultati delle ricerche finanziate dalla Fondazione dal 2002 al 2004 . . . Pag. 32
Allegato: *Il programma "10 Amici per la Ricerca FC" con i bollettini di c/c postale*

IN CASO DI MANCATO RECAPITO RESTITUIRE ALL'UFFICIO DI VERONA CMP - DETENTORE DEL CONTO, PER LA RESTITUZIONE AL MITTENTE, PREVIO PAGAMENTO RESI

Le linee di ricerca promosse dalla Fondazione ed i Gruppi Italiani di ricerca CF

Questo numero del Notiziario FFC è prevalentemente dedicato a illustrare il percorso di ricerca compiuto dalla Fondazione dal 2002 ad oggi, attraverso il suo sostegno a progetti di ricerca innovativi, selezionati tramite bandi pubblici annuali, con lo scopo di rendere partecipi ed edotti i nostri lettori e sostenitori dello sforzo compiuto e dei primi risultati che si stanno ottenendo. E' stata una grande sfida della Fondazione, dettata dalla necessità di evocare le eccellenti energie scientifiche di cui dispone la nostra nazione, 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.

Alla sfida hanno risposto con inatteso vigore numerosi 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 scoperto 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: 53 di essi sono stati sinora selezionati per un finanziamento. : Vi sono coinvolti circa 300 ricercatori complessivamente, distribuiti in 71 laboratori o gruppi di ricerca (si veda l'elenco in appendice a questo editoriale), con 46 responsabili di progetto e 46 partners (alcuni coinvolti 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.
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, circa 2000 complessivamente, che hanno creduto nella nostra iniziativa e che ne hanno reso possibile la realizzazione. Alcuni sostenitori hanno dato un impulso notevole all'iniziativa tramite l'adozione parziale o totale di ben 20 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 2005 2 milioni di euro.

Fin dall'inizio di questa avventura è stato imperativo guida della Fondazione e del suo Comitato Scientifico quello di puntare alla qualità dei progetti, senza concessioni ad aspetti politici o di convenienza tattica. Questa è stata la condizione condivisa per determinare 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 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 membrane 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 intensità determinano infezioni respiratorie nei pazienti FC. Si tratta in genere di batteri che si selezio-

nano 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 dar risposte a queste problematiche l'area di ricerca comprende 11 progetti.

E. Ricerca clinica.

È 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 stata sinora 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 ed Infantile, Biologia Genetica-Università di Verona, Verona (4 progetti)
• Dip. Scienze Biomediche e Chirurgiche, Divisione di Nefrologia -Università di Verona, Verona (1 progetto)
• Dip. di Patologia -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)

Nota. Nel tabulato sono indicati tra parentesi i progetti cui il gruppo partecipa con ruolo principale o come partners: uno stesso progetto può vedere coinvolti più gruppi.

I progetti selezionati nel 2005 e aperti a nuove adozioni

Trenta progetti di ricerca CF sono pervenuti a seguito del bando di concorso emanato il 15 dicembre 2004. L'iter selettivo è passato attraverso una prima valutazione del comitato di consulenza scientifica della Fondazione FFC, una revisione di 50 esperti internazionali (almeno due per progetto) e la valutazione finale del comitato scientifico nella seduta del 17 giugno 2005. 17 sono stati i progetti definitivamente scelti per un finanziamento. Vi sono coinvolti complessivamente 175 ricercatori appartenenti a 50 gruppi o laboratori di ricerca, così' suddivisi: Abruzzo (2 gruppi), Calabria (1), Campania (2), Emilia-Romagna (2), Friuli- Venezia Giulia (2), Lazio (9), Liguria (7), Lombardia (8), Marche (1), Piemonte (1), Puglia (3), Sicilia (2), Toscana (3), Veneto (7). I progetti sono inquadrabili in 5 aree principali: A. Proteina CFTR e interventi correttivi del difetto di base (5 progetti); B. Batteri emergenti e infezione respiratoria (4 progetti); C. Infiammazione polmonare e prospettive terapeutiche (4 progetti); D. Genetica molecolare applicata alla diagnosi (2 progetti); E. Ricerca clinica (2 progetti). La Fondazione ha stanziato complessivamente per i 17 progetti la somma di euro 650.000 (incluse le spese per l'iter selettivo).

Forniamo di seguito l'elenco dei progetti selezionati, proponendoli per nuove adozioni ai nostri sostenitori. Ricordiamo che le adozioni possono essere totali o parziali.
Per informazioni sulla pratica di adozione preghiamo contattare la sede della Fondazione (signora Antonella Milanesi, tel. 045 807 3599; e-mail: marketing.ffc@azosp.vr,.it).

A. FISIOPATOLOGIA DELLA PROTEINA CFTR E INTERVENTI CORRETTIVI DEL DIFETTO DI BASE

Progetto FFC #1/2005

Role of the scaffolding protein NHERF in the PKA-mediated regulation of CFTR sorting and activity
Ruolo della proteina di interazione NHERF nella regolazione dell'attività e della espressione della proteina - canale CFTR

Responsabile: **prof. Valeria Casavola** (Università di Bari)
Partner: **dr. Manuela Zaccolo** (Istituto Veneto Medicina Molecolare - Padova)
Ricercatori coinvolti: 8. Durata: 2 anni. Finanziamento: € 60.000

Obiettivo: *Analizzare i meccanismi e le dinamiche con cui la proteina NHERF collabora con la proteina CFTR (quella implicata nella fibrosi cistica), per regolarne l'inserimento sulla membrana delle cellule epiteliali e poi l'attività di trasporto del cloro. La comprensione di questi meccanismi rappresenta un passo chiave per lo sviluppo di nuove terapie farmacologiche della fibrosi cistica.*

Progetto FFC #2/2005

Macrolides and ion transport across CFTR
Effetto degli antibiotici macrolidi sul trasporto ionico attraverso la proteina - canale CFTR

Responsabile: **dott. Emanuele Giordano** (Istituto Nazionale di Ricerca Cardiovascolare - Università di Bologna/Cesena)
Ricercatori coinvolti: 11. Durata: 1 anno. Finanziamento: € 25.000

Obiettivo: *Verificare l'effetto dei macrolidi (tipo azitromicina) sul potenziale d'azione della cellula muscolare cardiaca, nel quale è probabilmente implicata la proteina - canale CFTR. Un tale studio su cellule cardiache da un lato può dare informazioni sulla genesi di alcune complicanze cardiache nella FC, dall'altro può consentire di interpretare l'effetto benefico dei macrolidi attraverso una loro azione più diretta sul difetto di base della malattia.*

Progetto FFC #3/2005

Evaluation of PEI-albumin for in vitro and in vivo delivery of CFTR chromosomal vectors in airway model systems
Valutazione di un polimero cationico, la polietilenimina, per il trasferimento di vettori genomici (minicromosomi) a epiteli respiratori in vitro e in vivo

Responsabile: **prof. Fiorentina Ascenzioni** (Università "La Sapienza" - Roma)
Partner: **dott. Massimo Conese** (Ospedale San Raffaele - Milano)
Ricercatori coinvolti: 8. Durata: 1 anno (studio pilota). Finanziamento: € 30.000

Obiettivo: *E' uno studio di terapia genica che intende testare la trasferibilità del gene CFTR normale mediante la sua incorporazione in un complesso sistema (polietilenimina - albumina - minicromosoma) che ne faciliti la penetrazione nelle cellule respiratorie consentendone la piena funzionalità.*
E' lo sviluppo di un precedente studio finanziato dalla Fondazione FFC che aveva portato a costruire un "minicromosoma" contenente il DNA del gene CFTR. Si tratta ora di trasferirlo alle cellule da curare, procedendo da esperimenti in vitro verso esperimenti in topi e poi su

pecore e alla fine su cellule staminali adulte del paziente CF.

Progetto FFC #4/2005

Novel generation lentiviral vectors: evaluation of inflammatory potential in human respiratory cells.
Vettori lentivirali di nuova generazione per la terapia genica della fibrosi cistica: valutazione del potenziale infiammatorio.

Responsabile: **Dott. Giulio Cabrini** (Centro Fibrosi Cistica – Osp. Maggiore, Verona)
Ricercatori coinvolti: 10 (in coll. esterna Dr. E. Copreni – Osp. S. Raffaele, Milano); Durata: 1 anno (studio pilota); Finanziamento: € 30.000

Obiettivo: *i vettori derivati da lentivirus per il trasferimento di copie normali di gene CFTR a cellule FC hanno l'attitudine ad inserire stabilmente il gene curativo nelle cellule respiratorie. Questo studio intende analizzare la possibilità che questi nuovi vettori inducano una risposta infiammatoria in cellule respiratorie umane coltivate in laboratorio, per valutare preliminarmente la sicurezza e l'agibilità del loro impiego in eventuali studi successivi rivolti alla correzione del difetto di base della malattia polmonare CF.*

Progetto FFC#5/2005

CFTR gene correction in human embryonic stem cells mediated by Small Fragment Homologous Replacement (SFHR)
Protocolli di terapia genica del gene CFTR in cellule staminali embrionali umane utilizzando la tecnica SFHR (rimpiazzo di piccoli frammenti di DNA omologo)

Responsabile: **Dr. Federica Sangiuolo** (Università Tor Vergata, Roma)
Partner 1: **Dott. Massimo De Felici** (Univ. Tor Vergata, Roma); Partner 2: **Dott. Lorenzo Guerra** (Univ. Di Bari). Partner 3; **Dott. Marco Lucarelli** (Univ. La Sapienza, Roma)
Ricercatori coinvolti: 16; Durata: 2 anni; Finanziamento: € 60.000

Obiettivo: *Si intende dapprima testare la possibilità di correggere in vitro il gene CFTR di una linea cellulare staminale embrionale umana, omozigote DF508, con la tecnica SFHR, e quindi valutare il ripristino di funzione del canale CFTR nelle cellule trattate. Le cellule corrette verrebbero poi indotte a differenziarsi in epitelio respiratorio, su cui verrebbe ulteriormente misurato il recupero di una normale funzione del canale CFTR. Questi esperimenti sono orientati ad un metodo innovativo di terapia genico-cellulare, con l'intento di superare i molti ostacoli noti, incontrati sinora negli studi di terapia genica con vettori tradizionali.*

B. BATTERI EMERGENTI E INFEZIONE RESPIRATORIA

Progetto: 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 relevance.
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.

Responsabile: **Dott. Silvia Campana** (Centro Fibrosi Cistica - Ospedale A. Meyer, Firenze)
Partner 1: **Dott. Luigi Ratclif** (Servizio Fibrosi Cistica – Osp. Cerignola); Partner 2: **Dott. Lisa Cariani** (Centro Fibrosi Cistica – Clinica Pediatrica, Univ. Parma); Partner 3: **Dott. Mariassunta Del Pezzo** (Microbiologia Funzionale, Univ. Federico II – Napoli); Partner 4: **Dott. Valeria Raia** (Centro Fibrosi Cistica; Univ. "Federico II", Napoli); Partner 5: **Dott. Flavio Favari** (Lab. Microbiologia - Osp. Maggiore, Verona); Partner 6: **Dott. Amalia Negri** (Unità Pediatrica – Osp. Livorno); Partner 7: **Dott. Rolando Gagliardini** (Centro Fibrosi Cistica, Osp. G. Salesi, Ancona); Partner 8: **Dott. Fulvia Gioffrè** e **Dott. Donatella Scuteri** (Laboratorio Clinico Patologico – Osp. Noverato, CZ)
Ricercatori coinvolti: 19;
Durata: 1 anno (studio pilota);
Finanziamento: € 15.000

Obiettivo: *Lo stafilococco aereo multiresistente (MRSA) è un patogeno sul cui significato clinico e prognostico nel paziente FC si conosce ancora poco, nonostante che il suo riscontro sia in continuo aumento. Si intende studiare le caratteristiche microbiologiche di MRSA isolato da pazienti colonizzati e dall'ambiente di cura; verificare l'ipotesi di trasmissione crociata tra pazienti; valutare l'impatto clinico sui pazienti colonizzati da MRSA.*

Progetto: FFC #7/2005

Stenotrophomonas maltophilia, an emergent pathogen associated to cystic fibrosis: identification and molecular characterization of virulence determinants as potential targets for new therapeutical strategies"
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.

Responsabile: **Dott. Bianca Colonna** (Univ. "La Sapienza" , Roma)
Partner 1: **Dott. Maurizio Sanguinetti** (Univ. Cattolica del Sacro Cuore, Roma); Partner 2: **Dott. Mauro Nicoletti** (Univ. "G. D'annunzio", Chieti); Partner 3: **Dott. Mariassunta Casalino** (Univ. Roma3); Partner 4: **Dott. Ersilia Fiscarelli** (Osp. "Bambin Gesù", Roma)
Ricercatori coinvolti: 18; Durata: 2 anni; Finanziamento: € 50.000

Obiettivo: *Identificazione dei geni espressi da St. maltophilia per conoscere i fattori essenziali all'instaurarsi del processo patogeno indotto nei polmoni da questo batterio, di cui ancora poco si conosce in FC. Lo scopo ultimo è orientato a sviluppare nuovi composti antimicrobici molto specifici per batteri come questo, altamente resistenti agli antibiotici in uso.*

Progetto: FFC #8/2005

Genetic fingerprinting of Pseudomonas aeruginosa isolates from Italian cystic fibrosis patients: comparison with isolates from the environment and other clinical origins in Europe."
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.

Responsabile: **Dott. Graziana Manno** (Laboratorio Microbiologia; Istituto G. Gaslini, Genova)
Partner 1: **Dott. Roberto Biassoni** (Lab. Medicina Molecolare - Osp. G. Gaslini - Genova); Partner 2: **dott. Eugenio Agenore Debbia** (DISCAT Istituto di Microbiologia "C.A. Romanzi", Genova); Partner 3: **Dott. Angela Sangiuolo** (ARPAL Agenzia Regionale Protezione Ambiente Ligure, Genova)
Ricercatori coinvolti: 10; Durata: 2 anni; Finanziamento: € 30.000

Obiettivo: *Si tratta sostanzialmente di un grosso studio epidemiologico sui ceppi di Pseudomonas aeruginosa diffusi tra i pazienti CF provenienti da varie regioni italiane. Questi ceppi saranno identificati con tecniche avanzate di genetica molecolare batterica. Si intende in particolare valutare quando i diversi ceppi si trasmettono da paziente a paziente e se vi siano in Italia ceppi cosiddetti "epidemici", cioè capaci di diffondersi con particolare vigore e particolarmente resistenti agli antibiotici. Di questi ceppi epidemici si intende anche conoscere la portata dell'impatto clinico.*

Progetto: FFC #9/2005

Studies of the Quorum Sensing Systems of Pseudomonas aeruginosa and Burkholderia cepacia complex
Studio dei sistemi di "quorum sensing" di Pseudomonas aeruginosa e Burkholderia cepacia complex.

Responsabile: **Dott. Vittorio Venturi** (Centro Internazionale per l'Ingegneria Genetica e Biotecnologie, ICGEB - Trieste).
Ricercatori coinvolti: 5; Durata: 2 anni; Finanziamento: € 50.000

Obiettivo: *il "Quorum Sensing" è una sorta di linguaggio con cui la popolazione batterica comunica, controlla e coordina la sua risposta genica a seconda della sua densità e esprime la sua virulenza, la sua aggressività e la sua capacità di difendersi dall'ospite e dai farmaci.*
Il progetto mira a conoscere come e quando Pseudomonas e Burkholderia attivano il loro sistema di Quorum Sensing. Ciò può consentire di individuare obiettivi di nuove molecole capaci di bloccare la cascata di eventi nocivi azionata dal Quorum Sensing.

C. INFIAMMAZIONE POLMONARE E PROSPETTIVE TERAPEUTICHE

Progetto: FFC #10/2005

Roles of azithromycin other than bactericidal: relevance for therapy of cystic fibrosis
Ruoli dell' azitromicina diversi da quelli antibatterici: rilevanza per la terapia della fibrosi cistica

Responsabile: **Dott. Paola Melotti** (Centro Fibrosi Cistica - Osp. Maggiore, Verona)
Partner 1: **Dott. Pierluigi Mauri** (Istituto per le Tecnologie Biomediche, Segrate MI); Partner 2: **Dott. Claudio Sorio** (Istituto Patologia Generale; Università di Verona)
Ricercatori coinvolti: 15; Durata: 1 anno; Finanziamento: € 30.000

Obiettivo: *E' il proseguimento di uno studio già finanziato dalla Fondazione che si propone di indagare i meccanismi d'azione dell'azitromicina, sui quali si fonda l'effetto benefico del farmaco in alcuni pazienti con infezione cronica da Pseudomonas aeruginosa.*
In particolare si intende approfondire l'effetto di contenimento di alcuni meccanismi dell'infiammazione polmonare da parte dell'azitromicina, effetto disgiunto da quello originariamente antibiotico del farmaco.

Progetto; FFC #11/2005

Chronic Oxidative Lung Injury during Cystic Fibrosis - Protective Roles of Gamma-Glutamyltransferase and Ascorbic Acid
Danno infiammatorio cronico in corso di fibrosi cistica: ruoli protettivi della gamma-glutamiltransferasi e dell'acido ascorbico.

Responsabile: **Dott. Alfonso Pompella** (Scuola Medica - Università di Pisa)
Ricercatori coinvolti: 4; Durata: 2 anni; Finanziamento: € 28.000

Obiettivo: *Nell'infiammazione polmonare cronica del malato CF si producono sostanze tossiche (in particolare radicali dell'ossigeno) che hanno un effetto ossidante lesivo dei tessuti polmonari: le cellule dell'organismo dispongono normalmente di sostanze anti-ossidanti che gli permettono di difendersi dalla lunga esposizione a questi agenti tossici. Il glutatione e la vitamina C sono tra le principali di queste sostanze. Il progetto intende verificare l'ipotesi che il glutatione e l'enzima gamma-glutamiltransferasi (alterati nei fluidi polmonari CF) possano agire sinergicamente per il rifornimento di vitamina C (acido ascorbico) da parte delle cellule respiratorie, con l'obiettivo ultimo di sviluppare strategie terapeutiche miranti a favorire l'assorbimento di vitamina C nelle cellule polmonari.*

Progetto; FFC #12/2005

Lipoxin A4 formation and signalling in cystic fibrosis
La lipoxina A4 nella fibrosi cistica: biosintesi e trasduzione del segnale.

Responsabile: **Dott. Mario Romano** (Univ. "G. D'Annunzio", Chieti)
Partner 1: Dott. **Luciana Iapichino** (Centro Fibrosi Cistica - Osp. dei Bambini "G. di Cristina", Palermo)
Ricercatori coinvolti: 16; Durata: 2 anni; Finanziamento: € 40.000

Obiettivo: *Si intendono analizzare alcuni meccanismi che portano ad insufficiente difesa contro l'infiammazione nei pazienti CF. Viene ipotizzato che le mutazioni del gene*

CFTR siano correlate con alterazioni di produzione di una piccola molecola, denominata "lipossina A4" che normalmente blocca l'infiammazione e promuove la guarigione nei tessuti. Il progetto cercherà di verificare questa ipotesi ed anche di capire se il difetto non sia dovuto ad alterazioni del sito cellulare cui, per agire, deve legarsi la lipossina A4. L'intento finale è quello di individuare nuove strategie terapeutiche basate sul potenziamento delle difese antinfiammatorie naturali.

Progetto: FFC #13/2005

Functional and Biochemical analysis of anti-microbial proteins in airways surface lining fluid (ASL).
Identificazione e caratterizzazione biochimica di proteine ad attività antibatterica prodotte nel fluido che bagna la superficie delle vie aeree.

Responsabile: **Dott. Roberto Biassoni** (Lab. Medicina Molecolare - Istituto "G. Gaslini", Genova)
Partner 1: **Dott. Giovanni Melioli** (Lab. Centrali Analisi - Istituto "G. Gaslini", Genova); Partner 2: **Dott. Giovanni Candiano** (Lab. Uremia - Istituto "G. Gaslini", Genova)
Ricercatori coinvolti: 12; Durata: 1 anno (progetto pilota); Finanziamento: € 25.000

Obiettivo: *il progetto intende studiare alcune proteine prodotte dall'epitelio delle vie respiratorie, in grado di contrastare l'infezione e l'infiammazione polmonare.*
L'intento è quello di conoscere i fattori coinvolti nei meccanismi di base della malattia polmonare CF per lo sviluppo di nuovi farmaci selettivi per controllare da un lato i germi patogeni e dall'altro l'eccesso di risposta infiammatoria.

D. GENETICA MOLECOLARE APPLICATA ALLA DIAGNOSI ED ALLA RELAZIONE GENOTIPO/FENOTIPO

Progetto: FFC #14/2005

New approaches for noninvasive prenatal diagnosis of cystic fibrosis by fetal DNA analysis in maternal plasma
Nuovi approcci per la diagnosi prenatale non invasiva di fibrosi cistica mediante analisi del DNA fetale nel plasma materno.

Responsabile: **Dott. Laura Cremonesi** (Fondazione Centro San Raffaele del Monte Tabor, Milano)
Partner 1: **Dott. Gabriella Restagno** (A.O.O.I.R.M. – Osp. S. Anna, Torino); Partner 2: **Dott. Manuela Seia** (Istituti Clinici di Perfezionamento, Milano); Partner 3: **Dott. Carlo Castellani** (Centro Fibrosi Cistica – Osp. Maggiore, Verona)
Ricercatori coinvolti: 11; Durata: 2 anni; Finanziamento: € 50.000

Obiettivo: *Utilizzando tecnologie molto avanzate, questo progetto intende testare su gravidanze a rischio CF la possibilità di una diagnosi prenatale precoce (a partire dalla 6° settimana di gestazione), analizzando le mutazioni del gene CFTR sul DNA di origine fetale, che normalmente circola in discreta quantità disciolto nel plasma del sangue materno. Il DNA che viene testato sarebbe quello che il feto ha preso dal padre. Questa modalità, ancora da verificare nella sua piena efficacia, eviterebbe la più invasiva diagnosi che attualmente si fa su prelievo di villi placentari fetali (villocentesi)*

Progetto: FFC #15/2005

Splicing affecting Genomic Variants in CFTR: Diagnostic and Therapeutic Aspects
Varianti genomiche che modificano lo splicing. Studio degli aspetti diagnostici e terapeutici nella fibrosi cistica.

Responsabile: **Dott. Franco Pagani** (Centro Internazionale per l'Ingegneria Genetica e Biotecnologie, ICGEB – Trieste)
Ricercatori coinvolti: 4; Durata: 2 anni; Finanziamento: € 60.000

Obiettivo: *il trasferimento dell'informazione per la sintesi della proteina CFTR dal DNA genico all' RNA (tramite la sintesi) si basa su un meccanismo chiamato "Splicing". Alcune mutazioni dette di "splicing" determinano anomalie in questo processo, impedendo la sintesi della proteina o consentendone una sintesi quantitativamente insufficiente. Il progetto, che rappresenta la continuazione di uno precedente già finanziato dalla Fondazione, intende approfondire la conoscenza di questi meccanismi, creare un sistema diagnostico basato su test funzionali dello splicing ed in definitiva esplorare nuove strategie terapeutiche per correggere lo splicing aberrante.*

E. RICERCA CLINICA

Progetto: FFC #16/2005

Diabetes, glucose intolerance and hypoglycemia in Cystic Fibrosis
Diabete, intolleranza al glucosio e ipoglicemia in pazienti con fibrosi cistica.

