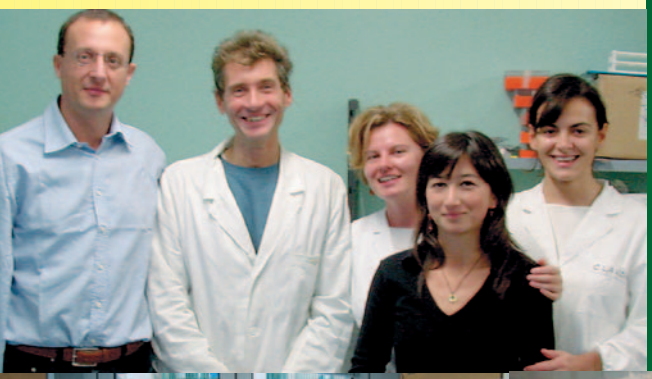
fondazione per la ricerca sulla fibrosi cistica - onlus
italian cystic fibrosis research foundation

4a CONVENTION D'AUTUNNO DEI RICERCATORI ITALIANI PER LA FIBROSI CISTICA



Verona 17 - 18 novembre 2006

Sala incontri Confindustria
Piazza Cittadella

Presentazione e discussione dello stato di avanzamento dei progetti finanziati dalla Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica nel periodo 2002 - 2006

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

Verona 17 – 18 novembre 2006
Sala Incontri Confindustria
Piazza Cittadella

Presentazione e discussione dello stato di avanzamento di progetti finanziati dalla Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica 2002 – 2006

- **Fisiopatologia della proteina CFTR e terapie del difetto di base**
- **Microbiologia di base**
- **Microbiologia clinica**
- **Ricerca clinica ed epidemiologica**
- **Infiammazione**
- **Genetica applicata**

Edizione a cura della Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica
Verona, novembre 2006

10 ANNI Significato di un appuntamento

La Fondazione per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica nacque a Verona nel gennaio 1997 con il preciso intento di dare impulso ad iniziative di ricerca innovativa in un campo della medicina, quello della fibrosi cistica, ancora limitatamente esplorato e comunque bisognoso di nuove idee e di nuovi investimenti nel mondo scientifico italiano. Questi primi 10 anni hanno rappresentato un percorso non facile, soprattutto per creare una sensibilità nuova e diffusa verso la ricerca, orientata alla costruzione di alleanze efficaci ed alla raccolta delle prime indispensabili risorse economiche. In molti ci hanno seguito e sostenuto, primi fra tutti gli stessi pazienti, loro famigliari ed amici. Ci hanno seguito molti ricercatori, provenienti da discipline diverse, spesso estranei alle problematiche specifiche della fibrosi cistica, ma comunque con competenze mediamente di alto livello, che hanno inteso mettere a disposizione, in maniera sinergica, dei nostri obiettivi di ricerca.

Questo del reclutamento di uomini, di competenze e di valide strutture di ricerca è stato l'obiettivo fondamentale degli ultimi 5 anni. Lo strumento per dare sviluppo a tale intento si è basato sui bandi annuali di concorso per grant di ricerca, ai quali hanno risposto un numero inatteso di ricercatori. Impegno fondamentale della Fondazione è stato quello di assicurare un processo qualificato di revisione e valutazione dei progetti proposti, attraverso il lavoro generoso e paziente del suo comitato scientifico, integrato con quello di oltre 100 esperti indipendenti, quasi tutti stranieri (per contenere al massimo possibili conflitti di interesse). Oltre 150 application sono pervenute in 5 anni e, tra queste, sono stati selezionati per un finanziamento 77 progetti. Purtroppo le limitate risorse della Fondazione hanno costretto finora a contenere il finanziamento in un contributo pur significativo ma solo parziale rispetto ai costi stimati dai proponenti: in media il 36% di tali costi. E tuttavia i ricercatori, quasi sempre, sono riusciti sinora a reperire integrazioni economiche che consentissero di affrontare lo svolgimento del progetto nella sua interezza.

Si è andata costituendo così una rete italiana di ricerca CF, con alcuni significativi collegamenti ed integrazioni con gruppi di ricerca stranieri. Sono stati oltre 300 i ricercatori complessivamente coinvolti nei 77 progetti e circa 80 i gruppi di ricerca (laboratori e centri clinici) distribuiti in quasi tutte le regioni italiane. Si sono andate impostando nuove collaborazioni, sono andati crescendo i progetti policentrici, con preziose integrazioni tra discipline e competenze diverse. Questo crediamo sia stato il risultato più significativo di questa prima fase dell'iniziativa italiana per la ricerca CF: riteniamo che questa rete possa costituire una base importante per cimentarci in futuro verso nuovi traguardi, aperti anche a più ampie collaborazioni europee.

L'investimento economico per la ricerca da parte della Fondazione negli ultimi 5 anni è stato complessivamente di circa 3 milioni di euro. Certamente ancora poco rispetto agli obiettivi ed ai bisogni, ma significativo per il modo con cui tali risorse sono state reperite. Vi hanno contribuito migliaia di persone, in buona parte direttamente o indirettamente coinvolte dalla malattia. Si sono attivate migliaia di piccole o grandi iniziative per sensibilizzare e raccogliere fondi. Vi è stata una coralità di risposta al di sopra delle attese, stante la difficoltà di comunicare alla popolazione i bisogni di ricerca per una patologia umana molto seria ma ancora sconosciuta ai più. Di grande significato l' "adozione" (sostegno economico finalizzato), parziale o totale, di ben 46 dei 77 progetti , ad opera di Aziende, Delegazioni della Fondazione, Associazioni regionali CF, Fondazioni bancarie, Istituti scolastici e Privati.

Le aree di ricerca affrontate in questo percorso sono state le più sensibili: da quella della fisiopatologia CFTR e degli studi preclinici di correzione del difetto di base, a quella della microbiologia di base e clinica, a quella dell'infiammazione ed all'area della genetica molecolare applicata. L'ambito clinico ed epidemiologico ha avuto pure i suoi primi significativi approcci, ma occorre dire che questa rimane l'area che trova tuttora difficoltà a decollare in Italia. Le opportunità sono molte: l'esistenza di molti centri clinici dedicati alla fibrosi cistica, con una cultura clinica assai qualificata, con strumenti sociali di raccordo importanti (la Società Italiana FC, i suoi gruppi di lavoro), un registro epidemiologico nazionale con 17 anni di storia, al quale la Fondazione ha dato un non piccolo contributo di natura economica e formativa, una legge speciale che "prescrive" e incoraggia e, in parte, finanzia la ricerca clinica. C'è da chiedersi

quali siano le ragioni di questo relativo impasse e quali siano le azioni da intrapprendere perché maturi attitudine dei clinici (e non solo dei clinici) italiani a cimentarsi con importanti progetti di ricerca clinica ed epidemiologica.

Forse è venuto anche il momento in cui i ricercatori attivi entro ciascuna delle aree "sensibili" di ricerca si trovino a fare insieme il punto su ciò che merita oggi perseguire come sviluppo di studio, con l'intento di individuare linee strategiche comuni e rilevanti e con l'obiettivo ultimo di elaborare progetti integrati sui quali investire in futuro con minor dispersione di energie e risorse e maggiore probabilità di contribuire a significativi avanzamenti di conoscenza, possibilmente trasferibili dagli studi di base alle persone malate. A questo è anche finalizzata questa Convention.

In questo quarto raduno dedicato alla ricerca finanziata dalla Fondazione FFC vengono presentati e discussi 44 dei 77 progetti, quelli appena conclusi e quelli ancora in corso o di recente selezione.

Gianni Mastella
(Direttore scientifico Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica)

Un bilancio della produzione di 4 anni di ricerca FFC (2002-2004) attraverso le pubblicazioni scientifiche

La Fondazione per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica (FFC) ha incominciato nel 2002 a finanziare progetti di ricerca. Inizialmente il numero dei progetti finanziati è stato molto limitato (4 nel 2002) per poi crescere a 13 nel 2003, 19 nel 2004, 17 nel 2005 e 24 nel 2006. Dal 2003 le domande presentate sono state formulate sulla base di un bando riportante indicazioni precise sulla modalità di presentazione della domanda e l'iter di valutazione (vedi anche Notiziario FFC del 16 Agosto 2006). E' presto per fare un primo bilancio del contributo che le ricerche finanziate hanno portato al progresso delle ricerche sulla FC. E' utile però riflettere brevemente su alcune "regole" condivise che sostengono il finanziamento della ricerca.

