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

# 2a CONVENTION D'AUTUNNO DEI RICERCATORI ITALIANI PER LA FIBROSI CISTICA

## Verona 19 - 20 novembre 2004

Presentazione e discussione dello stato di avanzamento dei progetti di ricerca finanziati dalla Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica nel periodo 2002/2004

# II CONVENTION D'AUTUNNO DEI RICERCATORI ITALIANI PER LA FIBROSI CISTICA

Verona 19-20 novembre 2004
Centro Culturale "G. Marani"

Presentazione e discussione dello stato di avanzamento dei progetti di ricerca finanziati dalla Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica nel periodo 2002/2004

***- Fisiopatologia CFTR e nuove terapie molecolari***

***- Terapia genica***

***- Genetica applicata alla diagnosi***

***- Microbiologia***

***- Infiammazione***

***- Ricerca clinica ed epidemiologica***

**A. Cao:** Introduzione alla Convention *pag. 8*

## 1. FISIOPATOLOGIA CFTR E NUOVE TERAPIE MOLECOLARI
Moderatore: **A. Cao**

**L. Galietta:** Introduzione alla sessione:
*Linee di sviluppo promettenti delle ricerche su nuove terapie molecolari.* *pag.9*

**- V. Casavola e M. Zaccolo:** *pag.9*
*Regolazione del canale CFTR mediante interazione proteina-proteina (Prog. FFC #4/2003)*
**- F. Osculati e A. Sbarbati:** *pag.10*
*Meccanismi di regolazione del canale CFTR e dei fenomeni secretori ad esso collegati (prog.FFC#4/2004)*
**- L. Galietta, M. Mazzei, M. Conese:** *pag.11*
*Screening di farmaci già approvati per uso umano al fine di identificare nuovi mezzi farmacologici per la fibrosi cistica (Prog. FFC#7/2003)*
**- O. Moran, O. Zegarra, V. Martorana:** *pag.12*
*"Attivatori del trasporto ionico: identificazione e modellazione molecolare dei siti leganti" (prog. FFC#6/2003)*
**- M. Colombatti** *pag.13*
*"Dissezione di processi di conformazione della proteina CFTR in cellule CFTR normali e con mutazione ΔF508. Uso di tossine disarmate per colpire le molecole 'chaperones' ed assistere la conformazione e l'espressione di DF508-CFTR" (prog. FFC #1/2004)*
**- B. M. Rotoli** *pag.14*
*"Aminoacidi naturali e sintetici quali chaperoni chimici per promuovere la conformazione di CFTR" (prog. FFC #3/2004)*
**- M. Strazzabosco** *pag.14*
*"Patogenesi e trattamento della malattia epatica in fibrosi cistica" (prog. FFC #11/2003)*
**- LM. Bambara** *pag.15*
*"Biochimica e fisiopatologia della membrana plasmatica di cellule bronchiali DF508 prima e dopo supplementazione con acido folico metilato" (prog. pilota FFC # 13/2003)*

## 2. TERAPIA GENICA
Moderatore: **A. Cao**

**G. Novelli:** Introduzione: *pag.17*
*Nuovi modelli biologici per la ricerca CF: cellule staminali embrionali.*

**- A. Tamanini** *pag.19*
*Ruolo dei recettori di Adenovirus nell'attivazione dei percorsi della proteinchinasi attivata da mitogeni e del fattore nucleare kB nelle cellule epiteliali delle vie respiratorie umane (prog.FFC #4/2004)*
**- M. Conese e E. Copreni** *pag.20*
*Valutazione dell'efficienza, efficacia e sicurezza di vettori lentivirali nel trasferimento del gene CFTR in sistemi modello di epitelio respiratorio con fibrosi cistica (Prog. #2/2002)*
**- F. Ascenzioni, M. Conese, O. Zegarra** *pag.21*
*Minicromosomi: un nuovo approccio per la terapia genica della fibrosi cistica (Prog. FFC #1/2002)*

## 3. GENETICA
Moderatore: **PF. Pignatti**

**PF. Pignatti** *Introduzione:* *pag.23*
*Prospettive di sviluppo della ricerca genetica applicata alla diagnosi in CF*

**- G. Novelli, PF. Pignatti, F. Salvatore** *pag.23*
*"Identificazione di geni modificatori mediante studi di famiglie e analisi 'microarray' " (prog. FFC #8/2003)*
**- F. Pagani** *pag.24*
*"Patologia molecolare del 'CFTR pre-mRNA splicing': aspetti diagnostici e terapeutici" (prog. FFC #9/2003)*
**- R. Strom, S. Quattrucci, F. Mazzilli** *pag.25*
*"Selezione e caratterizzazione funzionale delle variazioni di sequenza intronica CFTR potenzialmente responsabili di forme atipiche di fibrosi cistica: modulazione dello splicing alternativo di CFTR" (prog. FFC #9/2004)*
**- PF. Pignatti, C. Castellani, G. Modiano** *pag.27*
*"Valutazione del possibile utilizzo del genotipo CFTR-M470V per la determinazione del rischio di portatore del gene della fibrosi cistica" (prog. FFC #10/2003)*
**- G. Castaldo, C. Castellani, C. Bombieri, F. Sangiuolo** *pag.27*
*"Screening delle mutazioni di riarrangiamento genomico CFTR in pazienti CF italiani" (prog. FFC #5/2004)*
**- M. C. Rosatelli, F. Bricarelli Dagna, A. Bonizzato, M. Seia** *pag.28*
*"Fibrosi cistica: caratterizzazione delle mutazioni non riconosciute in pazienti italiani e valutazione del loro ruolo patogeno" (prog. FFC #8/2004)*
**- A. Lupo, PF. Pignatti** *pag.29*
*"Le persone con iperossaluria e ipocitraturia che formano calcoli renali calcarei rappresentano un nuovo disordine correlato alla Fibrosi Cistica?" (prog. FFC #6/2004:)*

## 4. MICROBIOLOGIA
Moderatore: **G. Bertoni**

**G. Bertoni** Introduzione: *pag.31*
*Il futuro della ricerca microbiologica nella prospettiva terapeutica in fibrosi cistica*

**- Bragonzi, G. Doering** *pag.32*
*"Regolazione genica e mutazioni adattative di Pseudomonas aeruginosa in un modello di infezione polmonare cronica per la fibrosi cistica" (prog. FFC #3/2003)*
**- V. Venturi** *pag.33*
*"Il sistema di regolazione 'Quorum sensing' nel batterio emergente Burkholderia cepacia" (prog. FFC #12/2003)*
**- A. Bevivino, F. Ascenzioni, A. Bragonzi** *pag.34*
*"Valutazione della patogenicità di ceppi ambientali e clinici di Burkholderia cepacia complex isolati ed in presenza di Pseudomonas aeruginosa" (prog. FFC #11/2004)*
**- G. Riccardi, G. Manno** *pag.35*
*"Resistenza antimicrobica in ceppi di Burkholderia cepacia complex isolati da pazienti fibrocistici: identificazione, caratterizzazione e ruolo dei trasportatori di efflusso nella resistenza intrinseca ed acquisita ai farmaci" (prog. FFC #12/2004)*

**- G. Bertoni** *pag.36*
*"Identificazione su tutto il genoma di un target di geni per disegnare antibiotici non convenzionali contro i patogeni correlati alla fibrosi cistica" (prog. FFC #10/2004)*
**- R. Fani, G. Manno, S. Tabacchioni, G. Taccetti** *pag.37*
*"Sviluppo di un test diagnostico rapido per discriminare le specie e i genomovars di Burkholderia cepacia complex nelle analisi cliniche routinarie che interessano pazienti con fibrosi cistica" (prog. FFC #5/2003)*

## 5. INFIAMMAZIONE

Moderatore: **G. Berton**

**G. Berton:** Introduzione:
*Aspetti emergenti della ricerca sull'infiammazione in fibrosi cistica*

**- P. Melotti** *pag.39*
*"Ruoli non battericidi dell'azitromicina: rilevanza per la terapia della fibrosi cistica" (prog. FFC #3/2002)*
**- O. Zegarra, G. Candiano, L. Bini** *pag.40*
*"Proteomica del liquido di superficie delle vie aeree: implicazioni per la fibrosi cistica" (prog. FFC #13/2003)*
**- M. C. Dechecchi** *pag.41*
*"Interazione in vitro tra batteri patogeni della fibrosi cistica e cellule epiteliali che esprimono la proteina CFTR" (prog. FFC #14/2004)*
**- F. Zazzeroni** *pag.42*
*"Infiammazione ed apoptosi nell'epitelio delle vie aeree in fibrosi cistica: ruolo di NF-kB e dei suoi geni bersaglio" (prog. FFC #17/2004)*
**- V. Raia, G. Castaldo** *pag.43*
*"Polipi nasali di pazienti FC come modello ex vivo per studiare l'infiammazione e la sua modulazione attraverso l'inibizione del percorso di p-38 MAP-kinasi: implicazioni per la terapia"( prog. FFC #16/2004)*
**- R. Gambari** *pag.44*
*"Strategie innovative per la diagnosi e la terapia della Fibrosi cistica" (prog. FFC #15/2004)*
**- F. Bazzoni** *"Ruolo di SOCS3 nelle cellule infiammatorie in risposta a stimoli di origine batterica" ( Prog. FFC #13/2004)*

## 6. RICERCA CLINICA ED EPIDEMIOLOGICA

Moderatore: **F. Pardo**

**C. Braggion** Introduzione: *pag.47*
*Le sfide della ricerca clinica ed epidemiologica CF in Italia*

**- A. Piazza** *pag.48*
*"Mappa delle mutazioni del gene CFTR in Italia: distribuzione regionale nel contesto europeo" (prog. FFC #7/2004)*
**- A. Bossi** *pag.49*
*"Costruzione di ipertesto, aggiornamento e controllo di qualità dei dati del Registro Italiano della fibrosi cistica: un punto di partenza per analizzare i dati clinici e divulgare i risultati" (prog. FFC #12/2003 e prog. FFC #19/2004)*
**- G. Taccetti** *pag.50*
*"Eradicazione precoce di Pseudomonas aeruginosa e sua successiva colonizzazione in pazienti con fibrosi cistica" (prog. FFC #18/2004)*

**Antonio Cao**
*(Direttore Istituto CNR di Neurogenetica e Neurofarmacologia, Università di Cagliari; Presidente Comitato di Consulenza Scientifica della Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica)*

**Introduzione generale alla Convention**

*Stamane ci incontriamo qui a Verona al Centro Culturale "G. Marani" dell'Ospedale Civile Maggiore in occasione della IIa Convention di Autunno, che ha radunato la maggior parte dei ricercatori italiani per la fibrosi cistica (CF). In questa sede vorrei anzitutto affrontare il problema generale del finanziamento della ricerca e sottolineare come la situazione del finanziamento pubblico (CNR e MIUR) della ricerca in Italia, non abbia mai raggiunto livelli così bassi come quelli attuali. Per contro, va rimarcato che si sono fatte avanti iniziative private come Telethon, l'AIRC e la fondazione Mariani che hanno consentito almeno in parte di colmare il vuoto dovuto alla carenza dei finanziamenti pubblici. Tra queste iniziative va collocata quella della Fondazione per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica, cui siamo in gran parte debitori per il progresso realizzato nella ricerca in questa malattia negli ultimi anni.*

*A seguito del bando della Fondazione del dicembre 2003 vennero presentati 35 progetti che sono stati sottoposti ad una accurata valutazione critica da parte del Comitato Scientifico della Fondazione stessa e di un vasto gruppo di esperti con competenze specifiche, in netta prevalenza stranieri. Nel complesso, si è avviato un sistema selettivo estremamente rigoroso, che premia ovviamente i progetti maggiormente originali e più promettenti, al fine di migliorare la salute dei nostri malati. Quest'anno sono stati selezionati 19 progetti, in buona parte multicentrici, che coinvolgono 30 gruppi di ricerca. Se consideriamo il lavoro portato globalmente avanti nel corso dei 3 anni di lavoro della Fondazione i progetti selezionati fino ad ora sono stati 36. Le ricerche finanziate hanno riguardato le tematiche più importanti ed in evoluzione nel campo della fibrosi cistica, tra cui la Clinica e l'Epidemiologia, l'infiammazione, la Microbiologia, la Genetica Molecolare, la Terapia Genica, la Fisiopatologia e le terapie innovative, tese a riattivare con diverse modalità le funzioni del CFTR mutato.*

*All'incontro sarà presentato e discusso lo stato di avanzamento dei progetti sinora finanziati dalla Fondazione, che vedono coinvolti in varia misura 54 gruppi di ricerca. Le tematiche trattate sono estremamente moderne, in competizione con la ricerca internazionale sull'argomento. Lo scenario è pertanto molto diverso rispetto a quello di alcuni anni fa, a testimonianza del ruolo fondamentale svolto dalla Fondazione per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica nel finanziare, ma anche nello stimolare e aggregare i gruppi di ricercatori più validi in Italia. Un altro frutto dello stimolo effettuato dalla Fondazione è rappresentato dall'arruolamento nell'ambito di ricerche CF di nuovi gruppi di ricercatori con interesse per altri argomenti anche se vicini alla CF stessa.*

*I risultati ottenuti fino ad ora sono ovviamente parziali. La ricerca nel campo della Fibrosi Cistica è estremamente difficile e problematica ed i risultati si ottengono per lo più dopo anni di lavoro. Tuttavia, già fin da ora, abbiamo potuto notare progressi significativi nel campo della ricerca sulla terapia genica con vettori lentivirali e con minicromosomi, del possibile controllo dell'infiammazione, nello studio di attivazione dei canali CFTR mutati, nella analisi dei rapporti genotipo-fenotipo, nella caratterizzazione dei germi patogeni più rilevanti e nella individuazione di possibili terapie farmacologiche dirette al ripristino della funzione difettosa del gene CFTR. Nel complesso, dall'analisi di questi elementi possiamo concludere con una previsione ottimista per il futuro, sia per quanto riguarda la ricerca italiana sulla Fibrosi Cistica ma soprattutto per quello che concerne le sue applicazioni al miglioramento della vita e alla possibile guarigione dei pazienti.*

# 1. Fisiopatologia CFTR e nuove terapie molecolari

*Moderatore:* ***Antonio Cao***

***Luis J.V. Galietta***
*Introduzione:* **"Linee di sviluppo promettenti delle ricerche su nuove terapie molecolari per la FC"**
*(Laboratorio di Genetica Molecolare, Istituto G. Gaslini, Genova)*

*La mutazione più frequente nella fibrosi cistica (FC) è la delezione dell'aminoacido fenilalanina in posizione 508 (deltaF508) a livello della proteina CFTR. Questa alterazione compromette principalmente la maturazione della proteina che quindi non riesce a raggiungere la membrana delle cellule ma che al contrario resta intrappolata all'interno dove viene degradata. Data la frequenza e la gravità degli effetti della mutazione deltaF508, è comprensibile che molti filoni di ricerca riguardino proprio la correzione del difetto di maturazione causato da questa stessa mutazione. Un approccio promettente è quello di identificare sostanze chimiche in grado di migliorare il ripiegamento e la stabilità della proteina CFTR mutata, in maniera tale da permetterne la corretta maturazione. A questo scopo, molti laboratori studiano la struttura del canale CFTR e cercano di identificare le altre proteine che sono responsabili della sua maturazione e localizzazione cellulare. Le conoscenze acquisite potrebbero portare alla progettazione "ragionata" di farmaci specifici. In alternativa, altri laboratori cercano farmaci utili attraverso l'analisi di un gran numero di composti chimici presi a caso. In questo approccio sono le cellule che esprimono il mutante deltaF508 a funzionare da "valutatori" delle molecole da saggiare.*
*Altri tipi di mutazioni che causano FC non alterano la maturazione della proteina CFTR, ma impediscono l'apertura del canale e quindi il passaggio degli ioni cloruro, oppure impediscono la sintesi della proteina stessa (mutazioni di stop). Nel primo caso è possibile intervenire utilizzando sostanze in grado di stimolare il canale CFTR mutato. Si conoscono già diverse sostanze efficaci che però allo stato attuale possono essere utilizzate solo in vitro su cellule. La ricerca è rivolta verso lo sviluppo di farmaci con effetti simili, ma dotati di minore tossicità e maggiore selettività, così da poter essere valutati su pazienti. Nel secondo caso è stata scoperta la capacità di alcuni antibiotici di consentire la prosecuzione della sintesi della proteina CFTR anche in presenza di una mutazione di stop. In questo caso alcuni studi clinici sono stati già effettuati dimostrando una certa efficacia. Tuttavia la ricerca prosegue verso lo sviluppo di molecole più selettive ed innocue.*

*Valeria Casavola e il suo gruppo*

***Valeria Casavola, Manuela Zaccolo***
**CFTR regulation by protein-protein interactions**
(Regolazione della proteina CFTR mediante interazione proteina-proteina)
*(Dip.to Fisiologia, Università di Bari; Ist. Veneto Medicina Molecolare, Padova)*

La fibrosi cistica (CF) è una patologia causata dalla perdita o dalla disfunzione di una proteina apicale di membrana, il CFTR, un canale per il cloro regolato dalla Protein chinasi AMP ciclico-dipendente (PKA).
Mutazioni di tale proteina determinano alterazioni sia nella secrezione di cloro che nel trasporto di altri ioni.
L'evidenza che il CFTR mutato, nella maggior parte dei casi di CF, conservi almeno parzialmente la propria funzione ha suggerito nuove strategie terapeutiche per il ripristi-

no della funzionalità della proteina, alcune delle quali mirate all'amplificazione del segnale di trasduzione cAMP/PKA.
E' ormai chiaro che la compartimentalizzazione del CFTR, in un complesso multiproteico, regoli l'attività dello stesso stabilizzando la proteina sulla superficie di membrana e/o aumentando l'efficienza della regolazione da parte della PKA.
E' rilevante notare come NHERF, una proteina sub-apicale a domini PDZ, identificata come fattore di regolazione di altri trasportatori ionici di membrana, mediante il dominio PDZ1, interagisca con il CFTR provvedendo ad un potenziale meccanismo di regolazione PKA-dipendente sia sull'attività del canale che di altri trasportatori. L'obiettivo di questo progetto è quindi quello di analizzare i meccanismi e le dinamiche delle interazioni mediante le quali NHERF regola l'inserzione del CFTR sulla membrana apicale e l'attività dello stesso, una volta in situ. Studieremo anche le dinamiche spazio-temporali dell'AMP ciclico e della PKA sia in cellule che esprimono correttamente il CFTR sia in quelle con CFTR mutato. La comprensione dei meccanismi molecolari coinvolti nella regolazione dell'attività del CFTR mediata da PKA rappresenta un passo chiave per lo sviluppo dell'effettiva terapia.