Responsabile: **Prof. Carla Colombo** (Centro Fibrosi Cistica - Fondazione IRCCS, Milano)
Partner 1: **Dott. Alberto Battezzati** (Fondazione Centro S. Raffaele del Monte Tabor, Milano)
Ricercatori coinvolti: 8; Durata: 1 anno (studio pilota); Finanziamento: € 25.000

Obiettivo: *diabete mellito e intolleranza al glucosio sono diventate complicanze comuni nella fibrosi cistica con l'allungarsi dell'attesa di vita dei pazienti. Il progetto si propone di studiare la storia naturale del diabete CF in una larga popolazione di pazienti e nel contempo intende valutare i meccanismi di secrezione e di sensibilità all'insulina per spiegare perché alcuni pazienti sviluppano diabete e in alcuni di questi esso è preceduto da ipoglicemia a digiuno. L'intento finale è quello di contribuire a migliorare la strategia di previsione, controllo e trattamento della complicanza diabetica.*

Progetto: FFC #17/2005

Multicenter Validation of a Disease-Specific Health-Related Quality of Life questionnaire (The Cystic Fibrosis Questionnaire - Cfq-R) Versions: Children aged 6 to 11 years - Children aged 12 and 13 years - Parents/caregivers - Adolescent and adults.

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

Responsabile: **Dott. Rita Nobili** (Centro Fibrosi Cistica - Fondazione IRCCS, Milano)
Partner 1: **Dr. Giovanni Apolone** (Lab. Ricerca Clinica, Istituto M. Negri, Milano); Partner 2: **Dr. Cesare Braggion** (Centro Fibrosi Cistica, Osp. Maggiore, Verona); Partner 3: **Dr. Nadia Oprandi** (Società Italiana Fibrosi Cistica); Partner 4: **Dr. Rita Pescini** (Centro Fibrosi Cistica, Istituto G. Gaslini, Genova); Partner 5: **Dr. Simone Spina** (Centro Fibrosi Cistica - Osp. S. Luigi Gonzaga, Orbassano TO); Partner 6: **Dr. Daniela Fazio** (Servizio Fibrosi Cistica - Policlinico, Messina); Partner 7: **Dr. Mariapia Intermite** (Centro Fibrosi Cistica - Univ. "La Sapienza", Roma)
Ricercatori coinvolti: 10; Durata: 1 anno; Finanziamento: € 6.000

Obiettivo: *il progetto si propone di studiare la validità, l'attendibilità, la sensibilità e la comprensibilità di un questionario di valutazione della qualità della vita dipendente dalla malattia e specifico per la fibrosi cistica. Verrà usato un questionario elaborato da un gruppo francese e successivamente adottato in altri paesi: si tratta di validarne l'applicabilità nel contesto dei pazienti italiani. E' questo uno strumento importante per misurare, al di là dei dati clinici, quanto la malattia in sé e quanto i trattamenti e le strategie di cura influenzano l'insieme delle prestazioni e lo stato di benessere complessivo del paziente, appunto la "qualità di vita".*

ADOTTA UN PROGETTO

I progetti di ricerca CF adottati fino a giugno 2005

Dei 36 progetti di ricerca CF selezionati e finanziati dalla Fondazione negli anni 2002-2004, venti sono stati adottati parzialmente o totalmente da Aziende, Associazioni regionali CF, Delegazioni della Fondazione, Scuole, Privati. E' stato questo un contributo fondamentale a sostegno dei programmi di ricerca finalizzati a nuove cure per i malati di fibrosi cistica, promossi e sostenuti dalla Fondazione FFC negli ultimi 3 anni. Di seguito proponiamo l'elenco dei progetti adottati con l'indicazione dei rispettivi adottanti.

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

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

FFC #8/2003 - *Gene regulation and adaptive mutations of Ps aeruginosa.*
Responsabile Dr.ssa 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. Strazzabosco (Ospedali Riuniti, Bergamo);
Adottato parzialmente da: **Fondazione Cariverona**

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

FFC #2/2004 - *Chemoreceptor mechanism in CFTR expressing cells.*
Responsabile Prof. 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 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. 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. Lupo (Dip. Nefrologia - Osp. Maggiore, Verona);
Adottato totalmente da: **Fondazione "Zanotto" - VR**

FFC #7/2004 - *The CF mutation spectra in Italy.*
Responsabile Prof. 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 Rosatelli(Osp. Microcitemici - Cagliari);
Adottato totalmente da: **Gruppo Alimentare Rossetto - VR**

FFC #10/2004 - *Genome-wide identification of target genes.*
Responsabile Dr. 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 Bevivino (ENEA - Casaccia - Roma);
Adottato parzialmente da: **Associazione Laziale FC e Associazione Lombarda FC**

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

FFC #13/2004 - *Role of SOCS3 in the imflammatory cells responses.*
Responsabile Dr.ssa 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 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 Raia (Univ. Federico II - Napoli);
Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Latina**

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

FFC #18/2004 - *Early eradication of Ps aeruginosa.*
Responsabile Dr. 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 Bossi (Istituto di Statistica Medica e Biometria - Milano);
Adottato parzialmente da: **Uovador S.p.A. - VR**

Notizie dal 3° seminario di primavera su Recenti progressi nella Ricerca per la Fibrosi Cistica

Nei giorni 13 e 14 maggio scorso si è svolto a Verona, presso il Centro "Marani" dell'ospedale Maggiore, il III Seminario di Primavera , cui hanno partecipato numerosi ricercatori ed operatori sanitari nella sessione scientifica del primo giorno e un largo numero di pazienti, famigliari e sostenitori nella sessione divulgativa del 2° giorno. Vi è stata in entrambe le giornate una nutrita e interessata partecipazione alla discussione. Il seminario è stato aperto dal dr. Fior, direttore sanitario dell'Azienda Ospedaliera di Verona, che ha illustrato lo storico impegno dell'Azienda nell'assistenza e nella ricerca per la FIbrosi Cistica. Del Seminario diamo una rapida sintesi e riportiamo i sommari delle relazioni della Dr.ssa Henneman sullo screening dei portatori, del Dr Huang sulle prospettive di terapia con cellule staminali e dei dottori Buzzetti e Braggion sulla prevenzione e controllo dell'infezione respiratoria FC.

Lo scopo dei Seminari di Primavera, giunti quest'anno alla terza edizione, è quello di dare evidenza ad alcuni dei problemi emergenti nel campo della fibrosi cistica, verso i quali si sta muovendo un significativo interesse di studio e ricerca. Viene chiesto per questo l'aiuto di

Dr. Fior
Direttore Sanitario Azienda Ospedaliera di Verona

persone che hanno dato di recente contributi rilevanti a queste problematiche, con l'invito a prospettare ipotesi nuove di lavoro e linee possibili di sviluppo di ricerca. Il carattere di seminario include l'ampio spazio che viene dato alla comunicazione degli esperti ma anche alla discussione che ne dovrebbe seguire.

Il primo tema, affrontato dalla Dr.ssa **Lidewijg Henneman**, una studiosa di Amsterdam attenta alle dinamiche sociali e alle iniziative di prevenzione che si sviluppano intorno all'impatto delle malattie genetiche sulla popolazione, riguarda lo screening dei portatori del gene CFTR. I tentativi di offrire alla popolazione la possibilità di identificare il loro stato di eterozigote per questo gene hanno una storia ormai di 15 anni, che data dalla scoperta del gene CFTR. A tuttoggi non pare esservi in Europa una strategia condivisa sull'opportunità e sulla fattibilità di uno screening di popolazione. La Dr.ssa Henneman ha riferito dell'esperienza olandese e ha esposto alcuni punti fermi cui forse si sta arrivando.

Dr. William Guggino
Biologo Molecolare di Baltimora

Il Dr **William Guggino**, biologo molecolare di Baltimora, uno dei più attivi studiosi di fisiopatologia della proteina CFTR, ha riferito delle nuove conoscenze acquisite sui meccanismi di maturazione e di funzionamento di questa proteina canale, soprattutto nella sua interazione con altre proteine nella complessa macchina cellulare che porta all'azione di trasporto del cloro nella membrana apicale. Il Dr Guggino, nato negli USA da genitori siciliani emigrati molti anni fa, ha cercato anche di illuminare le prospettive che si aprono oggi verso terapie del difetto di base come sviluppo di queste nuove conoscenze.

Una tematica calda che sta attraendo oggi molti gruppi di ricerca è quella delle cellule staminali, embrionali o adulte, per le potenzialità che esse hanno di essere impiegate per la terapia riparativa di parecchie malattie su base degenerativa, incluse alcune malattie genetiche. La fibrosi cistica si candida tra queste, con l'ipotesi che cellule staminali indifferenziate possano essere veicolate e trapiantate a livello polmonare dopo aver subito una correzione genica ed essere state indotte a moltiplicarsi e differenziarsi in cellule respiratorie. Siamo certamente ai primi passi per questa strategia. Il Dr **Guoshun Wang** di New Orleans, che con il suo gruppo ha recentemente prodotto risultati preliminari molto interessanti, specificamente mirati alla fibrosi cistica, ha fatto il punto sulla ricerca attiva in questo promettente filone.

In questo Seminario è stato anche inserito un breve report conclusivo sullo studio di revisione della letteratura, condotto da un gruppo che si è attivato nell'ambito della Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica, sulla prevenzione e il controllo dell'infezione respiratoria in fibrosi cistica. Si tratta di una vasta rassegna critica di tutto ciò che è stato prodotto negli ultimi anni su questo tema assai controverso, che coinvolge peraltro in maniera pesante i comportamenti dei centri di cura e le ansie dei malati e delle famiglie. Ha riferito nella sessione scientifica il Dr **Roberto Buzzetti**, che è stato il coordinatore e la guida di questo gruppo e, nella sessione divulgativa, il Dr **Cesare Braggion**, uno degli autori del volume che raccoglie i risultati di questa fatica , che è stato distribuito ai partecipanti del Seminario e che è a disposizione gratuitamente per quanti ne faranno richiesta alla Fondazione (fondazione.ricercafc@azosp.vr.it).

NUOVE STRATEGIE ED OPINIONI SULLO SCREENING DEI PORTATORI CF

Lidewij Henneman
Department of Clinical Genetics and Human Genetics, VU University

Medical Center, Amsterdam, The Netherlands.

Lidewij Henneman
Department of Clinical Genetics and Human Genetics, VU University Medical Center, Amsterdam, The Netherlands

Gli obiettivi dello screening dei portatori nella popolazione

Per molte malattie autosomiche recessive, quale la fibrosi cistica (CF), è possibile cercare se una persona sia un portatore sano. Se entrambi i partners sono portatori, ogni bambino ha un rischio 1 su 4 di avere la fibrosi cistica. Lo screening di popolazione dei portatori è possibile poiché è disponibile un test affidabile ed esso merita una valorizzazione perché la fibrosi cistica è è abbastanza frequente, è una malattia seria e porta ad una significativa morbidità ed anche a morte precoce. Inoltre, per le coppie di portatori identificate vi è la possibilità di sapere se il figlio sarà sano o malato.

La maggior parte dei portatori non sa che sono portatori, cosicchè essi non sono consapevoli del loro rischio e, nella maggior parte dei casi, la diagnosi di un bambino con CF rimane del tutto inattesa. Oltre l' 80% dei pazienti nascono in famiglie che non hanno storie di CF, ed è stato pertanto suggerito che sia assicurato per la popolazione generale lo screening dei portatori CF (Williamson, 1993) inoltre, Holloway e Brock (1994) hanno dimostrato che solo l' 8% - 24% di tutte le coppie di portatori sarebbero identificate se l'esame dei parenti di pazienti CF fosse ristretto al livello dei secondi cugini e dei parenti più stretti (cosiddetto "testing a cascata").

I programmi di screening di popolazione dei portatori orientati all'identificazione dello stato di portatore CF nelle coppie prima della nascita o del concepimento di un bambino, rendono possibile informare queste coppie circa il loro rischio di avere un bambino con CF. L'intento dello screening dei portatori CF è quindi quello di offrire a queste coppie l'opportunità di conoscere in anticipo questo aumentato rischio e di prendere quindi decisioni riproduttive informate. Le possibili opzioni riproduttive per coppie di portatori includono ad esempio: l'evitare una gravidanza, l'accettare il rischio di avere un bambino CF, la diagnosi prenatale e l'interruzione selettiva di gravidanza, o la preparazione per un bambino con CF. Benchè una delle conseguenze dello screening possa essere una riduzione nel numero di nascite di bambini con CF o una riduzione nei costi dell'assistenza, tali riduzioni non sono un obiettivo dello screening. Un programma di screening che risultasse in una forte riduzione nel numero di bambini nati con CF ma che non mettesse i partecipanti al programma in una condizione di prendere una decisione autonoma informata fallirebbe completamente.

Gruppi sui quali si può applicare lo screening dei portatori

Nella maggior parte dei paesi lo screening di popolazione per il portatore CF non è incluso negli standard di assistenza medica e il dibattito si concentra infatti sulla questione se esso sia desiderabile, nonostante stia aumentando il sostegno allo screening. Lo screening del portatore può teoricamente avvenire in momenti differenti della vita. Possibili gruppi interessati sono le donne in gravidanza ed i loro partners (screening di gravidanza o prenatale), individui o coppie prima della gravidanza (screening preconcezionale), bambini in età scolare (screening scolare), e neonati (screening neo-natale). Ogni approccio ha i suoi pro e contro (Willdhagen ed altri, 1998). Lo screening dei portatori nei neonati o nei bambini in età scolare è generalmente non consigliabile a causa del lungo lasso di tempo che intercorre fino al momento in cui l'informazione diventa utile ed a causa del fatto che i soggetti testati non possono decidere da sè stessi se desiderano o no conoscere se essi sono portatori (Williamson ed al. 1993; Willdhagen ed al. 1998). Lo screening di tutti gli individui in età riproduttiva è improbabile che possa essere sistematico poichè molte persone non considerano che sia rilevante un tale esame. Gli screening delle coppie in gravidanza o in fase pre-concezionale sembrano essere le opzioni migliori per interessare i futuri genitori. Lo screening in gravidanza ha un vantaggio pratico: poichè la maggior parte delle donne in gravidanza contattano il loro medico generico o si fanno visitare negli ambulatori pre-natali questo gruppo è facile da raggiungere. Uno svantaggio è che questo tipo di screening lascia limitate possibilità di scelta nel caso che entrambi i partners siano portatori e può imporre un vincolo di tempo allorché si debbono prendere decisioni circa la diagnosi pre-natale. Lo screening pre-concezionale consente un numero massimo di opzioni riproduttive ed un minimo di vincoli di tempo (Raeburn ed al., 1994) ed è considerato in tutto il mondo essere la più appropriata strategia per lo screening del portatore CF. Tuttavia, uno svantaggio dello screening pre-concezionale è l'assenza, nella maggior parte dei paesi, di un sistema di consultazione pre-concezionale (ad esempio, una rete di consultori efficienti) e pertanto deve essere messo in atto uno sforzo considerevole per raggiungere la popolazione interessata, cioè coloro che prendono in considerazione una gravidanza. Date le limitate risorse che sono disponibili per una assistenza pre-concezionale e stante che nella maggior parte dei paesi esiste già qualche infrastruttura pre-natale, la maggior parte dei programmi di screening del portatore si orientano allo screening durante la gravidanza.

In Olanda, dove la percentuale delle gravidanze programmate è alta (85%) (Dewalle ed al. 1999), lo

screening pre-concezionale sembra essere l'opzione più adatta. Lo screening pre-natale potrebbe essere usato come una "rete di salvataggio" per donne in gravidanza che non si sono occupate del problema in fase pre-concezionale.

Attitudini verso lo screening preconcezionale del portatore

In generale, la popolazione target ha attitudini positive verso lo screening preconfezionale del portatore (Poppelaars et al, 2004a; Henneman et al, 2003). Alcuni studi hanno anche dimostrato che la maggior parte dei genitori di bambini con CF riportano che essi avrebbero desiderato conoscere anticipatamente il loro stato di rischio (Henneman et al, 2001), e pertanto l'incremento nel numero di coppie di portatori identificate prospettivamente sembrerebbe auspicabile. Inoltre, alcuni studi hanno dimostrato che la maggior parte dei pazienti CF e loro parenti sono favorevoli ad uno screening CF routinario nella popolazione (Conway et al, 1994; Watson et al, 1991).
Uno studio basato su questionario condotto presso 102 potenziali providers di screening (campione rappresentativo dei GPs olandesi) ha mostrato che il 55% aveva una attitudine positiva nei confronti uno screening offerto come routine, e più dell'80% era favorevole ad informare la popolazione target circa la possibilità di avere un test del portatore (Poppelaars et al, 2004b). Altri studi confermano questi risultati (Boulton et al, 1996; Watson et al, 1991).

Considerazioni di ordine etico

Un importante criterio che viene applicato ai programmi di screening genetico è che essi dovrebbero essere presi i considerazione se gli aspetti di beneficio superano gli aspetti potenzialmente nocivi dello screening. L'introduzione di programmi di screening genetico dei portatori solleva parecchi problemi e preoccupazioni di ordine psicosociale, etico, legale ed economico. I possibili effetti avversi dello screening includono: l'ansia causata da informazioni che non possono essere usate per fare positive scelte personali; la stigmatizzazione sociale di alcuni individui che potrebbero rifiutare l'offerta di screening; cattivo uso dell'informazione e discriminazione basata sui risultati del test una volta che essi fossero rivelati a terzi, come ad assicuratori o datori di lavoro. Lo screening ha anche implicazioni per le famiglie, poiché esso non coinvolge soltanto il soggetto che intende essere testato ma anche altri membri della famiglia che non hanno acconsentito a farsi testare. L'identificazione del portatore ha anche sollevato la questione se l'opzione di interrompere una gravidanza in cui è stata identificata la malattia non tolga valore alla vita dei pazienti CF o non impedisca la ricerca di nuove cure. (Haddow et al, 1999). Inoltre, sono stati sollevati problemi relativi alla grande variabilità clinica ed etnica della malattia, incluso il prevedibile enorme carico che verrebbe imposto alle risorse per la consulenza genetica (Grody et al, 2001).

Uno dei principali problemi tecnici che si hanno con lo screening del portatore CF è che il test per identificare i portatori non è sensibile al 100%, poiché non tutte le mutazioni sono conosciute (nella maggior parte delle popolazioni di origine europea approssimativamente il 90-95% delle mutazioni CF può essere riconosciuto con i test correnti (In Italia e negli altri paesi mediterranei anche molto meno, ndr). Questo significa che per le coppie in cui una mutazione sia identificata in uno dei partners, mentre l'altro risultasse negativo al test, rimarrebbe ancora una certa probabilità che essi siano una coppia di portatori. Di conseguenza, queste cosiddette "coppie +/-" potrebbero entrare più in ansia, dal momento che esse avranno un rischio residuo di avere un bambino con CF, mentre ad esse non potrebbero essere offerti successivi test per arrivare ad una certezza, quali la diagnosi prenatale. Una particolare attenzione deve essere posta a questa imperfetta sensibilità del test nella informazione e nella consulenza fornita quando viene offerto lo screening.

Risultati di uno studio sullo screening preconcezionale

Lo screening preconcezionale del portatore CF è stato sottoposto a studio in una larga ricerca in Olanda, condotta tra il 1997 e il 2000 (henneman et al, 2003). Oltre 38.000 persone, in età tra i 20 e i 35 anni, furono invitate per via postale, sia dai Servizi Municipali per la Salute (MHS) che dal loro medico generico (GP) a partecipare ad un programma di screening, assieme ai loro partners, nel caso che essi stessero programmando una gravidanza. Veniva fornita una consulenza pre-test sia durante una seduta in gruppo che in occasione di una consultazione con il loro medico curante. Tra quelli che ricevettero l'invito, il 20% avevano un partner con cui intendevano avere bambini. La partecipazione variava in base al tipo di consulenza pre-test: la consulenza con il medico curante produsse il più alto tasso di partecipazione (25%). Non vi fu invece influenza sul grado di partecipazione in rapporto all'origine delle lettere di invito, MSH o GP. 559 coppie (96%) acconsentirono di essere testate dopo la seduta di informazione. La principale ragione addotta per non aver risposto all'invito fu la "mancanza di tempo per partecipare" (48%). Assai poche coppie riferirono che esse avevano partecipato perché avevano la sensazione che non avrebbero potuto rifiutare. In totale il 69% dei non partecipanti e l'89% dei partecipanti credevano che lo screening avrebbe dovuto essere offerto a tutte le coppie che stavano pianificando una gravidanza.

Furono identificati 18 portatori CF; i loro partner risultarono negativi al test. Otto partecipanti riferirono di sentirsi preoccupati e 7 portatori riferirono, su richiesta specifica, che essi si sentivano meno sani (Henneman et al, 2002). Tuttavia i risultati dello studio suggeriscono che questi inconvenienti sono tollerabili, poiché gli stessi soggetti si sentirebbero di decidere ancora per il test. Complessivamente, l'88% dei partecipanti raccomanderebbero ad altre persone di farsi testare. Questo studio ha dimostrato che, anche in assenza di servizi istituzionali di assistenza preconcezionale, lo screening preconcezionale dei portatori CF è fattibile, sia in termi-

ni di risultati pratici che di accessibilità al gruppo interessato.

Ulteriori passi

E necessario uno studio più esteso per rispondere alla questione se l'implementazione di uno screening preconcezionale del portatore CF su larga scala sia possibile anche in Olanda e per trovare quale sia la modalità migliore per introdurre un programma nazionale per tale screening. Inoltre, è stata data preferenza a collocare la consulenza pre-test per lo screening del portatore CF in un più vasto programma di assistenza preconcezionale, che includa l'informazione sui fattori di rischio per la gravidanza (ad esempio, alcool, fumo, etc), attività mirate a promuovere lo stato di salute e discussione sulla storia famigliare.

Il Consiglio per la Salute dell'Olanda ha attualmente costituito una commissione con lo scopo di fornire suggerimenti al Ministro della Salute e dello Sport sul se e come un'assistenza preconcezionale , che includa anche lo screening del portatore CF, sia desiderabile e fattibile.

TERAPIA DELLA FIBROSI CISTICA BASATA SU CELLULE STAMINALI?