Innanzitutto qualsiasi ente finanziatore (e questo vale in particolare per la FFC che ha iniziato la sua attività da pochi anni) valuta progetti. Un progetto parte da una lettura critica delle conoscenze già note, identifica un obiettivo da chiarire, propone una strategia sperimentale per farlo. In prima istanza è solo dalla valutazione di questi elementi che deriva la decisione di "give her/him a try". Aiuta in questa fase soltanto l'elemento oggettivo della competenza del proponente (esperienza precedente, pubblicazioni, etc.), ed eventualmente dei suoi collaboratori, e la fattibilità del progetto (strutture ed apparecchiature disponibili, etc.).
Non ho dubbi che questa prima regola sia stata rispettata con attenzione. I progetti sono stati valutati in profondità e secondo modalità utilizzate dai principali enti nazionali e internazionali di finanziamento della ricerca. Come è ovvio accadesse, i finanziamenti finora assegnati sono andati per lo più a ricercatori con un solido c.v. scientifico e che per la gran parte lavorano in Istituzioni di rilievo.
Qual è l'esito di un buon progetto di ricerca ? Certamente un buon prodotto; e il più misurabile prodotto della ricerca è una pubblicazione scientifica, la valutazione della quale non è sempre facile ma che può comunque essere, per lo meno in prima approssimazione, espressa con un'unità di misura quantitativa, vale a dire il famoso (o per alcuni "famigerato") "impact factor" (IF). Si è discusso e si discute tuttora animatamente nella comunità scientifica sull'uso eccessivo del IF nella valutazione del "successo" della ricerca. Ai critici del IF ho sempre opposto il banale ragionamento che Nature e Science hanno un altissimo IF e chiunque faccia ricerca vorrebbe pubblicare sempre su una di queste due riviste.

Prima del prodotto c'è qualcosa d'altro che la buona ricerca genera? Certo. Concentra motivazioni e capacità sulla soluzione di un problema. Crea competenze orientate, diffonde conoscenze, favorisce contatti e collaborazioni che creano quella sorta di "terreno coltivato" sul quale, perlomeno in questa parte del mondo, l'uomo ha deciso di condurre la sua battaglia per il progresso della conoscenza e contro la malattia e la sofferenza. Questo risultato della buona ricerca è più difficilmente misurabile, anche se si potrebbe pensare alla definizione di unità di misura anche per questo. E' quindi inevitabile, e però corretto, tornare al prodotto. Da questo "terreno coltivato", pur secondo tempi non sempre prevedibili e talvolta lunghi, devono sbocciare buone pubblicazioni scientifiche.

Come è andata la ricerca sulla FC finanziata dalla FFC in termini di analisi quantitativa del prodotto? Escludendo le domande relative al 2006, nel periodo 2002-2005 la FFC ha finanziato in totale 50 progetti (3 ricercatori principali hanno ottenuto fondi sia nel 2002 o 2003 che nel 2005). I lavori complessivi pubblicati su riviste elencate nel Journal Citation Report del ISI Web of Knowledge fino ad ottobre 2006 sono stati 38 (altre 6 pubblicazioni sono uscite su riviste non comprese in quell'elenco), con un IF totale di 179,12 e medio (IF/pubblicazione) di 4,71. Come detto all'inizio, è ancora presto per fare un primo bilancio, però questi freddi numeri, volutamente non scomposti in analisi più dettagliate, qualcosa dicono. Suggeriscono che il numero di lavori pubblicati su riviste di alto impatto scientifico è ancora basso (0.75 pubblicazioni per ricercatore finanziato), soprattutto considerando che a ciascun "group leader" fanno riferimento in varia misura numerosi altri ricercatori (quasi 300 complessivamente nel periodo considerato). Ritengo invece buono l' IF medio. Gene Therapy ha un IF di 4,8, Journal of Biological Chemistry di 5,8. 4,7 di IF medio indica quindi che la ricerca italiana sulla FC esce su buone riviste, in alcuni casi eccellenti. Partiamo da qui, da questo elemento di soddisfazione. Il Comitato Scientifico della FFC avrà modo di fare analisi più puntuali. Credo però che dal 2007 l'esame dei progetti dovrà essere accompagnato in maggior misura da quello dei prodotti.

Giorgio Berton
(Professore di Patologia Generale, Università di Verona,
membro del Comitato Scientifico della Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica)

1. FISIOPATOLOGIA DELLA PROTEINA CFTR E TERAPIE DI CORREZIONE DEL DIFETTO DI BASE

Casavola V.[1], Zaccolo M.[2]
[1]Department of General and Environmental Physiology; University of Bari, Bari;
[2]Venetia Institute for Molecular Medicine, University of Padova.

Role of the scaffolding protein NHERF in the PKA-mediated regulation of CFTR sorting and activity.

Ruolo della proteina di interazione NHERF nella regolazione dell'attività e della espressione della proteina – canale CFTR (Progetto FFC #1/2005)

Valeria Casavola (in primo piano) e il suo gruppo di ricerca

Recenti studi hanno dimostrato che l'espressione e l'attività della proteina CFTR sono regolate da varie proteine accessorie con le quali lo stesso canale interagisce. Tra queste, grande rilievo hanno le proteine a domini PDZ e in particolare NHERF (Na/H exchanger regulatory factor). Tale proteina è costituita da due domini PDZ, interagenti con il CFTR, e da un dominio ERM posto nella regione C-terminale che lega ezrin, che a sua volta è in grado di interagire con i filamenti F-actina del citoscheletro.

Abbiamo recentemente dimostrato che la sovraespressione di NHERF1 in cellule bronchiolari umane CFBE41o-, derivate da soggetti affetti da fibrosi cistica (FC) omozigoti per la mutazione ΔF508 del CFTR, induce una traslocazione del CFTR sulla membrana plasmatica determinando un recupero dell'efflusso di cloro CFTR dipendente.

In questo primo anno del progetto, mediante studi biochimici e funzionali, abbiamo analizzato il meccanismo cellulare attraverso il quale NHERF1 è in grado di regolare l'espressione e l'attività del CFTR.

L'integrità della proteina NHERF1 è risultata essere necessaria per il ripristino dell'attività del ΔF508 CFTR sulla membrana apicale in quanto la sovraespressione di NHERF1 mutata nei domini PDZ o mancante del dominio ERM, interagente con ezrin, non è più in grado di favorire la funzionalità del ΔF508 CFTR. Questi risultati suggeriscono che la formazione del complesso multiproteico -CFTR-NHERF1-Ezrin-F-actina - è necessaria per stabilizzare la proteina ΔF508 CFTR sulla membrana apicale ed attivarla. Mediante studi morfologici con microscopia confocale e dosaggi biochimici del contenuto di F-actina, abbiamo analizzato l'organizzazione e i livelli dell'actina citoscheletrica presenti in cellule bronchiolari umane sane 16HBE14o- e cellule FC CFBE41o-. I risultati ottenuti mostrano che le cellule FC presentano una minore organizzazione dei filamenti di F-actina e un contenuto di F-actina significativamente inferiore a quello riscontrato nelle cellule "sane". L'overespressione di NHERF1 nelle cellule FC incrementa il contenuto di F-actina sino a valori comparabili con quelli osservati nelle cellule sane e osservazioni al confocale mostrano una parziale riorganizzazione dell'actina citoscheletrica nella regione sub-apicale. Questi dati suggeriscono che un intatto citoscheletro è fondamentale per l'espressione e l'attività del CFTR e che NHERF1 ha un ruolo essenziale nel modulare l'organizzazione dei filamenti di F-actina.

Fiorentina Ascenzioni

Sante di Gioia[2,3], Luisa Pirone [1], Chris Boyd [3], Massimo Conese [2] & Fiorentina Ascenzioni [1]
[1]Dipartimento di Biologia cellulare e dello Sviluppo, University of Rome "La Sapienza"
[2]Institute for Experimental Treatment of Cystic Fibrosis, H.S. Raffaele, Milano
[3]Molecular Medicine Centre, University of Edinburgh, Edinburgh, UK

Evaluation of PEI-albumin for in vitro and in vivo delivery of CFTR chromosomal vectors in airway model systems

Valutazione di un polimero cationico, la polietilenimina, per il trasferimento di vettori genomici (minicromosomi) a epiteli respiratori in vitro e in vivo. (Progetto FFC #3/2005)

L'obiettivo principale di questo progetto consiste nello sviluppo di un sistema di trasferimento genico basato sulla polietilenimina (PEI) per veicolare vettori cromosomali in sistemi modello per la terapia genica della fibrosi cistica.

I vettori cromosomali sono costituiti da grandi frammenti di DNA che comprendono tutto o porzioni del locus genico CFTR e le regioni di regolazione a monte del gene stesso; possono raggiungere grandezze 10-50 volte superiori a quelle dei plasmidi. Le barriere fisiche e cellulari, che negli organismi si oppongono ad un effettivo trasferimento genico, sono ancora più evidenti quando si usano molecole di DNA complesse, che d'altra parte sono le uniche che possono garantire una espressione fisiologica temporale e spaziale del gene terapeutico.

Avvalendosi di uno studio precedente effettuato con complessi PEI-albumina, che ha dimostrato un efficiente trasferimento genico negli epiteli respiratori sia in vitro che in vivo, anche in presenza di muco ottenuto da pazienti FC, abbiamo messo a punto le condizioni sperimentali per l'uso di questo metodo con vettori cromosomali contenenti il locus CFTR. A tale scopo sono stati assemblati vettori BAC (cromosomi artificiali batterici) contenenti il locus CFTR che, unitamente ai costrutti PAC (cromosomi artificiali basati su P1) forniti dal Dott. Boyd, costituiscono una galleria di vettori cromosomali progressivamente più complessi di grandezza compresa tra le 100-300 kb.