Francesco Osculati

***Francesco Osculati e Angelo Sbarbati***
*(Dipartimento di Scienze Morfologico-Biomediche,*
*Sezione di Anatomia ed Istologia, Università di Verona)*

**Chemoreceptor mechanisms in CFTR-expressing cells**
(Meccanismi di regolazione del canale CFTR e dei fenomeni secretori ad esso correlati)

Il canale CFTR ha un importante ruolo nei processi di secrezione delle vie aeree. Tali processi richiedono informazioni sulla composizione del materiale che riveste la mucosa.
Il nostro gruppo ha recentemente dimostrato come tali informazioni siano ottenute anche per mezzo di un sistema di cellule recettoriali che esprimono meccanismi molecolari molto simili a quelli presenti nelle cellule gustative della lingua (1-3).
Nel presente progetto stiamo valutando se queste molecole siano co-espresse con il CFTR e se agendo su tali meccanismi chemorecettoriali sia possibile modificare la secrezione delle vie aeree. L'utilizzo di tecniche di immunocitochimica ultrastrutturale permetterà di valutare l'esatto fenotipo degli elementi esprimenti il CFTR e le altre molecole (4).
I risultati preliminari hanno permesso: 1) di valutare la presenza, in cellule delle vie aeree, di molecole della traduzione gustativa (recettori 7TM, T1R; G protein, $\alpha$-gust-ducin, PLC$\beta$2; IP3R3) per mezzo di immunocitochimica, immunoblotting e PCR. Da tali dati è emerso che esiste nelle vie aeree un sistema chemorecettoriale diffuso (DCS) costituito da Solitary Chemosensory Cells (SCCs) e che cellule secernenti sierose esprimono elementi della traduzione gustativa. 2) I dati preliminari sembrano dimostrare che tali elementi esprimono CFTR (valutato immunocitochimicamente) anche se la conferma definitiva sarà ottenuta per mezzo di doppia localizzazione per mezzo di microscopio confocale in immunofluorescenza.
3) E' stato inoltre riscontrato che il CFTR è espresso in elementi dei calici gustativi.
4) E' stata messa a punto una metodica basata su tecniche di risonanza magnetica ad elevata intensità di campo (4,7T) in grado di valutare la secrezione delle vie aeree in

modo del tutto incruento sul ratto. Mediante tale approccio di fMRI stiamo valutando la possibilità di modulare la secrezione delle vie aeree con ligandi di varia composizione. In conclusione, il progetto ha permesso di identificare un sistema chemorecettoriale di controllo secretorio a livello delle vie aeree.
La non-conoscenza di tale sistema ha verosimilmente ostacolato sino ad oggi gli studi sui meccanismi secretori tracheobronchiali. La conoscenza del legame tra tale sistema e il CFTR appare un obbiettivo raggiungibile del progetto. La disponibilità di tecniche di fMRI appare in grado di superare alcuni limiti sino ad oggi dovuti alla impossibilità di visualizzare le secrezioni tracheali nel vivente.

Luis J.V. Galietta

***Nicoletta Pedemonte 1, Olga Zegarra-Moran 1, Tullia Diena 1, Emanuela Caci 1, Raffaella Melani 1, Salvatore Carrabino 2, Massimo Conese 2, Luis J.V. Galietta 1***
*(1.Laboratorio di Genetica Molecolare, Istituto Giannina Gaslini, Genova 2.Istituto per la Terapia Sperimentale della Fibrosi Cistica, H.S. Raffaele.*

**Screening of drugs approved for human use to identify novel pharmacological tools for cystic fibrosis**
(Screening di farmaci già approvati per uso umano al fine di identificare nuovi mezzi farmacologici per la fibrosi cistica)

Durante il primo anno di svolgimento del progetto è stata completata l'analisi primaria di 2000 composti chimici che comprendono sia farmaci approvati per uso umano 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).
In particolare, sono stati effettuati due tipi di indagine che riguardano la correzione del difetto funzionale associato alla mutazione deltaF508. Questa mutazione causa alterazioni della proteina CFTR a due livelli: 1) riduzione della capacità di trasporto di cloruro; 2) localizzazione alterata della proteina all'interno della cellula.
La prima indagine ha riguardato la ricerca di composti che possano stimolare l'attività della proteina CFTR mutata (correzione del difetto di tipo 1).
Sono stati trovati alcuni composti chimici che sono effettivamente in grado di aumentare in maniera significativa l'attività del canale con le mutazioni deltaF508 e G551D.
La seconda indagine ha invece riguardato l'identificazione di sostanze che possano riportare la proteina CFTR con la mutazione deltaF508 nella sua giusta posizione cellulare (correzione del difetto di tipo 2). Anche in questo caso, l'esame dei 2000 composti chimici ha rivelato la presenza di sostanze che sono apparentemente in grado di correggere il difetto funzionale associato alla mutazione.
Sono ora in corso studi per la conferma dei risultati e per determinare la specificità e il meccanismo di azione. Tali esperimenti riguardano in particolare la valutazione su cellule epiteliali bronchiali e nasali in coltura da pazienti FC.
Altri studi effettuati nel primo anno riguardano altri possibili bersagli interessanti per una terapia farmacologica nella FC: canali del cloruro diversi dalla proteina CFTR e secrezione di interleuchina-8.
A tal riguardo, è stato messo a punto un saggio veloce per misurare l'attività dei canali del cloruro attivati da calcio (CaCC).

In questo modo sarà possibile effettuare screening di composti chimici per trovare sostanze in grado di prolungare l'attività dei canali CaCC nelle cellule delle vie respiratorie. Ciò può essere utile per compensare il difetto di trasporto di cloruro del canale CFTR nelle cellule di pazienti FC.
Un'altra linea di ricerca riguarda lo sviluppo di un saggio per rivelare l'espressione del gene della interleuchina-8. Questa proteina viene prodotta in grande quantità nelle vie aeree dei pazienti dove è in parte responsabile della risposta infiammatoria che danneggia i polmoni nella FC.
Il saggio permetterà di ricercare farmaci che inibiscono la produzione di interleuchina-8 e quindi di ridurre l'infiammazione.

*Progetto adottato in parte dalla Fondazione Cariverona*

Oscar Moran

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

**Activators of the CFTR ionic transport: identification and molecular modelling of the binding sites**
(Attivatori della proteina CFTR: Meccanismi d'azione e modelli molecolari dei siti di unione)

Molte mutazioni della proteina CFTR che producono la fibrosi cistica portano ad un difetto del trasporto di sali, in particolare dei cloruri, dovuto alla riduzione dell'attività della CFTR negli epiteli dove è espressa.
Recentemente è stato identificato un insieme di sostanze, denominate attivatori, capaci di aumentare il trasporto di cloruro in cellule che esprimono la CFTR con queste mutazioni ad "attività ridotta". Questa scoperta ha portato a proporre lo sviluppo di una terapia farmacologica per alcune forme di fibrosi cistica.
Ci sono evidenze che indicano che gli attivatori agiscano sulla CFTR legandosi ad una regione definita della proteina, chiamata dominio di legame dei nucleotidi (NBD). Mediante tecniche di modellistica molecolare al calcolatore abbiamo costruito un modello strutturale di questo dominio della proteina, che ci ha permesso di identificare la zona alla quale si potrebbero legare gli attivatori. Attualmente stiamo lavorando al controllo di questo modello, mediante il confronto tra le proprietà del legame degli attivatori previsto teoricamente al calcolatore e le caratteristiche d'azione di queste sostanze misurate sperimentalmente.
Finora questo modello può predire la dose effettiva media (affinità) dei diversi attivatori per la CFTR, i cambiamenti dell'affinità dovuti ad alcune mutazioni, e ci ha permesso di costruire una cornice operativa per interpretare alcuni risultati sperimentali. Questo tipo di modello potrà in seguito essere utilizzato per la previsione al calcolatore dell'interazione di nuove molecole con la CFTR, in modo di poter facilitare il disegno di nuove sostanze con promettenti possibilità terapeutiche.

Marco Colombatti

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

**Dissection of folding/defolding processes in CFTR cells. Use of disarmed toxins to target chaperones and assist refolding and expression of DF508-CFTR**

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

Nella maggior parte dei casi di Fibrosi Cistica (FC) si osserva che è presente una mutazione δF508 nel canale di membrana responsabile del trasporto di ioni cloro, il Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR).
Tale mutazione comporta difetti nel ripiegamento della molecola, nel suo traffico intracellulare e nella sua funzione di membrana, che è tuttavia parzialmente conservata. All'interno della cellula esistono dei sistemi che permettono di controllare la qualità delle proteine prodotte nel reticolo endoplasmico (ER) così da far proseguire verso la loro destinazione solo proteine correttamente ripiegate ed assemblate.
Le proteine non correttamente ripiegate ed assemblate vengono distrutte. Un complesso sistema di proteine ed enzimi prende parte a questi processi di "controllo di qualità" delle proteine nell'ER, a cui non sfugge il CFTR. Tra queste proteine ed enzimi un ruolo importante è dovuto alle proteine chaperones ed alle ossidoriduttasi.
Sono allo studio un insieme di composti chimici e farmacologici che possano influenzare le funzioni del sistema di "controllo di qualità" dell'ER al fine di facilitare il ripiegamento corretto ed il trasporto in membrane di CFTR. Tra questi vi sono sostanze che modificano la funzione di proteine chaperones, che inibiscono la degradazione di proteine parzialmente alterate o che aumentano l'espressione di proteine (es. deoxyspergualina, sodio butirrato, doxorubicina, genisteina).
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.
Tossine di origine batterica (es. Shiga toxin) o vegetale (es. Ricina) sono internalizzate dalla cellule seguendo un percorso retrogrado che conduce la tossina all'interno dell'ER dove le due subunità sono separate dall'intervento di riduttasi. La subunità catalitica viene percepita dal sitema di "controllo di qualità" come non correttamente ripiegata e successivamente trasportat nel citosol, dove parte delle molecule vengono distrutte dal proteasoma mentre parte delle molecule raggiungono il loro bersaglio (es. RNA ribosomiale) e ripiegandosi correttamente esercitano la loro attività catalitica intossicando la cellula.
Varianti geneticamente modificate della tossina con subunità catalitiche "disarmate" possono essere utilizzate per trasportare in compartimenti cruciali della cellula e ivi concentrarvi delle sostanze farmacologicamente attive nel facilitare un corretto ripiegamento di CFTR difettivo ed aumentarne la sua espressione in membrana.

Bianca Maria Rotoli

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

**Natural and synthetic amino acids as chemical chaperones to promote CFTR Folding.**
(Aminoacidi naturali e sintetici quali chaperoni chimici per promuovere la conformazione di proteina CFTR)

Diverse patologie umane sono dovute alla presenza di proteine caratterizzate da una anomala conformazione ("protein misfolding"), dal fatto cioè che la proteina patologica non è in grado, una volta sintetizzata, di assumere una forma corretta.
Una di queste patologie è la fibrosi cistica. Infatti, la maggior parte degli individui di origine nord-europea affetti dalla fibrosi cistica possiede almeno un allele δF508 del gene CF. La proteina CFTR codificata da CF-δF508, assume una conformazione anomala e, per questo motivo, una volta sintetizzata, viene trattenuta e degradata rapidamente all'interno della cellula. Nei pazienti con δF508-CFTR, la proteina, di per sé funzionale, non può quindi raggiungere la membrana plasmatica. Per una correzione del difetto in questi pazienti sarebbero quindi necessarie strategie capaci di fare assumere alla proteina δF508-CFTR una forma corretta e, così, di farle raggiungere normalmente la membrana plasmatica.
In altre patologie associate a "protein misfolding" sono stati compiuti tentativi di correzione delle proteine patologiche utilizzando piccole molecole definite "stabilizzatori proteici". Per quanto riguarda δF508-CFTR, risultati incoraggianti sono stati ottenuti con l'uso di composti quali glicerolo, mio-inositolo, betaina, taurina, 4-fenilbutirrato. Tuttavia, per raggiungere risultati apprezzabili, questi composti devono essere utilizzati a concentrazioni talmente elevate da causare tossicità.
Ai fini di un possibile impiego terapeutico, in questo progetto proponiamo invece di utilizzare come "stabilizzatori proteici" della proteina δF508-CFTR gli aminoacidi. Questa ipotesi di lavoro si basa sul fatto che gli aminoacidi, composti a tossicità modesta, vengono specificamente concentrati a livelli elevati all'interno delle cellule, grazie all'attività di trasportatori presenti naturalmente sulla membrana plasmatica.
Il progetto utilizzerà linee cellulari che esprimono δF508-CFTR. Le cellule verranno incubate in presenza di elevate concentrazioni di aminoacidi naturali (prolina, glutamina) o di analoghi sintetici in grado di essere concentrati all'interno delle cellule. L'effetto dei vari composti sarà valutato in termini di correzione funzionale e molecolare del fenotipo CF tramite, rispettivamente, efflusso di cloro e presenza di δF508 CFTR sulla membrana plasmatica.

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

**Pathogenesis and treatment of cystic-fibrosis related liver disease**
(Patogenesi e trattamento della patologia epatica correlata alla fibrosi cistica).

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 limi-

Mario Strazzabosco

tata 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 tale scopo durante il primo anno del nostro progetto abbiamo completato lo studio dei 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 ancora di più notevole interesse è il risultato che la glibenclamide è in grado di ristabilire la secrezione di fluidi in frammenti dei dotti biliari isolati da topi knock-out per il CFTR, nei quali la secrezione cAMP-mediata è significativamente inibita. Inoltre, abbiamo intrapreso uno studio per chiarire quali siano i meccanismi molecolari alla base dell'effetto terapeutico dell'UDCA. I risultati di questo studio dimostrano che l'UDCA stimola la secrezione di fluidi nelle cellule dei dotti biliari di topo con un meccanismo dipendente dal CFTR e tramite il coinvolgimento di alcune isoforme della protein chinasi C. Questo effetto non è però mantenuto nelle cellule isolate da topi knock-out per il CFTR, suggerendo che l'azione terapeutica dell'UDCA in fibrosi cistica dipenda da diverso meccanismo, che è attualmente oggetto dei nostri studi.