Guoshun Wang
Department of Medicine and Genetics, Gene Therapy program, Louisiana State University Health Sciences Center, New Orleans, USA

La fibrosi cistica (CF)

La fibrosi cistica è la più diffusa malattia genetica a prognosi grave nella popolazione caucasica: essa colpisce circa 1 su 2500 nati vivi ogni anno. Benché la CF interessi molteplici organi rivestiti da epitelio, la patologia più grave e che compromette la vita riguarda i polmoni. Il difetto fisiologico primario nel polmone è stato identificato in una anomalia del trasporto transepiteliale di ione cloro, mediato da AMP ciclico, e di trasporto ad esso osmoticamente accoppiato di fluidi. Le manifestazioni cliniche comprendono un muco abnormemente viscoso, una ridotta clearance mucociliare (detersione delle vie aeree), infezioni batteriche croniche,

Guoshun Wang

Department of Medicine and Genetics, Gene Therapy program, Louisiana State University Health Sciences Center, New Orleans, USA

bronchiettasie e con il tempo insufficienza respiratoria. La ricerca ha legato il difetto del gene CFTR alle alterazioni delle difese e della clearance mucociliare. A causa della inettitudine dell'organismo ad eradicare le infezioni, i batteri colonizzano le vie aeree, stabilendo così una infezione persistente. Il grande numero di globuli bianchi neutrofili reclutato nel polmone libera alcuni enzimi, denominati elastasi, ed altri fattori che causano un grave danno alle vie aeree. Gli attuali approcci terapeutici includono una combinazione di fisioterapia respiratoria, antibiotici e broncodilatatori, DNasi per via inalatoria, e agenti antinfiammatori. Alcuni nuovi approcci sono in corso di sperimentazione, come le antiproteasi, alcuni agenti mucolitici, e farmaci per la correzione delle anomalie di trasporto del sodio. Benché queste terapie siano in grado di curare i sintomi, nessuna di esse rappresenta una terapia radicale per le manifestazioni respiratorie.

La terapia genica della fibrosi cistica e i problemi incontrati

Da quando fu isolato il gene CFTR nel 1989, si è pensato che l'introduzione di un gene CFTR funzionante negli epiteli delle vie aeree CF potesse fornire la cura radicale più diretta per la malattia polmonare CF. Furono utilizzati dapprima come vettori del gene gli Adenovirus con l'intento di testare l'ipotesi basata sul fatto che l'adenovirus è un comune virus respiratorio di interesse clinico. Si sperò che i vettori derivati dall'adenovirus avrebbero trasferito il gene agli epiteli polmonari con grande efficienza. Sono stati pubblicati 9 studi clinici basati sull'impiego di tali vettori. Tutti i dati hanno dimostrato una bassa efficienza nella capacità di trasferire il gene nonché risposte infiammatorie come effetto collaterale. Sono stati testati in pazienti CF anche virus adeno-associati e vettori liposomici ma essi hanno mostrato la stessa deludente efficacia. Nessuno degli studi clinici ha dimostrato alcuna modifica dell'eccesso di assorbimento di sodio tipicamente associato a CF. L'epitelio polmonare si evolve in maniera tale da prevenire l'invasione dei microbi e mette in atto le stesse strategie difensive offrendo barriere per impedire un efficiente trasferimento del gene. Tali barriere includono: il muco, la mancanza di recettori, la degradazione del DNA, l'inefficiente importazione del DNA genico nel nucleo, la mancanza di integrazione del vettore con il genoma dell'ospite nonché la inettitudine ad interessare le cellule staminali. Stanti questi formidabili ostacoli nei confronti del trasferimento di gene basato sui vettori, necessita esplorare e sviluppare approcci alternativi.
L'uso di cellule staminali adulte per la terapia della fibrosi cistica rappresenta una strategia innovativa che potrebbe superare le barriere sopra menzionate.

Le cellule staminali midollari

Le cellule staminali sono una speciale popolazione di cellule che sono pluripotenti ed hanno la capacità di autorinnovarsi. Il midollo osseo contiene almeno due tipi di cellule staminali: le cellule staminali ematopoietiche (HSCs,) e cellule staminali mesenchimali (MSCs,). Le cellule ematopoietiche si differenziano in linee cellulari del sangue. Esse hanno peraltro dimostrato una sorprendente plasticità nel senso di essere in grado di differenziarsi anche in cellule epiteliali del fegato, dell'intestino, dei polmoni e della pelle (Krause et al, 2001; Jiang et al, 2002). Le staminali mesenchima-

li abitualmente si differenziano in osteoblasti (cellule dell'osso), condroblasti (cellule della cartilagine) adipociti (cellule di deposito di grasso) e cellule dello stroma ematopoietico (tessuto di sostegno del midollo). Segnalazioni recenti suggeriscono che le staminali mesenchimali possono anche differenziarsi in cellule di tessuti non di sostegno (Prockop et al, 2003). Benché la ricerca sulle cellule staminali sia ancora al suo primo stadio di sviluppo, sono stati riportati risulati promettenti con l'uso di cellule staminali sia ematopoietiche che mesenchimali in un certo numero di modelli animali per le malattie umane.

Basi molecolari per la differenziazione di cellule staminali adulte

Tutte le cellule di un individuo derivano da un singola cellula uovo fecondata. Pertanto, le cellule che formano i vari tessuti ed organi hanno l'identica informazione genetica. Le diversità nei livelli e tipi di differenziazione sono determinate da cosiddetti programmi di trascrizione (il passaggio dell'informazione da DNA a mRNA, ndr) e di translazione (dall'RNA alla sintesi della proteina, ndr), che sono in maniera preponderante influenzati dai micro-ambienti (tessuti e organi diversi, ndr). Questa speculazione è stato provato essere vera con la nascita della pecora Dolly (Wilmut et al, 1997). Il successo ottenuto nella clonazione di animali suggerisce che la differenziazione cellulare non comporta alcuna modificazione genetica irreversibile. Pertanto, le cellule staminali adulte dovrebbero essere in grado di venire indotte a differenziarsi in tessuti distinti da quelli naturalmente predeterminati, se si provvede a stabilire determinate condizioni. Accanto alla differenziazione o transdifferenziazione, sono stati riportati altri meccanismi, come la fusione cellulare, che conservano un potenziale beneficio terapeutico per tutto il tempo in cui il fenotipo funzionale è in gioco.

La generale attrazione per le cellule staminali mesenchimali (MSCs) e le potenziali applicazioni nella fibrosi cistica

Nel mio laboratorio ci sta focalizzando sulle cellule staminali mesenchimali per la terapia CF. Mi piacerebbe discutere di queste cellule con qualche ulteriore dettaglio. Le MSCs hanno attirato in misura crescente l'attenzione per il loro potenziale impiego nella terapia cellulare perché esse hanno alcune caratteristiche attraenti (per alcune rassegne veder Prockop, 1997; Pittenger et al, 1999). (a) Esse vengono facilmente isolate da un paziente per mezzo di una semplice aspirazione di midollo osseo in anestesia locale. (b) Esse possono essere facilmente moltiplicate in coltura fino a un miliardo di volte in 8 settimane. (c) Benché le cellule possano moltiplicarsi rapidamente, esse peraltro non sono immortali. Pertanto esse non presentano alcun rischio di produrre tumori. (d) Le MSCs possono differenziarsi ex vivo e in vivo in molteplici linee cellulari, inclusi osteoblasti, condrociti, apidociti, miociti, pneumoniti, cellule epiteliali e primi precursori neurali. (e) Esse possono essere agevolmente transdotte (trattate con materiale genico, ndr) mediante l'impiego di vettori virali e non virali. (f) Tali cellule hanno la rilevante proprietà di prendere posto su siti di danno tissutale e di riparare il tessuto sia differenziandosi in cellule con il fenotipo specifico di quel tessuto oppure creando un ambiente che aumenti la capacità delle cellule originarie a riparare il tessuto.

In uno studio preliminare di trapianto e innesto , Pereira e coll. (1998) iniettarono cellule staminali mesenchimali modificate in cellule del collageno-I in una vena della coda di un topo irradiato in misura subletale stabilendo che le MSCs potevano essere localizzate a livello di polmoni, osso e cartilagine per un periodo di almeno 5 mesi dopo il trapianto. Jiang e coll. (2002) dimostrarono che le MSCs adulte sono capaci di differenziarsi in tutti e tre i tipi di foglietti germinali (ectoderma, mesoderma, endoderma, ndr) e in vari tipi di cellule tessuto-specifiche, tra cui cellule epiteliali delle vie aeree, quando iniettate in una blastocisti (stadio precoce di sviluppo dell'embrione nella fase cosiddetta di blastula, ndr). E' stato anche documentato che le MSCs di un topo adulto si differenziano in pneumoniti di tipo I (particolari cellule degli alveoli polmonari, ndr) quando siano state danneggiate da bleomicina (Kotton et al, 2001). In uno studio più recente, Ortiz e coll. dimostrarono che il movimento di MSCs verso il polmone, in risposta ad un danno provocato con bleomicina, adotta una morfologia di tipo epiteliale e promuove la riduzione dell'infiammazione e della deposizione di collageno indotta da bleomicina (Ortiz et al, 2003). Recentemente, si è visto che MSCs umane si differenziano in cellule che morfologicamente assomigliano a cellule epiteliali delle vie aeree ed esprimono geni epitelio-specifici mano a mano che esse si differenziano (Spees et al, 2003). In un ambiente diverso, Grove e coll. (2002) trapiantarono cellule staminali midollari transdotte mediante retrovirus in topi irradiati im misura subletale. Essi trovarono che le cellule staminali del donatore ripopolavano il polmone e si differenziavano in cellule dell'epitelio polmonare. Questi risultati suggeriscono la pluripotenzialità delle cellule staminali mesenchimali , indicando che le MSCs adulte hanno il potenziale per una terapia di malattie polmonari.

Nel mio laboratorio noi abbiamo testato l'ipotesi che cellule staminali mesenchimali di pazienti CF possano essere isolate, moltiplicate e corrette genicamente e che le MSCs di origine CF corrette per il gene CFTR abbiano l'attitudine a correggere il difetto di secrezione del cloro associato a CF mediante il trasporto di questo anione a livello dell'apice cellulare (Wang et al, 2005). Dapprima noi abbiamo coltivato insieme MSCs umane e cellule epiteliali umane primarie delle vie aeree a livello di una interfaccia aria-liquido. Fu indotta quindi l'espressione di geni specifici dell'epitelio, quali i geni della cheratina 18 e dell'occludina, ricavandone l'indicazione che in tali condizioni di coltura le MSCs si differenziavano in epitelio. Inoltre , isolammo MSCs da alcuni pazienti CF . Le cellule staminali mesenchimali CF venivano quindi sottoposte a correzione del gene CFTR. Le cellule staminali CF

corrette per il gene CFTR conservavano ancora il loro potenziale di differenziarsi in osteoblasti, adipociti e condrociti. E soprattutto importante, le MSCs CF geneticamente corrette potevano contribuire alla secrezione di cloro in risposta alla stimolazione con AMP ciclico. Questi risultati ottenuti in vitro provavano il principio che si potevano usare MSCs per il trattamento della fibrosi cistica.

Le cellule staminali per la terapia CF: sfide e prospettive future

Benché i risultati in vitro si siano mostrati promettenti e che le cellule staminali midollari abbiano un sicuro potenziale terapeutico, questo approccio è ancora ad uno stadio di ricerca molto iniziale. Tre punti fondamentali dovrebbero essere risolti prima di ogni tentativo di studio clinico: 1) come convogliare efficientemente al polmone cellule staminali corrette per il gene CFTR? 2) come indurre efficientemente le cellule staminali geneticamente corrette a differenziarsi in cellule epiteliali per raggiungere effetti terapeutici in vivo? 3) come correggere geneticamente con sicurezza per il paziente cellule staminali provenienti da pazienti CF?
La ricerca di base sulla biologia delle cellule staminali e l'ingegneria genetica delle cellule staminali sono cruciali per migliorare le nostre conoscenze sul meccanismo cellulare che sta alla base della differenziazione delle cellule staminali e per ottenere l'orientamento delle cellule staminali a collocarsi e a trapiantarsi a livello del polmone. Necessita sviluppare metodi per testare funzionalmente la differenziazione di cellule staminali nel polmone. E' necessario anche ottenere un modello animale adeguato per testare l'approccio terapeutico basato sulle cellule staminali.

PREVENZIONE E CONTROLLO DELL'INFEZIONE RESPIRATORIA IN FIBROSI CISTICA

Roberto Buzzetti e Cesare Braggion, con la collaborazione di Filippo Festini, Gianni Mastella, Donatello Salvatore, Giovanni Taccetti e del Gruppo di Lavoro "Infection Control", Fondazione per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica (Verona)

Dr.Roberto Buzzetti, Epidemiologo,Coordinatore del progetto FFC "Infection Control".

Dr. Cesare Braggion, Centro FIbrosi Cistica, Verona

La colonizzazione cronica da parte di alcuni microrganismi è considerato uno dei punti critici della vita del paziente fibrocistico, forse il più temuto. E' infatti convinzione diffusa, e probabilmente fondata, che essa possa portare come conseguenza un peggioramento della prognosi. Una serie di misure "preventive" sono attualmente messe in atto nel tentativo di prevenire l'instaurarsi dell'evento infettivo: tra queste una serie di misure igieniche orientate a evitare la trasmissione di germi patogeni da paziente a paziente, specie negli ambienti di cura. Non sempre tuttavia tali misure, alcune anche molto impegnative, come la segregazione dei malati, appaiono sorrette da prove solide della loro efficacia, tant'è che il comportamento dei diversi Centri (in Italia e all'estero) è parecchio variabile nei modi e nei tempi di attuazione delle misure preventive.

Questo lavoro è stato pertanto mosso dall'obiettivo di condurre una revisione critica della letteratura scientifica (1) disponibile sui principali aspetti del controll dell'infezione, quali:

A. La relazione tra infezioni ed esiti clinici (prognosi)
B. La trasmissibilità dei vari germi
C. I fattori di rischio per l'acquisizione dell'infezione
D. Il ruolo delle pratiche igieniche e dell'ambiente di cura nel prevenire la diffusione dell'infezione

Per ognuno dei quesiti, sono state esaminate per un'analisi comparata le linee guida più importanti a livello internazionale (USA, Regno Unito, Francia, Europa, CDC) (2-8); ci si è inoltre chiesti quali indicazioni fossero contenute nella letteratura scientifica (revisioni sistematiche, studi sperimentali e studi di osservazione).

RISULTATI

La lettura comparata di ben 7 linee guida internazionali e di circa 400 articoli tratti dalla letteratura ha permesso di trarre le seguenti conclusioni:

A) Relazione tra infezioni ed esiti clinici/prognosi

® sembra essere presente relazione causale fra prima infezione e infezione cronica da PA ovvero la transizione da PA non mucoide a PA mucoide.
® le infezioni croniche da PA e BC sembrano associarsi in modo rilevante a un peggioramento dell'andamento clinico e della prognosi nei pazienti FC.
® L'impatto prognostico di SA rimane da valutare data la scarsità di dati disponibili. Lo stesso dicasi per i cosiddetti germi emergenti (SM, AX, NTM).

B) Trasmissione e trasmissibilità
C) Fattori di rischio per (o protettivi verso) l'acquisizione dei germi

® Il sesso femminile si associa ad una acquisizione più precoce di PA mucoide cronico.
® La più precoce età di prima comparsa di PA o di colonizzazione da PA, lo stato di infezione da parte di PA mucoide o un rischio di acquisire PA sono stati associati ad un genotipo con mutazioni cosiddette "severe" (classe I, II, III).
® Lo screening neonatale non si associerebbe a un ritardo di acquisizione di PA rispetto ad una diagnosi per sintomi
® studi di epidemiologia molecolare documentano la trasmissione di cloni di SA, MRSA, PA, BC complex , SM e AX fra pazienti.
® E' documentata la trasmissione dei principali patogeni attraverso il contatto diretto o indiretto con le secrezioni.
® La trasmissione per via aerogena dei patogeni classici della FC non è documentata e la trasmissione avviene principalmente attraverso le goccioline o per contatto diretto.
® I contatti stretti fra pazienti e gli ambienti affollati facilitano la diffusione di ceppi.
® Il ruolo dell'ambiente esterno e dell'ambiente domestico nell'acquisizione dei patogeni classici della FC, soprattutto per i Gram negativi non fermentanti, deve essere definito con certezza. La sorveglianza microbiologica non può riguardare esclusivamente l'ambiente di cura
® Le vasche e gli ambienti umidi, costituiscono un ambiente in cui i gram negativi possono facilmente sopravvivere.
® Tutti gli oggetti connessi con l'ambiente di cura esposti alle secrezioni dei pazienti possono essere contaminati e possono costituire fonte di infezione. Il germe si può ritrovare nei lavandini, sulle mani di pazienti e del personale, nella strumentazione per l'aerosol-terapia e per la spirometria, nell'aria dopo una seduta di fisioterapia.
® Per PA Le conoscenze più consolidate sulla trasmissione di PA sono relative a:
o Trasmissione di ceppi in pazienti ricoverati all'interno di strutture ospedaliere
o Trasmissione nei campi o trasmissione di ceppi attraverso i contatti sociali

Il Dr. Roberto Buzzetti (al centro) esamina Il volume "CONTROLLO E PREVENZIONE DELLE INFEZIONI RESPIRATORIE NEL PAZIENTE AFFETTO DA FIBROSI CISTICA"

o Superinfezione da parte di ceppi altamente trasmissibili
o Ceppi altamente trasmissibili descritti frequentemente come ceppi multiresistenti
o Generale necessità di segregare e evitare la socializzazione per ridurre il rischio di infezioni crociate
o Incremento di morbilità associato a trasmissione di ceppi epidemici
® Per BC Le conoscenze più consolidate sulla trasmissione di BC sono relative a:
o Trasmissione di ceppi in pazienti ricoverati all'interno di strutture ospedaliere
o Trasmissione di ceppi nei campi estivi o trasmissione attraverso i contatti sociali
o Superinfezione con ceppi appartenenti a diversi genomovars
o Generale necessità di segregare e evitare la socializzazione per ridurre il rischio di infezioni crociate
o Epidemie su larga scala

D) Ruolo delle pratiche igieniche e dell'ambiente di cura nel prevenire la diffusione

® Colpisce la disparità di giudizio tra le diverse linee guida a proposito di disinfezione routinaria delle superfici non critiche dell'ambulatorio FC e degli oggetti con cui i pazienti vengono a contatto. Non sono stati trovati studi condotti in ambito FC che abbiano indagato l'efficacia dei diversi disinfettanti verso i diversi patogeni respiratori.
® C'è consenso sulla necessità di sottoporre i dispositivi personali a disinfezione periodica ma i protocolli di disinfezione proposti differiscono notevolmente.
® Per quanto riguarda gli scarichi dei lavandini dei centri FC, noti per essere reservoir di PA, le linee guida raccomandano di attuare una disinfezione regolare.
® l'effetto della partecipazione a campi estivi specifici per ragazzi con FC, caratterizzati da rapporti sociali prolungati e ravvicinati, senza alcuna limitazione sembra da evitare, pur in presenza di pareri contrastanti
® L'applicazione dell'isolamento dei pazienti durante l'ospedalizzazione ha ridotto l'incidenza di nuove infezioni, anche se non l'ha completamente abolita. Tutte le linee guida concordano sulla necessità di segregare (o separare, isolare) i pazienti con BC tra di loro e da tutti gli altri, sia in regime ambulatoriale che in regime i ricovero.
® Viene spesso associata l'introduzione di politiche complessive di controllo delle infezioni (compren-

denti la segregazione dei colonizzati) adottate in due diversi centri FC ad una riduzione di incidenza e prevalenza di BC e PA.
® La segregazione viene generalmente intesa dalle linee guida come la separazione in giorni di ambulatorio diversi ma anche, specie per BC, in locali diversi.
® Per i pazienti in regime di ricovero, è riconosciuta da tutte le linee guida la necessità di collocare i pazienti in stanze singole con servizi propri per prevenire l'infezione crociata con altri pazienti FC.
® Evitare l'affollamento di pazienti in attesa e ridurre il più possibile i tempi di attesa nella sala d'aspetto è raccomandato da alcune LG per prevenire la l'infezione crociata
® Nelle linee guida, c'è generale consenso sul ruolo delle mani degli operatori nell'infezione crociata. Tutte le LG raccomandano infatti un'accurata igiene delle mani degli operatori

® Per quanto riguarda le misure che i pazienti possono adottare per prevenire le infezioni, le linee guida sono dunque concordi nel raccomandare:
o un'accurata igiene delle mani, specialmente in occasione dei contatti con i centri di cura;
o il contenimento delle secrezioni emesse con la tosse e lo starnuto in presenza di altri pazienti e in occasione dei contatti con i centri di cura;
o il mantenimento della distanza di un metro da tutti gli altri pz FC
o il non condividere con altre persone FC utensili e dispositivi che entrano in contatto con la mucosa orale e nasale.
o l'evitare situazioni di contatto ravvicinato o prolungato in ambienti chiusi con altre persone FC e di evitare il sovraffollamento in occasioni in cui è probabile la presenza di persone FC (ad es. congressi, convegni)

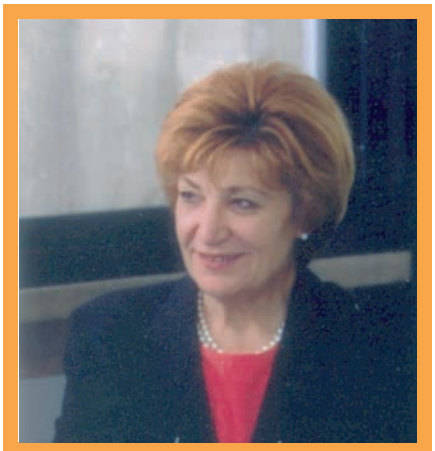
® Non esiste consenso sull'efficacia dell'uso della mascherina da parte dei pz in occasione della loro presenza nei centri di cura.

Dal punto di vista del metodo
Il livello generale degli studi non è molto elevato. Sono piuttosto rari gli studi di coorte prospettici. Talvolta manca anche un vero gruppo di controllo, selezionato come tale all'inizio dello studio. La numerosità dei pazienti studiati è generalmente piccola, specie negli studi prospettici. Anche per l'area D (ruolo delle pratiche igieniche e dell'ambiente di cura nel prevenire la diffusione) Sono pochi gli studi di buon disegno che indagano l'efficacia di misure di prevenzione delle infezioni da patogeni respiratori nello specifico ambito FC.
Molte delle misure storicamente adottate nei centri FC per prevenire la trasmissione dei patogeni (ad esempio la segregazione), sono state adottate in situazioni di "emergenza" costituite dal verificarsi di epidemie che hanno provocato bruschi innalzamenti di morbilità e mortalità tra i pazienti FC.
I dati raccolti in ambito specifico FC a sostegno dell'impiego di queste misure provengono prevalentemente da studi retrospettivamente condotti su dati storici, che hanno indagato sulla presenza di fattori di rischio associati nelle persone FC all'acquisizione di determinati patogeni, oppure dalla documentazione di particolari vie di trasmissione, oppure dalla individuazione di sorgenti di infezione nei luoghi di cura, con conseguente adozione di misure empiriche di prevenzione, basate quindi sul razionale teorico della presenza di un dato fattore di rischio o dalla possibilità di una via di trasmissione. L'efficacia di queste misure rimane nella gran parte dei casi non sperimentata attraverso la conduzione di studi controllati, e quindi non provata. La possibilità di sottoporle a sperimentazione è controversa e solleva fondati dubbi di carattere etico.