In questo anno di attività abbiamo ottenuto i seguenti risultati:

a) messa a punto del protocollo PEI-albumina usando come riferimento il plasmide peGFP ed il lipide lipofectamina. L'efficienza di trasferimento di complessi peGFP/PEI-albumina (assemblati in diversi rapporti DNA/PEI/albumina) e peGFP/lipofectamina (usato come controllo positivo) è stata valutata monitorando il gene reporter GFP. Successivamente è stata determinata l'efficienza di trasferimento di un PAC di grandezza media (111 kb). In tutti i casi abbiamo visto che la presenza di albumina aumenta in modo significativo l'efficienza di trasferimento rispetto al PEI.

b) Assemblaggio di BAC contenenti l'intero gene CFTR ed opportuni marcatori per cellule eucariotiche. Questi vettori mantengono la struttura esoni-introni tipica del locus CFTR per l'intera lunghezza del gene, e raggiungono una grandezza di circa 300 kb. Abbiamo assemblato due tipi di molecole che differiscono per l'ampiezza della regione a monte dell'esone 1: il costrutto cCFTR5A contiene circa 70 kb a monte dell'esone 1; il costrutto cCFTRD25 ne contiene circa 45 kb.

Giulio Cabrini[1], Anna Tamanini, Elena Nicolis, Valentino Bezzerri, Federica Quiri , Elena Copreni*[2] , Massimo Conese*[2], Lucia Palmieri*, Stefano Castellani*
*Laboratorio Patologia Molecolare, Azienda Ospedaliera di Verona e *Institute for the Experimental Treatment of Cystic Fibrosis, Associazione Lombarda Fibrosi Cistica, H.S. Raffaele, Milano*

Novel generation lentiviral vectors: evaluation of inflammatory potential in human respiratory cells.

Vettori lentivirali di nuova generazione: valutazione del potenziale infiammatorio in cellule respiratorie umane. (Progetto FFC #04/2005)

Giulio Cabrini (al centro) con il suo gruppo

Elena Coprenti (al centro) con i suoi collaboratori

Numerose linee di ricerca sono attualmente in corso per la sperimentazione di nuove cure per la malattia polmonare dei pazienti affetti da fibrosi cistica, tra le quali la possibilità di trasferire il gene corretto nelle cellule delle vie respiratorie, con veicoli del gene denominati vettori, un approccio concettualmente semplice ed attraente. Le prime sperimentazioni cliniche in pazienti affetti da fibrosi cistica, utilizzando vettori di origine virale oppure vettori sintetici, hanno mostrato che veicolare il gene nelle vie respiratorie è possibile, ma i benefici clinici sono ancora distanti da raggiungere, per la limitata espressione del gene terapeutico. L'espressione è infatti risultata transitoria sia per il mancato inserimento del gene curativo nel patrimonio della cellula respiratoria da correggere, sia perchè la stessa cellula era eliminata dalla risposta immunitaria dell'organismo. Un nuovo approccio basato su vettori in grado di fare inserire stabilmente il gene curativo nelle cellule respiratorie è stato recentemente proposto, utilizzando vettori derivati da lentivirus. I pochissimi studi di sicurezza sinora effettuati su questi vettori somministrati nel topo e coniglio hanno mostrato solo modesta risposta infiammatoria quando somministrati per la via circolatoria sistemica del topo. L'esperienza raccolta con vettori di prima generazione, in particolare di origine adenovirale, ci obbligano ad effettuare indagini approfondite ed il più possibile estese su tutti gli aspetti della sicurezza di questi vettori in modelli sperimentali di laboratorio, prima di qualsivoglia sperimentazione clinica sull'uomo. In questo progetto, vettori lentivirali di ultima generazione sono stati testati assieme a vettori adenovirali su cellule bronchiali umane. In sintesi, questo progetto ha permesso di verificare che vettori lentivirali di ultima generazione esposti a cellule bronchiali umane non inducono i segnali di attivazione della risposta immunitaria innata osservati con i vettori di tipo adenovirale, incoraggiando l'estensione di ulteriori studi di biosicurezza, innanzitutto nelle vie respiratorie di modelli animali, al fine di una futura applicazione di vettori lentivirali nel trasferimento del gene della fibrosi cistica.

Loi R.
Universita' di Cagliari, Dipartimento di Tossicologia, Sezione di Oncologia e Patologia Molecolare

Mechanisms of recruitment of adult bone marrow-derived cells to normal and cystic fibrosis airway epithelium.

Meccanismi di reclutamento di cellule staminali derivate dal midollo osseo nell'epitelio polmonare normale o affetto da fibrosi cistica. (Progetto FFC #5/2006)

Roberto Loi (secondo da sinistra) e il suo gruppo

Cellule derivate dal midollo osseo possono localizzarsi nei polmoni ed acquisire caratteristiche fenotipiche e funzionali di cellule epiteliali polmonari. Questo fenomeno potrebbe consentire il ripopolamento dell'epitelio polmonare non pienamente funzionale con cellule epiteliali

funzionali di origine midollare. Ciò potrebbe costituire un potenziale approccio terapeutico per la fibrosi cistica, attraverso la correzione *in vitro* del difetto genetico su cellule del midollo osseo prelevate dal paziente e la loro successiva reinfusione nel paziente stesso. Tuttavia, gli studi compiuti indicano che il numero di cellule di derivazione midollare che si localizzano nei polmoni è largamente insufficiente affinchè questo approccio abbia rilevanza terapeutica. E' perciò essenziale capire quali sono i meccanismi attraverso i quali le cellule derivate dal midollo vengono reclutate nei polmoni e partecipano al rimodellamento polmonare, in quanto una migliore comprensione di questi meccanismi, i quali sono ancora largamente sconosciuti, potrebbe consentire di aumentare l'efficienza del ripopolamento. E' noto che il danno polmonare aumenta il numero di cellule derivate dal midollo reclutate al polmone e che queste cellule possono partecipare al rimodellamento del polmone che segue il danno. Ciò suggerisce che sostanze rilasciate dal polmone danneggiato possano richiamare cellule derivate dal midollo e consentirne la conversione fenotipica in cellule epiteliali o interstiziali.

In studi preliminari *in vivo*, siamo stati in grado di ottenere una limitata riparazione dell'epitelio delle vie aeree in un modello murino di CF attraverso la somministrazione di cellule staminali mesenchimali derivate dal midollo (MSC). Abbiamo inoltre osservato che la IL-17, una citochina infiammatoria nota per la sua azione chemiotattica sui granulociti neutrofili, puo' mediare la migrazione di MSC verso cellule epiteliali delle vie aeree in colture primarie murine quando queste vengono danneggiate mediante esposizione a lipopolisaccaride (LPS).

Ci proponiamo di caratterizzare gli effetti della IL-17 sul reclutamento di MSC verso l'epitelio delle vie aeree e sulla loro conversione fenotipica utilizzando sovraespressione di IL-17 in cellule epiteliali, mediante il bloccaggio della IL-17 utilizzando anticorpi neutralizzanti, e mediante l'uso di topi knockout per il recettore della IL-17. Obiettivo di questi studi e' di contribuire a chiarire i meccanismi del reclutamento e della conversione fenotipica di cellule staminali derivate dal midollo in cellule dell'epitelio delle vie aeree. L'acquisizione di queste conoscenze di base è indispensabile affinchè si renda possibile in futuro il trattamento della malattia polmonare CF mediante cellule staminali del midollo osseo.

Massimo Conese (in alto a sinistra) con partners e collaboratori di ricerca

Conese M.,[1,2], Casavola V.,[3] Boffoli D.,[1] Guerra R.,[3] D'Aprile A.,[1] Piro D.,[1] Piccoli C.,[1] Rejman J.,[2] Copreni E.[2], Capitanio N.[1]

[1]Department of Biomedical Sciences, University of Foggia, Foggia; [2]Institute for the Experimental Treatment of Cystic Fibrosis, H.S. Raffaele, Associazione Lombarda FC, Milano; [3]Department of General and Environmental Physiology; University of Bari, Bari.

Homing of bone marrow-derived stem cells to the respiratory epithelium in a cystic fibrosis mouse model: Role of bioenergetic metabolism.