*Progetto adottato in parte dalla Fondazione Cariverona.*

L. M. Bambara e C. Scambi

***Lisa Maria Bambara, Cinzia Scambi***
*(Medicina Interna, Policlinico GB Rossi, Università di Verona)*

**Biochemical and physiopathological aspects of plasma membrane of human bronchial epithelial cells expressing DF508 mutation before and after supplementation of methylated folic acid and vitamin B12**
(Aspetti biochimici e fisiopatologici della membrana plasmatica delle cellule epiteliali bronchiali umane esprimenti la mutazione DF508 prima e dopo supplementazione di acido folico metilato e vitamina B12). *Progetto pilota*

Ci sono molti motivi per ipotizzare che l'acido folico possa essere utile per i pazienti con fibrosi cistica. Infatti, questa vitamina è la fonte principale di gruppi metilici che servono alle cellule del nostro organismo per il buon funzionamento di DNA, RNA, proteine e fosfolipidi.
Inoltre, studi sperimentali nell'animale hanno dimostrato che la supplementazione con acido folico determina un aumento degli acidi grassi omega-3 nel plasma e nelle membrane cellulari di globuli rossi, piastrine e cellule intestinali.
Negli ultimi anni vari lavori hanno documentato alterazioni a livello di fosfolipidi e acidi grassi omega-3 nel sangue e nelle cellule di pazienti con fibrosi cistica che sembrano

essere correlate con la gravità della malattia. Freedman nel 1999 segnalava il miglioramento della funzionalità di pancreas, intestino e polmoni in animali con fibrosi cistica dopo trattamento con DHA (acido grasso omega-3).
Attualmente sono in corso studi, sia clinici che laboratoristici, per verificare se la supplementazione con acido folico può migliorare i trasporti della membrana cellulare, modificando i fosfolipidi e gli acidi grassi presenti a livello della membrana stessa. Purtroppo coltivare le cellule bronchiali in terreni di coltura poveri di acido folico non è risultato facile e i primi tentativi non hanno portato i risultati sperati, mentre dall'analisi delle cellule del sangue circolante di pazienti affetti da fibrosi cistica, trattati per un breve periodo con acido folico, sono emerse modifiche nella composizione degli acidi grassi che ci fanno sperare in risultati migliori.

# 2. Terapia Genica

Moderatore: ***Antonio Cao***

***Giuseppe Novelli***
*(Dip.to Biologia, Sez. Genetica, Università Tor Vergata, Roma*)
Introduzione:**Cellule staminali: verso una possibile terapia cellulare della Fibrosi Cistica?**

*La Terapia Cellulare è una forma di trattamento medico di cui è prevedibile una grande espansione nel prossimo futuro.*
*Negli ultimi anni, infatti, le migliorate conoscenze sulla biologia del differenziamento cellulare (cioè della capacità delle cellule a diventare fegato, cuore, rene, polmone, cervello ecc. pur avendo lo stesso DNA e quindi la medesima informazione genetica), nonché gli enormi progressi compiuti nel campo della genetica e della biologia dello sviluppo hanno permesso l'identificazione di cellule (cellule staminali) che hanno questa capacità e che possono quindi essere isolate, "manipolate" in provetta per un impiego clinico quale quello sostitutivo, riparativo e rigenerativo di tessuti e di organi deteriorati. Le cellule staminali rappresentano quindi un'importante alternativa o integrazione ai trapianti di organo.*
*La possibilità di crescere in provetta queste cellule fino a produrne quantità elevatissime se non proprio illimitate, potranno risolvere i due limiti fondamentali dell'attuale tecnologia dei trapianti: la scarsità di organi e il rigetto.*
*Le cellule staminali sono inoltre in grado di accettare e tollerare, molto meglio delle cellule mature già specializzate, geni introdotti dall'esterno con tecniche d'ingegneria genetica e correggere quindi difetti genetici responsabili di gravi malattie ereditarie come la fibrosi cistica, l'atrofia muscolare spinale, la distrofia di Duchenne.*

*Ma dove si trovano le cellule staminali?*
*Il differenziamento cellulare può considerarsi un processo di graduale specializzazione e restringimento di potenzialità.*
*Poco dopo la fecondazione lo zigote (la prima cellula che deriva dalla fusione dello spermatozoo con la cellula uovo) si divide in due cellule figlie, che a loro volta si dividono ripetutamente, formando quattro, otto, sedici cellule o blastomeri. Questa struttura cellulare è definita morula.*
*Alcune cellule interne alla morula (cellule staminali embrionali), hanno la straordinaria capacità di dare origine a tutti i tipi cellulari, e quindi a tutti i tessuti, presenti nell'individuo adulto, per questa ragione vengono definite cellule totipotenti.*
*Queste cellule si trovano quindi nell'embrione ai primi stadi dello sviluppo.*
*E' vero che esistono altre fonti di cellule staminali, quali il cordone ombelicale, il midollo osseo, e anche il cervello di neonati o di persone adulte, ma queste NON hanno le stesse capacità rigenerative e l'ampia capacità di specializzazione che hanno le cellule staminali embrionali.*
*Naturalmente è molto difficile ottenere queste cellule da embrioni umani senza sollevare insormontabili problemi etici (sebbene si è molto discusso sulla possibilità di utilizzare gli embrioni mantenuti nei congelatori e non più utilizzati dalle coppie che hanno effettuato una fecondazione artificiale), ma anche pratici perché queste cellule non potrebbero essere utilizzate per la cura dei malati in quanto geneticamente diverse dall'individuo ammalato, ma molti ricercatori ritengono che in maniera limitata cellule derivate da questi embrioni potrebbero servire per la ricerca in questo campo.*

*Le prospettive a questo punto sono due:*

***1)*** *Ottenere cellule staminali embrionali di un individuo attraverso la cosiddetta clonazione terapeutica o meglio, "trasferimento somatico di nucleo".*
*Questo processo consiste nella produzione in provetta di cellule staminali del malato stesso (autologhe) attraverso la riprogrammazione del nucleo di cellule somatiche (ad esempio, cellule della pelle, del fegato) che una volta trasferito all'interno di una cellula uovo precedentemente enucleata (cioè privata del proprio nucleo), induce la formazione di cellule staminali embrionali totipotenti in grado di proliferare indefinitamente e di specializzarsi in numerosi tipi cellulari.*
*Le cellule ottenute con questa metodica, posseggono lo stesso genoma nucleare del donatore della cellula somatica e sono immunologicamente compatibili per autotrapianto, possono pertanto anche venire corrette se presentano mutazioni genetiche prima di essere somministrate all'ammalato, aumentando quindi l'efficacia di un trattamento terapeutico e riducendo i rischi della terapia genica.*

***2)*** *Utilizzare cellule staminali embrionali ottenute da fonti diverse (linee embrionali, prelievi bioptici da embrioni, cellule ottenute da embrioni congelati e non più utilizzabili per differenziare queste cellule a diventare cellule specializzate o a produrre "fattori" trofici per la riparazione cellulare durante lo sviluppo fetale o negli adulti.*

*Fondamentale perciò per il primo obiettivo è la possibilità di sviluppare protocolli di terapia genica innovativi e funzionanti.*
*In tal senso recentemente sono stati messi a punto approcci di terapia genica basati sul riparo genico o sulla modulazione dell'espressione genica piuttosto che sull'aggiunta di copie funzionali del gene difettivo. Strategie di riparo genico per mutazioni puntiformi o piccole delezioni hanno dimostrato una larga applicabilità in diversi modelli di patologie umane.*
*Tra questi protocolli la tecnica SFHR prevede l'uso di corti frammenti di DNA (fino a 1000 paia di basi) sintetizzati in vitro mediante PCR.*
*Studi recenti effettuati nel nostro e in altri laboratori, hanno dimostrato che questo approccio è in grado di indurre cambiamenti fenotipici a livello di DNA e di RNA sia in vitro che in vivo. Le cellule staminali embrionali (ES) per le loro peculiari caratteristiche rappresentano sicuramente il vettore più appropriato per protocolli di terapia genica mediante gene targeting.*
*Le loro potenzialità differenziative e la possibilità di coltivarle e manipolarle in vitro le rendono un target ideale per protocolli di terapia genica cellulare.*
*Nel nostro laboratorio è stato messo a punto un approccio innovativo di gene targeting che utilizza la tecnica SFHR (Small Fragment Homologous Replacement) allo scopo di inserire una delezione di 3 basi (mutazione δF508) all'interno dell'esone 10 del gene Cftr in cellule embrionali staminali murine con genotipo selvatico.*
*Questi frammenti di DNA, una volta inseriti all'interno delle cellule, riconoscono la sequenza omologa all'interno del genoma e la sostituiscono mediante un meccanismo di ricombinazione omologa.*
*I primi risultati sono incoraggianti, ma è necessario andare avanti e sperimentare questi approcci su linee cellulari diverse di cellule staminali embrionali ottenute da embrioni omozigoti per mutazioni CFTR o eventualmente indotte artificialmente a diventare tali, per capire il loro reale valore potenziale in termini terapeutici.*

Anna Tamanini

***Anna Tamanini, Paola Melotti, Elena Nicolis, Alberto Bonizzato, Cristina Cigana, Baroukh Maurice Assael e Giulio Cabrini.***
*(Lab. Patologia Molecolare, Centro Fibrosi Cistica, Verona)*

**Role of Adenovirus Receptors in the activation of Mitogen-activated Protein-kinase pathways and Nuclear Factor-kB in human airway epithelial cells.**
(Ruolo dei recettori adenovirali nell'attivazione di segnali intracellulari coinvolti nella risposta infiammatoria in cellule di origine epiteliale).

Tra le terapie innovative per correggere il difetto di base della fibrosi cistica, il trasferimento genico mediante vettori derivati da Adenovirus fornisce importanti informazioni per il disegno di vettori di nuova generazione.
I virus utilizzati per la terapia genica vengono deleti dei geni essenziali per la loro replicazione ottenendo vettori in grado di contenere segmenti di DNA codificanti le proteine desiderate.
I potenziali vantaggi nell'utilizzo dei vettori adenovirali per la terapia genica includono la loro relativa sicurezza essendo in grado di generare infezioni respiratorie moderate, la facilità con la quale possono essere prodotti, purificati e concentrati ad alti titoli e la loro capacità di infettare anche cellule non proliferanti. Una delle maggiori limitazioni al successo dei vettori adenovirali, in terapia genica, è l'induzione di una risposta immunitaria contro le proteine virali.
Recentemente è stato dimostrato, in vitro, che l'esposizione di cellule epiteliali ad Adenovirus ed ad Adenovirus inattivato al calore attiva segnali intracellulari che portano alla trascrizione di geni codificanti molecole coinvolte nel processo infiammatorio ( Tamanini A. et al., Virology 2003, 307: 228 – 242).
Alcuni recettori adenovirali sono stati identificati dopo l'inizio dell'utilizzo degli Adenoviruses in terapia genica e molto poco è conosciuto sul loro ruolo biologico.
Il recettore primario è comune per il Coxsackievirus e per l'Adenovirus ed è stato denominato Coxsackievirus Adenovirus Receptor ( CAR).
Dopo l'iniziale attacco della fibra adenovirale al CAR la base pentonica dell'Adenovirus si lega ad altri recettori di membrana chiamati integrine che ne facilitano l'internalizzazione. Gli eparansolfati glicosaminoglicani (HS GAGs), presenti sulla superficie cellulare sono stati identificati come recettori secondari adenovirali e non è possibile escludere l'esistenza di altri recettori non ancora identificati.
Questo studio si propone di indagare il ruolo dei recettori primari e secondari degli Adenovirus di tipo 5 e 2 nell'attivazione delle tre principali vie delle Mitogen Activated Protein Kinases (MAPKs) e del fattore di trascrizione genica NF-kB che portano all'induzione di geni codificanti molecole infiammatorie.
Il progetto prevede 2 fasi di studio. Fase I: preparazione degli Adenoviruses, dei diversi componenti virali e del recettore primario solubile; preparazione di cloni derivati da cellule epiteliali con espressione differenziale dei recettori adenovirali.
Fase II: studio di MAPKs, NF-kB e trascritto di molecole infiammatorie in cellule esposte a virus intero e alle diverse componenti virali.
I risultati di questo studio sono rilevanti per identificare i meccanismi di attivazione della risposta infiammatoria ed immunitaria nel trasferimento genico e sperimentare strategie per la costruzione di vettori ad elevata sicurezza ed efficienza.

Massimo Conese

***Elena Copreni, Marianna Penzo, Stefano Castellani, Salvatore Carrabino, Massimo Conese***
*(Institute for Experimental Treatment of Cystic Fibrosis, H. S. Raffaele, Milano).*

**Efficiency, efficacy and safety of Lentivirus vectors in CFTR gene transfer in model systems of airway epithelia with cystic fibrosis** (Valutazione dell'efficienza, efficacia e sicurezza di vettori lentivirali nel trasferimento del gene CFTR in sistemi modello di epitelio respiratorio con fibrosi cistica)

I lentivirus (LV) ricombinanti presentano delle caratteristiche biologiche (integrazione nel genoma dell'ospite, infezione di cellule a bassa attività proliferante come quelle dell'epitelio respiratorio) che li fanno considerare come vettori promettenti per la terapia genica della malattia polmonare FC. Lo scopo primario di questo progetto è quello di verificare l'efficienza e l'efficacia di vettori lentivirali in modelli pre-clinici di epitelio respiratorio adeguati per la Fibrosi Cistica. Studi precedenti hanno dimostrato che per ottenere una efficienza ottimale di trasferimento genico nell'epitelio respiratorio mediante LV ricombinanti c'è bisogno di rompere l'integrità dell'epitelio. In questo secondo anno di finanziamento abbiamo verificato che un LV di ultima generazione fosse capace di trasferire il gene veicolato nell'epitelio respiratorio di vari modelli in vitro e in vivo senza attuare questa strategia deleteria per il paziente FC.
Nello studio in vivo sono stati utilizzati due modelli, uno interamente murino ed uno misto topo-uomo. Nel primo, il LV viene somministrato ai polmoni di topi immunocompetenti attraverso la trachea. L'espressione del gene marcatore è stata valutata dopo due giorni e due settimane dalla somministrazione. In entrambi i tempi di osservazione, il gene era espresso dall'epitelio respiratorio a livello dei bronchioli, con una diminuzione dei livelli a due settimane. L'analisi istochimica non dimostrava alcuna alterazione dell'architettura tessutale. Nel secondo modello si sono impiantati tessuti respiratori (polmoni e trachea) di origine fetale al di sotto della cute di topi immunocompromessi, i quali non possono quindi rigettare il trapianto. I tessuti fetali così impiantati si sviluppano e si differenziano come nell'individuo normale. Il LV è stato iniettato nel lume della trachea o nel parenchima polmonare e l'espressione genica è stata valutata dopo due settimane. Nella trachea, l'espressione genica era localizzata a livello di cellule colonnari e basali. Nei polmoni, le cellule positive erano localizzate a livello bronchiolare ed alveolare. Questi risultati ci permettono di concludere che un LV di ultima generazione permette l'espressione del gene in epiteli ben differenziati in modelli animali ed umani che possono essere considerati pre-clinici nella FC.
Al fine di verificare la modalità con cui il LV traduce l'epitelio respiratorio integro, sono stati condotti degli studi in vitro su cellule epiteliali respiratorie. Poiché l'eparan-solfato (HS), è stato descritto essere il recettore di una proteina presente sulla membrana del virus, è stato indagato il ruolo di HS nel trasferimento genico da parte del LV in in due diverse linee cellulari epiteliali respiratorie di derivazione umana, una bronchiale non FC (16HBE-S1) e l'altra tracheale FC (CFT1-C2). L'analisi citofluorimetrica mostra che entrambe le linee esprimono l'HS e che la percentuale di cellule positive è circa del 85% in entrambe le linee cellulari. L'efficienza di trasferimento genico è pari al 90% di cellule positive, in assenza di una tossicità cellulare significativa. Studi di

immunfluorescenza confocale su cellule polarizzate mostrano che l'espressione di HS è maggiore a livello del versante baso-laterale rispetto a quello apicale nella linea CFT1-C2, ma non nella linea 16HBE-S1.
I nostri dati mosrano che un LV di ultima generazione è capace di trasferire un gene marcatore nell'epitelio respiratorio integro con minima tossicità. Sono in corso studi di trasferimento genico su cellule polarizzate per verificare che la molecola HS giochi un ruolo nel trasferimento genico mediato da LV. Studi futuri saranno mirati a valutare la posssibilità di somministrazioni ripetute di LV in vivo, nonché il trasferimento del gene CFTR in topi e tessuti umani FC considerando come finalità terapeutiche la reversione del fenotipo infiammatorio e della colonizzazione batterica.