Le linee guida esistenti basano le loro raccomandazioni principalmente su studi o su altre linee guida non FC-specifiche. In numerosi casi le raccomandazioni sono state formulate sulla base di esperienze cliniche e pareri di esperti; in molti altri casi, raccomandazioni di forza anche elevata sono fondate su prove di efficacia raccolte in campi diversi dalla FC o sulla identificazione (retrospettiva) di fattori di rischio per la trasmissione. Solo in un numero relativamente basso di casi esse sono basate su vere prove di efficacia.

ABBREVIAZIONI
Pa: Pseudomonas aeruginosa
Bcc: Burkholderia cepacia complex
Sa: Staphylococcus aureus (MSSa: Sa meticillino sensibile; MRSa: Sa meticillino resistente)
Ax: Alcaligenes xylosoxidans
Sm: Stenotrophomonas maltophilia
NTMB: Micobatteri non tubercolari

Il volume "CONTROLLO E PREVENZIONE DELLE INFEZIONI RESPIRATORIE NEL PAZIENTE AFFETTO DA FIBROSI CISTICA" può essere consultato sul sito www.fibrosicisticaricerca.it nella sessione "Documenti Informativi" o può essere richiesto gratuitamente alla Fondazione FFC (fondazione.ricercafc@azosp.vr.it)



Dr.ssa Graziella Borgo e Prof. Giuseppe Magazzù, Moderatori della Sessione Laica del Seminario di Primavera

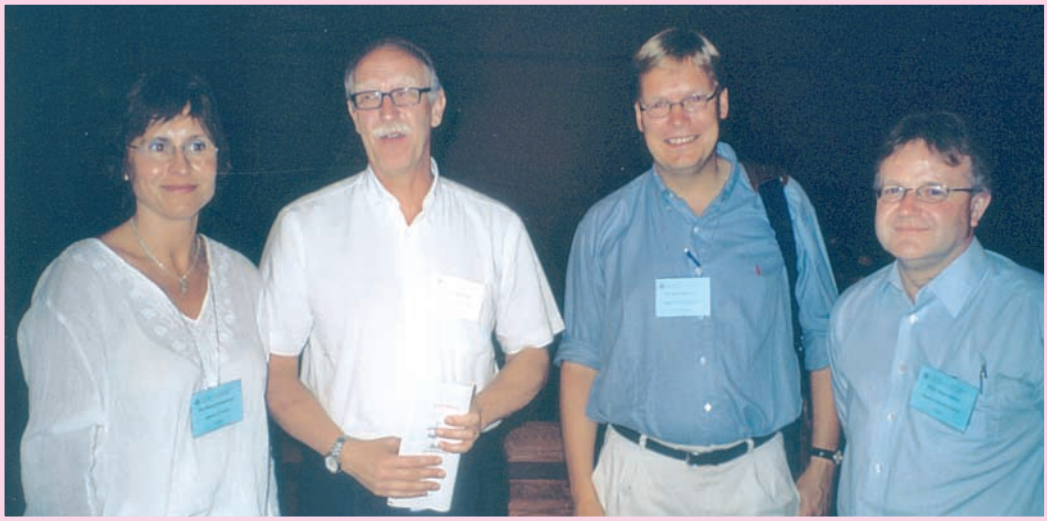
Report dal 28° congresso europeo sulla Fibrosi Cistica

Creta, 22-25 giugno 2005

Nella splendida cornice di questa grande isola del Mediterraneo si è svolto il 28° Congresso della Società Europea Fibrosi Cistica. Bisogna dire che il contorno ambientale molto attraente, nonostante le non poche recenti deturpazioni turistiche, con le molte testimonianze dell'antica civiltà minoica e con un mare di smeraldo, non hanno distratto più di tanto i congressisti dalla partecipazione molto attiva ai lavori congressuali. Più di un migliaio i partecipanti, ricercatori, medici, infermieri, fisioterapisti, microbiologi, psicologi ed altri professionisti di ogni nazione europea ma anche del Nord America e dell'Australia. Una cinquantina di persone la delegazione italiana. Oltre 500 i contributi di studio, sotto forma di comunicazioni o di posters. 28 i contributi italiani, di cui 10 relativi a progetti di ricerca finanziati dalla Fondazione FFC.

Il palazzo di Minosse a Cnosso (Creta)

Il Congresso è stato una efficace composizione di informazioni, in gran parte già note dalla letteratura scientifica. Ma è stato soprattutto una grande occasione di confronto tra ricercatori ed operatori addetti all'assistenza, ma anche di occasione per stringere nuovi rapporti di collaborazione tra gruppi di ricerca. Tra i numerosi temi affrontati meritano segnalazione: il confronto di opinioni pro o contro l'uso della ventilazione con intubazione nei pazienti in insufficienza respiratoria grave; il confronto di pareri sul valore della correzione del difetto CFTR di base per i malati FC; le innovazioni sulla terapia aerosolica; la potenzialità delle nuove terapie farmacologiche emergenti dalla ricerca di laboratorio; l'ottimizzazione della fisioterapia respiratoria; il vasto campo degli studi sull'infiammazione; le più recenti acquisizioni sulla funzione della proteina CFTR; le cellule staminali per la riparazione e la rigenerazione dell'epitelio delle vie aeree; i geni modificatori; i problemi della garanzia di qualità per le



Nel corso del Congresso è stato eletto il nuovo presidente della Società Europea Fibrosi Cistica, la dr.ssa M. Johannesson, responsabile del centro CF di Uppsala in Svezia (la prima sx). Accanto il prof. G. Doering, presidente uscente, il dr. H. Heijerman e il dr. JS Elborn.

Dipinti della reggia di Cnosso (Creta)

La sede del Congresso (Palazzo dei Congressi)

indagini genetiche.

Ci limitiamo a pubblicare di seguito tre reports su temi che ci sembra abbiano avuto nel congresso una significativa rilevanza: le innovazioni e i problemi aperti nella genetica applicata alla diagnostica FC; le nuove conoscenze sui meccanismi di splicing (il trasferimento dell'informazione genetica dal DNA al RNA messaggero per la sintesi della proteina) e sulla possibilità di correggere le mutazioni cosiddette di "splicing"; lo screening neonatale in una iniziativa di raccolta dati e di coordinamento organizzativo e metodologico a livello europeo.

NOVITÀ SULLA GENETICA MOLECOLARE APPLICATA ALLA DIAGNOSTICA DELLA FIBROSI CISTICA

MARCO LUCARELLI (Dip. Biotecnologie Cellulari ed Ematologia, Università degli Studi di Roma "La Sapienza")

La maggiore difficoltà che si incontra conducendo indagini genetiche a scopo diagnostico nella FC è la necessità di indagare un numero elevato di mutazioni in una sempre più ampia tipologia e gravità di manifestazioni cliniche riconducibili alla FC. Questa grande variabilità clinica origina da un'altrettanto ampia variabilità genetica. A questo ultimo riguardo esistono almeno 2 sorgenti di variabilità: l'elevato numero di mutazioni del CFTR, con l'ancor più elevato numero di loro possibili combinazioni (fino ad arrivare ai cosiddetti "alleli complessi" con più di una mutazione sulla stessa copia del gene), e la possibilità che geni diversi dal CFTR possano intervenire sull'effetto finale di tali mutazioni. Emerge infatti con sempre maggiore chiarezza che, pur rimanendo il gene CFTR il principale responsabile della patologia, numerosi altri geni possano modificare (da cui il nome di "geni modificatori") le caratteristiche cliniche condizionando la gravità della malattia. Da ciò consegue che, oltre alle circa 1000 mutazioni del gene CFTR sinora conosciute, nei prossimi anni si sarà chiamati ad indagare un numero, per il momento non prevedibile ma presumibilmente elevato, di altre mutazioni in svariati altri geni. D'altra parte anche la corretta classificazione delle variazioni nella sequenza del DNA (sia del CFTR che di altri geni correlati) costituisce un problema rilevante. Infatti ciascuna variazione necessita di approfonditi studi funzionali volti all'individuazione di un suo eventuale ruolo patologico. La combinazione degli studi strutturali (ricerca di mutazioni) e di quelli funzionali (assegnazione di un eventuale ruolo patologico) dovrebbe consentire di effettuare una diagnosi di FC che tenga in considerazione, oltre che il ritrovamento nel CFTR di 2 mutazioni con uno specifico ruolo funzionale, anche l'assetto di altri geni correlati. Ciò dovrebbe consentire l'esatto posizionamento del soggetto in esame nel gradiente di quelle che più propriamente vengono chiamate CFTR-patie (di cui la FC in forma completa è la manifestazione più grave).

Attualmente le ricerche si stanno concentrando in 4 aree, che sche-

maticamente possono essere descritte come segue: 1) sviluppo di protocolli di ricerca di mutazioni a sempre maggiore specificità e sensibilità; 2) caratterizzazione funzionale delle variazioni di sequenza individuate; 3) studio delle CFTR-patie, comprendenti le cosiddette forme "atipiche" di FC; 4) ricerca dei geni modificatori. Per quanto riguarda i primi 2 punti, si sta assistendo ad un notevole sforzo, sia da parte dei ricercatori che dei produttori di sistemi commerciali, volto al miglioramento delle tecniche di ricerca di mutazioni, con particolare riguardo all'automazione delle metodiche e all'incremento di sensibilità. Ciò è vero sia per i metodi di ricerca diretta (quali ad esempio ibridazione inversa, PCR/OLA/SCS, minisequencing, chip genomici), utilizzabili per quelle mutazioni con una frequenza elevata in determinate aree geografiche, che per i metodi di scansione (ad esempio DGGE, DHPLC, sequenziamento) utilizzabili anche per identificare mutazioni rare, al limite individuali ed anche "nuove" (non precedentemente descritte). Diventa inoltre sempre più evidente l'elevata frequenza di riarrangiamenti del gene CFTR con effetto patologico (come le delezioni) e la necessità di disporre di metodiche specifiche (quali ad esempio metodi di PCR quantitativa o semi-quantitativa) per la loro individuazione. L'impressione generale che se ne trae è che non esista attualmente un unico sistema adeguato a qualsiasi tipo di indagine, considerando come variabili principali l'eterogeneità geografica delle mutazioni, il tipo di mutazione ricercata nonché la specifica forma di CFTR-patia in studio. Sembrerebbe invece consigliabile un approccio in più fasi successive, effettuando inizialmente indagini di I livello, volte all'applicazione di pannelli mutazionali ristretti, a limitata sensibilità ma anche a costo contenuto ed accettabile complessità tecnica, per procedere poi, qualora necessario, ad indagini di II e finanche di III livello, utilizzando tecniche a più alta sensibilità, costo e complessità.

L'affinamento dei protocolli di ricerca mutazionale pone tuttavia la sfida della caratterizzazione funzionale: l'alterazione di sequenza trovata nel DNA in studio produce un effetto patologico? Questo è attualmente il "collo di bottiglia" in cui finiscono molte delle variazioni di sequenza individuate. E' quindi indispensabile che nei prossimi anni venga compiuto lo sforzo di migliorare gli attuali approcci di caratterizzazione funzionale per poter conferire un reale significato diagnostico alle indagini mutazionali.

Anche i rimanenti 2 punti sono tra loro strettamente interconnessi. Il malfunzionamento del CFTR può originare manifestazioni cliniche anche lontane dalla forma classica di FC (quali ad esempio alcune forme di infertilità maschile e di bronchite cronica, le bronchiectasie disseminate, la pancreatite cronica idiopatica, la poliposi nasale, l'ipertripsinemia transitoria neonatale, solo per citarne alcune), con conseguente complicazione della diagnosi se non adeguatamente supportata dall'indagine genetica. Molte ricerche vengono attualmente compiute sia per individuare tutte le possibili manifestazioni cliniche legate ad anomalie del CFTR, sia per la progettazione di metodi e pannelli di indagine mutazionale in grado di individuare le mutazioni specifiche di ciascuna manifestazione. D'altra parte è pur vero che in molti casi, sia tipici che "atipici" di FC, il solo CFTR possa non spiegare la manifestazione clinica. Pur essendo stati individuati alcuni candidati geni modificatori che potrebbero esercitare la loro influenza sull'effetto finale (ad esempio coinvolti nella risposta immunitaria o nello stress ossidativo, inibitori di proteasi, canali alternativi del cloro, canale del sodio, proteine CFTR associate, per ricordare solo alcune delle classi geniche prese attualmente in considerazione), l'indagine mutazionale su di essi è solo all'inizio.

Occorre infine tenere ben presente che il completamento diagnostico mediante il ritrovamento delle mutazioni del CFTR (ed eventualmente anche dei suoi modificatori) causa della malattia, diventa fondamentale per le terapie farmacologiche con azione su specifiche mutazioni (farmacogenomica) nonché per le terapie geniche basate sulla sostituzione di limitate zone di DNA comprendenti il sito di mutazione (ricombinazione omologa), che è auspicabile entrino a breve nella pratica clinica.

Il Dr Lucarelli partecipa al progetto di ricerca #8/2004, coordinato dal prof R. Strom, finanziato dalla Fondazione FFC e dedicato allo studio delle variazioni di sequenza nel DNA del gene CFTR che possono essere responsabili di forme atipiche di CF.

COMMENTO AL SIMPOSIO SULL'ESPRESSIONE DELLA PROTEINA CFTR E LO SPLICING ALTERNATIVO

FRANCO PAGANI (International Centre Genetic Engineering & Biotechnology, Padriciano, Trieste)

Nell'ambito della 28a conferenza europea sulla fibrosi cistica il simposio dal titolo "CFTR expression and alternative splicing" e' stato un punto di incontro e confronto per i ricercatori che da vari anni sono impegnanti, attraverso lo studio della espressione e "splicing" del gene CFTR nella ricerca di nuove terapie.

Luca Clarke dell'Universita' di Lisbona ha mostrato i recenti progressi ottenuti attraverso l'utilizzo di microarray per la identificazione di marcatori utili per una diagnosi piu' precisa e puntuale della malattia. Attraverso la analisi della espressione genica sono stati identificati una serie di geni espressi differentemente nelle cellule malate. Poiche' alcuni di questi geni possono svolgere un ruolo chiave nella malattia, come per esempio i geni dell'infiammazione, questo studio permettera' di sviluppare un sistema diagnostico innovativo basato su microchip che selezioni specificatamente i geni alterati.

Le successive relazioni hanno fatto il punto piu' nello specifico sul ruolo dello "splicing" nella fibrosi cistica. Lo "splicing" e' un processo fondamentale attraverso il quale il gene trasmette il messaggio per la sinte-

si della proteina. Per poter trasmettere il messaggio il gene subisce un processo di rimaneggiamento, definito appunto "splicing" (= processo di "taglia e cuci"). I difetti di splicing disturbano questo "taglia e cuci". Come e' noto, in alcuni pazienti la malattia e' causata da un difetto di "splicing" nel gene CF ed e' pertanto importante per questi pazienti sviluppare una terapia mirata. Per esempio un farmaco in grado di correggere il difetto CFTR non avrebbe efficacia in questi difetti e viceversa. Il confronto tra i ricercatori si e' incentrato su come identificare gli errori di splicing, sui meccanismi di base e sullo sviluppo di terapie specifiche.

La Dottoressa Maria Tzetis di Atene ha analizzato l'importanza delle mutazioni di splicing facendo il punto sulla loro frequenza e correlazione con la severita' della malattia. Infatti e' noto che alcune mutazioni si associano a forme di malattia conclamata mentre altre a forme meno severe. Batsheva Kerem di Gerusalemme ha studiato come correggere una mutazione particolarmente frequente in Israele ed ha identificato alcune proteine che, quando prodotte in eccesso, sono in grado di rispristinare la normale funzione del gene CF. Franco Pagani, del Centro Internazionale di Ingegneria Genetica di Trieste ha identificato una nuova proteina TDP43 che e' implicata nei difetti di splicing del gene CFTR. In particolare, la riduzione di TDP43, ottenuta mediante "RNA interference", una promettente metodica attualmente in sviluppo per altre patologie, e' in grado di correggere un difetto di splicing. Tale incoraggiante risultato e' stato ottenuto attraverso un finanziamento della Fondazione FFC ed e' frutto di una ampia ricerca di base che ha portato in prima istanza alla caratterizzazione di numerose proteine regolatorie ed in seguito alla identificazione del bersaglio terapeutico ideale.

Sulla base delle evidenze presentate durante il simposio risulta sempre piu' chiaro che e' necessario identificare i meccanismi di base di ogni difetto di splicing (le mutazioni di splicing sono assai numerose) per potere in seguito sviluppare terapie per ogni singolo paziente. L'identificazione di proteine bersaglio coinvolte a vari livelli nello splicing rappresenta il primo passo per lo sviluppo e la ricerca di farmaci selettivi. Questi farmaci, potranno ora essere identificati mediante screening selettivi per lo splicing, e dovranno essere in grado di modificare l'espressione di queste nuove proteine bersaglio.

Il Dr Franco Pagani è coordinatore dei progetti #5/2003 e #15/2005 finanziati dalla Fondazione FFC e dedicati allo studio dei meccanismi di splicing e delle possibilità di correzione terapeutica delle relative anomalie.

IL GRUPPO DI LAVORO SULLO SCREENING NEONATALE DELL'EUROPEAN CYSTIC FIBROSIS SOCIETY

Il Dr. Carlo Castellani (a dx) assieme ad alcuni esperti di screening neonatale, tra cui il dr. Ph. Farrell (secondo da sx)

In occasione della ventottesima conferenza dell'European Cystic Fibrosis Society, tenutasi a Creta nel giugno 2005, si è tenuta la prima riunione del gruppo di lavoro sullo screening neonatale della società. Il gruppo si è venuto costituendo nell'anno precedente e conta attualmente più di 70 iscritti da nove nazioni europee.
Potenziali obiettivi del gruppo sono:
• creazione di team multidisciplinari che si occupino di screening neonatale per fibrosi cistica sia a livello locale che internazionale, e che connettano le problematiche di laboratorio e quelle cliniche dello screening
• standardizzazione di protocolli, creazione di linee-guida
• condivisione di informazioni tecniche sulle analisi del tripsinogeno immunoreattivo e di mutazioni
• creazione di un registro europeo che raccolga i dati connessi allo screening neonatale per fibrosi cistica
• valutazione dell'efficacia clinica della diagnosi precoce da screening
• creazione di strumenti in grado di aiutare la messa in atto di programmi di screening neonatale in regioni che ne stiano progettando l'implementazione
• formulazione di criteri diagnostici e di follow-up per le forme non classiche di malattia individuate dallo screening neonatale
• standardizzazione delle modalità di informazione sullo screening.

Nel corso della riunione sono stati presentati i risultati di un'indagine sulle strategie e procedure di screening in 26 regioni o nazioni europee, che interessano nel complesso più di 1.600.000 neonati all'anno. Inoltre sono state individuate 5 aree di interesse, per ognuna delle quali sono previsti sottogruppi e progetti specifici. Le aree sono:
1. protocolli, tecnologia e controllo di qualità nell'analisi del tripsinogeno immunoreattivo
2. analisi molecolare correlata allo screening neonatale
3. gestione dei risultati positivi, test del sudore, criteri di diagnosi
4. valutazione efficacia clinica, costi/benefici
5. informazione sullo screening neonatale, comunicazione di diagnosi.

Il Dr Castellani è membro del board direttivo della Società Europea Fibrosi Cistica (ECFS) ed è il promotore e coordinatore del gruppo europeo per lo screening neonatale CF.
Egli è partner in alcuni progetti di ricerca genetica finanziati dalla Fondazione FFC (# 6/2003, # 5/2004, #14/2005)

Domande significative dal sito della Ricerca CF

*Riportiamo dal sito **www.fibrosicisticaricerca.it** alcune domande, con relative risposte, pervenute negli ultimi tempi: esse possono dare una idea delle problematiche sollevate dai visitatori di questo sito, interessati da un lato agli sviluppi della ricerca CF e dall'altro ad aspetti molto pratici e concreti del vivere quotidiano con la fibrosi cistica*

NUOVE CURE

Sono in arrivo nuove cure che porteranno alla guarigione o perlomeno ad una aumentata speranza di vita?

Scorrendo la sezione "Progressi di ricerca" di questo sito può vedere come siano numerose e importanti le segnalazioni di nuovi farmaci "candidati" ad essere impiegati nei malati FC. Alcune di queste sostanze erano già conosciute, ma è nuova l'idea di usarle nella FC, con scopi diversi da quelli tradizionali (può vedere la scheda sulla doxorubicina, un chemioterapico noto da tempo), altre molecole sono del tutto nuove (può vedere la scheda sul PTC124), altre sono ancora da trovare ma intanto è importante aver individuato il modo di "legarle" alla proteina CFTR (veda la scheda"Siti di legame di farmaci attivatori sulla proteina CFTR").

L'aspetto del tutto nuovo della maggior parte di questi farmaci è che essi mirano ad agire non **più sulle conseguenze** del difetto di base (per esempio sull'infezione respiratoria), ma **sul difetto di base stesso**, vale a dire sulla proteina CFTR difettosa o sulla mutazione genetica responsabile della produzione della proteina difettosa. Questo vuol dire cercare cure non più per i sintomi, ma per la causa della malattia, vuol dire cercare la cura per guarire.
Questo avviene perché nel 1989 è stato scoperto il gene responsabile della malattia.
Da allora sono passati 16 anni e sono stati anni fruttuosi perché hanno visto un lento ma graduale progresso delle conoscenze, corrispondente ad una sempre maggiore "messa a fuoco" dell'obbiettivo. Ma non abbiamo ancora in mano il "risultato" sensazionale. La ricerca scientifica è un percorso imprevedibile e al momento nessuno può dire se la cura della fibrosi cistica verrà da questa somma di progressi o da una nuova sensazionale scoperta (chi scrive personalmente è più convinta della prima ipotesi).

L'aspetto problematico è che la maggior parte delle ricerche innovative, comprese quelle dei nuovi farmaci citati sopra, è ancora contenuta tra le mura dei laboratori e ci vogliono altre prove, altro "tempo" prima che si passi alla fase di sperimentazione nei malati. Invece chi è malato sente che il tempo è prezioso, non ha tempo di aspettare. Qui entra in gioco la speranza, un sentimento soggetto ad oscillazioni profonde, difficile da coltivare, impossibile da produrre in provetta nei laboratori, essenziale per vivere la vita di tutti i giorni. La Fondazione FFC è profondamente coinvolta nella ricerca scientifica FC: da parte della Fondazione possiamo dirle che più che in passato abbiamo ragioni concrete per sperare.

Dr Graziella Borgo

ACQUAPORINE: UNA NUOVA VIA DI RICERCA?

Ho appreso da alcune letture della recente scoperta delle acquaporine

(AQP) "... che costituiscono una famiglia di canali per l'acqua proteici largamente distribuiti in natura dove mediano il trasporto osmotico di acqua ed in alcuni casi anche di piccoli soluti anaelettroliti attraverso le membrane plasmatiche,.....". Considerato che uno dei problemi in F.C. è l'eccessiva concentrazione dei muchi bronchiali e di altri muchi o secrezioni in generale, è possibile una loro possibile diluizione naturale utilizzazndo in qualche modo tale scoperta?