Migrazione di cellule staminali corrette nel polmone di topi con fibrosi cistica e recupero dell'attività funzionale di CFTR: ruolo del metabolismo energetico. (Progetto FFC #2/2006)

Il trattamento con più possibilità di cura della malattia polmonare Fibrosi Cistica, in maniera più o meno permamente, sarà quello che permetterà di sostituire le cellule epiteliali del polmone malato con cellule staminali corrette dello stesso individuo

mediante trapianto. E' stato recentemente dimostrato che le cellule staminali ottenute da midollo osseo (ematopoietiche e mesenchimali) sono capaci di migrare nella mucosa respiratoria delle vie aeree di topi sottoposti a procedure finalizzate ad indurre un danno dell'epitelio. I risultati di questi studi indicano d'altro canto che la capacità di queste cellule di trasformarsi in epitelio respiratorio funzionale è molto bassa.
Lo scopo del progetto è di studiare se esiste una correlazione tra il metabolismo bioenergetico delle cellule staminali derivate da midollo osseo (BM-SC) e la loro capacità di migrare e differenziare in epitelio delle vie aeree in via di rigenerazione. Poiché il fine ultimo del progetto è quello di trasdurre *ex-vivo* le cellule di midollo osseo murine con un vettore integrante esprimente la forma "selvaggia" del gene CFTR umano e trapiantarle in un topo con Fibrosi Cistica, nell'anno in corso verrà studiata la eventuale modificazione del metabolismo energetico in cellule trasdotte con un vettore lentivirale (LV), nonché la loro capacità di acquisire una proteina CFTR funzionante mediante trasduzione con LV. Le BM-SC verranno trasdotte con un LV di ultima generazione e verranno studiate l'efficienza di trasduzione e la sua persistenza nel tempo. Verranno valutate sia la popolazione totale che in seguito a piastratura in modo da arricchire per cellule staminali mesenchimali. Una volta che siano state trovate le condizioni ottimali per una trasduzione efficiente con mantenimento del fenotipo "staminale", le cellule trasdotte verrranno valutate relativamente ad aspetti del metabolismo energetico ed O_2-correlato. Cellule BM-SC wild type e trasdotte con GFP-LV saranno esaminate per la loro efficienza di consumo dell'ossigeno, la loro funzionalità mitocondriale e la espressione e stabilizzazione del fattore HIF-1α. L'attività del CFTR in colture di BM-SC, sia in condizioni di controllo che dopo trasduzione con GFP-LV, verrà esaminata in differenti condizioni sperimentali e in relazione al loro metabolismo bioenergetico per stabilire i migliori parametri per poter effettuare la trasduzione con hCFTR-LV in topi affetti da Fibrosi Cistica.

Rotoli B.M.
Department of Experimental Medicine,
University of Parma

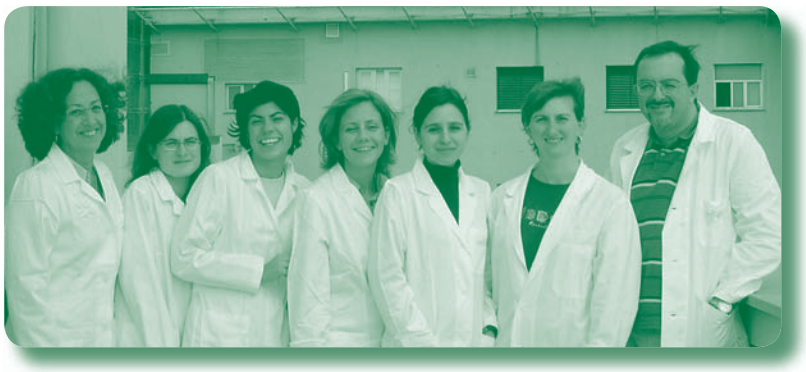
Bianca Maria Rotoli (prima da destra) con il suo gruppo di ricerca

Natural and synthetic amino acids as chemical chaperones to promote CFTR folding

Impiego di aminoacidi, sintetici o naturali, quali "chemical chaperones" per la correzione fenotipica della proteina CFTR (Progetto FFC#3/2004)

Alcuni aminoacidi neutri si comportano da "chemical chaperones", stabilizzano cioè le proteine cellulari, rallentandone la degradazione. Questa proprietà è di particolare interesse per la fibrosi cistica in quanto, nella maggior parte dei casi, la proteina mutata (mutazione ΔF508) non raggiunge la superficie cellulare, dove svolge la funzione di canale per il cloro, perché viene degradata rapidamente all'interno della cellula. Questo progetto ha valutato se aminoacidi neutri o loro derivati rallentino la degradazione di ΔF508CFTR, consentendone l'espressione sulla membrana cellulare e portando così ad una correzione funzionale o fenotipica del difetto. Sono stati utilizzati aminoacidi spontaneamente accumulati all'interno delle cellule e caratterizzati da una tossicità estremamente ridotta, proprietà importante ai fini di potenziali applicazioni terapeutiche. Gli aminoacidi sono stati aggiunti al mezzo di incubazione di cellule che esprimono la proteina mutata (C127 ΔF508CFTR) sia acutamente (da 1 a 4 giorni a concentrazioni da 10 a 30 mM) sia cronicamente (almeno 8 settimane ad una concentrazione di 1 mM). L'avvenuta correzione funzionale è stata valutata mediante: a) la comparsa di un efflusso di ^{36}Cl- cAMP-dipendente e b) l'analisi in Western Blot della proteina CFTR mediante visualizzazione

della forma "matura" glicosilata (banda C a più alto peso molecolare) e quella "immatura" non glicosilata (banda B a più basso peso molecolare). L'effetto correttivo dei composti è stato confrontato con l'effetto dell'incubazione a bassa temperatura (28°C), una condizione che promuove l'espressione di ΔF508CFTR. I risultati ottenuti hanno dimostrato che il trattamento acuto o cronico con taurina è in grado di provocare la comparsa di un efflusso di cloro di poco inferiore a quello osservato dopo trattamento a 28 °C. Tra i numerosi altri aminoacidi valutati, alcuni non si sono dimostrati efficaci mentre MeAIB, glutamina, glicina ed ipotaurina hanno prodotto una parziale correzione fenotipica, seppure a livelli più modesti della taurina. L'analisi di CFTR in Western Blot non ha comunque evidenziato la comparsa della banda C, indice di espressione della proteina matura sulla membrana, in nessuna condizione ad eccezione della bassa temperatura. Alla luce della minore sensibilità della tecnica Western Blot rispetto all'esperimento funzionale, questo risultato potrebbe indicare che la quantità di proteina "ripristinata" è molto modesta. Tuttavia, il discreto livello di ripristino funzionale ottenuto, associato alla assoluta mancanza di effetti tossici, inducono comunque a ritenere l'approccio utilizzato meritevole di ulteriori approfondimenti.



Luis Galietta (primo a destra) con il suo gruppo di ricerca

Pedemonte N. (1), Caputo A. (1), Caci E. (1), Sondo E. (1), Zegarra-Moran O. (1), Nieddu E. (2), Mazzei M. (2), Boido D. (3), Moran O. (3), Galietta L. J. V. (1)

1) Laboratorio di Genetica Molecolare, Istituto Giannina Gaslini, Genova

2) Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università di Genova

3) Istituto di Biofisica, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Genova

Identification, optimization, and validation of potentiators and correctors for the pharmacotherapy of cystic fibrosis.

Identificazione e ottimizzazione di composti chimici per la terapia farmacologica della fibrosi cistica. (Progetto FFC #3/2006)

Molte delle mutazioni responsabili della fibrosi cistica (FC) alterano il trasporto di cloruro nelle cellule epiteliali attraverso due tipi di meccanismi. Un tipo di mutazioni impedisce alla proteina CFTR di raggiungere la membrana plasmatica (difetto di "trafficking" o di maturazione). Un altro tipo riduce invece la capacita' della proteina CFTR di trasportare ioni cloruro (difetto di "gating" o di attività). La mutazione più frequente nei pazienti FC, la delezione della fenilalanina in posizione 508 (deltaF508), causa entrambi i difetti. Il nostro progetto si propone di identificare e ottimizzare composti chimici in grado di ripristinare la maturazione e l'attività della proteina CFTR mutata. La ricerca effettuata finora da vari gruppi di ricerca, compreso il nostro, ha portato alla scoperta di varie sostanze attive. Un gruppo di sostanze in particolare, le 1,4-diidropiridine, sono in grado di correggere il difetto di attività causato da vari tipi di mutazioni FC compreso deltaF508, G551D, G1349D e D1152H. Esse quindi rappresentano un interessante punto di partenza per la progettazione di nuovi farmaci per la correzione del difetto funzionale nella FC. Tuttavia le 1,4-diidropiridine sono attive anche sui canali del calcio voltaggio dipendenti e quindi potenzialmente in grado di generare effetti collaterali in vivo. Per esplorare la possibilità di generare 1,4-diidropiridine con alta selettività per la proteina CFTR, abbiamo valutato un pannello di sostanze composto da 330 nuove 1,4-diidropiridine. Tali molecole sono state saggiate sia sulla proteina CFTR mutata sia sui canali del calcio. Gli studi finora condotti hanno rivelato che, attraverso particolari modificazioni della struttura chimica di base, è possibile ottenere molecole molto efficaci sulla proteina CFTR e, al tempo stesso, inattive sui canali del calcio. Le informazioni

ottenute sulla correlazione tra struttura e attività delle 1,4-diidropiridine serviranno anche per la progettazione di nuove molecole, ottimizzate per quanto riguarda attività e selettività per la proteina CFTR mutata. A questo scopo verranno anche eseguite simulazioni al calcolatore dell'interazione delle 1,4-diidropiridine attive con un modello tridimensionale di una regione critica della proteina CFTR. In questo modo si pensa di identificare i gruppi della proteina coinvolti nell'interazione con la sostanza attivante e quindi di passare ad una possibile fase di progettazione razionale di nuovi composti attivi. Il perfezionamento dei composti attivi sulla proteina CFTR mutata costituisce un processo molto importante verso lo sviluppo di nuovi farmaci per la terapia farmacologica della FC.