*(Progetto Finanziato in parte dall'Associazione Lombarda Fibrosi Cistica ONLUS).*

Fiorentina Ascenzioni

***Fiorentina Ascenzioni, Massimo Conese, Olga Zegarra-Moran***
*(Dipartimento di Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Università "La Sapienza" Roma, Istituto per la terapia sperimentale della fibrosi cistica, HSR, Milano, Istituto Gianna Gaslini, Genova)*

**Minichromosomes: a new approach for gene therapy of cystic fibrosis** (Minicromosomi: un nuovo approccio terapeutico per la terapia genica della Fibrosi Cistica)

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 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 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 accumulati 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. Entrambe 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 prodotti 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 trasferire 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 adottato in parte dalla Delegazione di Treviso-Montebelluna della Fondazione (" Bottega delle Donne")*

# 3. Genetica applicata alla Diagnostica CF

Moderatore: ***Pierfranco Pignatti***

Pier Franco Pignatti

***Pier Franco Pignatti***
*(Sezione di Biologia e Genetica,*
*Dipartimento Materno-Infantile e di Biologia-Genetica,*
*Università degli Studi di Verona)*
*Introduzione:* **Prospettive di sviluppo della ricerca genetica applicata alla diagnosi in CF**

*Dalla scoperta del gene della fibrosi cistica nel 1989 ad oggi sono state trovate molte mutazioni diverse che determinano la fibrosi cistica quando sono presenti su entrambi i geni che vengono ereditati dai genitori. Si è visto che paesi diversi e regioni diverse in Italia hanno mutazioni parzialmente diverse o con diversa frequenza. Una pubblicazione collaborativa nazionale (Rendine ed altri, Ann Hum Genet 1997; 61:411) ed un meritorio sito web (http://spazioinwind.libero.it/laboratoricf) riportano i dati per le regioni più studiate. Nuovi studi sono necessari per aggiornare ed estendere questi dati. I kit diagnostici in uso contengono alcune mutazioni e a volte debbono essere integrati con una analisi aggiuntiva di altre mutazioni, in relazione al luogo di nascita del paziente o meglio dei suoi genitori o meglio ancora dei suoi quattro nonni. In base ai dati di frequenza delle mutazioni saggiate nel test e ai dati di provenienza geografica è doveroso determinare, nelle persone nelle quali non si è trovata alcune mutazione, il rischio residuo dopo test genetico negativo di avere egualmente una mutazione causa di CF (Bombieri e Pignatti 2001; Genetic Testing, 5:229), come sottolineato da un recente controllo nazionale di qualità dei laboratori per la diagnosi di CF (Taruscio ed altri 2004; Clin Chem Lab Med 42:915).*
*Le prospettive di sviluppo della ricerca genetica applicata alla diagnosi di CF riguardano sia il gene della fibrosi cistica che altri geni potenzialmente coinvolti nello sviluppo della malattia (geni modificatori). Nel determinare la malattia giocano un ruolo anche alcune varianti del DNA del gene CF che regolano la quantità e la qualità del prodotto finale pur non essendo di per sé mutazioni causa di CF. Si parlerà infatti in questa sessione di una variante (M470V), della maturazione alterata del messaggio genetico prodotto dal gene (splicing, introni), di riarrangiamenti genomici e mutazioni non riconosciute, che finora non sono inclusi nelle indagini standard. In casi atipici di fibrosi cistica questa analisi ulteriore della sequenza del gene potrebbe essere particolarmente importante, ad esempio nelle forme atipiche e monosintomatiche di CF potenzialmente correlate a mutazioni nel gene della fibrosi cistica (calcolosi renale).*

***Giuseppe Novelli (1), Pierfranco Pignatti (2), Francesco Salvatore(3).***
*((1) Dip. Biologia, Sez. Genetica, Univ. Tor Vergata, Roma;*
*(2) Ist. Biologia e Genetica, Univ. Verona;*
*(3) Dip. Biochimica e Biotecnologie, Univ. Napoli "Federico II")*
**Identification of CF modifier genes by family studies and microarray analysis** (Identificazione di geni modificatori della fibrosi cistica attraverso studio di famiglie ed analisi "microarray")

La Fibrosi Cistica è una malattia autosomica recessiva dovuta a mutazioni nel gene CFTR. Il fenotipo clinico risulta altamente eterogeneo sia tra i diversi individui affetti che tra i malati della stessa famiglia a causa della presenza di geni modificatori, diver-

Giuseppe Novelli

si dal gene CFTR, e di fattori ambientali . Benché sia stato prodotto uno sforzo scientifico considerevole, i meccanismi patogenetici precisi della FC non sono ancora chiari, e il ruolo dei geni modificatori totalmente sconosciuto.
L'obiettivo di questo progetto è l'identificazione dei geni di suscettibilità in grado di influenzare la gravità clinica della malattia. A tale scopo abbiamo riunito le esperienze di tre gruppi di ricerca diversi con conoscenze specifiche sulla genetica e la genomica della FC ed abbiamo condotto lo studio mediante un duplice approccio:
1-Studio di varianti in geni candidati che possono essere associate ai diversi quadri clinici di Fibrosi Cistica. Sono stati analizzati dalle diverse unita' operative geni coinvolti nella risposta infiammatoria, geni che regolano l'attivita' del CFTR e geni che sono responsabili del target del CFTR sulla membrana. Questo ha permesso di individuate varianti in alcuni geni che risultano statiscticamente significative se associate ad alcuni fenotipi FC.
2-Analisi mediante la tecnica di microarray a cDNA, che permette di comparare l'espressione genica di due diverse popolazioni cellulari analizzando contemporaneamente migliaia di geni nello stesso esperimento. Questo permette di identificarei geni il cui livello di espressione risulti differente comparando individui sani ed individui affetti.
Lo studio e' stato condotto su linee cellulari proveniente da tessuto bronchiale di individui sani ed affetti.
I nostri risultati hanno confermato la presenza di geni differentemente espressi (ipo ed iperespressi) , alcuni dei quali sono stati confermati mediante Real Time PCR, e sono in seguito stati caratterizzati a livello genotipico.

Elisa Goina e Franco Pagani

***Franco Pagani, Elisa Goina***
*(ICGEB, Trieste)*
**Molecular pathology of CFTR pre mRNA splicing. Diagnostic and therapeutic aspects"**
(Patologia molecolare di "mRNA splicing" del gene CFTR. Aspetti diagnostici e terapeutici)

Questo studio ha come obiettivo, attraverso la identificazione dei meccanismi di base implicati nello "splicing" e lo studio delle alterazioni patologiche connesse, lo sviluppo di nuove strategie diagnostiche e terapeutiche nella Fibrosi Cistica. Il primo passo nella espressione del gene della Fibrosi Cistica consiste nella produzione di una molecola di RNA precursore che e' identica a quella del DNA che funge da stampo. Questa molecola di RNA precursore, enormemente piu' lunga dell'RNA maturo, contiene la informazione necessaria per dirigere la sintesi della proteina CFTR. Tuttavia, poiche' questa informazione e' contenuta solo in alcune porzioni della molecola di RNA

(gli esoni), la maggior parte della sequenza originaria (gli introni) viene rimossa attraverso il meccanismo dello "splicing". Per la formazione della molecola di 6.500 basi del CFTR i segmenti rimossi sono enormemente piu' lunghi: ben 188.000 basi. Mutazioni nel gene del CFTR possono alterare lo splicing generando la malattia. In molti casi tuttavia e' difficile riconoscere e/o predirre se un particolare cambiamento nel gene produrra' un difetto di splicing. Questo perche' molti dei segnali che regolano lo splicing sono complessi, non ben conosciuti e possono essere distribuiti nella intera molecola di RNA.
In questo studio abbiamo analizzato in dettaglio l'effetto di mutazioni nell'esone 12 sul processo di splicing. Le mutazioni esoniche vengono categorizzate normalmente secondo il loro effetto sulla proteina: mutazioni sinonime non cambiano la proteina e mutazione non-sinonime che causano un cambio aminoacidico. Generalmente vengono considerate come patologiche solo le mutazioni non-sinonime. In questo studio, si e' dimostrato che numerose mutazioni sia non sinonime cosi' come quelle sinonime possono causare un difetto di splicing con esclusione dell'esone dal mRNA. In particolare e' stata compiuta una analisi sistematica dell'effetto di gran parte dei siti sinonimi sullo splicing. Inaspettatamente, una sostituzione sinonima su quattro induce salto dell'esone. Inoltre abbiamo studiato con quale meccanismo le mutazioni possono causare un difetto di splicing. Questo ha portato alla identificazione di proteine dello "splicing" che prendono contatto e si legano alle basi dell'RNA ed in tal modo modulano lo splicing. Tale dato e' di notevole interesse poiche' mediante la modulazione di queste proteine, o la creazione di varianti terapeutiche, sara' possibile in futuro cercare di correggere il difetto di base, cioe' lo splicing.

Roberto Strom

***1, Roberto Strom, 2, Quattrucci S., 3, Mazzilli F., 1, Lucarelli M., 2, Narzi L., 3, Rossi T., 1, Ferraguti G., 1, Piergentili R., 2, Narzi F., 1, Pierandrei S., 2, Stamato A.***
*(1Dip. Biotecnologie Cellulari ed Ematologia; 2Centro Fibrosi Cistica Regione Lazio, Istituto di Clinica Pediatrica; 3Dip. Fisiopatologia Medica - Università di Roma "La Sapienza")*

**Selection and functional characterization of CFTR intronic sequence variations potentially causing atypical forms of Cystic Fibrosis: modulation of CFTR alternative splicing?**
(Selezione e caratterizzazione funzionale delle variazioni di sequenza intronica del CFTR suscettibili di causare forme atipiche di Fibrosi Cistica: modulazione dello splicing alternativo di CFTR?)

Razionale. Alcune forme di Fibrosi Cistica (FC), che non manifestano appieno tutti i classici sintomi della malattia ma solo alcuni di essi e/o con minore gravità, sono attualmente classificate come atipiche (o anche CFTR-correlate). Quali siano le variazioni nella sequenza del DNA del CFTR, che specificamente causano queste forme atipiche, è ancora noto solo in parte. La conoscenza di queste forme atipiche è tuttavia importante sia per poter stabilire la diagnosi nei casi dubbi, sia per prevedere quale potrà essere l'evoluzione della malattia e, in futuro, adattare la terapia.

L'obiettivo generale di questo progetto è la ricerca e l'identificazione, nelle forme atipiche di FC, di variazioni di sequenza nel DNA del CFTR e la loro caratterizzazione funzionale per stabilire se possano o meno causare malattia.
Risultati preliminari ottenuti prima della presentazione di questo progetto. Abbiamo evidenziato che, in diverse forme atipiche di FC, le mutazioni "classiche" del CFTR sono presenti ad una frequenza significativamente minore che nelle forme tipiche. Per contro, alcune variazioni di sequenza dal significato funzionale incerto, o solo lievemente patologico, sono invece state rinvenute in soggetti con forme atipiche di FC. Nel complesso abbiamo rinvenuto, oltre a 15 mutazioni non comprese nei pannelli standard seppur già descritte come causa di patologia (che generalmente non si manifesta però in forma grave), 1 mutazione mai descritta in precedenza e 4 variazioni introniche (di cui una mai descritta in precedenza). Abbiamo inoltre individuato un'elevata frequenza di tratti varianti del CFTR (di lieve significato patologico già noto) in maschi infertili per iperviscosità congenita del liquido seminale (Fertility & Sterility 82, in stampa Nov. 2004).
Disegno sperimentale (primo anno finanziato). Sono state individuate le seguenti popolazioni sperimentali (tutte già caratterizzate dal punto di vista biochimico, clinico, dell'analisi genetica preliminare, dell'analisi del tratto variante (TG)mTn): 1) soggetti con sintomi di FC ma con diagnosi incerta; 2) neonati con ipertripsinemia alla nascita e diagnosi incerta; 3) maschi infertili, azoospermici per agenesia dei deferenti; 4) maschi infertili per iperviscosità congenita del liquido seminale, resistente al trattamento farmacologico. Vengono inoltre studiate: 5) una popolazione di soggetti con diagnosi certa di FC; 6) soggetti della popolazione generale; 7) maschi normospermici (queste ultime 2 popolazioni in qualità di controlli negativi).
In tutti i soggetti, nei quali un'analisi genica preliminare a pannello ha evidenziato almeno un allele non mutato, viene condotta un'estesa ricerca mutazionale mediante sequenziamento completo di tutti gli esoni del CFTR e delle adiacenti zone introniche, nonché della zona 5'-flanking. L'attenzione si concentra, quali possibili candidati per la produzione di splicing anomalo e quindi di forme atipiche della malattia, soprattutto sulle variazioni di sequenza introniche e su quelle esoniche che non cambiano l'aminoacido. Per tutte le variazioni di questo tipo è valutata la frequenza nelle popolazioni sperimentali ed in quelle di controllo. Per le variazioni di sequenza, la cui frequenza nelle popolazioni sperimentali risulta significativamente maggiore che in quelle di controllo, vengono condotti studi di espressione per la valutazione di eventuali splicing anomali.
Risultati preliminari ottenuti dalla presentazione del progetto ad oggi (inclusi i primi 2 mesi di progetto settembre – ottobre 2004).
E' stata estesa la casistica già disponibile mediante selezione di ulteriori soggetti appartenenti alle popolazioni indicate; questa estensione continuerà nell'arco di tutto il primo anno di progetto.
Sono state evidenziate altre 4 mutazioni del CFTR (già descritte come causa di malattia, in alcuni casi di patologie non gravi), che si aggiungono alle 16 già descritte, per un totale di 20. Sono state inoltre evidenziate altre 18 variazioni introniche (di cui 6 mai precedentemente descritte) che si aggiungono alle 4 già selezionate, per un totale di 22. Per una di queste variazioni introniche, la cui frequenza è risultata significativamente maggiore nelle popolazioni sperimentali che in quelle di controllo, sono già stati acquisiti risultati preliminari relativi allo splicing del CFTR in cellule dell'epitelio nasale ottenute mediante "brushing".

Cristina Bombieri

***Pierfranco Pignatti, Carlo Castellani, Guido Modiano, Cristina Bombieri***
*(Sezione di Biologia e Genetica, Università di Verona; Centro Regionale Veneto Fibrosi Cistica, Verona; Dip. Biologia "E. Calef", Università di Roma-Tor Vergata)*

**Assessing the possibile utilization of the CFTR-M470V genotyping for CF risk determination**
(Determinazione del possibile utilizzo del polimorfismo cftr-m470v per la determinazione del rischio di FC)

Questo studio si proponeva di determinare se i geni CFTR con 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 F508del si trova sui geni CFTR che presentano la variante M del polimorfismo, i pazienti selezionati avevano almeno una mutazione diversa dalla F508del.
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 F508del 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 avrebbe un rischio di essere portatore di una mutazione FC di 1/11 (9.24%), circa 13 volte superiore rispetto ad un individuo omozigote per la variante V, il quale avrebbe un rischio di 1/143 (0.70%).
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.

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

**Screening of CFTR gene rearrangements in italian CF patients**
(Screening delle mutazioni di riarrangiamento genomico CFTR in pazienti CF italiani)

L'analisi molecolare del gene CFTR, e la ricerca di mutazioni responsabili di Fibrosi Cistica (CF) può essere utile per: a) confermare la diagnosi in alcune forme clinicamente dubbie; b) identificare i portatori sani della malattia, nelle famiglie dove siano

presenti pazienti CF; c) prevedere (per alcuni organi) l'espressione clinica della malattia; d) sviluppare (almeno per alcuni tipi di mutazione) terapie specifiche in grado di correggere l'alterazione molecolare.

Fino ad oggi sono state identificate oltre 1000 mutazioni nel gene CFTR responsabili di malattia, e quindi è abbastanza complesso studiare l'intero gene e ricercare tutte le possibili mutazioni; in molti casi vengono ricercate soltanto alcune decine di mutazioni più diffuse nell'ambito etnico-geografico cui appartiene il paziente.

Tuttavia, anche se si utilizzano tecniche in grado di analizzare tutta la parte codificante del gene CFTR, in un 10% circa di cromosomi di pazienti CF non vengono identificate mutazioni (Castaldo G. et al., Ann Hum Genet, 2004, in press). In questi casi, non conoscendo le mutazioni responsabili della malattia nel paziente, diventa difficile estendere lo studio alla famiglia per identificare i portatori ed effettuare eventuali diagnosi prenatali della malattia.

In questi cromosomi da pazienti CF in cui lo studio della regione codificante del gene CFTR risulta negativa all'analisi molecolare, è possible ipotizzare che le mutazioni responsabili della malattia: a) siano localizzate nelle regioni non codificanti del gene (introni, regioni regolatrici); b) siano localizzate in altri geni, responsabili, ad esempio, della glicosilazione della proteina CFTR; c) siano mutazioni estese, ossia grossi riarrangiamenti del gene, che, se presenti in eterozigosi non vengono identificate dalla tecniche di analisi correntemente utilizzate.
A conferma di questa ipotesi, vi sono diversi casi di CF dovuti a grosse delezioni del gene CFTR in omozigosi, osservate dai gruppi che propongono questa ricerca; inoltre, alcuni studi recenti sviluppati da gruppi di ricerca francesi, hanno mostrato un'elevata incidenza di grossi riarrangiamenti del gene CFTR nei cromosomi di pazienti CF negativi all'analisi molecolare di primo livello (Audrezet MP, et al, Hum Mutat 2004;23;343).