Le acquaporine sono delle proteine di membrana che rendono possibile il passaggio osmotico di acqua (dentro e fuori le cellule).
Generalmente tali proteine si trovano entro le cellule in formazioni vescicolari che, in seguito ad uno stimolo ormonale, vengono trasportate sulla membrana delle cellule stesse. Fino ad ora sono state evidenziate varie forme di tali proteine, con localizzazione specifica in differenti epiteli. Nelle cellule dell'epitelio respiratorio è stata evidenziata una isoforma di acquaporina, chiamata AQP3. Alcuni studiosi hanno dimostrato che la permeabilità all'acqua mediata dalle proteine AQP3 è incrementata quando, sulla stessa membrana, è espresso il canale per il cloro CFTR (Schreiber R., Nitschke R., Greger R., Kunzelman K. J. Biol. Chem.1999;274:11811-16; Schreiber R., Pavenstadt H., Greger R., Kunzelman K. FEBS 2000;475:291-295).
Il meccanismo cellulare alla base dell'interazione CFTR-AQP3 non è noto, anche se è stata avanzata l'ipotesi che entrambe le proteine sono co-espresse nelle stesse vescicole che sono trasportate sulla membrana in seguito allo stimolo.
Nella patologia della fibrosi cistica, la mancata inserzione della proteina CFTR sulla membrana compromette anche la permeabilità all'acqua. Gli studi attuali sono diretti alla comprensione del meccanismo cellulare che è alla base dell'interazione CFTR -AQP3. Si stanno inoltre studiando i meccanisami cellulari e gli attivatori di altre acquaporine, quali la AQP4, che potrebbero collaborare al ripristino di una normale permeabilità all'acqua in cellule respiratorie (Jun ES, Kim YS, Jung JS. Life Sciences 2001; 68: 827-40).

Dr. Valeria Casavola, ricercatrice, Università di Bari

TERAPIE DELLA FIBROSI CISTICA IN FASE DI SPERIMENTAZIONE

Vorrei sapere se a livello europeo esiste una documentazione simile alla Cystic Fibrosis Foundation Therapeutics Pipeline nella quale si possono vedere le terapie e le cure per la fibrosi cistica nelle varie fasi di sperimentazione fino all'applicazione terapeutica aggiornate all'aprile 2005. Allego il link al suddetto documento in PDF: http://www.cff.org/UploadedFiles/research/files/CFFT%20PipelineforWeb%2004-05.pdf.

La cosiddetta "Pipeline" citata dalla nostra interlocutrice è uno schema che riassume i progetti di ricerca su farmaci potenzialmente utili nel trattamento della fibrosi cistica, finanziati dalla fondazione americana Cystic Fibrosis Foundation.
Lo schema riporta per ciascuno dei 28 farmaci in corso di studio lo stato di sviluppo della ricerca, secondo sei stadi: dalla fase di ricerca preliminare (identificazione di farmaci potenzialmente interessanti), agli studi preclinci (su linee cellulari e animali da laboratorio), agli studi clinici sull'uomo di fase I (testare la sicurezza del farmaco), a quelli di fase II (testare ancora la sicurezza ma anche alcuni aspetti di efficacia), a quelli di fase III (studi clinici definitivi) ed infine allo stadio di farmaci pronti per l'impiego corrente nei pazienti. Nell'ultimo aggiornamento (aprile 2005) la maggior parte di quei farmaci sono allo stadio di studi preclinici o di fase I-II.

Solo 4 farmaci (Pulmozyme, salina ipertonica, TOBI e Azitromicina) hanno superato la fase III di studio clinico e tre di essi (Pulmozyme, TOBI e Azitromicina) sono entrati già da anni nel trattamento corrente dei pazienti.
Per quanto concerne l'Europa non abbiamo documenti simili ma si possono trovare indicazioni sugli studi in corso finanziati dalle tre principali organizzazioni che sostengono la ricerca sulla fibrosi cistica. Esse sono:
- La Fondazione inglese **Cystic Fibrosis** Trust: www.cftrust.org.uk
- L'Associazione francese **Vaincre la Mucoviscidose:** www.vaincrelamuco.org/index.php
- La Fondazione italiana **Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica:** www.fibrosicisticaricerca.it (Sezione Ricerca e Formazione- Progetti di ricerca). NOTIZIARIO FFC quadrimestrale e NEWSLETTER periodica.

FORME DIVERSE DI FC

Volevo sapere se nella fc ci sono malati "leggeri", cioè che hanno una speranza di vita più lunga perchè in loro la fc è meno aggressiva.

Ci sono sicuramente in fibrosi cistica forme di malattia più "leggere" ed altre più gravi.
Oggi in particolare sta aumentando la conoscenza di forme leggere che in passato non sarebbero state nemmeno diagnosticate; come pure sono in aumento le diagnosi di forme dette "atipiche" perché non hanno l'associazione di sintomi che è tipica della FC "classica" (sintomi respiratori, sintomi intestinali e valori elevati di sodio e cloro nel sudore).
Nelle forme atipiche i sintomi possono riguardare in maniera localizzata solo i polmoni o il pancreas o altri apparati dell'organismo, come per esempio l'apparato riproduttivo; infatti sempre più vengono diagnosticati casi di un particolare tipo di infertilità maschile dovuta ad Atresia Congenita dei Dotti Deferenti, considerata una forma "leggera" di fibrosi cistica.

Però ci sono delle considerazioni da fare:
1) non tutte le forme leggere rientrano nelle forme atipiche: ci sono forme leggere anche nell'ambito della FC classica;
2) non tutte le forme atipiche possono essere definite leggere;
3) la malattia si può definire leggera per lo più quando ne è stato osservato il decorso su di un ampio arco di tempo;
4) non si può invece definire leggera o grave la malattia nei primi anni di vita o comunque quando l'osservazione è fatta su di un arco di tempo limitato.
Purtroppo mancano gli "indicatori di prognosi", cioè caratteristiche cliniche o indagini (nemmeno quella genetica raggiunge questo scopo) che permettano di fare previsioni certe e sicure per il futuro del singolo malato.
L'imprevedibilità dell'andamento rimane ancora oggi una caratteristica

della fibrosi cistica.

Dr. Graziella Borgo

PISCINA E RISCHIO DI PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Vorrei sapere se è effettivamente pericoloso per un bambino con FC frequentare la piscina per via dell'ambiente caldo-umido che favorisce il formarsi di batteri e se tale rischio è possibile anche nelle piscine all'aperto.

Il contatto di alcuni particolari tipi di batteri con le vie respiratorie dei bambini con FC può rappresentare un problema per il loro stato di salute. In particolare, Pseudomonas .aeruginosa, un batterio frequente nelle vie aeree delle persone con FC, ha il suo habitat naturale nelle acque dolci stagnanti. Non ci sono attualmente studi che misurino il rischio di contrarre infezione da Pseudomonas per i bambini FC che frequentano piscine. Tuttavia, le diverse linee guida sull'argomento sono concordi nel ritenere che se le piscine sono adeguatamente disinfettate con cloro ed hanno un adeguato ricambio di acqua possono essere frequentate in sicurezza da tutti compresi i bambini FC (senza distinguere tra piscine coperte o all'aperto). In particolare, le linee guida francesi dell'Associazione "Vaincre la Muco" suggeriscono che le piscine usate da pazienti FC abbiano una concentrazione di cloro tra 0,4 e 1,4 mg di cloro libero per litro, ed un pH tra 6,9 e 7,5. Diverso è invece il caso di terme, idromassaggi ed altri luoghi con presenza di acqua dolce calda vaporizzata non sottoposta a disinfezione. Questi luoghi sono considerati un ambiente favorevole alla proliferazione di Pseudomonas e tutte le linee guida ne sconsigliano la frequentazione alle persone con FC.

Dr Filippo Festini
(caposala Centro FC di Firenze)

L'USO DELLA PEP-MASK PUÒ DANNEGGIARE I POLMONI?

Volevo sapere se con il passare degli anni la pep può essere dannosa per il polmone. Può far perdere di elasticità e quindi deteriorare il tessuto polmonare? esistono studi riguardanti questo eventuale problema?

Per rispondere alla domanda è utile qualche precisazione sull'uso ed il razionale della PEP-mask per facilitare la mobilizzazione delle secrezioni bronchiali. Nell'impiego più corrente si utilizzano una maschera facciale (o un boccaglio) ed una resistenza espiratoria, cioè un sistema che riduce il diametro dell'apertura da cui esce l'aria (stenosi) durante l'espirazione. Questa resistenza o stenosi è variabile ed attiva solo durante la fase espiratoria e non interferisce con l'inspirazione, che è "libera". L'espirazione, incontrando una resistenza, non può avvenire passivamente, come si verifica durante il respiro normale, ma deve essere attiva, cioè deve verificarsi grazie all'intervento, alla contrazione dei muscoli addominali, che sono muscoli espiratori, che "pompano" l'aria verso l'esterno. Per la durata della contrazione degli addominali durante l'espirazione si forma a monte della resistenza (stenosi), quindi nelle vie aeree, una pressione positiva tanto maggiore quanto maggiore è la stenosi. Un manometro consente di controllare il livello di questa pressione e normalmente si fa in modo che non superi i 20 cmH2O. L'espirazione a labbra socchiuse produce lo stesso fenomeno di una pressione positiva nelle vie aeree di pochi (4-5) cmH2O.

Il calibro bronchiale normalmente varia in rapporto alla profondità e forza applicate durante l'inspirzione ed espirazione. Durante l'inspirazione profonda i bronchi si dilatano e durante l'espirazione attiva, più o meno forzata, il calibro dei bronchi si riduce. In presenza di bronchiectasie, l'alterazione tipica dei bronchi nella fibrosi cistica, la "debolezza" della parete bronchiale comporta che queste variazioni di calibro bronchiale siano accentuate: vi è una dilatazione abnorme durante l'inspirazione profonda ed una abnorme riduzione di calibro, fino al collasso del bronco, durante l'espirazione attiva. Uno dei razionali dell'uso della PEP-mask è proprio quello di impedire il collasso dei bronchi durante l'espirazione, grazie alla pressione positiva nelle vie aeree. L'azione sulle vie aeree è mantenuta solo durante la fase attiva dell'espirazione, con una pressione che può essere misurata e controllata con il manometro e per la durata dell'uso della PEP-mask. La PEP-mask facilita anche lo svuotamento degli alveoli, perchè è possibile e più facile prolungare la fase espiratoria. Ciò ha particolare significato nelle malattie delle vie aeree, nelle quali la durata dell'espirazione è insufficiente ad un completo svuotamento del polmone ed alcune vie aeree possono chiudersi spontaneamente durante l'espirazione. Possiamo perciò concludere che la PEP-mask ha effetti "protettivi" sulle vie aeree, poichè impedisce l'esagerata e brusca riduzione di calibro dei bronchi durante l'espirazione, e sugli alveoli, favorendo il loro svuotamento (ciò ostacola un "intrappolamento" di aria nel polmone).

La possibilità di "trauma" sulle vie aeree, e soprattutto sugli alveoli, esiste se si usano in modo continuo pressioni positive elevate nelle vie aeree specie durante l'inspirazione. Questo rischio di "barotrauma" (trauma da pressione) è osservabile quando si usano ventilatori, cioè macchine che erogano una pressione positiva nelle vie aeree sia durante l'inspirazione che durante l'espirazione per molti giorni di seguito. Nei reparti di cure intensive (rianimazione) si cerca di evitare che la pressione nelle vie aeree durante l'inspirazione sia superiore ai 30 cmH2O: pressioni inspiratorie così elevate possono danneggiare le delicate ed elastiche strutture alveolari. Gli studi si sono interessati proprio di questo aspetto ed oggi ci sono modalità di utilizzare i ventilatori con pressioni non dannose per le vie aeree e per gli alveoli.

Non vi sono studi specifici per la PEP-mask ma l'uso limitato a qualche decina di minuti al giorno, l'erogazione di una pressione positiva nelle vie aeree solo durante l'espirazione e a valori massimi di 20 cmH2O, fa escludere ragionevolmente la possibilità di un barotrauma significativo.
A ciò va aggiunto che oggi abbiamo a disposizione numerose tecniche e regimi di fisioterapia per mobilizzare le secrezioni bronchiali: sulla base delle caratteristiche della malattia polmonare, dell'efficacia di un regime drenante nel singolo malato, del suo adattamento al trattamento, è possibile proporre anche regimi di fisioterapia drenante diversi ed alternativi alla PEP-mask.

Dr Cesare Braggion
(Centro Fibrosi Cistica, Verona)

Il Cubo dei Sogni

AIUTA ANCHE TU A REALIZZARLI

Un cubo magico con la storia di Pinocchio e con le informazioni sulla Fibrosi Cistica.
Un graditissimo ed originale regalo per grandi e piccoli che aiuterà la ricerca.
Per informazioni ed ordinazioni rivolgersi alla Fondazione FC telefonando al numero: 045 8073604/3599

La III settimana della ricerca italiana per la fibrosi cistica

24-30 ottobre 2005

Torna in ottobre la terza edizione della Settimana dedicata alla ricerca CF. Essa è finalizzata a far conoscere la fibrosi cistica e i problemi che essa comporta: nonostante parecchi anni di sensibilizzazione della popolazione generale, manca ancora una conoscenza diffusa in Italia. Riproporremo soprattutto i temi del bisogno di attivare la ricerca finalizzata a far avanzare le conoscenze per cure risolutive. Ci varremo di **spot televisivi e radiofonici, di interventi informativi a livello di TV , quotidiani e riviste, di manifesti e depliant.**

A Verona ci sarà un **evento speciale per le scuole superiori:** una trentina di scuole della provincia parteciperanno ad un incontro di informazione e testimonianza presso il palazzo della Gran Guardia nei giorni 26, 27, 28 ottobre. Le stesse scuole si attiveranno per una **lotteria a premi** con il proposito di distribuire almeno 30 mila biglietti. Alcune scuole hanno adottato un progetto ed altre si uniranno in tale iniziativa, comunicando la loro esperienza di interazione scuola/ricerca CF.

Le Delegazioni della Fondazione FFC stanno preparando i loro programmi, che includono **spettacoli teatrali, concerti, lotterie, vendita di gadgets nelle piazze e tanto altro.**
Alcune Associazioni regionali CF, aderenti alla Lega Italiana Fibrosi Cistica, si attiveranno per raccogliere fondi per **l'adozione di nuovi progetti.**

Un appello viene rivolto a chiunque sia attento e sensibile alla necessità di sostenere la grande sfida italiana per la ricerca CF affinché organizzi **un evento nella propria città.** La segreteria della Fondazione si mette a disposizione per fornire supporto informativo e organizzativo (tel 045 807 3438 - 3599)

Con un posticipo di alcuni giorni rispetto alla Settimana, si terrà in una villa veneta del veronese, l'11 novembre, **un incontro di aziende** sensibili alle potenzialità di un rapporto concreto tra imprese e ricerca: alcune aziende hanno adottato un progetto CF, altre sono in procinto di farlo, altre hanno esperienza di interazione tra interessi dell'impresa e solidarietà sociale.

segue il programma preliminare di questo evento.

INVESTIRE IN RICERCA E COMUNICAZIONE AZIENDALE

Il caso della Ricerca Biomedica

Villa Arvedi,
Grezzana in Valpantena (Verona)
11 novembre 2005, ore 18.00

PROGRAMMA PRELIMINARE

Investire in ricerca nel contesto attuale
• Gestire la crisi della ricerca biomedica italiana: il contributo delle aziende
• Il sistema dell'imprenditoria e la ricerca: finalità e vantaggi
• Il contesto sociale: società, consumatori e portatori di interessi
• I nuovi incentivi fiscali: scaricare il 10% del reddito per le liberalità in favore della ricerca

Come si comunica oggi l'investimento in ricerca
• Il ruolo dei mezzi di comunicazione
• Il ruolo dei testimonial
• Comunicare la ricerca: un servizio agli utenti

Un'esperienza italiana: la Fondazione per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica (FFC)
• La Fondazione FFC: cosa fa e a cosa serve
• Il ruolo della scuola per amplificare la percezione del problema: il caso veneto
• Adotta un progetto, una iniziativa FFC: perché le aziende investono
Testimonianza di quattro aziende che hanno adottato un progetto

Nuove modalità di comunicare l'investimento in ricerca: il caso della Fondazione FFC
• Ricerca e Aziende: un programma televisivo dedicato
• Esperienze di associazionismo aziendale: il caso dell'Assimp
• Il "club della ricerca": coniugare e comunicare ricerca e impresa

Seguirà all'incontro un concerto di musica da camera ed una cena di gala.

"10 amici per la ricerca FC"

"10 Amici per la Ricerca FC". E' questo il tema della nuova iniziativa lanciata con il Notiziario n. 12 nell'aprile scorso e che ora viene riproposta ai nostri lettori. Vorremmo ricordare che tale campagna è finalizzata ad incrementare il numero delle persone che intendono approfondire la conoscenza dei problemi della fibrosi cistica e farsi sostenitori degli sforzi di ricerca compiuti dalla Fondazione FFC per aprire nuove vie di trattamento per i malati di fibrosi cistica. L'idea alla base di questa proposta è che ciascun lettore, convinto della causa per cui lottiamo, possa reclutare tra i suoi amici e parenti almeno 10 persone, che vengono informate ed accettano di farsi Amici della Fondazione, contribuendo con una donazione di almeno 15 euro. Questi nuovi Amici riceveranno un adesivo con il logo **"AMICO DELLA RICERCA FC"** e, periodicamente, tutte le informazioni sullo stato di avanzamento della ricerca CF e sulle attività della Fondazione. I migliori "reclutatori " di Amici riceveranno uno speciale premio a fine gennaio 2006. La campagna si chiuderà il 6 gennaio 2006.

Allegato a questo numero del Notiziario FFC si trova un fascicolo contenente le istruzioni per partecipare alla campagna e 10 bollettini di conto corrente postale da consegnare a 10 Amici per la loro adesione.

Eventi FFC prima estate 2005

BARDOLINO (VR)

24 aprile 2005

Neppure la pioggia, il freddo, la nebbia sono riusciti a fermare i partecipanti della prima "Gran Fondo Ciclistica di Bardolino" per la ricerca FC. In prima fila Matteo Marzotto, nostro consigliere di amministrazione e noto amante di ciclismo, è partito "fresco come una rosa" ed è ritornato solo con un po' di rugiada.

Matteo Marzotto alla Gran Fondo di Bardolino.
Foto: Giorgio Marchiori

Il Dott.Gianpaolo Letta,
Presidente della Medusa Film

ROMA

5 maggio 2005

Warner Village Moderno

MEDUSA FILM
Anteprima mondiale di beneficenza del Film
LE CROCIATE di Ridley Scott
L'incasso è stato interamente devoluto alla Fondazione FC

VERONA E DINTORNI

maggio

Mamma-rosa-ricerca

La festa della mamma è diventata un appuntamento per alcuni gruppi di volontari di offrire rose,o altri fiori, per la ricerca.
La gente apprezza e dona.

Rose tra le rose alla giornata della mamma
(Silvia, Gabriella e Marina)

26 maggio 2005

MILANO

Trussardi

"LA VIE", UNA BORSA PER LA VITA
Una borsa speciale realizzata da Beatrice Trussardi e Lavinia Borromeo è stata venduta in anteprima ai vip per contribuire al finanziamento dei progetti di ricerca promossi dalla Fondazione FC

Invito con borsa "La Vie"

Sembra, ma non è una foto d'archivio: è la passione ed il lavoro che ringiovanisce la nostra "Bottega delle donne" sempre in pole position per le donazioni!

BARCON DI VEDELAGO (TV)

5 giugno 2005

Barchessa di Villa Pola

Il Pic - nic della "Bottega delle donne" sta diventando un evento atteso ogni anno.
Sempre più affollato, più curato... più accattivante!

***Lorenzo del Grande Fratello 1**, cuoco macellaio, tra i colleghi (a dx **Alessandro Molon** coordinatore con **Luigi Bortolazzi**, Presidente dell' Associazione Macellai veronesi) della manifestazione.*

VERONA

12 giugno 2005

Loggiato della Gran Guardia

TANTO ARROSTO E NIENTE FUMO PER LA RICERCA SULLA FIBROSI CISTICA
Manifestazione gastronomica organizzata dall'Associazione Macellai Veronesi in collaborazione con la Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica.
Manifestazione riuscitissima: tanta gente, piatti eccezionali, sponsor generosi e... macellai da brivido.

LATINA E FONDI

giugno - luglio 2005

Spettacoli di danza, teatro e musica a Latina e Fondi per raccogliere i fondi per finanziare un progetto di ricerca in ricordo di Sara. L'Associazione Domus Mea di Latina ha dedicato tutti gli spettacoli di chiusura dell'anno a questo scopo. Molto apprezzata anche la commedia in dialetto fondano "Qual è ju peccate ?" scritta e diretta da Anna Cardogna con la compagnia "Gli amici del teatro" rappresentata al Teatro Tenda Gobetti di Fondi

Performance del corso "Teatro per conoscersi" tenuto da Paola Tulli alla Domus Mea di Latina

CHERUBINE (VR)

19 giugno

Presso il campo sportivo

Grande successo del pranzo per la ricerca sulla fibrosi cistica organizzato dall'Associazione di giovani **"il SORRISO di JENNY"**
con il patrocinio del Comune e dei servizi sociali di CEREA (VR).**Evento da ripetersi a breve!**

MONCALIERI (TO)

19 luglio

Grande estrazione a premi per la ricerca Fibrosi cistica
Il ricavato al netto delle spese è stato di 4000 €.
Il ricavato di informazione al netto dell'impegno del piccolo gruppo di volontari è stato grande!
Bravissimi!

CRESPADORO, ARZIGNANO, VALDAGNO (VI)

luglio-agosto

Serata conclusiva di un nutrito pacchetto di iniziative (teatro - concerti di musica classica - sport -concerti di gruppi rock - gastronomia) iniziate con la primavera in molti paesi vicentini bagnati dall'Agno. Il promotore è sempre lui: il vulcanico Dario Antoniazzi, responsabile della Delegazione di Vicenza della nostra Fondazione. E' ovvio che Dario riesce a far tutto ciò perché in questi anni è riuscito a creare un gruppo di volontari, a sensibilizzare amministratori, a coinvolgere sponsor e a mobilitare la stampa. A tutti loro un grazie molto particolare.
Ai nostri lettori ricordiamo che in ottobre ci sarà la presentazione del III CD compilation "Musica & Solidarietà" e che possono richiederlo alla Delegazione di Vicenza. Inoltre per essere aggiornati sulle molteplici attività della Delegazione collegarsi con il sito www.fibrosicisticavicenza.it

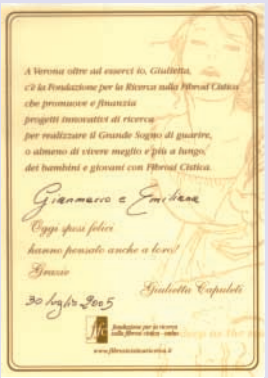
*"Musica & Solidarietà" in tour ad Arzignano e Crespadoro **(VI)***

Il gruppo organizzatore di "Musica e Cabaret" di Valdagno con la cabarettista Giusy Zenere (da sx Fornasa, Granello, Antoniazzi)

W GLI SPOSI

Ai neosposini
Gianmarco-Emiliana
e Federico-Veronica
che hanno voluto sperimentare le nostre pergamene
l'augurio di tanta Felicità!

le pergamene per la ricerca
da richiedere alla Fondazione



Riunione del consiglio di amministrazione della fondazione

Il presidente, Vittoriano Faganelli, il consigliere Valerio Alberti e la segretaria Gabriella Cadoni

Il 6 maggio scorso si è riunito il Consiglio di Amministrazione per discutere il seguente ordine del giorno:

- Approvazione bilancio consuntivo della Fondazione anno 2004
- Relazione consuntiva (2004) e programmatica (2005) sulle attività scientifiche della Fondazione
- Esame programma attività di marketing e relativo piano di spesa per l'anno 2005. Provvedimenti
- Intesa con la Lega Italiana Fibrosi Cistica

Il CdA ha approvato il consuntivo economico 2005, che ha registrato come entrate la somma complessiva di euro 892.498,45. C'è stato un incremento di entrate del 98,11% rispetto all'anno precedente. Esse sono così ripartite: donazioni € 485.675,76; eventi € 393.856,90; altro (interessi bancari) € 12.965,79.
Le uscite hanno raggiunto complessivamente € 765.841,13, con la seguente ripartizione: formazione € 39.710,50; Informazione € 147.657,46; organizzazione eventi € 50.701,85; personale € 76.318,74; spese funzionamento sede € 31.462,44; progetti di ricerca € 413.844,92; varie € 6.145,22. Il 78,50% delle spese effettuate sono state destinate alla "mission" della Fondazione (ricerca, formazione, informazione), il rimanente 21,5% alle spese di gestione e di organizzazione eventi.