Moran O., Martorana V., Cincin C., Ferrera L., Guida P. Monteverde M., Galletta L. J. V., Dimasi N. e Zegarra-Moran O.
Istituto di Biofisica CNR, Genova; Laboratorio Genetica Molecolare, Ist. G. Gaslini, Genova; Lab Medicina Molecolare, Ist. G. Gaslini, Genova; Ist. Biofisica CNR, Palermo).

Activators of the CFTR ionic transport: identification and molecular modelling of the binding sites. Functional and structural basis of the molecular mechanism of CFTR potentiators: towards therapeutic feasible molecules

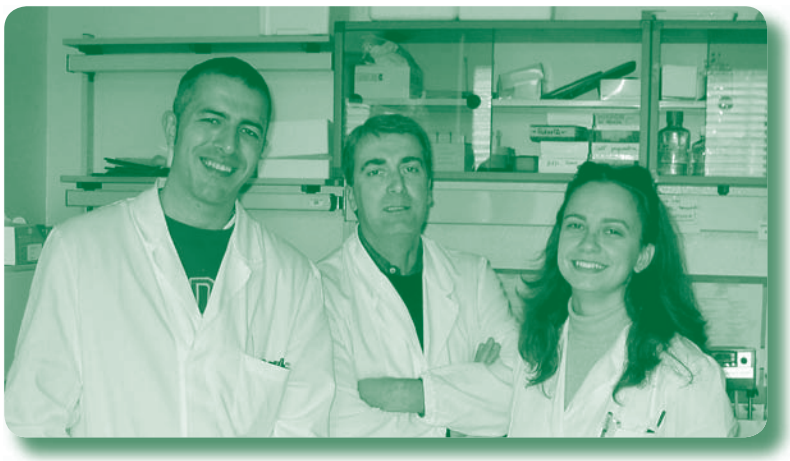
Identificazione dei siti d'unione dei potenziatori della CFTR e studio del loro meccanismo d'azione (Progetti: FFC #2/2003 e FFC #4/2006)

Oscar Moran

I potenziatori della CFTR sono molecole in grado di aumentare l'attività di trasporto del Cl^-, anche in presenza di mutazioni che alterano le proprietà funzionali della CFTR e danno luogo alla malattia. Queste molecole sono state proposte come punto di partenza per una possibile terapia farmacologica per la fibrosi cistica, ma il disegno di molecole più attive e specifiche è stato limitato dalla poca conoscenza della struttura e del meccanismo d'azione dei potenziatori. Dalla loro diversa efficacia nell'attivare la CFTR, quando questa presenta alcune mutazioni, abbiamo ipotizzato che i potenziatori si legano ad una regione chiamata dominio di legame dei nucleotidi (NBD). Utilizzando un modello molecolare dei due NBD costruito al calcolatore abbiamo previsto un comune sito di legame per vari potenziatori, localizzato nell'interfaccia tra i due NBD. Questa ipotesi è sostenuta dalla buona correlazione tra l'energia di legame dei potenziatori alla proteina calcolata sul modello e l'energia calcolata dai dati esperimentali e dall'alterazione delle proprietà di azione dei potenziatori in mutanti della CFTR, dove sono stati modificati residui che farebbero parte del sito di legame. Questi risultati ci hanno portato alla proposta secondo la quale il meccanismo molecolare d'azione dei potenziatori consisterebbe nella stabilizzazione dell'interazione tra i due NBD, che è correlata alla conformazione attiva della CFTR.

Nel progetto appena cominciato estenderemo lo studio sull'interazione tra la CFTR e gli potenziatori per formulare un modello d'azione che permetta un'analisi quantitativa delle correlazioni tra la struttura dei potenziatori e della loro azione. Inoltre proponiamo di studiare l'interazione tra i potenziatori e la proteina a livello atomico, mediante esperimenti mirati a raffinare i modelli molecolari teorici utilizzando tecniche di biologia strutturale. A questo scopo abbiamo messo a punto un protocollo per la produzione di NBD ricombinanti e stiamo procedendo a fare un'analisi biochimica e biofisica della loro interazione con i potenziatori nonchè a ottenere la loro purificazione per la determinazione della loro struttura per diffrazione a raggi-X.

La comprensione dei meccanismi di attivazione della CFTR da parte dei potenziatori, e la descrizione accurata del loro legame alla proteina, ci permetteranno di definire nuovi bersagli nello sviluppo di farmaci, in modo di poter migliorare il potenziale terapeutico degli attivatori della CFTR, e anche per progettare farmaci specifici per mutazioni individuali.



Marco Colombatti (al centro) con collaboratori

Colombatti M, Cabrini G, Dosio F
Dip.to Patologia, Università di Verona; Lab. Patologia Molecolare, Azienda Ospedaliera-Universitaria, Verona; Dip.to Scienze e Tecnologie del Farmaco, Università di Torino

Novel methods of intracellular delivery of DF508-CFTR correctors

Nuove strategie di trasporto intracellulare di farmaci per la correzione del fenotipo ΔF508-CFTR (Progetto FFC #1/2006)

Uno dei difetti genetici più frequenti nella fibrosi cistica è rappresentato dalla mutazione ΔF508 a carico del canale del cloro (CFTR). Tale mutazione implica un difetto nel funzionamento di CFTR che risulta meno disponibile alla superficie delle membrane cellulari e meno efficiente nel trasporto del cloro. Sono tuttavia allo studio delle molecole farmacologiche ("correttori") che possono facilitare il raggiungimento della membrana cellulare da parte di CFTR interferendo con i sistemi di controllo cellulare che distruggono le proteine difettose. I "correttori" tuttavia necessitano di alti dosaggi e sono in grado di correggere soltanto una piccola frazione di CFTR mutata. In una fase precedente della ricerca abbiamo dimostrato che è possibile legare chimicamente un "correttore" (desossispergualina, DSG) ad una proteina trasportatrice (albumina umana, HSA) ottenendo un reagente farmacologico dotato di maggiore stabilità, maggiore efficacia e funzionante solo se rilasciato all'interno della cellula. Con il progetto qui proposto intendiamo proseguire le nostre indagini identificando il percorso intracellulare di HSA-DSG ed il suo meccanismo d'azione. HSA verrà poi utilizzata come trasportatore di altri "correttori" per verificarne la loro applicabilità come componenti di coniugati proteina-"correttore". Come ulteriore evoluzione di questa strategia verranno utilizzate delle tossine, la cui attività tossica è stata abolita mediante mutazioni, ma che mantengono la capacità di essere direzionate in compartimenti sub-cellulari definiti (es. reticolo endoplasmico) successivamente all'internalizzazione. L'utilizzo di tossine disarmate coniugate con "correttori" potrebbe permettere di aumentare la selettività d'azione di alcune molecole in grado di correggere i difetti di traffico della proteina ΔF508-CFTR e al tempo stesso rappresentare un prototipo di intervento terapeutico per direzionare molecole nella cellula diminuendone così ulteriormente la tossicità generale nei pazienti con fibrosi cistica.

Emanuele Giordano (terzo da sinistra) con il suo gruppo

S. Furini^˙*, M. Govoni°˙*, E. Grandi^˙*, S. Severi^˙*, G. Alessandrini˙, P. Iorio∞, A. Miano∞, V. Mazzone˙*, C.M. Caldarera*; S. Cavalcanti^˙*, E. Giordano°˙*.
*^Dipartimento di Elettronica, Informatica e Sistemistica – UniBo; °Dipartimento di Biochimica "G. Moruzzi" – UniBo; ˙Laboratorio di Ingegneria Cellulare e Molecolare per lo Studio dei Bionanosistemi – UniBo (Campus di Cesena); ∞Azienda USL Cesena; *Istituto Nazionale per la Ricerca Cardiovascolare.*

Macrolides and ion transport across CFTR

Effetto degli antibiotici macrolidi sul trasporto ionico attraverso la proteina-canale CFTR. (Progetto FFC #2/2005)

Numerosi studi confermano che gli antibiotici macrolidi (p. es. eritromicina e azitromicina) producono un miglioramento della funzionalità polmonare nei pazienti con fibrosi cistica (CF). Sebbene sia evidente che ciò avvenga indipendentemente dalla loro azione antibatterica, i meccanismi molecolari sottostanti rimangono da chiarire. Un'ipotesi da valutare è la possibilità di un'interazione diretta con la conduttanza ionica del canale del cloro, in analogia al loro effetto sulla proteina che regola l'ingresso del potassio attraverso la membrana delle cellule muscolari cardiache, responsabile di un allungamento dell'intervallo QT dell'elettrocardiogramma (QT).