Da queste considerazioni nasce il presente progetto di ricerca che si propone: a) di sviluppare metodi di analisi nuovi (DHPLC, Taqman, etc,) da impiegare su vasta scala, per la ricerca di grossi riarrangiamenti del gene CFTR, utili a facilitare la diagnosi molecolare della malattia; b) analizzare una ampia serie di pazienti CF con una o entrambe le mutazioni non note, per definire l'incidenza ed il tipo di riarrangiamento genico. I gruppi che prenderanno parte al progetto hanno un'ampia esperienza nel campo della diagnostica molecolare di CF ed altre malattie genetiche ereditarie, e dispongono di una banca di campioni biologici, che comprende il DNA di oltre un centinaio di pazienti CF portatori di una o entrambe le mutazioni del gene CFTR non note.

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

**Cystic Fibrosis: characterization of the unknown mutations in italian CF patients and assessment of their pathogenic role**

Maria Cristina Rosatelli

(Caratterizzazione molecolare dei difetti del gene CFTR in pazienti con mutazioni rare o sconosciute e definizione del loro ruolo patogenetico)

Il progetto si prefigge di chiarire le basi molecolari della fibrosi cistica in pazienti con fenotipo classico, nei quali gli studi mutazionali (ricerca di 30-32 mutazioni più comuni) non hanno definito i difetti responsabili della malattia. Si tratta di uno studio collaborativo organizzato da quattro centri italiano che raccoglieranno i dati clinici e biologici di 100 pazienti con fenotipo classico. Lo studio è articolato nei seguenti punti:
A) Reclutamento pazienti (100 pazienti) affetti da Fibrosi cistica classica con genotipo non determinato già analizzati con metodi molecolari OLA, RDB e/o DHPLC. Sono stati raccolti 100 pazienti nei quali è in corso l'analisi DHPLC e/o sequenziamento del DNA. I pazienti che risulteranno negativi a questo primo livello diagnostico verranno avviati al secondo punto:
B) Ricerca di riarrangiamenti del gene CFTR, attraverso Southern blotting e analisi qualitativa dell'mRNA ottenuto da brushing nasale. Lo studio è già stato avviato in 10 pazienti di origine sarda. I partner stanno reclutando i loro pazienti che hanno terminato lo screening con DHPLC con esito negativo per l'estrazione dell'RNA e l'invio a Cagliari
C) Analisi quantitativa dell'mRNA per studi di espressione del gene CFTR per la ricerca di difetti che non alterano l'mRNA ma riducono l'efficienza della trascrizione riducendo di conseguenza la quantità di mRNA prodotto
D) Selezione di pazienti da avviare a studi funzionali. I pazienti in cui saranno trovate nuove mutazioni verranno studiati con approcci funzionali per definire il ruolo patogenetico delle stesse.

Antonio Lupo

***Giovanni Gambaro, Antonio Lupo, Antonio Fabris, Pierfranco Pignatti***

**Do hyperoxaluric-hypocitraruric calcium renal stone formers represent a new cystic-fibrosis related disorder?**

(E' possibile che le persone con iperossaluria e ipocitraturia che formano calcoli renali calcici siano affette da un disordine correlato alla fibrosi cistica ?)

La fibrosi cistica (CF), una delle più frequenti malattie ereditarie nelle popolazioni occidentali, è dovuta a mutazioni del gene CFTR. Fino ad oggi sono state descritte circa 1000 diverse mutazioni di questo gene; con l'eccezione di poche di esse in specifiche popolazioni, la gran parte è scarsamente rappresentata nei pazienti con CF (meno dello 1%). Come conseguenza di ciò, l'uso diagnostico dell'analisi genetica del DNA per identificare i pazienti e i portatori è dispendiosa in termini di tempo e di costi. Data questa situazione, per semplificare e migliorare la diagnosi genetica molecolare della CF e per il consiglio genetico sarebbe estremamente utile la possibilità di 1) associare una speci-

fica mutazione del CFTR con quadri clinici specifici, e 2) riconoscere pazienti con forme subcliniche o lievi di CF (cosiddette CF-patie). Ciò ha consentito di riconoscere patologie diverse dalla CF, anch'esse però dovute a mutazioni del gene CFTR: ad es., l'assenza congenita dei vasi deferenti responsabile di sterilità maschile, etc.
I pazienti con CF hanno un rischio di calcolosi calcica urinaria aumentato. Alcuni dei fattori di rischio urinario per la calcolosi nei pazienti con CF sono simili a quelli osservati nei pazienti calcolatici calcici non affetti da CF (cosiddetti calcolatici idiopatici, pazienti ICN). In particolare, entrambi i gruppi molto spesso presentano iperossaluria e ipocitraturia.
La nostra ipotesi è che i pazienti ICN con iperossaluria e ipocitraturia possano presentare una forma lieve di CF. Indagheremo a tale scopo oltre 200 soggetti ICN ricercando manifestazioni cliniche suggestive di CF; inoltre in quelli che presentino contemporaneamente iperossaluria ed ipocitraturia e in un gruppo di controllo confrontabile per età e sesso senza iperossaluria e ipocitraturia cercheremo le mutazioni del gene CFTR.
Se la nostra ipotesi venisse 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.

Moderatore: ***Giovanni Bertoni***

***Giovanni Bertoni***
*(Dip.to Scienze biomolecolari e biotecnologie, Università di Milano)*
*Introduzione:* **Il futuro della ricerca microbiologica nella prospettiva terapeutica in fibrosi cistica**

*La patogenesi batterica è un processo complesso che richiede l'espressione coordinata da parte del batterio di un'ampia batteria di fattori di virulenza. Tuttavia, quasi mai lo stato patologico dell'ospite che deriva dall'infezione batterica è da attribuirsi unicamente all'azione diretta e deleteria dei fattori di virulenza. Al contrario, la patogenesi batterica è spesso il risultato di un'intricata rete di interazioni tra ospite e batterio e, come conseguenza, all'insorgenza della stato patologico contribuisce anche l'organismo infettato. E' questa consapevolezza che sta guidando e dovrà guidare la prospettiva terapeutica della ricerca microbiologica sui batteri patogeni in generale, e in particolare su quelli maggiormente correlati alla fibrosi cistica come Pseudomonas aeruginosa e Burkholderia cepacia. Questo significa che la nostra attenzione dovrà certamente continuare ad essere rivolta ai batteri per se al fine di: i) sviluppare metodi sempre più potenti per la loro tipizzazione, ii) studiare la possibile interazione tra specie diverse, iii) caratterizzare i fattori di virulenza e la loro complessa regolazione, iv) descrivere in dettaglio i meccanismi che portano alla resistenza agli antibiotici, v) identificare nuovi bersagli per nuovi antibiotici convenzionali e infine vi) sviluppare nuove generazioni di antibiotici non convenzionali che possano eludere gli attuali meccanismi di resistenza. Tuttavia, sarà anche lo studio della complessa rete di interazioni ospite/batterio, la caratterizzazione della risposta difensiva dell'ospite e la definizione del suo contributo al processo di patogenesi che suggeriranno nuove strategie per combattere i batteri patogeni. Nella fattispecie, è urgente per esempio la definizione della normale risposta difensiva di cellule sane alla presenza di P. aeruginosa, e se questa sia compromessa in cellule fibrocistiche. Nel suo insieme, si tratterebbe di dare una base molecolare alla spiccata suscettibilità all'infezione da P. aeruginosa propria dei pazienti fibrocistici e di comprendere come un individuo sano è invece in grado di difendersi in modo efficace.*
*Indipendentemente dal tipo di approccio, la disponibilità di intere sequenze genomiche, sia di patogeni che dei loro ospiti, ha certamente potenziato e ampliato la nostra possibilità di indagine. Infatti, l'era genomica ha da un lato facilitato enormemente gli studi genetico-molecolari più tradizionali sui batteri patogeni, e dall'altro ha stimolato nuovi sistemi sperimentali volti all'individuazione di funzioni batteriche essenziali per la patogenesi, che costituiscono da sempre i bersagli ideali per lo sviluppo di nuovi antibiotici. Inoltre, la conoscenza delle sequenze genomiche ha fornito solide piattaforme per lo sviluppo di tecnologie che permettono di monitorare simultaneamente l'espressione di un gran numero di geni, virtualmente tutti, di un organismo. L'applicazione di queste tecnologie allo studio della patogenesi batterica, tra cui anche quella correlata alla fibrosi cistica, sta permettendo di chiarire nel loro complesso non solo le strategie di virulenza dei batteri ma anche di caratterizzare il "dialogo" tra patogeno ed ospite durante il processo di infezione che, come abbiamo già sottolineato, suggerirà nuove strategie terapeutiche. In questa direzione va anche lo sviluppo di nuovi sistemi modello che facilitano lo studio dell'interazione ospite/patogeno con possibilità di riportare i risultati all'uomo. Un sistema emergente che presenta numerosi vantaggi è quello costituito dal nematode Caenorhabditis elegans. Infatti, rispetto a sistemi tradizionali in mammifero, risulta di più facile utilizzo per gli studi*

*sui batteri patogeni, sia per quanto riguarda gli approcci genetico-molecolari pre-era genomica che per l'applicazione delle nuove tecnologie che si basano sul sequenziamento dei genomi. Inoltre, data l'ampia caratterizzazione da un punto di vista genomico, C. elegans permette anche un approccio sperimentale più semplice allo studio dell'interazione ospite/patogeno e della risposta difensiva dell'ospite stesso.*

Alessandra Bragonzi

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

**Gene regulation and adaptative mutations of Pseudomonas aeruginosa in a chronic lung infection model for cystic fibrosis.** (Regolazione genica e mutazioni adattative di Pseudomonas aeruginosa in un modello animale murino ed in pazienti con Fibrosi Cistica).

Nelle vie aeree di pazienti con fibrosi cistica (FC), Pseudomonas aeruginosa incontra condizioni di stress quali, la crescita in anaerobiosi, la pressione del sistema immunitario ed i trattamenti antibiotici. In queste condizioni, P. aeruginosa si adatta e cambia il suo fenotipo in mucoide, producendo copiose quantità di un polisaccaride extracellulare chiamato alginato. Questo fenotipo è evidenziabile in colture microbiologiche (in vitro) di pazienti con infezione cronica ed è stato associato a mutazioni nel gene mucA. Ad oggi, non esistono sufficienti dettagli microbiologici che permettano di definire quale sia la cinetica di questo processo adattativo in vivo e quali meccanismi genetici consentono la persistenza di P. aeruginosa.
Per questo obbiettivo, abbiamo messo a punto un modello animale murino per la FC dove un ceppo da laboratorio non-mucoide di P. aeruginosa (PAO1) è stato incluso in sfere di agar e veicolato nel polmone tramite iniezione intratracheale.
Abbiamo dimostrato che le sfere di agar si caratterizzano per una parziale assenza di ossigeno riflettendo le condizioni esistenti nel muco FC. Nel polmone murino, P. aeruginosa sottoposta a stress anaerobico cresce formando macro-colonie ed attiva la regolazione genica inducendo espressione di alginato entro 24 ore dall'infezione. I geni coinvolti nell'espressione di alginato in condizioni anaerobiche sono: algU/algR/algD e mucABCD, come dimostrato da analisi dell'espressione genica attraverso microarray. In vivo, il processo di adattamento e' rapido ma il fenotipo viene perso quando P. aeruginosa e' riscresciuta in vitro. Il cambiamento fenotipico è un fenomeno di adattamento generale e non esclusivo del ceppo di laboratorio PAO1. 25 ceppi ambientali di P. aeruginosa, negativi per alginato in condizioni aerobiche, cambiavano il loro fenotipo in positivo quando cresciuti in condizioni anaerobiche.
Dal punto di vista clinico questi risultati implicano che batteri positivi per alginato di P. aeruginosa potrebbero essere presenti nell'epitelio respiratorio di pazienti dopo pochi giorni dalla colonizzazione ma non identificabili in colture microbiologiche. Infatti, P. aeruginosa, positiva per alginato, era presente in 17 sputi di pazienti FC, le cui culture microbiologiche evidenziavano solo P. aeruginosa non mucoide.
Questi risultati dimostrano che la regolazione genica di alginato ha un ruolo fondamentale nel determinare la sopravvivenza e virulenza di P. aeruginosa anche in assenza di un fenotipo mucoide stabile.

Al fine di determinare il ruolo di mutazioni nel gene mucA 37 ceppi di P. aeruginosa sono stati isolati da pazienti FC dopo colonizzazione cronica. Dopo 4-18 anni di persistenza nelle vie aeree, mutazioni in mucA erano presenti solo nella metà dei ceppi suggerendo che la presenza di una mutazione in questo gene non è determinante nella persistenza e virulenza di P. aeruginosa nelle vie aeree FC.

Vittorio Venturi

***Vittorio Venturi***
*(Internat. Centre Genetic Engineering &Biotechnology, Padriciano Trieste)*

**The quorum sensing regulon of the emerging fibrocystic bacterial pathogen Burkholderia cepacia**
(Il sistema di regolazione "Quorum sensing" nel patogeno emergente Burkholderia cepacia)

Il lavoro di ricerca del nostro gruppo si focalizza sul sistema di quorum sensing di diversi microorganismi fra cui Burkholderia cepacia. Burkholderia cepacia è un batterio ambientale capace di colonizzare sia tessuti vegetali che animali, e la sua importanza come patogeno opportunista nelle infezioni nosocomiali, in particolare per i pazienti affetti da fibrosi cistica o altre patologie respiratorie, sta crescendo rapidamente sia per numero di casi sia per varieta' delle specie: da campioni clinici sono stati individuati molti membri del Burkholderia cepacia complex e anche di altre specie come B. glumae. Nei pazienti affetti da fibrosi cistica le infezioni polmonari possono portare ad un drastico peggioramento delle loro condizioni; la normale terapia antibiotica è per Burkholderia cepacia fortemente limitata per via della sua innata ed acquisita resistenza agli antibiotici e dalla produzione di biofilm.
Negli ultimi cinque anni e' apparso sempre piu' evidente che in questi microorganismi esiste un sistema di regolazione genica che coinvolge la comunicazione fra batteri mediante la produzione di molecole segnale chiamate autoinduttori e di proteine regolatrici che interagiscono con essi.
Questa comunicazione permette ai batteri di coordinare l'espressione di molti fattori, compresi quelli di virulenza e la produzione e crescita in forma di biofilm, rendendoli piu' aggressivi, dannosi e difficili da estirpare in caso di infezione.
Il sistema di regolazione necessario per ottenere questa coordinazione si chiama Quorum Sensing. Il progetto di ricerca condotto nel nostro laboratorio studia questo sistema di comunicazione fra batteri e i fattori che lo regolano e che lui regola. Nell'anno di attivita' di ricerca finanziato dalla Fondazione per la Fibrosi Cistica abbiamo individuato 28 geni regolati attivamente dal quorum sensing in B. cepacia ed abbiamo studiato le relazioni che intercorrono fra il sistema di quorum sensing ad altri importanti regolatori globali in Pseudomonas. (I risultati ottenuti fin'ora sono stati pubblicati e sono a disposizione della comunta' scientifica). Comprendere bene questi meccanismi e le relazioni che intercorrono fra essi e' molto importante perche' il coinvolgimento del quorum sensing nella virulenza di organismi patogeni per i pazienti affetti da CF come Pseudomonas aeruginosa e Burkholderia cepacia e' stato gia' dimostrato cosi' come e' stato dimostrato che in altre specie batteriche, patogene per le piante, quali per esempio Erwinia carotovora, l'inattivazione del sistema del Quorum Sensing riduce notevolmente la patogenicità del batterio in vivo.