Il CdA ha approvato la relazione scientifica, basata sulle attività di ricerca, di formazione e informazione, di cui questo Notiziario ha dato ampia comunicazione nei vari numeri del 2004 e 2005.
Sulla base delle disponibilità finanziare acquisite, il CdA ha approvato un preventivo di spesa per il 2005 di € 897.000, così ripartito: ricerca € 650.000; formazione € 60.000; informazione-comunicazione € 55.000; organizzazione eventi € 45.000; gestione sede e servizi € 25.000; personale € 80.000; varie € 22.000.
Il programma di marketing sociale prevede numerose iniziative di raccolta fondi (di cui questo Notiziario ha dato ampie informazioni), che dovrebbero portare ad un incasso stimato complessivo nel 2005 di € 1.027.000.

Circa l'intesa con la Lega Italiana FC, essa viene confermata anche per l'anno 2005. Vi sarà in particolare collaborazione per la Settimana della Ricerca Italiana FC (24-30 ottobre2005).
Le Associazioni aderenti alla Lega si impegneranno in particolare nell'adozione di progetti selezionati dalla Fondazione nel 2005. Il CdA intende al momento attendere lo sviluppo degli eventi relativi all'istituzione di un laboratorio nazionale di ricerca CF, disponibile a prendere in considerazione in futuro un eventuale progetto in tal senso da attuarsi di comune intesa con la Lega.

Alcuni consiglieri alla riunione del CdA del 6 maggio

Stato di avanzamento e risultati dei progetti finanziati dalla Fondazione dal 2002 al 2004

Abbiamo pensato di condividere con i nostri sostenitori alcuni aspetti essenziali dei risultati sinora ottenuti e dello stato di avanzamento, al 31 luglio 2005, dei 36 progetti selezionati e finanziati dalla Fondazione tra il 2002 e il 2004, con il contributo di quanti hanno voluto investire con noi su importanti direzioni di studio, rivolte a conoscere di più della fibrosi cistica e contribuendo a piccoli ma significativi passi verso nuove soluzioni di cura. La Fondazione ha impegnato per i 36 progetti la somma complessiva di euro 1.700.000.

I brevi sommari riportati sono stati redatti dai responsabili dei 36 progetti. Abbiamo consapevolezza che per taluni di essi la comprensione può essere non agevole per i non addetti ai lavori. Al momento abbiamo comunque preferito pubblicarli così come ce li hanno trasmessi i ricercatori, ma ci ripromettiamo di preparare una sintesi più popolare per il prossimo Notiziario, quando potremo disporre anche delle informazioni più aggiornate e complete che verranno comunicate in novembre alla Convention d'Autunno dei Ricercatori Italiani CF.

PROGETTI 2002

Progetto FFC #1/2002 (concluso)
Adottato totalmente da: "La Bottega delle donne" - Delegazione FFC di Montebelluna (TV)
Titolo: ***Minicromosomi: un nuovo approccio terapeutico per la terapia genica della Fibrosi Cistica***
Responsabile: *Fiorentina Ascenzioni* (Dipartimento di Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Università "La Sapienza" Roma)
Partners: *Massimo Conese* (Istituto per la terapia sperimentale della fibrosi cistica, HSR, Milano) *Olga Zegarra-Moran* (Istituto Gianna Gaslini, Genova)
Durata: 2 anni **Finanziamento:** 131.000 euro

RISULTATI:

Il progetto minicromosomi ha lo scopo primario di valutare le possibili proprietà terapeutiche di un minicromosoma contenente il gene CFTR in modelli FC. Tale progetto, organizzato nella sua formulazione originale con un piano di lavoro della durata di 4 anni è stato successivamente riorganizzato in modo da suddividerlo in due fasi biennali, di cui la prima prevedeva l'uso di modelli FC in vitro. Al termine di questa fase, che ha impegnato tre giovani ricercatori ed i rispettivi coordinatori, i risultati prodotti possono essere così riassunti.

Sono stati valutati diversi modelli cellulari FC quali possibili ospiti del minicromosoma MC1-CFTR A tale scopo cellule epiteliali FC e non-FC sono state analizzate per i diversi parametri che normalmente vengono considerati al fine di valutare la funzionalità della CFTR:

- *la formazione di un epitelio in coltura*
- *la misurazione della funzionalità del canale CFTR con metodi elettrofisiologici*
- *la produzione della citochina IL-8 coinvolta nel processo infiammatorio*
- *l'interazione delle cellule con i batteri che mimano le infezioni batteriche presenti nei pazienti FC*
- *il numero di copie del gene CFTR mutato presente nelle cellule*
- *la sensibilità alle diverse procedure di fusione cellulare utilizzate per trasferire il minicromosoma contenente il gene normale dalle cellule donatrici alle cellule riceventi*
- *la messa a punto delle analisi molecolari per l'individuazione delle cellule FC che hanno acquisito il minicromosoma*

I risultati ottenuti ci hanno permesso di effettuare una scelta tra 6 linee cellulari analizzate prendendo in considerazione tutti i parametri ma dando priorità alla migliore risposta alla procedura di trasferimento del minicromosoma. Come risultato di questa scelta abbiamo individuato nelle linee cellulari IB3 ed FRT i possibili ospiti del minicromosoma. Entrambi le linee cellulari, di cui la prima è di origine umana e la seconda di ratto, permettono infatti di evidenziare con metodi molecolari ed elettrofisiologici la funzionalità del canale CFTR. Esperimenti di fusione cellulare con microcellule prodotte dal donatore CHO/MC1-CFTR hanno infatti prodotto cloni IB3 e cloni FRT che, pur mantenendo le caratteristiche delle cellule riceventi, presentano alcuni marcatori propri del minicromosoma. Questi cloni sono ora in fase di analisi citogenetica per determinare la composizione del loro genoma e la sua stabilità. È infatti possibile che, pur avendo utilizzato microcellule per trasferi-

re il minicromosoma, siano stati trasferiti anche altri cromosomi del donatore. L'altro aspetto da controllare è la presenza e l'integrità strutturale e funzionale del minicromosoma e del gene CFTR in esso contenuto.

Progetto FFC #2/2002 (Concluso)

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

Responsabile: *Massimo Conese* (Istituto per la terapia sperimentale della fibrosi cistica, HSR, Milano)

Durata: 3 anni **Finanziamento:** 131.000 euro

RISULTATI:

I lentivirus (LV) sono vettori integranti (si inseriscono stabilmente nelle cellule da curare) 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 in modelli preclinici di terapia genica per la Fibrosi Cistica. 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 con Fibrosi Cistica. L'instillazione intratracheale del lentivirus, recante il gene marcatore "Green Fluorescence Protein (GFP)", dimostra che esso si trasferisce (traduce) all'epitelio respiratorio del polmone a due settimane. L'espressione della GFP non è osservata ad un mese dalla somministrazione e compare dopo tre mesi, indicando la "traduzione" di un compartimento progenitore nelle vie aeree. Il trasferimento genico non induce la formazione di infiltrati di cellule infiammatorie nel polmone trasdotto rispetto al controllo non infettato. Per quanto riguarda l' efficienza nei tessuti umani, il lentivirus trasduce l'epitelio respiratorio nel modello preclinico della trachea e polmone fetali. Il nostro studio indica che un vettore lentivirale è molto efficiente nell' epitelio respiratorio, ha un potenziale infiammatorio ridotto e potrebbe essere molto promettente per la terapia genica della FC.

Progetto FFC #3/2002 (Concluso)

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

Responsabile: *Paola Melotti* (Centro Regionale Fibrosi Cistica, Ospedale Maggiore - Verona)

Durata: 3 anni **Finanziamento:** 131.000 euro

RISULTATI:

All'azitromicina (AZM), antibiotico utilizzato con sempre maggior interesse per la terapia della fibrosi cistica (FC), sono state attribuite tante possibili proprietà. Abbiamo cercato di capire come questo farmaco può essere utile per la terapia della FC. In diversi tipi di cellule di epitelio delle vie respiratorie con caratteristiche della FC l'AZM è risultata capace di ridurre la produzione di interleuchina 8, una molecola protagonista dell'infiammazione in FC. Questa capacità può essere alla base di effetti anti-infiammatori del farmaco ed è stata ulteriormente approfondita. E' risultato che l'AZM riduce l'attività di alcuni fattori in grado di far produrre varie molecole favorenti l'infiammazione. L'analisi su larga scala di geni che possono essere influenzati dal farmaco ha permesso l'identificazione di nove nuovi bersagli dell'AZM. Poiché la risposta alla terapia con AZM risulta variabile 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 in questo studio non permettono di proporre un'analisi genetica utile per tale scopo.

Progetto FFC #4/2002 (Concluso)

Titolo: ***Markers tassonomici e di virulenza di ceppi di Burkholderia cepacia associati alle infezioni respiratorie in pazienti FC***

Responsabile: *Roberta Fontana* (Laboratorio Microbiologia, Ospedale Maggiore - Verona)

Durata: 2 anni **Finanziamento:** 17.560 euro

RISULTATI:

L'infezione da Burkholderia cepacia (B. c.) rappresenta uno degli eventi problematici per il paziente affetto da fibrosi cistica (FC) per le pesanti conseguenze in termini sia di morbilità sia di mortalità. La riduzione dell'incidenza di tali infezioni si è avuta quando, dimostrando la possibilità di infezioni crociate fra i pazienti di uno stesso centro, si sono adottate, di conseguenza, strette misure di controllo e di segregazione fra pazienti. La precisa identificazione di B.c. è pertanto fondamentale per la corretta gestione del paziente FC. Nonostante siano stati messi a punto numerosi terreni e protocolli per la coltura e identificazione di questo microrganismo, altri batteri gram-negativi vengono frequentemente ed erroneamente identificati come B.c. Obiettivo del progetto è stato l'applicazione delle tecniche di biologia molecolare allo studio dell'epidemiologia dei diversi genomovar e/o specie di B.cepacia complex nei pazienti FC del Centro di Verona . 163 ceppi isolati da 82 pazienti e identificati come B.c. mediante prove biochimiche sono stati riidentificati mediante analisi dei profili di restrizione del gene dell'rRNA 16S generati dall'enzima DdeI e del gene recA generati dagli enzimi HaeIII e MnlI Un'elevata percentuale (26%) di ceppi biochimicamente identificati in precedenza come B.c. non sono stati confermati come tali dall'indagine genetica, suggerendo la necessità di estendere quest'ultimo tipo di indagine a tutti i batteri gram-negativi non fermentanti isolati da pazienti FC. I nostri risultati indicano che le maggiori incongruenze si sono riscontrate per A.xilosoxidans, S. maltophilia e B. gladioli. Inoltre, l'analisi dei RFLP del gene recA dei 121 ceppi geneticamente confermati come appartenenti a B.c. complex ha permesso la seguente suddivisione: genomovar I 8.3%, genomovar II 5.8%, genomovar III-A 37.2%, genomovar III-B 47.10% e genomovar V 1.6%. Nessun ceppo possedeva il marker di virulenza cblA, mentre il 37.9% possedeva il marker BCESM riscontrato in ceppi virulenti epidemici. I genomovar III-A e III-B si sono confermati come i più diffusi nella popolazione FC afferente al Centro di Verona, risultato in linea con l'andamento epidemiologico di altri centri nazionali ed internazionali. Il nostro studio ha anche confermato l'elevato grado di resistenza agli antibiotici dei ceppi appartenenti al genomovar III (oggi chiamato B. cenocepacia), caratteristica questa associabile alla maggiore gravità delle infezioni da questi causate.

PROGETTI 2003

Progetto FFC #1/2003 (Si conclude al 31.08.05)

Titolo: ***Regolazione del canale CFTR mediante interazione proteina-proteina***

Responsabile: *V. Casavola* (Dip. Fisiologia Università di Bari)

Partner: *M. Zaccolo* (Ist. Veneto di Medicina Molecolare, Padova)

Durata: 2 anni **Finanziamento:** 50.000 euro

RISULTATI:

L'evidenza che la proteina CFTR mutata conservi almeno parzialmente la propria funzione di canale ionico, ha suggerito nuove strategie terapeutiche per il ripristino della funzionalità della proteina, alcune delle quali mirate sia all'amplificazione del segnale di trasduzione AMPc-dipendente, che alla maggiore espressione/ritenzione della proteina sulla membrana. Recentemente abbiamo dimostrato una reciproca interazione tra CFTR e il trasportatore ionico Na+/H+. Tale interazione è mediata dalla proteina sub-apicale NHERF, la cui funzione sembra quella di connettere in complessi multiproteici diverse proteine e chinasi (enzimi) rendendo possibile una migliore regolazione del trasporto transepiteliale di cloruro di sodio in epiteli polarizzati. Abbiamo analizzato le dinamiche di interazione mediante le quali NHERF regola l'inserzione e l'attività del CFTR sulla membrana, evidenziando come NHERF in cellule CFBE41o-, derivate da un soggetto affetto da fibrosi cistica (mutazione DF508), si ottenga una maggiore espressione, esaltando la sintesi di proteina CFTR sulla membrana e il ripristino dell'attività secretoria del cloro. Parallelamente, mediante tecniche di FRET (Fluorescence Energy Tranfer), stiamo analizzando come la protein chinasi AMP ciclico- dipendente (un enzima cardine per l'attivazione del canale CFTR) possa essere diversamente compartimentalizzata in cellule "sane" o CF e come l'espressione della proteina NHERF possa influenzare tale processo.

Progetto FFC #2/2003

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

Responsabile: *O. Moran* (Ist. Biofisica CNR, Genova)

Partners: *O. Zegarra* (Lab. Genetica Molecolare "Gaslini", Genova; V. Martorana, Ist. Biofisica CNR, Palermo)

Durata: 3 anni **Finanziamento:** 60.000 euro

RISULTATI:

Parecchi gruppi hanno intrapreso la ricerca ed identificazione di sostanze capaci di attivare la CFTR, anche quando questa ha funzione ridotta per la presenza di alcuni tipi di mutazioni. Alcune di queste sostanze sono considerate come buoni punti di partenza per la ricerca di farmaci per la terapia dei pazienti. Siccome lo sviluppo di farmaci adeguati richiede una dettagliata conoscenza dei meccanismi di azione, il nostro gruppo sta lavorando nell'identificazione del sito d'azione di queste sostanze e nella comprensione delle interazioni molecolari coinvolte. Utilizzando sia metodi teorici, mediante la modellistica molecolare al calcolatore, che mediante il confronto con dati sperimentali, abbiamo sviluppato un modello molecolare della regione della CFTR implicata nel legame e abbiamo ipotizzato la natura dell'interazione tra queste sostanze e il loro sito. I risultati ottenuti ci hanno permesso di proporre un'ipotesi concreta per spiegare il meccanismo d'azione di queste sostanze. Questo tipo di approccio ci sarà molto utile per migliorare il potenziale terapeutico degli attivatori della CFTR e dare le basi per il disegno di farmaci per il trattamento della fibrosi cistica.

Progetto FFC #3/2003 (si conclude al 31 .08.05)

Adottato parzialmente da: Fondazione Cariverona

Titolo: Screening di farmaci già approvati per uso umano al fine di identificare nuovi mezzi farmacologici per la terapia della fibrosi cistica.

Responsabile: *L. Galietta* (Lab. Genetica Molecolare Ist. "G. Gaslini", Genova)

Partners: *M. Mazzei* (Dip. Scienze Farmaceutiche Università di Genova) *M. Conese* (Ist. Terapia Sperimentale CF, Osp. S. Raffaele, Milano)

Durata: 2 anni **Finanziamento:** 60.000 euro

RISULTATI:

La strategia del progetto è basata sulla valutazione in vitro dei farmaci già in uso per il trattamento di altre malattie allo scopo di trovare eventuali sostanze che possano correggere il difetto funzionale presente nella fibrosi cistica. In questo modo si potrebbero scoprire trattamenti di più rapida applicazione clinica. E' stato effettuato lo screening di 2000 composti chimici che comprendono sia farmaci approvati sia sostanze di origine naturale. Si è valutata la capacità di tali composti di stimolare l'attività della proteina CFTR con mutazioni che causano la fibrosi cistica (FC). Lo screening ha portato all'identificazione di una famiglia di farmaci in grado di stimolare il canale CFTR quando questo è già presente sulla membrana cellulare e quindi di correggere il difetto di attività causato dalle mutazioni quali deltaF508, G551D, G1349D e D1152H. Sono ora in corso indagini per la valutazione di sostanze che siano invece capaci di riportare la proteina CFTR con la mutazione deltaF508 nella sua giusta posizione cellulare.

Progetto FFC #4/2003 (Si conclude al 31.08.05)

Titolo: Identificazione di geni modificatori mediante studi di famiglie e analisi " microarray"

Responsabile: *G. Novelli* (Dip.to Biologia Sez. Genetica, Università Torvergata, Roma)

Partners: *P.F. Pignatti* (Dip.to Materno-infantile, Sez. Biologia e Genetica, Università di Verona) *F. Salvatore* (Dip. Biochimica e Biotecnologie, Università di Napoli "Federico II°)

Durata: 2 anni **Finanziamento:** 30.000 euro

RISULTATI:

La Fibrosi Cistica è una malattia monogenica (unico gene), 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. L'identificazione di geni modificatori potrebbe essere importante per prevedere l'espressione clinica della malattia e 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 far-

maci, basati sulla conoscenza del funzionamento di questi geni. Il progetto di ricerca è stato condotto 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 mediante "microarray" (tecnologia avanzata di processore elettronico per l'analisi contemporanea di moltissimi campioni) in linee cellulari FC con diverso genotipo hanno permesso di concludere che l'espressione dei potenziali geni modificatori in cellule FC è fortemente dipendente dal genotipo CFTR, e mostrano come la diversa gravità delle mutazioni influenza l'espressione genica della cellula. Studi di associazione fra vari geni candidati e e manifestazioni polmonari, gastrointestinali ed epatiche hanno invece messo in evidenza l'importanza, come possibili geni modificatori, di TNFa (suggerendo un'origine infiammatoria della sindrome e quindi un coinvolgimento del sistema immunitario), alfa-1-antitripsina, HFE (gene-malattia dell'emocromatosi) e lectina legante il mannosio (MBL).

Progetto FFC #5/2003 (Si conclude al 31.08.05)
Titolo: ***Patologia molecolare del "CFTR pre-mRNA splicing": aspetti diagnostici e terapeutici***
Responsabile: *F. Pagani* (Internat. Centre Genetic Engineering & Biotechnology, Padriciano Trieste)
Durata: 2 anni **Finanziamento:** 40.000 euro
RISULTATI:
Lo studio coordinato dal Dr Franco Pagani ha identificato un nuovo bersaglio terapeutico, la proteina TDP43 che e' implicata nei difetti di "splicing" del gene CFTR (le mutazione dette di "splicing" impediscono il trasferimento dell'informazione genetica dal DNA al RNA messaggero, ostacolando così la sintesi della proteina CFTR). Tale proteina e' stata selezionata, tra numerose proteine regolatorie precedentemente identificate, per le sue particolari caratteristiche inibitorie sullo splicing. In particolare si e' dimostrato che la riduzione di TDP43, ottenuta mediante "RNA interference", una promettente metodica attualmente in sviluppo per altre patologie, e' in grado di correggere un difetto di splicing. Tale risultato apre la possibilita' di sviluppare farmaci mirati che siano in grado di modulare l'espressione di TDP43, e pertanto correggere i difetti di splicing del gene CFTR.

Progetto FFC #6/2003 (Concluso)
Titolo: ***Valutazione del possibile utilizzo del genotipo CFTR-M470V per la determinazione del rischio di portatore del gene della fibrosi cistica***
Responsabile: *P.F Pignatti* (Dip.to Materno-infantile, Sez. Biologia e Genetica, Università di Verona)
Partners: *C. Castellani* (Centro Fibrosi Cistica, Verona; G. Modiano Dip. Biologia, Università Torvergata, Roma)
Durata: 1 anno **Finanziamento:** 20.000 euro
RISULTATI:
Questo studio si proponeva di determinare se i geni CFTR che si presentano la variante M del polimorfismo M470V hanno un rischio aumentato rispetto a quelli con la variante V di presentare, in un'altra posizione, anche una mutazione causa di fibrosi cistica (FC). Per verificare questa ipotesi abbiamo analizzato il polimorfismo M470V e le principali mutazioni causa di fibrosi cistica in un campione di 170 famiglie di pazienti affetti da FC, per un totale di 510 individui. Essendo già noto che la mutazione DF508 si trova sui geni CFTR che presentano la variante M del polimorfismo, i pazienti selezionati avevano almeno una mutazione diversa dalla DF508. E' stato possibile determinare quale variante del polimorfismo fosse associata con la mutazione FC in 152 delle famiglie studiate, per un totale di 304 geni: 100 geni sono stati esclusi perché portavano la mutazione DF508 e l'analisi statistica si è focalizzata sui 204 restanti. La variante M è stata trovata in 171/204 geni (84%), un valore di molto superiore all'atteso, dato che la variante M è presente nella popolazione generale con una frequenza del 38.5%. I risultati ottenuti confermano quindi la presenza preferenziale delle mutazioni causa di FC nei geni CFTR con la variante M del polimorfismo M470V. L'analisi di questo polimorfismo permette pertanto di identificare gli individui (o le coppie) che hanno un rischio maggiore di avere mutazioni FC, sui quali può essere più indicato proseguire con l'analisi genetica molecolare per identificare l'eventuale mutazione: un individuo omozigote per la variante M e non portatore di DF508 avrebbe un rischio di essere portatore di una mutazione FC di 1/23, circa 8 volte superiore rispetto ad un individuo omozigote per la variante V, il quale avrebbe invece un rischio di 1/190. L'analisi del polimorfismo M470V potrebbe essere utile come primo approccio di screening del portatore nella popolazione generale o per iniziare le indagini in paesi economicamente svantaggiati, dati i costi contenuti e la semplicità del test con cui viene analizzato questo polimorfismo.