Lo studio sperimentale che abbiamo intrapreso per valutare questo parametro si è svolto utilizzando un duplice approccio. Da un lato, abbiamo valutato l'incidenza dell'allungamento del QT nei pazienti CF trattati e non trattati con azitromicina. La verifica clinica, effettuata presso il Centro Regionale Fibrosi Cistica dell'Ospedale "M. Bufalini" di Cesena, ha escluso differenze fra i gruppi studiati, rassicurando rispetto all'eventualità di potenziali effetti collaterali cardiaci del macrolide nei pazienti CF. Sul versante di laboratorio, sono stati ottenuti dati sperimentali, acquisiti tramite studi elettrofisiologici in *patch-clamp*, sui potenziali elettrici di membrana di cellule cardiache di ratto e sulla conduttanza del canale CFTR in un sistema di espressione eterologo (cellule C127; cortesia del Dr C. Seng, Genzyme Corp., Framingham, MA, USA e del Dr G. Cabrini, Centro Fibrosi Cistica, Verona). In entrambi i casi il macrolide utilizzato è stato l'eritromicina (stante l'indisponibilità della ditta licenziataria a concedere l'azitromicina). L'antibiotico ha prodotto un allungamento dose-dipendente del potenziale d'azione nei cardiomiociti, in accordo con quanto noto dalla letteratura. Nelle cellule C127, la corrente di cloro di membrana, specifica per CFTR, è risultata attivabile da forskolin e dBcAMP, che ne hanno provocato un graduale aumento fino a un valore stabile in circa 3 minuti. La caratteristica tensione-corrente successiva all'attivazione è risultata tipica di un canale voltaggio-indipendente con potenziale di inversione così come atteso per il canale CFTR nelle condizioni sperimentali utilizzate. La perfusione con eritromicina di cellule con canale CFTR attivato ha provocato una riduzione della corrente di membrana (bloccaggio) proporzionale alla concentrazione di antibiotico. I dati ottenuti mostrano quindi che l'eritromicina e' in grado di interagire con CFTR modulandone la conduttanza ionica, tuttavia escludono che l'azione clinica dell'antibiotico possa esplicarsi attraverso un aumento del flusso del cloro attraverso il canale. La concentrazione necessaria per bloccare metà del flusso ionico, prossima a 90 μM, è risultata di circa un ordine di grandezza superiore alle concentrazioni plasmatiche di picco verificate nei soggetti in terapia con eritromicina (10-15 μM), il che tranquillizza rispetto al potenziale rischio di un effetto negativo nei soggetti trattati. Allo stato attuale il nostro studio è riferito all'interazione fra farmaco e canale non-mutato. Non possiamo quindi escludere che il macrolide possa interagire in modo diverso con un canale mutato. Ci proponiamo quindi di estendere lo studio a cellule esprimenti il canale con la mutazione ΔF508, la più comune in corso di CF, completandolo con l'analisi mediante metodi computazionali dell'interazione farmaco-canale e dei suoi determinanti molecolari.

2. MICROBIOLOGIA DI BASE

Alessandra Bragonzi con due collaboratrici

Montanari S, Paroni B, Bragonzi A
Istituto Terapia Sperimentale CF,
Osp. San Raffaele,
Associazione Lombarda FC, Milano

Gene regulation and adaptative mutation of *Pseudomonas aeruginosa* in a chronic lung infection model for cystic fibrosis

Regolazione genica e mutazioni adattative di Pseudomonas aeruginosa in un modello murino ed in pazienti con fibrosi cistica (Progetto FFC #8/2003)

I pazienti FC acquisiscono *P. aeruginosa* prevalentemente dall'ambiente e rimangono colonizzati da linee clonali per molti anni. In queste linee clonali, varianti fenotipiche e genotipiche vengono generate per assicurare la sopravvivenza batterica alle condizioni ostili degli epiteli respiratori FC. L'adattamento batterico, supportato da meccanismi di regolazione genica e generazione di mutazioni adattative, ha quindi un ruolo fondamentale nello sviluppo di infezioni croniche in pazienti FC. Gli obbiettivi del progetto sono stati:

1) caratterizzare cambiamenti fenotipici di *P. aeruginosa* in condizioni di anaerobiosi simili a quelle del muco FC

2) caratterizzare varianti genetiche di *P. aeruginosa* isolate sequenzialmente da pazienti FC

3) valutare la patogenicità di varianti genetiche di *P. aeruginosa* in un modello animale murino di infezione cronica.

Utilizzando un approccio di microarray, 440 geni corrispondenti all'8% del genoma di *P. aeruginosa* sono risultati differenzialmente espressi in condizioni di anaerobiosi, ricreate *in vitro* e simili a quelle del muco di pazienti FC, rispetto a condizioni di aerobiosi caratteristiche dell'ambiente. Oltre a geni della virulenza già noti, altri 136 geni non risultano associati ad una funzione specifica. Questo risultato indica che condizioni specifiche imposte da un ospite FC giocano un ruolo fondamentale nel modulare l'espressione genica di *P. aeruginosa* e favorire processi di adattamento che coinvolgono numerosi fattori di virulenza, alcuni dei quali rimangono ancora da definire.

Per capire come il potenziale di virulenza di P. aeruginosa cambi durante l'adattamento abbiamo caratterizzato una collezione di ceppi clonali isolati alla prima colonizzazione e dopo anni di persistenza in pazienti FC. La collezione contiene varianti genetiche di *P. aeruginosa* che causano una diversa patogenicità del ceppo quando testato in un modello animale murino di infezione cronica. Ceppi clonali di *P. aeruginosa*, isolati in diverse fasi dell'infezione, sono risultati diversi nella capacità di sviluppare infezioni croniche. Nel complesso, ceppi isolati in una fase tardiva presentano una migliore capacità di persistenza ed un potenziale di virulenza ed invasività attenuato, caratteristico invece sia di ceppi isolati alla prima infezione che ambientali. Significative differenze sono state evidenziate anche in ceppi di *P. aeruginosa* clonali isolati alla stessa fase dell'infezione indicando la presenza di molteplici comunità batteriche coesistenti nel polmone FC, con diversi potenziali di virulenza e diverse suscettibilità a trattamenti antibatterici.

Bragonzi A.(1), Bertoni G. (2), Scarselli M. (3)
(1) Institute for Experimental Treatment of Cystic Fibrosis, Scientific Institute H.S.Raffaele, Associazione Lombarda FC; (2) Dipartimento di Scienze Biomolecolari e Biotecnologie Università degli Studi di Milano; (3) Bioinformatic Unit, Chiron Vaccines Research Centre - Siena

A genome-wide approach to the identification of novel targets for immuno-antibacterials in *Pseudomonas aeruginosa*

Analisi del genoma di Pseudomonas aeruginosa per l'identificazione di bersagli utili per lo sviluppo di una nuova terapia immunitaria (Progetto FFC #8/2006)

Nonostante il recente sviluppo di nuove terapie antibiotiche e immunitarie, nessuna strategia di intervento è, ad oggi, risolutiva nell'eradicazione di *P. aeruginosa* in pazienti FC. Nuove acquisizioni sulla patogenesi delle infezioni polmonari da *P. aeruginosa* indicano come il batterio cambi rapidamente il suo fenotipo in relazione alle condizioni dell'ospite FC modificando notevolmente i bersagli accessibili dalle terapie antibatteriche. Lo sviluppo futuro di nuove terapie antibatteriche, mirate a bersagli batterici sensibili ed accessibili, è quindi strettamente dipendente dall' identificazione di processi adattativi che abbiano un ruolo chiave nello sviluppo di infezioni croniche.
Recentemente il progresso scientifico fatto in campo della genomica e bioinformatica ha aperto la strada per uno screening genetico su larga scala, fornendo gli strumenti necessari per nuovi studi verso l'identificazione di nuove funzioni geniche e lo sviluppo di terapie più efficaci. Usando una combinazione di nuovi approcci (microarray, analisi in silico e librerie di mutanti), screeneremo l'intero genoma di *P. aeruginosa* per identificare nuove funzioni batteriche con un alto potenziale immunogenico. Queste funzioni batteriche devono possedere i seguenti requisiti: 1) essere espresse durante il processo dell'infezione; 2) presenti in un vasto numero di ceppi e 3) esposte sulla membrana cellulare. Questo approccio sarà utile nel disegnare nuove strategie di intervento e trattamenti terapeutici in pazienti con FC.