Annamaria Bevivino

***Annamaria Bevivino, Fiorentina Ascenzioni, Alessandra Bragonzi***
*(ENEA Casaccia, UTS Biotecnologie, Protezione della Salute e degli Ecosistemi, Roma; Dip. Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Università La Sapienza, Roma; Institute for Experimental Treatment of Cystic Fibrosis, H. S. Raffaele, Milano)*

**Evaluation of the pathogenicity of environmental and clinical isolates of Burkholderia cepacia complex alone and in the presence of Pseudomonas aeruginosa**
(Valutazione della patogenicità di ceppi ambientali e clinici di Burkholderia cepacia complex in presenza ed in assenza di Pseudomonas aeruginosa)

Fin dai primi anni ottanta, i batteri appartenenti al Burkholderia cepacia complex (Bcc) si sono rivelati tra i più importanti patogeni opportunisti nei pazienti affetti da fibrosi cistica (FC). L'infezione da Bcc di solito si verifica nei pazienti già colonizzati da Pseudomonas aeruginosa, il principale patogeno per i pazienti FC. Il Bcc rappresenta un notevole problema nei pazienti FC, a causa della potenziale gravità dell'infezione polmonare da essi provocata, della facilità di trasmissione paziente-paziente e dell'alta resistenza ad una vasta gamma di agenti antimicrobici. Il Bcc comprende attualmente nove specie strettamente correlate tra loro. In particolare, la specie B. cenocepacia riveste una notevole importanza nell'infezione polmonare dei pazienti FC poiché comprende ceppi epidemici e particolarmente virulenti.
Questa specie risulta, inoltre, molto eterogenea poiché al suo interno sono state identificate, attraverso analisi molecolari basate sul polimorfismo del gene recA, 4 linee filogenetiche, denominate IIIA, IIIB, IIIC e IIID, che sembrano avere una diversa diffusione in ambiente clinico e naturale. L'ampia diffusione di B. cenocepacia in ambiente naturale solleva la preoccupazione che alcuni habitat naturali possano costituire una riserva di ceppi potenzialmente patogeni. Pertanto gli studi volti ad esaminare il potenziale patogeno e la virulenza di isolati ambientali e clinici di B. cenocepacia rivestono una notevole importanza. Studi recenti effettuati su un numero limitato di ceppi clinici hanno dimostrato che B. cenocepacia è in grado di sopravvivere e replicarsi sia nelle singole cellule epiteliali che nei macrofagi, come anche di stabilire un'infezione cronica persistente in tessuti murini. Per quanto riguarda i ceppi di origine ambientale, finora soltanto un limitato numero di ceppi appartenenti ad alcune specie del Bcc è stato analizzato per la capacità invasiva. Inoltre, sono disponibili pochissimi dati in letteratura riguardanti la patogenicità di ceppi del Bcc di diversa origine in presenza di P. aeruginosa.
Lo scopo principale di questo progetto è quello di esplorare la patogenicità di ceppi ambientali e clinici appartenenti alle diverse linee filogenetiche del B. cenocepacia analizzando la loro capacità di invasione delle cellule epiteliali, come pure per la loro capacità di colonizzare i tessuti polmonari murini. In particolare, verranno studiate: (i) le differenze nella capacità di invasione e di infezione di ceppi ambientali e clinici appartenenti alle diverse linee filogenetiche del B. cenocepacia; (ii) l'influenza di P. aeruginosa, il principale patogeno per i pazienti FC, sulle capacità di invasione ed infezione dei ceppi presi in esame. Durante questi primi mesi di attività è stato allestito un pannello di 12 ceppi ambientali e clinici di B. cenocepacia, scelti da un'ampia col-

lezione di ceppi disponibile presso il laboratorio di Microbiologia del Centro ENEA di Roma. I ceppi selezionati, appartenenti alle diverse linee filogenetiche del B. cenocepacia, sono stati in parte tipizzati mediante la tecnica PFGE e i risultati finora ottenuti dimostrano che non sono correlati geneticamente. I ceppi verranno analizzati per alcuni tratti correlati alla virulenza e patogenicità, quali la produzione di biofilm, la resistenza agli antibiotici, la presenza di sequenze di inserzione, del sistema di secrezione di tipo III e di marcatori genetici di virulenza, come il B. cepacia Epidemic Strain Marker. Il potenziale patogeno di questi ceppi sarà analizzato mediante saggi di infezione in vitro ed in vivo. I primi prevedono l'utilizzo di colture di cellule epiteliali FC e non FC; per il saggio in vivo verrà utilizzato il modello murino di infezione cronica polmonare.

Giovanna Riccardi

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

**Antimicrobial resistance in Burkholderia cepacia complex from cystic fibrosis patients: identification, characterization and role of efflux transporters in intrinsic and acquired drug resistance**

(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)

Burkholderia cepacia è un batterio che può essere isolato da vari ambienti quali suolo, acqua e vegetazione. Recentemente, ceppi appartenenti al B. cepacia complex sono emersi quali patogeni responsabili di gravi malattie in pazienti affetti da fibrosi cistica (FC). Spesso la cura di tali infezioni è complicata dall'insorgenza di una resistenza multipla ai più comuni antibiotici.
I meccanismi di resistenza nei batteri sono dovuti alla ridotta permeabilità del batterio al farmaco, all'iperproduzione del bersaglio, alla produzione di enzimi che inattivano o modificano l'antibiotico, all'alterazione del bersaglio e all'attivazione di pompe di efflusso, proteine in grado di espellere dalla cellula i farmaci, impedendone l'azione. In particolare, in ambiente clinico, sono stati individuati batteri multiresistenti che non presentano mutazioni nei geni codificanti i bersagli degli antibiotici. Responsabile di tali fenotipi di resistenza potrebbe essere l'iperespressione di geni codificanti pompe di efflusso.
L'obiettivo di questo progetto è l'identificazione e la caratterizzazione in B. cepacia di nuove pompe di efflusso mediante due differenti approcci: l'analisi bioinformatica del genoma e lo studio di geni responsabili di multiresistenze in isolati clinici. I trasportatori di membrana a cui appartengono le pompe di efflusso, in base al tipo di energia utilizzata, sono classificati in più famiglie: ABC (ATP Binding Protein), MFS (Major Facilitator Superfamily), RND (Resistance-Nodulation-Cell Division), MATE (Multidrug and Toxic Compound Extrusion) e SMR (Small Multidrug Resistance). Poiché in isolati clinici di altri microrganismi, quali Pseudomonas e Staphylococcus, è già stato dimostrato che proteine appartenenti alla famiglia RND sono responsabili della resistenza agli antibiotici, questo progetto si focalizza sullo studio di pompe di efflusso appartenenti a tale famiglia di trasportatori in B. cepacia.

I geni codificanti le proteine di trasporto della famiglia RND sono stati individuati in B. cepacia utilizzando metodi bioinformatici, che consentono la ricerca di sequenze omologhe, l'allineamento delle sequenze amminoacidiche dedotte e la ricerca di domini transmembrana. Il prossimo obiettivo sarà quello di clonare tali geni in opportuni vettori e di analizzarne la capacità di conferire resistenza agli antibiotici più comunemente utilizzati in terapia.
Il secondo approccio consentirà lo studio di pompe di efflusso coinvolte nella resistenza ai farmaci in isolati clinici con fenotipo multiresistente. Tali ceppi multiresistenti, isolati all'Ospedale Gaslini di Genova, sono in fase di caratterizzazione. In prima analisi, saranno ricercate mutazioni in geni codificanti i bersagli noti degli antibiotici usati in terapia, che potrebbero essere responsabili della multiresistenza. Solo i ceppi multiresistenti senza mutazioni nei geni codificanti i bersagli saranno oggetto di ulteriori studi. In particolare, la costruzione di una banca genomica, la trasformazione in opportuni ospiti batterici e la successiva selezione contro diversi antibiotici consentirà di individuare il gene responsabile della resistenza.

Giovanni Bertoni

***Giovanni Bertoni***
*(Dipartimento Scienze Biomolecolari &Biotecnologie, Università di Milano)*

**Genome-wide identification of target genes for the design of non-conventional antibiotics against cystic fibrosis-related pathogens.**
(Identificazione su tutto il genoma di un target di geni per disegnare antibiotici non convenzionali contro i patogeni correlati alla fibrosi cistica)

Le nostre armi migliori contro le infezioni batteriche sono le diverse classi di antibiotici finora sviluppate. Tuttavia, con sempre maggiore frequenza, i trattamenti antibiotici si rilevano inefficaci a combattere i batteri patogeni. Questa debolezza della terapie antibiotiche convenzionali deriva principalmente dalla libera circolazione tra le popolazioni batteriche di fattori di resistenza, anche multipla, agli antibiotici. Se a metà degli anni '80 si pensava di poter contrastare facilmente le infezioni batteriche con le terapie antibiotiche, oggi ci troviamo di fronte a molti esempi di batteri che sono resistenti ad ogni antibiotico clinicamente disponibile. Perciò c'è urgenza di sviluppare nuove classi di antibiotici che eludano gli attuali sistemi di resistenza batterica. Differenti approcci possono essere usati in questo senso. Ad esempio, la modificazione chimica degli antibiotici attualmente disponibili o lo sviluppo di antibiotici non-convezionali di nuova concezione. Quest'ultimo approccio potrebbe essere ulteriormente promosso dall'identificazione di nuovi bersagli batterici per gli antibiotici. La recente era genomica ha fortemente stimolato la ricerca e l'identificazione di bersagli per gli antibiotici in vari patogeni come Salmonella typhimurium, Vibrio cholerae e Staphylococcus aureus. In questo ambito, una nuova tecnologia molto potente per l'identificazione di bersagli batterici è quella che si basa sull'RNA antisenso. Oltre a permettere l'identificazione di molti bersagli, questa tecnologia permette di ottenere in modo immediato informazioni per lo sviluppo di nuove molecole antibiotiche che possono eludere gli attuali meccanismi di resistenza. Infatti, una volta individuato il bersaglio attraverso la tecnologia dell'RNA antisenso, la sequenza stes-

sa dell'RNA che è servito per l'individuazione del bersaglio permette la sintesi di oligomeri, detti PNA, che possono essere attivi contro il bersaglio stesso. Lo scopo di questo progetto è di adottare questa tecnologia dell'RNA antisenso per individuare un pannello di nuovi bersagli e per sviluppare PNA specifici e attivi contro due patogeni opportunisti correlati alla fibrosi cistica, Pseudomonas aeruginosa e Burkholderia cepacia.

Renato Fani

***Renato Fani1, Graziana Manno3, Giovanni Taccetti4, Silvia Tabacchioni2***
*(1Dipartimento di Biologia Animale e Genetica, Università di Firenze; 2ENEA Casaccia, Biotec-gen; 3Lab. di Ricerca Diagnostica Infettivologica, Istituto G. Gaslini, Genova; 4 Divisione di Pediatria, Malattie infettive, Fibrosi Cistica, Ospedale Pediatrico Anna Meyer, Firenze)*

**Development of a rapid diagnostic test to discriminate B. cepacia complex species and genomovars in routine clinical analysis involving CF patients.**
(Sviluppo di un test diagnostico per la discriminazione di specie e genomovars di Burkholderia cepacia complex nella routine clinica)

Il Burkholderia cepacia complex ,categoria tassonomica comprendente patogeni opportunisti responsabili della grave condizione clinica conosciuta come "cepacia syndrome" , che affligge tanto pazienti CF che immunodepressi in genere,risulta spesso di difficile trattamento terapeutico a causa dell'elevata trasmissibilità e della resistenza di alcuni ceppi a numerosi antibiotici.
L'identificazione di questi batteri risulta lunga e difficoltosa a causa della complessità tassonomica del comlex, che comprende nove diverse specie genomiche o genomovar (gvr), e dei metodi analitici attualmente in uso(RFLP o PCR-specie specifiche del gene recA) non sempre di facile lettura o esenti da errori.
Lo scopo del progetto è pertanto quello di mettere a punto un nuovo sistema, basato sull'analisi SNP (Single Nucleotide Polymorphism), che permetta di discriminare le diverse specie del complex, e sia di facile applicazione alla routine clinica.
Durante il primo anno di attività è stato definito un pannello di oltre 100 ceppi batterici (clinici e/o ambientali), rappresentativo di tutto il Bcc, comprendente 50 ceppi di cui era già nota la sequenza di recA, che era stata già recuperata dalle banche dati. Successivamente è stata determinata la sequenza nucleotidica del gene recA da oltre 60 ceppi Bcc in modo da avere a disposizione un numero di sequenze recA sufficiente (>100) per poter passare alla loro analisi comparativa. Questa ha permesso di identificare, all'interno delle regioni variabili del gene, i siti polimorfici (in conseguenza di "mutazioni puntiformi") che caratterizzano in modo univoco una specie o un genomovar dall'altro. E' stato così possibile disegnare un set di cinque primer il cui utilizzo permette di discriminare inequivocabilmente i batteri BCC dei gvr IIIa, IIIb, IIIc, IIId e V. I dati sperimentali finora ottenuti sui batteri appartenenti al gvr III e V sono in perfetto accordo con quelli attesi, confermando quindi le potenzialità del sistema sperimentale che, in seguito, sarà saggiato su altri batteri del Bcc, appartenenti agli stessi e ad altri genomovar.
Contemporaneamente è stato anche avviato lo studio di un secondo marcatore mole-

colare da affiancare al gene recA: gyrB, gene comunemente analizzato per l'identificazione di ceppi appartenenti a diverse specie batteriche.Lo studio di questo marcatore non è stato finora portato avanti sui batteri appartenenti al BCC, sono quindi risultate disponibili in banca dati solo tre sequenze nucleotidiche appartenenti a batteri del complex. E' stato quindi necessario mettere a punto un sistema di amplificazione via PCR del gene gyrB da batteri del Bcc; da 50 ceppi è stato amplificato un frammento di circa 2100 bp, di cui è stata successivamente determinata la sequenza nucleotidica. L'analisi comparativa di queste sequenze è in fase avanzata e permetterà di identificare dei siti polimorfici da utilizzare nella tecnica SnuPE e/o RFLP.

Moderatore: ***Giorgio Berton***

***Giorgio Berton***
*(Dipartimento di Patologia, Università di Verona)*
*Introduzione:*
**Aspetti emergenti della ricerca sull'infiammazione in fibrosi cistica**

Paola Melotti

***Pasetto M1, 2, Nicolis E1, Cigana C1, Negrini M3, Ferracin M3, Casotti V1, Pradal U1, Assael B1, Melotti P1, 2.***
*(1 Centro Fibrosi Cistica - Az. Osp. Verona; 2 Fondazione per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica; 3 Centro Interdipartimentale per la Ricerca sul Cancro - Università di Ferrara).*
**Non-antibiotic mechanisms of Azithromycin: implications for therapy of cystic fibrosis**
(Meccanismi non antibiotici dell'azitromicina: rilevanza per la terapia della fibrosi cistica).

Vari studi clinici stanno accumulando evidenze sugli effetti favorevoli dell'azitromicina in pazienti affetti da fibrosi cistica. E' stato considerato che i benefici ottenuti non possano in generale essere attribuiti all'attività battericida dell'azitromicina, in considerazione del suo spettro d'azione e delle sue concentrazioni tessutali descritte. Lo svolgimento di questo progetto, focalizzato sui possibili ruoli non battericidi dell'azitromicina rilevanti per la terapia della fibrosi cistica, sta mettendo a fuoco qualche possibile meccanismo d'azione di questo farmaco. In cellule di epitelio respiratorio con le caratteristiche della fibrosi cistica, si è evidenziata infatti la sua capacità di inibire la produzione di interleuchina 8, un' importante molecola protagonista dell'infiammazione. Un altro antibiotico, molto simile all'azitromicina ma privo di effetti anti-infiammatori, denominato iosamicina, nelle stesse condizioni sperimentali non ha mostrato lo stesso effetto. Questa proprietà dell'azitromicina potrebbe essere quindi un meccanismo con cui essa può avere benefici effetti anti-infiammatori nei pazienti affetti da fibrosi cistica. La capacità di inibire la produzione di interleuchina 8 viene considerata una prova molto importante da parte di vari studiosi nella selezione di molecole potenzialmente utili per la terapia della fibrosi cistica. Si sta cercando di capire come avviene questa regolazione studiando l'attività di molecole che sono in grado di far produrre l'interleuchina 8 ed altri fattori favorenti l'infiammazione: in particolare l'attività di alcuni di essi (Nuclear Factor-kB, Sp1, AP1) sta risultando essere ridotta dall'azitromicina. Come conseguenza di tale effetto si considera la possibilità di avere una diminuita produzione di diversi agenti pro-infiammatori in presenza di questo farmaco. Sta proseguendo anche l'analisi su larga scala di geni la cui espressione può essere regolata dall' azitromicina, sempre alla ricerca di bersagli di questo antibiotico all'interno delle cellule. Inoltre in questo progetto vengono indagati possibili effetti dell'azitromicina direttamente in soggetti affetti da fibrosi cistica. Si è considerata l'ipotesi che l'azitromicina possa influenzare il trasporto del cloro, che è difettoso nella fibrosi cistica. Per valutare questo parametro è stato eseguito il test del sudore in venti pazienti: i livelli di cloro sono risultati simili nelle rilevazioni effettuate prima e durante la terapia. Tale dato non esclude la possibilità che in altri tessuti, funzionalmente rilevanti come quello polmonare, lo stesso antibiotico possa influire sul trasporto del cloro; si deve però conside-

rare a questo punto che il test del sudore non può evidenziare eventuali effetti dell'azitromicina, come è invece avvenuto con la misurazione dei potenziali nasali in studi preliminari che sono ora in corso di approfondimento. E' stata rilevata un'importante variabilità di risposta al farmaco tra i pazienti. Si sta quindi cercando la possibilità di poter identificare, eventualmente su basi genetiche, quali pazienti potrebbero più probabilmente trarre beneficio dall'uso dell'azitromicina. A questo scopo prosegue l'analisi del DNA di un gruppo di pazienti in una regione che ha caratteristiche peculiari nei diversi soggetti e che potrebbe essere coinvolta nella risposta all'azitromicina.