Progetto FFC #7 /2003 (Si conclude al 31.08.05)
Titolo: ***Proteomica del liquido di superficie delle vie aeree: implicazioni per la fibrosi cistica***
Responsabile: *O. Zegarra* (Lab Genetica Molecolare, Ist. G. Gaslini, Genova)
Partners: *G. Candiano* (Lab. Fisiopatologia-uremia, Ist. G. Gaslini, Genova); *L. Bini* (Dip. Biologia Molecolare, Università di Siena); *V. De Rose* (Malattie Respiratorie, Dip. Scienze Cliniche e Biologiche, Università di Torino)
Durata: 2 anni **Finanziamento:** 55.000 euro
RISULTATI:
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 (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, che hanno un ruolo importante nei meccanismi di difesa dai batteri. Lo scopo del nostro progetto è l'identificazione delle proteine secrete dall'epitelio bronchiale nel fluido periciliare ipotizzando che, nella fibrosi cistica (FC), la perdita o riduzione di alcune di queste abbia 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 portando il livello di identificazione a 180 spot proteici per un totale di 60 famiglie di proteine. Di queste, la metà è risultata essere modulata da almeno uno dei seguenti stimoli infiammatori: TNF-alpha, interleuchina-1beta, interleuchina-4 e gamma-interferone. Sono risultate particolarmente interessanti 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 studiato il fluido superficiale ottenuto da epiteli di alcuni pazienti FC con fenotipo severo. Abbiamo riscontrato 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.

Progetto FFC #8/2003

Adottato totalmente da: Delegazione FFC di Bologna
Titolo: Regolazione genica e mutazioni adattative di Pseudomonas aeruginosa in un modello di infezione polmonare cronica per la fibrosi cistica
Responsabile: *Alessandra Bragonzi* (Istituto Terapia Sperimentale CF, S.Raffaele, Milano)
Partner: *Gerd Doering* (Institut fur Allgemeine Hygiene und Umwelthygiene, Universitat Tübingen)
Durata: 3 anni **Finanziamento:** 45.000 euro
RISULTATI:
Nelle vie aeree di pazienti FC, P. aeruginosa è sottoposta a condizioni di stress quali anaerobiosi, pressione del sistema immunitario e trattamenti antibiotici. In queste condizioni, P. aeruginosa cambia il suo fenotipo (modo di manifestarsi e di agire) in mucoide, producendo un polisaccaride extracellulare chiamato alginato, considerato oggi il principale fattore di virulenza in FC. Il presente progetto ha studiato la cinetica, l'impatto di segnali ambientali e la genetica dell'espressione di alginato in un modello animale ed in pazienti FC. Condizioni di anaerobiosi (assenza di ossigeno) aumentano l'espressione genica di alginato di P. aeruginosa in vitro e nel polmone di topo entro 24 ore dall'infezione. Queste caratteristiche contribuiscono a determinare la persistenza del batterio nel polmone in una fase precoce della malattia FC. L'acquisizione di mutazioni adattative in geni muc del batterio e la trasformazione dei ceppi batterici in mucoidi dovrebbe avere un ruolo determinante nella progressione della malattia in una fase cronica. Quando ceppi clinici, isolati da due gruppi di pazienti FC con un decorso dell'infezione tra loro diverso, sono stati analizzati per la presenza di mutazioni, non è stata rilevata associazione tra genotipo mutato e severità della malattia polmonare. Altri geni batterici potrebbero avere un impatto determinante nella patologia e sono ancora oggetto di studio.

Progetto FFC #9/2003 (Si conclude al 31.08.05)

Titolo: 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
Responsabile: *R. Fani* (Dip. Biologia Animale e Genetica, Università di Firenze)
Partners: *G. Manno* (Lab. Malattie Infettive, Dip. Pediatria Ist. G. Gaslini, Università di Genova); *S. Tabacchioni* (Sez. Genetica e Genomica Vegetale, ENEA, Roma); *G. Taccetti* (Centro Fibrosi Cistica, Firenze)
Durata: 2 anni **Finanziamento:** 30.000 euro
RISULTATI:
I batteri appartenenti al Burkholderia cepacia complex (Bcc) rappresentano una delle principali cause di infezione e mortalità nei pazienti FC. Attualmente il Bcc comprende 9 specie che spesso sono difficili da identificare nella routine clinica. Il progetto ha previsto la messa a punto di un metodo diagnostico innovativo, basato sulla tecnica SNuPE (Single Nucleotide Primer Extension), che permette di ottenere un profilo, simile ad un codice a barre, specifico di ogni specie. A questo scopo un frammento del gene gyrB di circa 1900 bp di 68 ceppi clinici e ambientali, rappresentativi di tutte le specie, è stato amplificato mediante PCR e sequenziato. L'analisi delle sequenze ottenute ha evidenziato più di 400 siti polimorfici; 6 di questi sono stati utilizzati per disegnare un set di 6 "primer" (sequenza specifica di DNA usata per l'analisi genetica) impiegati per ottenere profili specifici di ogni specie. I primer sono stati utilizzati sia singolarmente che contemporaneamente sul DNA di 27 ceppi batterici rappresentativi di tutte le specie del Bcc. I risultati mostrano che i profili ottenuti permettono di discriminare le diverse specie del Bcc e pertanto evidenziano le grandi potenzialità di questa tecnica nelle analisi cliniche di routine.

Progetto FFC #10/2003 (Si conclude al 31.08.05)

Titolo: ***Il sistema di regolazione "Quorum sensing" nel batterio patogeno emergente Burkholderia cepacia***
Responsabile: *V. Venturi* (Internat. Centre Genetic Engineering & Biotechnology, Padriciano Trieste).
Durata: 2 anni **Finanziamento:** 30.000 euro
RISULTATI:
Il Quorum Sensing (QS) è un sistema di regolazione genica che permette ai batteri di monitorare la densita' raggiunta dalla loro comunita' e di attivare o reprimere, in risposta alla crescita raggiunta, una serie di geni. Questo tipo di comportamento si basa sulla produzione e riconoscimento di molecole segnale chiamate autoinduttori ed e' un sistema usato da molte specie batteriche. Studi su P. aeruginosa hanno dimostrato che il QS gioca un ruolo fondamentale nello stabilire e cronicizzare le infezioni batteriche in pazienti affetti da fibrosi cistica regolando la produzione di fattori di virulenza e di biofilm maturi. Il progetto ha visto la caratterizzazione dei geni responsabili del meccanismo QS nel patogeno Burkholderia cepacia. Si e' visto che il sistema QS di questo batterio si basa su molecole segnale conosciute come "acil-omoserin-lattoni" e regola la produzione di fattori di virulenza. Sono stati anche isolati 28 geni di Burkholderia regolati dal sistema QS, cosa che ha evidenziato ancora di piu' la sua caratteristica di regolatore globale. Il nostro lavoro, insieme a quello di altri due

laboratori, ha dimostrato che il sistema QS è necessario per garantire a Burkholderia il successo dell'infezione e quindi puo' essere un obbiettivo per lo studio di nuove molecole antimicrobiche.

Progetto FFC #11/2003 (Si conclude al 31.08.05)

Adottato parzialmente da: Fondazione Cariverona

Titolo: Patogenesi e trattamento della malattia epatica in fibrosi cistica

Responsabile: *M. Strazzabosco* (Osped. Riuniti di Bergamo e Ist. Veneto di Medicina Molecolare, Padova).

Durata: 2 anni **Finanziamento:** 60.000 euro

RISULTATI:

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 abbiamo appena pubblicato una parte dello 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 con difetto di CFTR, suggerendo che l'azione terapeutica dell'UDCA in fibrosi cistica dipenda da diverso meccanismo, che è attualmente oggetto dei nostri studi.

Progetto FFC #12/2003 (Concluso)

Titolo: ***Costruzione di un ipertesto aggiornato annualmente che permetta un flessibile accesso per aggregare dati provenienti dal Registro Italiano Fibrosi Cistica (ICFR)***

Responsabile: *A. Bossi* (Institute of Medical Statistics and Biometry of the University of Milan).

Durata: 1 anno **Finanziamento:** 20.000 euro

RISULTATI:

Nel 1988 fu istituito il Registro Italiano per la Fibrosi Cistica (RIFC) al fine di censire i pazienti FC in cura presso i Centri specializzati. Negli ultimi 15 anni, il Registro ha archiviato i dati anagrafici, le modalità di diagnosi, la tipizzazione genetica degli oltre 4000 pazienti residenti in Italia. Dal 1998 il Registro include anche dati concernenti trapianto di organi, insorgenza di complicanze, dati antropometrici, microbiologici e di funzionalità respiratoria.

I dati sinora analizzati sono stati sintetizzati in Rapporti Statistici annuali (inviati ai Direttori dei Centri FC) e in articoli pubblicati su riviste nazionali ed internazionali o utilizzati per comunicazioni a convegni. Tuttavia, per consentire l'accesso ai dati archiviati ad un pubblico più vasto, si è ritenuto utile costruire uno strumento (disponibile in rete) che offrisse la possibilità di ottenere molte delle informazioni contenute nel RIFC.

I dati forniti sono disponibili aggregati a livello nazionale o disaggregati per regione di nascita o di residenza dei pazienti ma non per Centro FC. Per ora, le variabili per le quali si forniscono informazioni sono quelle relative a: Dati Anagrafici, Diagnosi, Status del paziente, Trapianto d'organo.

L'interfaccia grafica è stata realizzata in modo che l'utente possa disporre, nel modo più semplice e completo possibile, dell'insieme delle variabili disponibili e dei raggruppamenti possibili per sintetizzarle. A partire da un menù di facile consultazione, e senza particolari conoscenze statistiche od informatiche, è possibile selezionare le variabili di interesse (da 1 a 3 contemporaneamente). I risultati sono forniti sotto forma di tabelle e, in alcuni casi, sono disponibili anche grafici e semplici statistiche descrittive.

Ogni anno sarà possibile aggiornare il database sul quale sono effettuate le elaborazioni ed eventualmente aggiungerne di nuove.

Tutto ciò senza che l'utente abbia diretto accesso ai dati che saranno sempre e solo disponibili in forma aggregata e non manipolabili da chi richiede le elaborazioni. Il progetto finanziato dalla Fondazione ha permesso di realizzare un programma che consente di ottenere, in tempo reale e in modo estremamente semplice, alcune informazioni sui pazienti FC censiti dal RIFC dal 1988 al 2001.

Progetto FFC #13/2003 (Concluso)

Titolo: ***Aspetti biochimici e fisiopatologici della membrana plasmatica delle cellule epiteliali bronchiali umane che esprimono la mutazione DF508 prima e dopo supplementazione di acido folico metilato e vitamina B12***

Responsabile: *L.M. Barbara* (Medicina interna, Policlinico G.B. Rossi, Verona)

Durata: 1 anno **Finanziamento:** 8.000 euro

RISULTATI:

Le cellule di pazienti con fibrosi cistica trasportano anomale quantità di sali e acqua attraverso la membrana cellulare. I fosfolipidi sono componenti fondamentali delle membrane cellulari. Modifiche quantitative e/o qualitative dei fosfolipidi possono indurre importanti cambiamenti funzionali nella cellula. Un lavoro recente ha dimostrato che i fosfolipidi metilati sono in grado di aumentare l'espressione di CFTR in cellule che sono omozigoti DF508.

Dal momento che l'acido folico è il donatore principale di gruppi metilici, abbiamo ricercato eventuali effetti di questa vitamina in colture di cellule bronchiali umane che esprimono la mutazione DF508. I primi risultati non

hanno evidenziato modifiche nel trasporto di sali da parte delle cellule trattate, forse per la presenza di sostanze nel terreno di coltura che hanno inferito con l'esperimento. Riteniamo pertanto che sia necessario rivalutare alcune condizioni dell'esperimento, anche alla luce di questi risultati preliminari, per poter esprimere un parere definitivo sulle possibilità di impiego di questa vitamina.

PROGETTI 2004

Progetto FFC #1/2004

Adottato parzialmente da:
"Liceo Scientifico Messedaglia" - Verona
Titolo: ***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***
Responsabile: *M. Colombatti* (Ist. Immunopatologia, Università di Verona)
Durata: 1 anno **Finanziamento:** 18.000 euro
RISULTATI:
La mutazione ΔF508 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 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. Queste possono essere utilizzate per trasportare in compartimenti cruciali della cellula e ivi concentrarvi delle sostanze farmacologicamente attive.
Risultati preliminari ottenuti finora in vitro permettono di concludere che sostanze farmacologiche opportunamente modificate per essere trasportate nella cellula sembrano svolgere la funzione desidereta. Sono in corso ulteriori sperimentazioni per ottimizzarne l'effetto.

Progetto FFC #2/2004

Adottato parzialmente da: "Istituto Fermi" e "Istituto Comprensivo Santini" - VR
Titolo: ***Meccanismi di regolazione del canale CFTR e dei fenomeni secretori ad esso correlati***
Responsabile: *F. Osculati* (Dipartimento di Scienze Morfologico Biomediche, Università di Verona)
Durata: 1 anno **Finanziamento:** 15.000 euro
RISULTATI:
Il progetto ha permesso di scoprire come le cellule "malate" nei pazienti con fibrosi cistica (esprimenti il canale di membrana CFTR) contengano molecole (□-gustducin/PLC □2) tipiche dei chemorecettori. La presenza di tali molecole nelle vie aeree è stata valutata tramite immunocitochimica in microscopia confocale laser o in microscopia elettronica e confermata dall'indagine biochimica. I risultati suggeriscono che le cellule secernenti possano valutare il contenuto delle vie aeree e, sulla base dei dati ottenuti, regolare la loro secrezione. Tali cellule potrebbero anche essere in grado di valutare la presenza di microrganismi intercettando i segnali chimici prodotti da questi ultimi. Attualmente stiamo lavorando sull'ipotesi che, nei pazienti con fibrosi cistica, la presenza di una alterata composizione dei fluidi intra- ed extra-cellulari ostacoli l'interazione tra i processi chemorecettivi e quelli secretivi impedendo alle cellule di regolare correttamente le secrezioni. Utilizzando tecniche di risonanza magnetica nucleare stiamo procedendo all'individuazione di composti estratti da piante in grado di modificare le secrezioni agendo sui meccanismi chemorecettoriali.

Progetto FFC #3/2004

Titolo: ***Aminoacidi naturali e sintetici quail chaperoni chimici per promuovere la conformazione di CFTR***
Responsabile: *B. M. Rotoli* (Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università di Parma)
Durata: 2 anni **Finanziamento:** 28.000 euro
RISULTATI:
Nella maggior parte dei pazienti affetti da fibrosi cistica la patologia dipende dalla mancata espressione sulla membrana plasmatica di una proteina mutata (DF508 CFTR) che, avendo una conformazione anomala viene degradata troppo rapidamente. Questo progetto ha lo scopo di individuare sostanze che stabilizzino la proteina mutata, rallentandone la degradazione e consentendone l'espressione sulla membrana plasmatica. Le sostanze studiate sono aminoacidi neutri o loro derivati: prolina, glutamina, glicina, alanina, taurina, betaina, ipotaurina, beta-alanina, aminoiminometil-beta-alanina, MeAIB. Questi composti, caratterizzati da bassa tossicità, si comportano da "chemical chaperones" (cioè stabilizzatori proteici) nei confronti di diverse proteine e sono spontaneamente accumulati nelle cellule umane. Cellule che esprimono DF508 CFTR sono state incubate per tempi diversi con gli aminoacidi: la correzione funzionale del difetto CF è stata valutata mediante la comparsa di un efflusso cAMP-dipendente di 36Cl e confrontata con l'effetto dell'incubazione a bassa temperatura, una condizione che promuove l'espressione sulla membrana della proteina mutata. Tra i composti sinora esaminati, risultati preliminari incoraggianti sono stati ottenuti con taurina e MeAIB che sembrano in grado di causare la comparsa di un efflusso cAMP-dipendente di 36Cl in cellule mutate.

Progetto FFC #4/2004 (Si conclude al 31.08.05)

Adottato totalmente da: Associazione Veneta per la lotta contro la Fibrosi Cistica
Titolo: ***Ruolo dei recettori di Adenovirus nell'attivazione dei percorsi della protein-chinasi attivata da patogeni e del fattore nucleare -kB in cellule epiteliali delle vie respiratorie umane.***
Responsabile: *A. Tamanini* (Laboratorio di Patologia Molecolare, Centro Fibrosi Cistica – Verona).
Durata: 1 anno **Finanziamento:** 15.000 euro

RISULTATI:

Uno dei principali ostacoli alla applicazione della terapia genica della FC riguarda l'induzione da parte di vettori virali 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 identificare quali delle 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.

Progetto FFC #5/2004

Titolo: ***Screening delle mutazioni di riarrangiamento genomico CFTR in pazienti CF italiani***

Responsabile: *G. Castaldo* (Università Federico II - Napoli)

Partners: *C. Castellani* (Centro Fibrosi Cistica, Verona); *C. Bombieri* (Biologia e Genetica, Università di Verona); *F. Sangiuolo* (Dip. Biopatologia e Diagnostica per immagini, Univ Tor Vergata, Roma)

Durata: 2 anni **Finanziamento:** 45.000 euro

RISULTATI:

La CF è dovuta a mutazioni nel gene CFTR, e sinora sono state descritte oltre 1000 mutazioni responsabili di malattia. Tuttavia, anche utilizzando metodi di diagnostica molecolare che permettono di analizzare l'intera regione codificante del gene, circa il 10% delle mutazioni sfuggono all'identificazione, limitando le opportunità di screening dei portatori e di diagnosi prenatale della malattia basate sull'analisi molecolare. Recentemente un gruppo di ricerca francese ha dimostrato che una parte delle mutazioni non identificate sono dovute a larghe delezioni (perdita di frammenti)del gene CFTR, difficili da identificare attraverso le tecniche di analisi convenzionali. Il progetto prevede di sviluppare tecniche di analisi molecolare (da impiegare su vasta scala per l'analisi routinaria) in grado di identificare le delezioni del gene CFTR; si tratta di tecniche di "dosaggio genico" basate su amplificazioni quantitative in PCR seguite da rivelazione in DHPLC o elettroforesi capillare. Quindi, sarà effettuato uno studio su pazienti CF portatori di mutazioni non note nel gene CFTR, per definire l'incidenza e la tipologia delle larghe delezioni presenti nei pazienti italiani. Allo stato attuale (circa 1 anno di attività) sono stati ottenuti i seguenti risultati: a) i partners hanno sviluppato e validato le procedure per l'analisi delle macrodelezioni del gene CFTR; b) hanno raccolto un ampio numero di pazienti CF portatori di mutazioni non note nel gene CFTR, che hanno rilasciato il consenso ad aderire allo studio; c) è stata avviata la ricerca delle macrodelezioni che, secondo dati preliminari, indicherebbe che almeno il 4-5% delle mutazioni del gene CFTR sono macrodelezioni che includono da 1 a 4 esoni del gene.

Progetto FFC #6/2004 (Si conclude al 31.08.05)

Adottato totalmente da: Fondazione Zanotto - Verona

Titolo: ***Le persone con iperossaluria e ipocitraturia che formano calcoli renali calcarei rappresentano un nuovo disordine correlato alla Fibrosi Cistica?***

Responsabile: *A. Lupo* (Dipartimento di Scienze Biomediche e Chirurgiche - Università di Verona)

Partner: *P.F.Pignatti* (Dip. Biologia e Genetica, Università di Verona)

Durata: 1 anno **Finanziamento:** 18.000 euro

RISULTATI:

L'ipotesi di questo progetto è che i pazienti con calcolosi renale calcica idiopatica con iperossaluria e ipocitraturia presentino una forma lieve di fibrosi cistica CF. Sono stati raccolti campioni urine ed ematici di 107 pazienti presso la Divisione di Nefrologia dell'Università di Verona. Attualmente è in corso lo screening sulle urine per l'individuazione tra questi dei soggetti con iperossaluria & ipocitraturia. Inoltre sono stati raccolti campioni di DNA di pazienti con queste caratteristiche urinarie da nefrologi e urologi che collaborano con noi di Milano (9 casi), Treviso (6), Parma (10), ed altri saranno forniti a breve da Varese, Lecco e Firenze. L'estrazione di DNA dai campioni raccolti presso la nostra Divisione è iniziata nelle settimane scorse.

Se la nostra ipotesi sarà provata, si potrebbe riconoscere come malattia correlata alla CF una condizione clinica non precedentemente sospettata, e cioè una particolare calcolosi calcica che interessa persone apparentemente normali. Ciò consentirebbe di estendere il consiglio genetico anche a questi soggetti riducendo il rischio di CF conclamata.

Progetto FFC #7/2004 (Si conclude al 31.08.05)

Adottato parzialmente da: Delegazione FFC di Belluno

Titolo: Mappa delle mutazioni del gene CFTR in Italia: distribuzione regionale nel contesto europeo.

Responsabile: *A. Piazza* (Dipartimento di Genetica, Biologia e Biochimica - Università di Torino)

Durata: 1 anno **Finanziamento:** 18.000 euro

RISULTATI:

Lo scopo di questo progetto è di valutare la distribuzione delle mutazioni a livello regionale in Italia, e confrontarla con quella europea. Sono stati considerati i pazienti afferenti al Registro Italiano FC, di cui è nota la regione di nascita dei 4 nonni, per cui è stato possibile attribuire le mutazioni ad ogni singola regione. Sono state identificate alcune nuove mutazioni, caratteristiche di specifiche aree geografiche. Valutando la distribuzione delle mutazioni più comuni si è osservata una situazione eterogenea delle mutazioni in Italia, ed è possibile sud-

dividere le regioni in 4 gruppi principali, Nord-est, Nord-ovest, Centro e Sud Italia con mutazioni tipiche. Tali gruppi devono essere comunque distinti dalla Sardegna che è caratterizzata principalmente dalla mutazione T338I non presente in altre regioni. Attualmente si stanno confrontando i dati italiani con quelli europei, messi a disposizione dal Dr. Macek a nome del Consorzio Europeo della FC, per verificare aree geografiche di omogeneità ed eterogeneità nella distribuzione delle mutazioni: ad esempio la presenza di mutazioni "pubbliche" e "private" è comune sia all'Europa, sia all'Italia ed una analisi dettagliata sulle seconde (mutanti rari) può avere un interesse sia clinico sia popolazionistico.