Bertoni G, Bragonzi A, Milani A, Renzi F
Dipartimento di Scienze Biomolecolari e Biotecnologie, Università degli Studi di Milano; Ist. terapia Sperimentale Fibrosi Cistica, Osp. S. Raffaele, Milano

Genome – wide identification of target genes for the design of non – conventional antibiotics against CF related pathogens

Identificazione su tutto il genoma di geni target per disegnare antibiotici non convenzionali contro i patogeni correlati alla fibrosi cistica (Progetto FFC #10/2004, e progetto FFC #6/2006)

Giovanni Bertoni (al centro) con collaboratori

L'ostacolo maggiore per il trattamento delle infezioni batteriche è costituito dall'insorgenza di resistenza anche multipla agli antibiotici. Infatti 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. Per svolgere la loro funzione di agenti antibatterici, gli antibiotici interferiscono generalmente con funzioni che sono essenziali per la vita del batterio. Gli antibiotici attualmente disponibili hanno come bersaglio solamente una quindicina delle circa trecento funzioni che sono state stimate essere essenziali per la sopravvivenza di un batterio. Dato l'ampio numero di potenziali bersagli, esiste quindi, almeno sulla carta, un buon margine d'azione per lo sviluppo di nuove generazioni di antibiotici. Tuttavia la stragande maggioranza di queste presunte funzioni essenziali deve essere ancora identificata e

caratterizzata e questo è sicuramente un fattore limitante per lo sviluppo di nuovi antibiotici. Nell'ambito di un progetto finanziato dalla Fondazione e iniziato nel 2004, abbiamo utilizzato una tecnologia genomica innovativa che si basa sull'interferenza dell'espressione genica mediata da RNA antisenso, con il proposito di identificare il maggior numero di funzioni essenziali di *Pseudomonas aeruginosa*, il batterio patogeno opportunista più rilevante per i malati di fibrosi cistica. Abbiamo scelto questo approccio per la sua versatilità. Infatti, oltre a permettere l'identificazione di molti bersagli contro cui sviluppare nuovi antibiotici convenzionali, questa tecnologia permette anche di ottenere in modo immediato informazioni per lo sviluppo contro gli stessi target di molecole antibiotiche non convezionali ed innovative. Con questo screening abbiamo identificato alcune regioni genomiche che con buona probabilità contengono geni che codificano funzioni essenziali ancora sconosciute di *P. aeruginosa*. Gli obbiettivi futuri di questo progetto saranno di confermare la caratteristica di essenzialità di queste funzioni e di caratterizzarle. Inoltre è nostra intenzione proseguire nell'attività di screening genomico per potere ampliare ulteriormente l'identificazione di nuovi bersagli.

Vittorio Venturi

Venturi V.
Bacteriology Group, International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, Area Science Park, Padriciano Trieste

Studies of the Quorum Sensing Systems of *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* complex

Studi dei sistemi di Quorum Sensing di Pseudomonas aeruginosa e Burkholderia cepacia complex (Progetto FFC#9/2005)

Il lavoro di ricerca del nostro gruppo si focalizza sul sistema di quorum sensing di diversi microorganismi fra cui membri del genere *Burkholderia e Pseudomona*s. I generi *Burkholderia e Pseudomonas* comprendono batteri ambientali capaci di colonizzare sia tessuti vegetali che animali, e la loro importanza come patogeni opportunisti nelle infezioni nosocomiali, in particolare per i pazienti affetti da fibrosi cistica, sta crescendo rapidamente sia per numero di casi sia per varietà delle specie. Da campioni clinici sono stati individuati molti membri del *Burkholderia cepacia* complex e anche di altre specie come *B. glumae e B. gladioli:* questi ultimi sono anche importanti patogeni del riso. Negli ultimi anni è apparso sempre più 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, che li rende più aggressivi, dannosi e difficili da estirpare in caso di infezione. Il sistema di regolazione necessario per ottenere questa coordinazione si chiama Quorum Sensing (QS). Il progetto di ricerca condotto nel nostro laboratorio sta studiando intensamente il sistema QS in *P. aeruginosa, B. plantarii, B. gladioli, B. cepacia* e *B. glumae* ed in particolare è stata messa a confronto l'importanza dei geni QS nella regolazione della patogenicità di due ceppi di *B. glumae*: uno di origine ambientale ed uno di origine clinica attraverso l'uso di un modello vegetale (riso). Risultati preliminari conferiscono un ruolo molto importante dei geni QS nella patogenicità nel riso del ceppo clinico. E' stato inoltre caratterizzato il sistema QS di *B. plantarii,* che è risultato identico al sistema presente in *B. glumae* e 75% simile a quello di *B. cepacia* ed e' coinvolto nella patogenicità del riso. Altro risultato importante, raggiunto grazie alla collaborazione con il laboratorio della dr. Livia Leoni dell'Università di Roma

Tre, è stata l'identificazione del ruolo sostenuto dalla proteina RsaL in *P. aeruginosa.* Questa proteina si è dimostrata capace di legare il DNA del promotore del gene lasI, responsabile per la sintesi delle molecole segnale coinvolte nella comunicazione QS, reprimendone la trascrizione fino al raggiungimento di una certa densità cellulare. RsaL dunque è un regolatore molto importate del QS in *P. aerugionosa* determinando la tempistica della sua attivazione. I risultati ottenuti finora sono stati in parte pubblicati ed altri lo saranno a breve.

Landini P. °, Bernardi A. *, Senesi P. ^
*° Dept. of Biomolecular Sciences and Biotechnology, University of Milan; * ^Dept. of Organic and Industrial Chemistry, University of Milan;*

Counteracting Pseudomonas aeruginosa biofilm formation by inhibition of novel targets: regulation of the levels of the di-cyclic-GMP signal molecule

Inibizione della formazione di biofilm da parte di Pseudomonas aeruginosa tramite inibitori della molecola segnale GMP-diciclico (c-di-GMP) (Progetto FFC #9/2006)

Paolo Landini (secondo da sinistra) con il suo gruppo

Nei pazienti con fibrosi cistica (pazienti CF), l'infezione batterica delle vie respiratorie provoca frequentemente forme molto gravi di polmonite. Queste infezioni sono causate in genere da comunità batteriche dette biofilm, in cui il patogeno opportunista *Pseudomonas aeruginosa* ha un ruolo dominante. Le particolari proprietà fisiologiche dei biofilm batterici li rendono tolleranti al trattamento con antibiotici, così da renderne difficile l'eliminazione anche dopo trattamenti prolungati nel tempo. Una caratteristica peculiare dei biofilm batterici è la produzione di una matrice extracellulare, costituita prevalentemente da polisaccaridi, che avvolge le cellule microbiche. Recentemente è stato dimostrato che in molti batteri la produzione di polisaccaridi extracellulari e la formazione di biofilm dipendono dalla concentrazione intracellulare di una particolare molecola segnale, detta GMP-diciclico (c-di-GMP). La concentrazione di questa molecola nelle cellule batteriche è regolata da enzimi cellulari responsabili della sua sintesi o degradazione. Ad alte concentrazioni, il c-di-GMP si lega in maniera specifica a proteine coinvolte nella sintesi di polisaccaridi extracellulari stimolandone l'attività. Mentre il c-di-GMP sembra essere molto conservato tra i batteri, è totalmente assente nelle cellule degli eucarioti superiori. Quindi, gli enzimi coinvolti nel metabolismo di questa molecola possono rappresentare un bersaglio importante per il controllo dello sviluppo dei biofilm batterici. Un inibitore delle proteine coinvolte nel metabolismo del c-di-GMP con proprietà anti-biofilm potrebbe rivelarsi uno strumento molto efficace nella terapia delle infezioni respiratorie in pazienti CF, particolarmente se usati in combinazione con antibiotici ad azione battericida. In questa proposta, abbiamo delineato una semplice strategia per identificare composti chimici in grado di inibire gli enzimi coinvolti nel metabolismo del c-di-GMP e di esercitare un'attività di eliminazione del biofilm batterico. Composti così identificati verranno studiati tramite analisi computazionale e sottoposti a modificazioni chimiche per migliorarne le proprietà antibiofilm e/o antimicrobiche. Il nostro scopo è lo sviluppo di inibitori della formazione del biofilm che possano essere usati per la prevenzione e la cura di polmoniti croniche in pazienti CF.

Bianca Colonna (seconda da inistra) con il gruppo di ricerca

Colonna B. , Sanguinetti M., M. Nicoletti M. , Casalino M. , Fiscarelli E.
Dip.Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Univ. Roma La Sapienza;
Lab. di Microbiologia Molecolare, Roma;
Institute of Microbiology-Catholic University of Sacred Heart;
Dip. Scienze di Sanità Pubblica, Università "La Sapienza", Roma;
Department of Biology - University Roma 3;
Ospedale Pediatrico "Bambin Gesù"- Roma

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

Stenotrophomonas maltophilia, un patogeno emergente nei malati di fibrosi cistica: identificazione e caratterizzazione molecolare dei determinanti di virulenza come potenziali bersagli per una nuova strategia antimicrobica. (Progetto FFC #7/2005)

Stenotrophomonas maltophilia è un batterio Gram negativo aerobio obbligato, generalmente isolato nell'ambiente a temperature comprese tra 20 e 25°C.

Negli ultimi anni, anche in conseguenza dell'esposizione a terapie antibiotiche ripetute, *S. maltophilia* si è affermato come patogeno emergente nell'ambito nosocomiale, essendo isolato con frequenza sempre maggiore dall'apparato respiratorio dei pazienti affetti da fibrosi cistica. A causa della multiresistenza mostrata verso la maggior parte degli antibiotici ad ampio spettro, le infezioni causate da *S. maltophilia* risultano difficili da eradicare. Poche sono le informazioni relative ai fattori di virulenza codificati da *S.maltophilia* e alle proteine espresse dal microrganismo appena entrato in contatto con l'ospite.