Olga Zegarra

***Olga Zegarra-Moran, Giovanni Candiano, Luca Bini***
*(Laboratorio di Genetica Molecolare, Istituto G. Gaslini, Genova; Laboratorio di Nefrologia, Istituto G. Gaslini, Genova; Dipartimento di Biologia Molecolare, Univ. Degli Studi di Siena)*

**Proteomics of the airways surface liquid: implications for cystic fibrosis** (Proteomica del liquido di superficie delle vie aeree: implicazioni per la fibrosi cistica)

La fibrosi cistica (FC) è una malattia genetica nella quale la mutazione di un gene che codifica per un canale permeabile al cloruro, porta ad un'alterazione nell'assorbimento e secrezione di fluido nell'epithelio delle vie aeree e secondariamente a colonizzazione batterica e ad un massiccio processo infiammatorio. Il meccanismo che porta alla colonizzazione batterica nella FC è ignoto, ma è possibile che il difetto primario provochi la perdita o la modificazione di un fattore importante nel sistema di difesa delle vie aeree. Questo progetto ha lo scopo di identificare le proteine secrete dall'epitelio delle vie aeree e di valutare se diversi stimoli proinfiammatori siano capaci di modificare la concentrazione di alcune di queste proteine. In questo primo anno di progetto noi abbiamo usato la proteomica come método per identificare le proteine che l'epitelio delle vie aeree secerne in condizioni normali e nei processi infiammatori. Per fare ciò abbiamo recuperato ed analizzato il fluido che bagna la superficie delle vie aeree di un modello sperimentale di cellule bronchiali, in presenza e in assenza di stimoli infiammatori simili a quelli presenti nei bronchi dei pazienti FC. Mediante spettrometria di massa sono state identificate molte proteine, alcune delle quali con funzione e ruolo nell'epitelio delle vie aeree già note; altre con funzione nota in altri distretti, ma la cui presenza sull'epitelio era ignota. Altre proteine invece sono funzionalmente sconosciute. Sono state inoltre identificate delle proteine la cui produzione è modificata da diversi stimoli proinfiammatori. Il coinvolgimento di alcune proteine identificate nei fenomeni infiammatori è stato confermato con mètodi molecolari e biochimici. Di particolare interesse la presenza regolata da alcuni stimoli infiammatori di gelsolina, una proteina che rompe i filamenti di actina e quindi serve a diminuire la viscosità del muco. Abbiamo anche iniziato lo studio del fluido di epiteli FC. In questo caso è importante analizzare epiteli di molti individui per stabilire se eventuali differenze con epiteli non-FC siano dovuti alla malattia stessa oppure se si tratti di semplici variazioni individuali. Questi esperimenti sono in fase di analisi. Per il secondo anno di progetto stiamo iniziando lo studio delle proteine secrete da cellule ghiandolari Calu-3 e metteremo su un protocollo per ricuperare secrezione di ghiandole ex vivo. Continueremo anche lo studio delle proteine secrete da epiteli FC.

Maria Cristina Dechecchi

***Maria Cristina Dechecchi , Elena Nicolis, Anna Tamanini, Federica Quiri, Barouk M. Assael e Giulio Cabrini***

*(Laboratorio Patologia Molecolare, Centro Fibrosi Cistica di Verona)*

**Interaction in vitro between cystic fibrosis pathogens and epithelial cells expressing the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)**

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

Il meccanismo molecolare attraverso cui la proteina CFTR mutata è responsabile dei danni respiratori nei pazienti affetti da FC non è ancora chiarito. Una clearance batterica inefficace sembra essere la diretta conseguenza del difetto di base e causa una persistente colonizzazione batterica, in modo particolare da Pseudomonas aeruginosa (PA). Il declino della funzione polmonare è il risultato di un circolo vizioso di infezione e infiammazione che si instaura nelle vie aeree dei pazienti FC. Nonostante l'argomento sia ancora dibattuto, sono sempre più numerose le evidenze di una risposta infiammatoria esagerata, anche in assenza d'infezione, direttamente legata alla presenza di CFTR mutata. Alcuni studi hanno dimostrato che le cellule respiratorie FC presentano una aumentata attivazione del fattore di trascrizione NF-kB deputato alla trascrizione di molti geni coinvolti nei processi infiammatori. La più comune CFTR mutata, δF508, viene accumulata nel reticolo endoplasmico in seguito ad alterata maturazione e conformazione. L'accumulo di proteina mutata e un difetto funzionale della CFTR potrebbero essere entrambe cause di attivazione endogena di NF-kB, anche prima dell'infezione. Non in tutti i modelli in vitro ed in vivo è stata evidenziata una risposta infiammatoria aumentata in FC, probabilmente a causa della considerevole variabilità con cui le cellule epiteliali rispondono ai diversi stimoli a seconda delle condizioni sperimentali.

Questo progetto intende testare l'ipotesi di una infiammazione intrinseca in FC e di una risposta esagerata rispetto allo stimolo. L'obiettivo preliminare è stato quello di studiare se questo difetto era evidenziabile in cellule C127, una linea epiteliale mammaria di origine murina che esprime in modo stabile la CFTR w/t o δF508. Il marker infiammatorio considerato è il trascritto della molecola di adesione intercellulare (ICAM-1 mRNA) che nel nostro modello è risultato più elevato sia in condizioni basali che dopo stimolo con PA in C127 δF508. L'adesione batterica, misurata nelle stesse condizioni sperimentali, non è risultata significativamente diversa in cellule C127 δF508 rispetto alle cellule w/t. La relazione tra accumulo di CFTR mutata, mancanza funzionale di CFTR e risposta infiammatoria sarà oggetto dello studio proposto analizzando come trattamenti che modificano il traffico intracellulare della CFTR mutata possano modulare la risposta infiammatoria. I composti benzo(c)chinolonici (MPB), potenti correttori della CFTR, saranno utilizzati in cellule C127 insieme ad altri interventi quali l'uso di CPX o di glicerolo o la coltura delle cellule a basse temperature. I risultati ottenuti in cellule C127 saranno estesi a linee cellulari respiratorie umane, analizzando la modulazione di citochine chemiotattiche e pro-infiammatorie a livello di trascritto e proteina e verificando le principali vie di trasduzione del segnale implicate. Questo studio intende contribuire a chiarire i meccanismi che alterano la risposta infiammatoria in FC e fornire indicazioni per applicazioni terapeutiche.

Francesca Zazzeroni

***Francesca Zazzeroni***
*(Dip. Medicina Sperimentale, Università de L'Aquila)*

**Inflammation and apoptosis in cystic fibrosis airway epithelium: role of NF-kB and its target genes**
(Infiammazione ed apoptosi nell'epitelio delle vie aeree in fibrosi cistica: ruolo di NF-kB e dei suoi geni bersaglio)

L'infiammazione cronica delle vie respiratorie e le infezioni polmonari ricorrenti sono un tratto caratteristico della fibrosi cistica (FC). Nelle vie respiratorie normali, una valida risposta all'infezione da germi patogeni richiede l'attivazione di una efficace risposta infiammatoria, cui fa seguito la risoluzione e la restitutio ad integrum. Le cellule epiteliali sono capaci di internalizzare i patogeni e di eliminarli dalla superficie mucosa mediante la desquamazione, un processo basato sulla morte cellulare programmata (apoptosi) delle cellule epiteliali. E' stato recentemente dimostrato che le cellule epiteliali mutate per il gene cftr sono meno sensibili all'apoptosi indotta da infezione con P. aeruginosa rispetto alle cellule epiteliali normali, lasciando ipotizzare che una ridotta clearance dei germi invasori possa essere, almeno in parte, responsabile delle manifestazioni polmonari in corso di FC. Il primo obiettivo di questo progetto sarà quello di valutare il ruolo di NF-kB, un importante regolatore delle risposte infiammatoria ed apoptotica che è cronicamente attivo nelle cellule FC, e di alcuni geni anti-apoptotici regolati da questo fattore di trascrizione nella compromissione dell'apoptosi delle cellule epiteliali affette da FC.
Un altro importante aspetto della ricerca sulla FC è rappresentato dall'individuazione di nuovi markers diagnostici e di nuovi approcci terapeutici. Giacchè l'infiammazione gioca un ruolo fondamentale nelle manifestazioni polmonari della FC, terapie immunomodulatorie volte ad inibire NF-kB sono state da tempo proposte. Tuttavia, oltre a regolare le risposte flogistiche, NF-kB coordina anche la risposta immunitaria ed è coinvolto nel controllo della proliferazione cellulare, del differenziamento e dell'apoptosi. Terapie mirate verso specifici geni target di NF-kB possono disaccoppiare queste diverse e fondamentali funzioni. In linea di principio è quindi possibile identificare trattamenti capaci di modulare specifici set di geni attivati da NF-kB nelle cellule FC senza compromettere la funzione della barriera epiteliale o la risposta infiammatoria dell'ospite a tutti i patogeni respiratori. Tuttavia, molti geni regolati da NF-kB nella FC devono ancora essere identificati. Il secondo obiettivo di questo progetto è quello di eseguire uno screening su larga scala dei geni indotti da NF-kB nelle cellule epiteliali delle vie respiratorie che esprimono forme mutanti di CFTR, utilizzando sia DNA array dedicati che microarrays. L'identificazione di questi geni e la caratterizzazione del loro ruolo nella patogenesi della malattia potrà fornire nuovi strumenti utili a fini diagnostici e terapeutici.

***Valeria Raia, Luigi Maiuri, Salvatore Auricchio, Giovanni Castaldo , R. Tomaiuolo, G. Cardillo M. Londei , I. Ricciardelli***
*(Dipartimento di Pediatria Università Federico II Napoli; Unità CEINGE, Università Federico II Napoli; Institute of Child Health University College London)*

**Nasal polyps of Cystic Fibrosis patients as an ex vivo model to study inflammation and its modulation via the inhibition of the p-38 MAP-kinase**

Valeria Raia

**pathway: implications for therapy** (Polipi nasali di pazienti FC come modello ex vivo per studiare l'infiammazione e la sua modulazione attraverso l'inibizione del percorso di p-38MAP-chinasi: implicazioni per la terapia)

Una abnorme regolazione della risposta infiammatoria e' un evento cruciale nella patogenesi della Fibrosi Cistica (FC), sebbene sia ancora dibattuto se ci sia un difetto intrinseco della risposta infiammatoria o se questa sia determinata dall'infezione e colonizzazione batterica.
Sebbene la FC sia una malattia monogenica in cui e' concettualmente ipotizzabile l'uso di una terapia genica, questo approccio non ha dato fino ad ora i risultati sperati.
Pertanto, nuove strategie terapeutiche sono state implementate, e fra queste, le terapie antinfiammatorie hanno guadagnato un ruolo prominente in quanto farmaci antinfiammatori si sono rivelati efficaci in pazienti con FC.
L'uso di un modello ex vivo, la coltura d'organo di biopsie prelevate a scopo diagnostico e/o terapeutico, può rappresentare un modello idoneo.
Questo modello "ex-vivo" rappresenta la condizione sperimentale piu' vicina allo studio "in vivo" in quanto e' preservata l'integrita' morfostrutturale del tessuto. Il gruppo proponente ha già utilizzato la coltura in vitro di biopsie intestinali per lo studio della risposta mucosale ad antigeni in altre malattie infiammatorie, come la malattia celiaca, individuando strategie di modulazione della risposta infiammatoria con potenziale impatto terapeutico.
Poiche' l'infiammazione nasale in FC riflette il quadro di infiammazione, con elevati livelli di IL-8, delle altre aree dell'albero respiratorio, sono stati utilizzati espianti chirurgici di polipo nasale di pazienti FC che sono sottoposti a polipectomia. Dati preliminari del gruppo proponente hanno validato la coltura d'organo del polipo nasale e hanno dimostrato che il Lipopolisaccaride (LPS) di Pseudomonas Aeruginosa induce una specifica risposta infiammatoria mucosale.
Il risultato piu' stimolante e' rappresentato dalla capacita' di inibitori della MAP chinasi p38, come l'inibitore SB203580, utilizzati localmente a contatto con il tessuto, di antagonizzare questa abnorme risposta infiammatoria nei polipi nasali di pazienti con FC, controllando la secrezione di IL-8, la ridistribuzione dei neutrofili nei compartimenti mucosali apicali e i fenomeni infiammatori epiteliali. Scopo dello studio proposto e' quello di studiare i meccanismi d'azione di questo inibitore della p38 MAP-chinasi, ed in particolare: 1) di espandere i dati preliminari con lo studio di almeno 15 pazienti FC e 15 controlli con poliposi idiopatica; 2) di paragonare gli effetti a quelli di altre sostanze con riconosciuto meccanismo antinfiammatorio, come i macrolidi; 3) di studiare l'apoptosi epiteliale dopo trattamento con macrolidi o con inibitori della p38 MAP chinasi, in considerazione del ruolo della p38 MAP-chinasi nel processo apoptotico; 4) di analizzare le modalità di azione dell'inibitore della p38 MAP chinasi in paragone ai macrolidi, dal momento che e' stato riportato che questi ultimi inibiscono la trascrizione dell'mRNA mentre gli inibitori della p-38 alterano la stabilita' dell'mRNA di molte citochine fra cui la IL-8.
Sara' inoltre studiata la cinetica di sintesi delle beta-defensine e l'attività pro-chemiotattica e antimicrobica dei surnatanti di coltura dopo stimolazione batterica.
La comprensione degli eventi cruciali della risposta infiammatoria in FC e la possibili-

ta' di modulare il processo infiammatorio nel sistema della coltura d'organo di espianti di polipo nasale di pazienti FC potrebbe rappresentare una strategia ideale di validazione di un nuovo approccio terapeutico prima della applicazione in vivo nei pazienti.

Roberto Gambari

***Roberto Gambari***
*(Dipartimento di Biochimica e Biologia Molecolare, Sezione Biologia Molecolare, Università di Ferrara)*
**Novel diagnostic and therapeutic approaches for cystic fibrosis** (Strategie innovative nella diagnosi e terapia della fibrosi cistica)

Diagnostica Prenatale. Il Progetto di ricerca si propone di sviluppare metodologie diagnostiche innovative per la diagnosi non invasiva della fibrosi cistica (CF). La strategia proposta si basa sull'utilizzo di Lab-on-a-chip basati sulla dielettroforesi (DEP) per la manipolazione e bioseparazione di cellule rare presenti in fluidi biologici. L'obiettivo finale è l'isolamento di cellule fetali utilizzando un singolo prelievo di sangue e l'arricchimento di cellule eritroidi fetali nucleate (NRBC) con metodi convenzionali e la loro bioseparazione attraverso DEP, utilizzando piattaforme DEP-chip e DEP-array sviluppate dal Laboratorio di ingegneria elettronica diretto dal Prof. Roberto Guerrieri (ARCES, Università di Bologna). Le cellule fetali separate dovranno essere utilizzabili per l'identificazione convenzionale di mutazioni puntiformi impiegando metodi di amplificazione PCR e sequenziamento o analisi con biosensori e tecniche SPR.

Strategie innovative per alterare l'espressione del fattore di trascrizione NF-kappaB: la strategia "decoy". Le ricerche volte allo sviluppo di terapie innovative hanno come bersaglio molecolare il fattore di tascrizione NF-kappaB, il quale è coinvolto in numerosi processi pro-infiammatori associati alle manifestazioni cliniche tipiche della CF. Un primo approccio è la strategia "decoy" per fattori di trascrizione (TFD), il cui obiettivo è quello di utilizzare corte sequenze di DNA (oppure analoghi strutturali) recanti il sito di interazione per NF-kappaB. Queste sequenze oligonucleotididiche legano NF-kappaB ad alti livelli di efficienza e, in questo modo, ne impediscono la funzione di attivatore trascrizionale. Utilizzeremo per questo tipo di esperimenti sia molecole di DNA che analoghi (soprattutto chimere PNA-DNA-PNA e LNA). Le chimere PNA-DNA-PNA sono molecole che contengono sequenze di acidi peptido-nucleici (PNA) e sono molto interessanti perchè sono molto attive come molecole decoy e stabili in siero e in estrattti cellulari. Inoltre, possono essere veicolate con metodi classici di veicolazione di farmaci (come microsfere e liposomi). Le molecole LNA (locked nucleic acids) sono analoghi del DNA che mostrano buona attività TFD e sono resistenti alle nucleasi.