Progetto FFC #8/2004 (Si conclude al 31.08.05)

Adottato totalmente da: Gruppo Alimentare Rossetto - VR

Titolo: ***Fibrosi Cistica: caratterizzazione delle mutazioni sconosciute in pazienti CF italiani e valutazione del loro ruolo patogenetico.***

Responsabile: *M. C. Rosatelli* (Dipartimento di Scienze Biomediche e Biotecnologie – Università di Cagliari)

Partners: *F. Bricarelli Dagna* (Lab. Genetica, Osp. Galliera, Genova); *A. Bonizzato* (Lab Patologia Molecolare, Centro Fibrosi Cistica, Verona); *M Seia* (Lab. Genetica Istit. Clinici Perfezionamento, Milano)

Durata: 1 anno **Finanziamento:** 25.000 euro

RISULTATI:

Il progetto ha lo scopo di definire i difetti molecolari rari o sconosciuti del gene della Fibrosi cistica in pazienti italiani e di studiarne eventuali nuovi meccanismi di espressione. Sono stati selezionati 267 pazienti con CF classica ma genotipo non definito, negativi al test molecolare di I livello che ricerca le mutazioni più frequenti nella popolazione italiana. I pazienti selezionati sono stati avviati ad uno screening di II livello che prevedeva l'analisi DHPLC e/o il sequenziamento del gene CFTR.

Con questo approccio sono stati definiti 232 pazienti. Questo risultato consentirà di offrire alle famiglie un valido aiuto nella prevenzione della malattia poiché permetterà l'identificazione di tutti i familiari portatori e di eventuali coppie a rischio.

Inoltre, 35 pazienti non definiti sono stati avviati a studi di terzo livello per la ricerca di rari genotipi complessi. Lo studio è già terminato nei pazienti sardi nei quali è stata evidenziata una nuova mutazione che consiste nella inserzione-delezione di un tratto di gene e che in Sardegna ha una frequenza del 3,2%. Il test per la ricerca di questa mutazione è stato già inserito nello screening regionale della fibrosi cistica.

Progetto FFC #9/2004 (Si conclude al 31.08.05)

Titolo: Selezione e caratterizzazione funzionale delle variazioni di sequenza intronica CFTR potenzialmente responsabili di forme atipiche di fibrosi cistica: modulazione dello splicing alternativo di CFTR

Responsabile: R. Strom (Dipartimento Biotecnologie Cellulari ed Ematologia – Università La Sapienza – Roma).

Partners: *S. Quattrucci* (Centro Fibrosi Cistica , Università La Sapienza, Roma); *F. Mazzilli* (Dip. Fisiopatologia Medica, Università La Sapienza, Roma)

Durata: 1 anno **Finanziamento:** 25.000 euro

RISULTATI:

È stata indagata la presenza di vere e proprie mutazioni, o di alterazioni "potenzialmente patologiche" della sequenza nucleotidica, negli alleli del gene CFTR in gruppi di soggetti con patologie presumibilmente riconducibili a forme atipiche di FC: a) in neonati con ipertripsinemia alla nascita (HT) seppur con test del sudore borderline o addirittura negativo; b) in maschi totalmente infertili per atresia congenita dei dotti deferenti (CBAVD); c) in maschi adulti con ridotta fertilità per iperviscosità congenita del liquido seminale (SCH). Rispetto al 93% di mutazioni riscontrate in un gruppo di soggetti diagnosticati come affetti dalla forma classica di FC, la frequenza di alleli recanti mutazioni ad accertato effetto patologico è stata pari al 76% nei soggetti HT, 63% nei CBAVD, 24% negli SCH. Negli stessi gruppi di soggetti sono state inoltre individuate 29 tipologie di alterazioni (10 delle quali "nuove") della sequenza nucleotidica complessiva, potenzialmente suscettibili di risvolti patologici seppur non automaticamente correlate a modificazioni della sequenza proteica del canale dei cloruri. Sono tuttora in corso studi funzionali per correlare queste alterazioni di sequenza nucleotidica all'effettivo malfunzionamento del canale dei cloruri.

Progetto FFC #10/2004

Adottato totalmente da: Valentino Gruppo Marzotto

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

Responsabile: *G. Bertoni* (Dipartimento di Scienze Biomolecolari e Biotecnologie- Università di Milano).

Durata: 2 anni **Finanziamento:** 45.000 euro

RISULTATI:

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 antisenso. 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 antisenso di P. aeruginosa. Questa procedura ci ha portato ad identificare nella libreria sei sequenze che inibiscono, alcune in modo molto efficiente, la crescita di P. aeruginosa. Al momento stiamo analizzando queste sequenze per pianificare esperimenti che ci permetteranno di identificare le sottoregioni responsabili dell'attività inibitoria.

Progetto FFC #11/2004 (Si conclude al 31.08.05)

Adottato parzialmente da: Associazioni Lombarda e Laziale per la lotta contro la Fibrosi Cistica

Titolo: Valutazione della patogenicità di ceppi ambientali e clinici di Burkholderia cepacia complex isolati ed in presenza di Ps. aeruginosa

Responsabile: *A. Bevivino* (ENEA, Casaccia, Roma)
Partners: *F. Ascenzioni* (Dip. Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Università La Sapienza, Roma); A. Bragonzi (Institute Experimental Treatment of Cystic Fibrosis, Osp. S. Raffaele, Milano)
Durata: 1 anno **Finanziamento:** 30.000 euro

RISULTATI:

Lo scopo principale del progetto è quello di esplorare la patogenicità di ceppi ambientali e clinici di Burkholderia cenocepacia, una specie del B. cepacia complex che riveste una notevole importanza nell'infezione polmonare dei pazienti affetti da fibrosi cistica (FC). 15 ceppi ambientali e clinici di B. cenocepacia, non correlati geneticamente, 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 del topo. Gli esperimenti di infezione in modelli in vitro hanno evidenziato una maggiore capacità di internalizzazione dei batteri nelle cellule FC rispetto alle cellule non-FC. E' 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. Questi risultati sono stati confermati con il modello murino di infezione cronica, che ha evidenziato come i ceppi ambientali siano capaci di sviluppare un'infezione cronica nel topo, anche se in percentuale diversa rispetto ai ceppi clinici.

Progetto FFC #12/2004 (Si conclude al 31.08.05)

Adottato totalmente da: sigg. Furlini e Zini con Delegazione FFC di Trento (dedicato a "Sara")
Titolo: ***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.***
Responsabile: *G. Riccardi* (Dipartimento di Genetica e Microbiologia – Università di Pavia).
Partner: *G. Manno* (Lab. Microbiologia, Istituto G. Gaslini, Genova)
Durata: 1 anno **Finanziamento:** 20.000 euro

RISULTATI:

Scopo di questo progetto è studiare il ruolo svolto dalle pompe di efflusso (proteine di membrana) nella multiresistenza agli antibiotici in isolati clinici di B. cepacia. Lo studio del meccanismo di resistenza, mediato da pompe di efflusso, è importante per due motivi. Primo, può spiegare la resistenza intrinseca di questi microrganismi ad un ampio spettro di antibiotici, poichè le pompe di efflusso possono prevenirne l'accumulo. Secondo, in batteri filogeneticamente affini (Pseudomonas), è stato dimostrato che mutazioni nei geni codificanti queste pompe aumentano il livello di resistenza ai farmaci. Le pompe di efflusso dei batteri sono classificate in 5 diverse famiglie, ognuna delle quali è caratterizzata da motivi consensus (sequenze di ammino acidi) specifici. In particolare, noi stiamo studiando la famiglia RND (Resistance-Nodulation-cell Division) che svolge un ruolo fondamentale nell'efflusso dei farmaci nei batteri Gram-negativi.
Approcci sperimentali e risultati ottenuti
1. La ricerca ha permesso di identificare 14 ipotetici geni codificanti proteine di efflusso. Per verificare l'effettivo ruolo di questi geni nella resistenza agli antibiotici si sta procedendo al clonaggio di questi geni in particolari vettori e successiva trasformazione delle molecole ricombinanti in opportuni ospiti batterici.
2. Ad oggi, 5 geni sono stati amplificati. Il punto successivo riguarda la ligazione dei geni amplificati in opportuni vettori. In generale, i vettori sono molecole di DNA circolari che si replicano in particolari organismi ospiti.
3. Per i problemi sopra-descritti abbiamo valutato la stabilità plasmidica dei vettori pMLBAD, pUFR047 e pLAFR3 in B. multivorans. I risultati indicano che soltanto il plasmide pMLBAD risulta stabile.
4. Nonostante i problemi di stabilità plasmidica, abbiamo tentato di clonare i 5 geni in tutti i vettori testati e di trasformare E. coli e B. multivorans (in cui tali vettori si).
5. Data la bassa percentuale di successo del clonaggio genico abbiamo cercare di seguire due vie alternative:
• Utilizzo di una banca cosmidica di B. cepacia ATCC25416 (gentilmente fornita dal Dr. V.Venturi) e ricerca dei geni di interesse. Gli esperimenti sono in corso.
• Coniugazione triparentale della stessa banca cosmidica in B. cepacia complex e selezione su diversi antibiotici (ofloxacina, ciprofloxacian, trimetoprim, rifampicina, acido nalidixico, cloramfenicolo, meropenem, piperacillina…). Sono stati identificati numerosi cloni resistenti, la cui analisi è in corso.

Progetto FFC #13/2004 (Si conclude al 31.12.05)

Adottato parzialmente da: Liceo Scienze Umane "Montanari" - Verona
Titolo: ***Ruolo di SOCS3 nelle cellule infiammatorie in risposta a stimoli di origine batterica***
Responsabile: *F. Bazzoni* (Dipartimento di Patologia – Università di Verona)
Durata: 1 anno **Finanziamento:** 18.000 euro

RISULTATI:

Il presente progetto si propone di definire il ruolo ed il meccanismo d'azione di SOCS-3, una proteina intracellulare coinvolta nella regolazione della risposta a diverse citochine da parte dei granulociti neutrofili polimorfonucleati, che costituiscono il tipo di cellule infiammatorie predominante nel polmone del paziente CF. Il nostro obiettivo è quello di generare delle molecole di piccoli RNA (small interfering RNA, siRNA) in grado di interferire e bloccare l'espressione di SOCS-3 e, successivamente, di analizzare se e quali risposte infiammatorie dei granulociti neutrofili siano modificate in assenza di SOCS-3. Allo stato attuale abbiamo portato a termine la prima parte del progetto, che consisteva nel generare degli strumenti molecolari per interferire con l'espressione della proteina intracellulare SOCS-3. Abbiamo infatti generato diversi siRNA diretti contro SOCS-3 ed abbiamo analizzato quale/i tra questi fosse in grado di inibire l'espressione della proteina SOCS-3. Tra tutti i siRNA analizzati, due si sono dimostrati capaci di ridurre l'espressione di SOCS-3 del 60% circa. Attualmente stiamo mettendo a punto una strategia per introdurre queste molecole nei granulociti polimorfonucleati e nei monociti e silenziare l'espressione della proteina endogena.

Progetto FFC #14/2004

Adottato totalmente da: Associazione Veneta per la lotta contro la fibrosi cistica

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

Responsabile: *M. C. Dechecchi* (Laboratorio di Patologia Molecolare – Centro Fibrosi Cistica – Verona)

Durata: 2 anni **Finanziamento:** 45.000 euro

RISULTATI:

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 di iperinfiammazione, 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. Abbiamo osservato che il composto MPB-07 ripristina la funzione di trasporto del cloro CFTR-dipendente sia in cellule IB3 che CuFi-1 e sono in corso esperimenti per studiarne l'effetto sulla risposta infiammatoria da PA.

Progetto FFC #15/2004 (Si conclude al 31.08.05)

Titolo: ***Strategie innovative per la Diagnosi e la Terapia della Fibrosi Cistica***

Responsabile: *R. Gambari* (Dipartimento di Biochimica e Biologia Molecolare – Università di Ferrara).

Durata: 1 anno **Finanziamento:** 20.000 euro

RISULTATI:

Il Progetto si proponeva due obiettivi principali: (a) l'utilizzo di piattaforme Lab-on-a-chip basate sulla dielettroforesi (DEP) per separare ad alta efficienza cellule fetali e (b) lo sviluppo di nuove molecole ad attività anti-infiammatoria funzionanti inibendo l'attività del fattore di trascrizione NF-kB.

Riguardo il primo obiettivo abbiamo prodotto un protocollo basato su un DEP-array contenente elettrodi disposti in griglia per identificare cellule utilizzando microsfere funzionalizzate con anticorpi monoclonali. Il DEP-array permette di spostare in modo programmato cellule (cellule fetali da cordone ombelicale e trofoblasti) marcate con anticorpi fluorescenti per consentirne l'isolamento e la caratterizzazione. Questi risultati consentono lo sviluppo di metodologie non-invasive per la diagnosi pre-natale utilizzando un semplice prelievo di sangue materno.

Per quanto attiene al secondo obiettivo, abbiamo utilizzato una molecola decoy per NF-kB, dimostrando una alterazione in cellule CF IB-3 dell'espressione di geni coinvolti nel processo di infiammazione (ICAM-1, IL-6 e IL-8). Abbiamo inoltre saggiato 30 estratti da piante medicinali, identificandone alcuni molto attivi nell'inibire l'interazione tra NF-kB e DNA e l'espressione dei geni per IL-6 e IL-8. Questi risultati rappresentano una premessa importante per sostenere lo sviluppo di nuove molecole nella terapia di manifestazioni pro-infiammatorie associate a CF.

Progetto FFC #16/2004 (Si conclude al 31.08.05)

Adottato totalmente da: Delegazione FFC di Latina (dedicato a "Saretta")

Titolo: ***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-kinase: implicazioni per la terapia***

Responsabile: *V. Raia* (Dipartimento di Pediatria – Università Federico II – Napoli).

Partner: *G. Castaldo* (Dip. Biochimica e Biotecnologie, Università Federico II, Napoli).

Durata: 1 anno **Finanziamento:** 20.000 euro

RISULTATI:

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 Pseudomonas 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.

Progetto FFC #17/2004

Adottato parzialmente da: Associazione Siciliana per la

lotta contro la fibrosi cistica

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

Responsabile: *F. Zazzeroni* (Dipartimento di Medicina Sperimentale – Università dell'Aquila)

Durata: 2 anni **Finanziamento:** 60.000 euro

RISULTATI:

L'infiammazione cronica delle vie respiratorie e le infezioni polmonari ricorrenti sono un tratto caratteristico della fibrosi cistica. Inoltre, le cellule epiteliali mutate per il gene CFTR sono meno sensibili all'apoptosi (morte programmata della cellula) indotta da infezione con P. aeruginosa rispetto alle cellule epiteliali normali, lasciando ipotizzare che una ridotta clearance (detersione) dei germi invasori possa essere, almeno in parte, responsabile delle manifestazioni polmonari della fibrosi cistica.

Uno degli obiettivi di questo progetto è quello di eseguire uno screening su larga scala dei geni indotti da NF-KB nelle cellule epiteliali respiratorie che esprimono forme mutanti di CFTR. A tal fine, abbiamo generato cloni di queste cellule in cui NF-KB non è attivabile ed abbiamo utilizzato l'RNA estratto da questi cloni per analizzare, utilizzando DNA microarrays, l'espressione genica differenziale dipendente da NF-KB in cellule CF rispetto a cellule normali. L'analisi dei geni iperespressi e ipoespressi è in corso.

Secondo obiettivo di questo progetto è quello di valutare il ruolo di NF-KB nella compromissione dell'apoptosi delle cellule epiteliali FC. Abbiamo valutato i livelli di espressione di alcuni geni anti-apoptotici regolati da NF-KB, ed abbiamo verificato che alcuni di questi sono maggiormente espressi nelle cellule che presentano mutazioni CFTR.

Progetto FFC #18/2004 (Si conclude al 31.08.05)

Adottato totalmente da: Milior SpA - Prato

Titolo: ***Eradicazione precoce di Pseudomonas aeruginosa e sua successiva colonizzazione in pazienti con fibrosi cistica***

Responsabile: *G. Taccetti* (Centro Regionale Toscano Fibrosi Cistica - Firenze)

Durata: 1 anno **Finanziamento:** 15.000 euro

RISULTATI:

Le infezioni polmonari batteriche da P. aeruginosa (Pa) sono una caratteristica dei pazienti FC e costituiscono la principale causa di morbilità e mortalità. L'eradicazione del germe è possibile solo al momento della colonizzazione con un tempestivo trattamento antibiotico. Il periodo di tempo libero dal germe è di rilevanza clinica poiché la colonizzazione cronica è associata a un lento deterioramento della funzionalità polmonare e la vita del paziente è pesantemente condizionata dalla necessità di trattamenti antibiotici.

Tra il 1992 e il 2004 si sono verificati nel nostro Centro 79 episodi di nuove colonizzazioni da Pa. L'età media dei pazienti al momento della prima colonizzazione è 8.5 anni, senza differenza tra sessi. Tutti i pazienti sono stati trattati con terapia eradicante (ciprofloxacin per os e colistina o tobramicina per via inalatoria) e l'efficacia del trattamento è stata valutata in base ai risultati microbiologici e alla risposta immunitaria del paziente.

Abbiamo documentato eradicazione nell'85% dei casi trattati. I pazienti sottoposti a terapia eradicante possono essere nuovamente colonizzati da Pa. In questo caso non è chiaro se si tratti di ricrescita dello stesso ceppo o colonizzazione da parte di altri ceppi. In un sottogruppo di 16 pazienti FC l'analisi genetica, tramite PFGE, di ceppi di Pa ha mostrato un differente profilo genetico nel 73% degli episodi successivi, confermando la colonizzazione da parte di altri ceppi e quindi l'efficacia della terapia effettuata. I pazienti sopposti a eradicazione hanno evidenziato rispetto a un gruppo di controllo di pazienti cronicamente colonizzati da Pa un minor decremento di funzione polmonare nel tempo e una riduzione complessiva del costo della terapia antibiotica. Il trattamento eradicante non ha portato alla colonizzazione con altri patogeni.

Progetto FFC #19/2004 (Si conclude al 31.08.05)

Adottato parzialmente da: Uovador SpA - VR

Titolo: ***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***

Responsabile: *A. Bossi* (Istituto di Statistica Medica e Biometria, Università di Milano)

Durata: 1 anno **Finanziamento:** 20.000 euro

RISULTATI:

La realizzazione di questo progetto ha consentito di istituire la figura di un "monitor" con il compito di coordinare la raccolta dei dati per il Registro Italiano Fibrosi Cistica a livello centrale e a livello locale, di fornire al personale dei Centri per la FC il supporto per inviare con regolarità e in modo standardizzato le informazioni relative a tutti i pazienti in cura nelle diverse strutture. In particolare, l'intervento del "monitor" ha permesso di

- installare, dove ancora non disponibile, il programma per l'inserimento dei dati;

- istruire opportunamente il personale incaricato dell'inserimento dei dati;

- recuperare, anche da cartelle cliniche ormai archiviate, informazioni mancanti ma essenziali di carattere demografico o relative alle condizioni cliniche di alcuni pazienti;

- correggere dati errati;

- individuare le parti del questionario per la raccolta dati che più necessitano di revisione;

- completare, per tutti i pazienti diagnosticati in età adulta (circa 400), la raccolta dei dati clinici relativi a funzionalità respiratoria, peso e statura, infezioni, complicanze.

Quest'ultimo lavoro ha permesso di realizzare la prima parte di uno studio atto a valutare se i soggetti diagnosticati tardivamente siano pazienti con forme lievi e atipiche della malattia o con forme conclamate non riconosciute in età pediatrica.

Fondazione per la ricerca sulla fibrosi cistica - onlus

Sede c/o Ospedale Maggiore - Piazzale 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

Segretariato Comunicazione
Tel. 045 8073599-3438
E-mail: comunicazione.ffc@azosp.vr.it

Marketing Sociale:
Tel. 045 8073604-3599
Fax 045 8073568
E-mail: marketing.ffc@azosp.vr.it

Sito internet:
www.fibrosicisticaricerca.it

DELEGAZIONI E GRUPPI DI SOSTEGNO DELLA FONDAZIONE

Belluno	Bice Gallo: tel. 0437 943360 info@cravattaland.it
Bologna	Morena: cell. 348 1565099
Breganze - VI	Augusto: augusto99@tele2.it
Cerea - VR	Federico: cell. 339 4312185 - federico@lineagrafica.it
Lago di Garda	Eleonora Crocè: paolo.gallina2@tin.it
Latina	De Santis: cell. 328 8042186 - adrianadesantis@libero.it
Mantova	Mina Bergamaschi: tel. 0376 531009
Roma	Inge Saxon Mills: tel. 06 30889168
Rovigo	Cristina Scagnolari: tel. 0425 360025
Torino	Gabriella: cell. 333 6740357 - gabpan.ffc@virgilio.it
Trento	Bruna Pelz: marcobruna@virgilio.it
Treviso-Montebelluna	A. Maria Danieli: tel. 0423 952977 - cell. 335 8413296
Treviso-Trevignano	Gino Pozzobon: tel. 0423 818820
Valdadige	Roberta Camparsi: cell. 340 6750646
Vicenza	Dario Antoniazzi: info@fibrosicisticavicenza.it

Consiglio di Amministrazione

Presidente Vittoriano Faganelli

Vicepresidente Carlo Delaini

Consiglieri Valerio Alberti, Luigi Bozzini, Donato Bragantini, Giuseppe Ferrari, Matteo Marzotto, Gianni Mastella, Sergio Ricciardi, Gianluca Rana, Michele Romano, Luciano Vettore, Paolo Del Debbio

ADOTTA UN PROGETTO: NOI L'ABBIAMO FATTO

VALENTINO Gruppo Marzotto
Gruppo Alimentare Rossetto – tutti i giorni un grande risparmio
Pasqui
VERONAFIERE
Milior
MEDUSA
MONDADORI PRINTING
Fondazione Giorgio Zanotto
Fondazione Cariverona
Associazione Siciliana FC
Associazione Veneta FC
Associazione Laziale e Lombarda FC
delegazione FFC - Belluno
delegazione FFC - Bologna
delegazione La Bottega delle Donne - Treviso
delegazione FFC - Latina
Sigg. Furlini e Zini con delegazione FFC - Trento

Per adottare progetti di ricerca: tel. 045 807 3599 e-mail: fondazione.ricercafc@azosp.vr.it

Per donare:

- c/c postale n°18841379
- UniCredit Banca c/c n°9465517
  Ag. di B. Trento - ABI 2008 - CAB 11718 - CIN-N
- Banca Popolare Verona c/c n°48829
  Ag. di B. Trento - ABI 5188 - CAB 11708 - CIN-V
- sul sito www.fibrosicisticaricerca.it

La Fondazione FC collabora con la Lega Italiana Fibrosi Cistica - Onlus
Sede c/o Methodos Spa - Via S. Vittore, 39 – 20123 Milano - Tel. 02 48011219 - e-mail:info@fibrosicistica.it - sito: www.fibrosicistica.it

NOTIZIARIO FFC N.13
Bollettino quadrimestrale della Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica
Presso Ospedale Maggiore,
Piazzale Stefani, 1 - 37126 Verona

DIRETTORE RESPONSABILE
Andrea Sambugaro

REDAZIONE
Tecla Zarantonello
045 8073438

CONSULENZA SCIENTIFICA
Gianni Mastella, Graziella Borgo

REALIZZAZIONE GRAFICA
Giovanna Dolfini, Denise

STAMPA
Tipografia Artigiana di Mengoi Giorgio e Danilo
Via Monte Carega, 8
37057 San Giovanni Lupatoto (VR)

REGISTRAZIONE
Tribunale di Verona n° 1533 del 13/3/2003