Strategie innovative per alterare l'espressione del fattore di trascrizione NF-kappaB: identificazione di molecole bioattive da estratti di piante medicinali. Molecole bioattive in grado di interferire con NF-kappaB saranno identificate da una serie di estratti da piante medicinali provenienti dal Bangladesh e già in parte studiate dal nostro gruppo di ricerca per la loro attività su questo fattore di trascrizione. Gli estratti utilizzati provengono dalle seguenti piante medicinali: Emblica officinalis, Aegle marme-

los, Moringa oleifera, Terminalia arjuna, Vernonia anthelmintica, Oroxylum indicum, Saraca asoka, Rumex maritimus, Lagerstroemia speciosa, Red sandal, Cuscuta reflexa, Argemone mexicana, Hemidesmus indicus, Polyalthia longifolia.

Saggi in sistemi cellulari. Ulizzeremo linee cellulari wild type e CF per saggiare gli effetti delle biomolecole che hanno dimostrato possedere un'attività anti NF-kappaB. Analizzeremo gli effetti del trattamento sull'espressione di alcuni geni come ICAM-1, IL-8, IL-6.

Il gruppo di ricerca. Il gruppo di ricerca è costituito da due ricercatori universitari (Carlo Mischiati e Giordana Feriotto), un tecnico (Nicoletta Bianchi), un borsista (Monica Borgatti), un assegnista (Ilaria Lampronti) e tre dottorandi di ricerca (Enrica Fabbri, Leonardo Vizziello e Cristina Zuccato).

Flavia Bazzoni

***Flavia Bazzoni***
*(Dipartimento di Patologia, Università di Verona)*

**Role of SOCS3 in the inflammatory cells responses to stimuli of bacterial origin**
(Ruolo di SOCS3 nella regolazione della risposta delle cellule infiammatorie agli stimoli di origine batterica)

Una frequente causa di decesso nei pazienti affetti da fibrosi cistica (CF) è rappresentata dal progressivo deterioramento delle funzioni polmonari. Il declino delle funzioni polmonari dei pazienti CF è, a sua volta, la conseguenza di un circolo vizioso di infezione cronica e infiammazione delle vie aeree. La risposta infiammatoria si instaura precocemente, è dominata dai granulociti neutrofili e si può sviluppare nel polmone anche in assenza di alcun segno identificabile di infezione, suggerendo che l'incapacità di controllare l'infiammazione non dipende dal perdurare dell'infezione, ma piuttosto da anomalie dei meccanismi responsabili dello spegnimento della risposta delle cellule infiammatorie per eccellenza, quali i granulociti neutrofili.
Negli ultimi anni il nostro gruppo si è occupato dello studio dei meccanismi attraverso cui citochine anti-infiammatorie sono in grado di inibire le risposte dei granulociti neutrofili a stimoli di origine batterica. In particolare, abbiamo recentemente dimostrato che citochine anti-infiammatorie, come l'IL-10, inducono l'espressione di SOCS-3 nei granulociti neutrofili e che la presenza di questa proteina intracellulare inibisce la produzione di citochine pro-infiammatorie (TNF$\alpha$, IL-6, GM-CSF) in risposta a molecole di origine batterica, limitando in questo modo l'infiammazione. SOCS-3 appartiene ad una famiglia di proteine coinvolte nei meccanismi di spegnimento della risposta cellulare a stimoli e citochine pro-infiammatorie. Tuttavia, gli studi condotti allo scopo di caratterizzare le funzioni di SOCS-3 nelle cellule infiammatorie hanno prodotto risultati spesso contrastanti ed il meccanismo attraverso cui SOCS-3 svolge la sua azione anti-infiammatoria è stato chiarito solo in parte. Nel presente progetto di ricerca ci proponiamo di analizzare innanzitutto se l'espressione di SOCS-3 nei granulociti neutrofili di pazienti CF è paragonabile a quella osservata nei neutrofili purificati da donatori sani. Intendiamo inoltre definire il ruolo ed il meccanismo d'azione di SOCS-3 nella

risposte delle cellule infiammatorie bloccando l'espressione di questa proteina intracellulare attraverso la recente strategia dell'RNA interference. Una volta chiarito se e come SOCS-3 può inibire la produzione di mediatori infiammatori avremo a disposizione una nuova molecola anti-infiammatoria di potenziale interesse terapeutico rilevante soprattutto in patologie quali la CF, caratterizzate da infiammazione eccessiva e persistente e/o dalla mancanza dei meccanismi che controllano la risposta infiammatoria.

# 6. Ricerca Clinica ed Epidemiologica

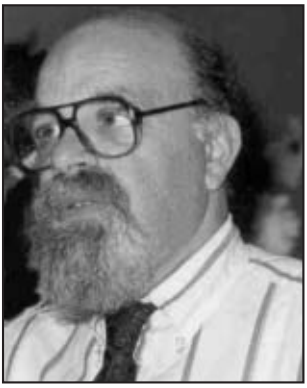
Moderatrice: **Francesca Pardo**

Cesare Braggion

***Cesare Braggion***
*(Centro Fibrosi Cistica, Istituti Ospitalieri, Verona)*
*Introduzione:*
**La sfida della ricerca clinica ed epidemiologica italiana in fibrosi cictica.**

*La maggior parte delle terapie applicate nella fibrosi cistica (FC) è basata su un razionale fisiopatologico piuttosto che sulle prove di efficacia e, quando sono applicate per molti anni, disponiamo di poche informazioni sul loro profilo di sicurezza. Nella ricerca clinica si fa riferimento a misure "surrogato" di esito (spirometria, HRCT, densità batterica, etc.), nella maggior parte ancora poco definite nella loro variabilità, sensibilità, specificità e potere predittivo. Questi aspetti rappresentano l'oggetto della ricerca clinica ed epidemiologica: in questi ultimi anni essa si è dimostrata decisamente più attiva e diffusa ma è ancora insufficiente in diverse realtà, compresa quella italiana.*
*Come si può raccogliere la sfida di potenziare la ricerca clinica ed epidemiologica in Italia? Accanto alle iniziative e alle proposte dell'industria, deve crescere l'iniziativa autonoma dei Centri specialistici. La legge n. 548 del 23/12/1993 incentiva il loro sviluppo indirizzandolo non solo al miglioramento ed ottimizzazione dell'assistenza ma anche alla promozione della ricerca. Sono determinanti le iniziative dei singoli Centri per "liberare" risorse da dedicare alla ricerca, identificando ambiti di interesse, "facilities" locali ed una progettualità specifica coerente ed aperta al confronto e alla cooperazione con altri. L'iniziativa di ogni singolo Centro deve avere continuità ed essere potenziata ma deve congiungersi ad iniziative che favoriscano la cooperazione tra i Centri, la costruzione di una "rete" dei Centri: solo la ricerca collaborativa, multicentrica può ottimizzare le risorse disponibili per la ricerca e può consentire di arruolare un numero sufficiente di pazienti per contribuire a dare le risposte attese. La costruzione di una "rete" dei Centri, finalizzata sia al potenziamento della ricerca che al miglioramento dell'assistenza erogata ai pazienti e alle loro famiglie, rappresenta un obiettivo prioritario di una società scientifica.*
*Le iniziative in questa direzione devono essere molteplici ed integrate:*
*1) Promozione ed organizzazione di formazione alla ricerca per gli operatori sanitari.*
*2) Lavoro in gruppo multidisciplinare e multiprofessionale (commissioni, gruppi di lavoro, gruppi professionali) sui grandi temi assistenziali per produrre protocolli, linee-guida, progetti assistenziali, di ricerca, organizzativi. Uno "stile" di lavoro cooperativo consente di condividere e diffondere i prodotti, cementa e gratifica chi lo realizza.*
*3) Una unica commissione dedicata alla ricerca rappresenta una opportunità importante di integrazione: il ricercatore di base, il genetista ed il ricercatore clinico identificano aree su cui convergere e mettere in comune risorse. Nasce il dibattito sulle priorità e si possono così identificare i "nodi" comuni della rete, cioè le facilities (un laboratorio, un gruppo di consulenti) che conviene sviluppare a diversi scopi e che sono a disposizione di molti.*
*4) Il collegamento con altre società scientifiche consente di inserirsi in un tessuto più ampio, dove trovare punti di convergenza per iniziative sia di formazione che di ricerca.*
*5) Il confronto e l'elaborazione di standard organizzativi dei Centri contribuisce ad identificare, oltre ad un "minimo indispensabile" che sia comune ai Centri per erogare assistenza, cosa è utile sviluppare localmente e "in comune" per il potenziamento della ricerca multicentrica.*
*6) Il Registro anagrafico-clinico dei pazienti è quanto di più prezioso abbiamo a disposi-*

*zione per lo sviluppo della rete dei Centri: esso rappresenta da una parte un referente per i singoli Centri (restituisce dati dei singoli), dall'altra un "bene comune" (restituisce dati di insieme della realtà nazionale). In una fase in cui il Registro si sta interrogando sul suo futuro, non sfugge che vi è necessità di renderlo più efficiente nella raccolta dei dati, nel controllo della loro qualità e nella capacità di interloquire con i singoli e con l'insieme della comunità assistenziale-scientifica "restituendo" dati e proposte ed accogliendo stimoli, idee ed iniziative. La realtà attuale e l'esigenza di trovare un suo riconoscimento giuridico e le aspirazioni sopra indicate spingono verso un Registro, inserito con una sua autonomia, nel contesto della nuova società scientifica.*
*7) Collaborazione in modo previlegiato con enti ed associazioni onlus della comunità della FC al fine di definire le priorità e le linee di impegno comune per il sostegno e la promozione della ricerca; collaborare con l'industria, gli istituti di ricerca, le istituzioni sanitarie, proponendo delle priorità nella ricerca ed una metodologia coerente ed adeguata per realizzare gli studi.*


Alberto Piazza

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

**The Cystic Fibrosis mutation spectra in Italy: regional distribution and the European framework**
(Spettro delle mutazioni CFTR in Italia: distribuzione regionale e contesto europeo)

Sono stati svolti molti studi che mostrano la distribuzione delle mutazioni sia in ambito italiano (Rendine et al., 1997) sia in ambito europeo (Estivill et al., 1997; Lao et al., 2003). Lo studio per cui si è ottenuto il finanziamento ha lo scopo di aggiornare le frequenze delle mutazioni nelle regioni italiane e di inserire queste informazioni in uno scenario europeo. Si ricorda che il finanziamento è avvenuto molto recentemente, per cui non si possono presentare risultati, ma solo il progetto di ricerca, eventualmente da rimodulare, a suo tempo presentato. Come è noto, i dati italiani sono raccolti dai Centri per la Fibrosi Cistica e inseriti in un database gestito dall'Istituto di Statistica e Biometria dell'Università di Milano. In accordo con i Centri e i Laboratori, la prima decisione da prendere è una data definitiva di aggiornamento dei dati stessi. Una seconda decisione è l'eventuale completamento dei dati per le regioni e/o province in cui sono carenti. Per la parte europea saranno utilizzati i dati che il Dott. Milan Macek ha raccolto dalla letteratura, da richieste dirette a laboratori europei e da fonti personali, rispetto ai quali sembra esserci una disponibilità completa per il loro uso.
Come per i campioni italiani, uno dei problemi più delicati è il numero ed il tipo di mutazioni saggiato, differenti da campione a campione, che impedisce di ottenere in modo semplice un confronto statisticamente valido tra le popolazioni prese in esame. Secondo studi effettuati in precedenza (Rendine et al., 1997; Estivill et al., 1997), sia in ambito italiano sia in ambito europeo, le mappe che illustrano la distribuzione delle mutazioni sembrerebbero essere compatibili con modelli di differenziamento che risalgono al tempo pre-romanico, ma occorre saggiare tale ipotesi con dati più numerosi e più dettagliati quali quelli che ci si augura vengano prodotti da questo lavoro di aggiornamento e rielaborazione.

Anna Bossi

***Anna Bossi***
*(Istituto di Statistica e Biometria dell'Università di Milano)*
**Construction of an annually updated hypertest allowing flexible access to aggregated data coming from the Italian Cystic Fibrosis Registry (ICFR).**
(Realizzazione di un ipertesto per l'utilizzo guidato dei dati del registro italiano per la fibrosi cistica, con aggiornamento annuale del data base usato per le analisi)

Nel 1988, presso l'Istituto di Statistica Medica e Biometria dell'Università degli Studi di Milano, si è istituito il Registro Italiano per la Fibrosi Cistica (RIFC) al fine di censire i pazienti FC in cura presso i Centri specializzati. Negli ultimi 16 anni, il Registro ha archiviato i dati anagrafici, le modalità di diagnosi, la tipizzazione genetica degli oltre 4300 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.

***Anna Bossi***
*(Istituto di Statistica e Biometria, Università di Milano)*
**Quality control and update of follow-up data in the italian cystic fibrosis registry: a starting point for the analysis of clinical data and the dissemination of results.** (Aggiornamento e controllo di qualità dei dati relativi al follow-up clinico dei pazienti censiti dal Registro Italiano Fibrosi Cistica dal 1998).

Negli ultimi 16 anni, il Registro Italiano Fibrosi Cistica (RIFC) ha archiviato i dati anagrafici, le modalità di diagnosi, la tipizzazione genetica e l'anamnesi degli oltre 4300 pazienti in cura presso tutti i Centri specializzati presenti in Italia. Dal 1998 si sono archiviati anche i dati relativi al follow-up clinico dei pazienti (trapianto d'organo, complicanze, spirometria, dati antropometrici e microbiologici); tali informazioni sono però incomplete e non ancora sottoposte ad un attento controllo di qualità e di congruenza. Questo rende impossibile il loro uso benché siano relative a circa la metà dei pazienti. Il presente progetto mira ad eseguire l'ag-

giornamento e il controllo di qualità dei dati relativi ai pazienti censiti dal RIFC. Poiché questo compito non può essere svolto con le sole risorse umane dei Centri CF e senza un attento coordinamento, si è pensato di istituire un data manager dedicato a questo compito.
Tale persona coordinerà la raccolta dei dati a livello centrale e, a livello locale, fornirà il supporto necessario a quei Centri che non sono in grado di inviare tempestivamente e regolarmente le informazioni sui loro pazienti a causa di carenze di personale o di competenze informatiche. In un primo tempo si provvederà all'aggiornamento del Registro al 31.12.2003 con i dati sinora pervenuti e ad inviare a ciascun Centro CF un dettagliato rapporto sulla situazione dell'archivio relativamente ai pazienti in carico a quel Centro: record incompleti, dati non congruenti, ecc. In un secondo tempo il data manager incaricato si recherà presso ciascun Centro per completare, ove possibile, la raccolta dei dati.

Giovanni Taccetti

***Giovanni Taccetti***
*(Centro Regionale Toscano Fibrosi Cistica, Ospedale A. Meyer, Firenze)*

**Early eradication of Pseudomonas aeruginosa and subsequent colonization in cystic fibrosis patients**
(Eradicazione precoce di Pseudomonas aeruginosa e successiva colonizzazione in pazienti con fibrosi cistica)

La colonizzazione cronica da P. aeruginosa condiziona pesantemente la sopravvivenza e la qualità di vita dei pazienti affetti da fibrosi cistica (FC) ed è da considerare un evento prognostico sfavorevole in quanto associata ad un lento e progressivo decremento della funzione polmonare. Esperienze cliniche indicano che l'eradicazione di P. aeruginosa dalle vie aeree è possibile solo con un tempestivo trattamento antibiotico, a seguito del primo isolamento del germe. I pazienti FC che hanno eseguito terapia eradicante possono tuttavia essere nuovamente colonizzati da P. aeruginosa. Gli scopi del presente progetto sono:
a./ Determinare il periodo di tempo libero da P. aeruginosa nei pazienti che hanno eseguito con successo la terapia eradicante.
b./ Determinare se i ceppi di P. aeruginosa che ricolonizzano i pazienti sono ceppi di nuova acquisizione oppure ceppi non eradicati dal precedente trattamento antibiotico.
Il progetto, già regolarmente iniziato, prevede anche di analizzare:
- l'incidenza di colonizzazione da P. aeruginosa nella popolazione suscettibile in un periodo di 2 anni
- l'effetto del trattamento precoce anti-P. aeruginosa sulla funzione polmonare nel gruppo che ha eseguito con successo eradicazione del patogeno rispetto ad un gruppo di pazienti cronicamente colonizzati dal germe.
- l'effetto del trattamento precoce anti-P. aeruginosa sulle resistenze batteriche di ceppi al primo isolamento rispetto a ceppi isolati da pazienti cronicamente colonizzati dal germe
- l'effetto del trattamento precoce anti-P. aeruginosa sulla spesa complessiva riguardante gli antibiotici nel gruppo che ha eseguito trattamento precoce rispetto ad un gruppo di pazienti cronicamente colonizzati dal germe.
Migliorare le conoscenze relative alla prima infezione da P. aeruginosa e all'efficacia della terapia eradicante appare attualmente importante per consentire un periodo libero dall'infezione con probabili effetti benefici sulla sopravvivenza a lungo termine dei pazienti.

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

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