È noto che, per molti microrganismi patogeni, la variazione di temperatura tra l'ambiente esterno e l'ospite riveste un ruolo fondamentale nell'attivazione dei fattori di virulenza responsabili del processo di infezione. Una volta nell'ospite *S. maltophilia* tende inoltre, in analogia con altri patogeni coinvolti nella colonizzazione delle vie aeree dei pazienti CF, a formare strutture di tipo biofilm. Con il nostro progetto di ricerca ci proponiamo di identificare quali siano i geni di *S.maltophilia* espressi in quelle condizioni che mimino il più possibile l'ambiente polmonare dell'ospite , sia da un punto di vista della temperatura che dello stato di aggregazione.

In questo primo anno abbiamo avviato diverse linee di ricerche nel tentativo di comprendere "a tutto campo" le varie strategie utilizzate da questo microrganismo per incrementare ed esprimere il suo potenziale patogenico e per eludere le difese dell'ospite. Allo scopo di valutare i cambiamenti dell'espressione genica indotta dalla variazione di temperatura, abbiamo ottenuto la prima mappa bidimensionale di un ceppo clinico di *S. maltophilia* su cui è stata effettuata l'analisi delle proteine totali (proteoma) alle temperature di 26°C e 37°C. I risultati ottenuti ci hanno permesso di evidenziare un gruppo di proteine espresse selettivamente alla temperatura dell'ospite sulle quali ci proponiamo di incentrare lo studio per comprenderne il loro ruolo nella virulenza. L'analisi comparativa del proteoma di *S. maltophilia* riveste fondamentale importanza per far luce sull'interazione ospite-microrganismo ed, in particolare, per identificare geni di virulenza quali potenziali bersagli per nuove terapie antimicrobiche.

Buroni S., Riccardi G., Valvano M.
Department of Genetics and Microbiology, Università di Pavia; Department of Microbiology and Immunology, University of Western Ontario, Canada

The role of RND drug efflux transporters in the intrinsic antibiotic resistance of *Burkholderia cenocepacia*

Ruolo delle pompe di efflusso RND di Burkholderia cenocepacia nella resistenza intrinseca agli antibiotici (FFC#10/2006)

Giovanna Riccardi (prima a sinistra in alto) con le sue collaboratrici

Burkholderia cenocepacia è un microrganismo Gram-negativo appartenente ad un gruppo di batteri geneticamente distinti, ma fenotipicamente simili, il *Burkholderia cepacia* complex. Può essere isolato da diversi ambienti quali suolo e acqua, ma può costituire un importante patogeno opportunista che colonizza le vie aeree dei pazienti affetti da fibrosi cistica. L'eradicazione dell'infezione è ostacolata dalla resistenza intrinseca di questo microrganismo a diversi antibiotici. I meccanismi responsabili della resistenza in isolati clinici di batteri Gram-negativi, quali *Pseudomonas aeruginosa*, comprendono i sistemi di efflusso RND che espellono dalla cellula diversi farmaci.

Nell'ambito di un progetto finanziato dalla Fondazione Italiana per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica (FFC#12/2004) abbiamo precedentemente identificato 14 geni *rnd* codificanti ipotetiche pompe di efflusso nel ceppo clinico *B. cenocepacia* J2315. 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. Nelle condizioni di crescita da noi utilizzate, abbiamo dimostrato che alcuni complessi RND sono costitutivamente espressi in *B. cenocepacia* J2315, ma ad oggi, non è ancora completamente chiaro se questi geni contribuiscano alla resistenza intrinseca in questo microrganismo. Un metodo alternativo, per testare il ruolo dei complessi RND nella resistenza agli antibiotici già utilizzato in altri batteri Gram-negativi per lo studio del ruolo svolto da questi trasportatori, si basa sull'inattivazione del gene di interesse tramite esperimenti di knock-out e sull'analisi della resistenza ai farmaci del ceppo inattivato.

I nostri obiettivi futuri comprendono l'inattivazione di 3 dei 14 geni *rnd (orf3, orf11 e orf13)* in *B. cenocepacia* K56-2 identificati in precedenza. La valutazione delle minime concentrazioni inibenti dei ceppi inattivati per diversi composti con attività antibatterica ci permetterà di attribuire un ruolo ai geni inattivati nella resistenza a uno o più antibiotici. Inoltre, saranno condotti esperimenti di uptake/efflusso dei farmaci per caratterizzare i mutanti e il ceppo wild-type. Questa ricerca sarà condotta in stretta collaborazione con il Prof. Miguel Valvano dell'University of Western Ontario (Canada).

I risultati di questa ricerca porteranno ad una migliore comprensione dei determinanti genetici, che svolgono un ruolo nella resistenza agli antibiotici, favorendo lo sviluppo di nuove strategie per il trattamento di infezioni da *B. cenocepacia* multi-resistenti ai farmaci in pazienti con fibrosi cistica.

Annamaria Bevivino

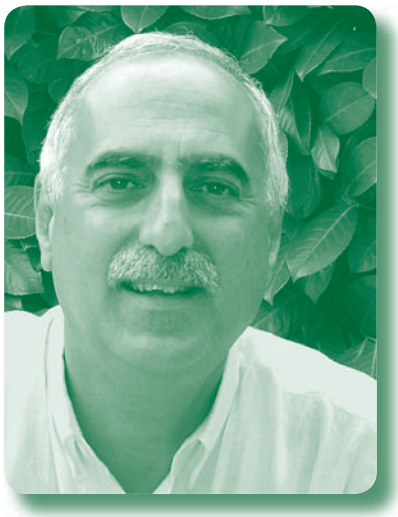
Bevivino A, Ascenzioni F, Bragonzi A
ENEA C.R. Casaccia, Dip. di Biotecnologie, Roma; Università La Sapienza, Dip.to Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Roma; Istituto Trattamento Sperimentale della Fibrosi Cistica, Ospedale San Raffaele, Associazione Lombarda FC, Milano

Influence of *Pseudomonas aeruginosa* and CF host on *Burkholderia cenocepacia* pathogenicity

Influenza di Pseudomonas aeruginosa e dell'ospite FC sulla patogenicità di Burkholderia cenocepacia (Progetto FFC #7/2006)

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, principale patogeno per i pazienti FC. Tra le nove specie incluse nel Bcc, *Burkholderia cenocepacia* rappresenta un notevole problema nei pazienti FC. L'infezione ai polmoni causata da *B. cenocepacia* determina spesso un drastico aggravamento del quadro clinico, difficilmente curabile per l'elevata resistenza batterica ad una vasta gamma di antibiotici, che spesso sfocia in una broncopneumopatia acuta fatale, nota come "cepacia syndrome". I meccanismi di patogenicità di *B. cenocepacia* sono scarsamente conosciuti. Ceppi di *B. cenocepacia* sono stati anche isolati in diversi habitat naturali, quali la rizosfera di piante di interesse agronomico, dove *B. cenocepacia* rappresenta una delle specie predominanti. Attualmente è ampiamente riconosciuto che l'ambiente possa rappresentare una riserva di patogeni opportunisti. Pertanto, diventa sempre più importante valutare la patogenicità sia di ceppi ambientali che clinici di *B. cenocepacia* e determinare se *P. aeruginosa* possa aumentare in modo sinergico il loro potenziale di virulenza.

In un precedente progetto (Progetto n° FFC #11/2004), abbiamo esaminato la patogenicità di un pannello di ceppi ambientali e clinici appartenenti alla specie *B. cenocepacia*. I risultati ottenuti ci hanno portato a concludere che i ceppi ambientali, sebbene in misura minore rispetto ai ceppi clinici, posseggono tratti correlati alla virulenza e patogenicità, sono in grado di essere internalizzati da cellule FC dell'epitelio polmonare e di stabilire delle infezioni croniche nel tessuto polmonare murino. Nella presente proposta di ricerca vogliamo analizzare: 1) l'influenza di *P. aeruginosa* sul potenziale patogeno di ceppi ambientali e clinici di *B. cenocepacia*, usando modelli sperimentali in vitro e in vivo; 2) l'influenza dell'ospite FC sulla patogenicità di *B. cenocepacia*, valutando i cambiamenti del potenziale patogeno di un ceppo ambientale di *B. cenocepacia*, in seguito a successivi passaggi in topi FC, e determinando la variazione del profilo dell'espressione genica nel corso dell'infezione cellulare in modelli FC e non FC.



Roberto Rizzo

Rizzo R, Molinaro A, Tonin EA
Univ. di Trieste e Univ. di Napoli,
Dip. di Biochimica, Biofisica e Chimica delle Macromolecole

A Structure-function investigation of exopolysaccharides and lipopolysaccharides produced by clinical strains of the *Burkholderia cepacia* complex and of their interaction with antimicrobial peptides of the host innate immune system.

Studio delle relazioni struttura-funzione in esopolisaccaridi e lipopolisaccaridi prodotti da ceppi clinici appartenenti al complesso della Burkholderia cepacia (Progetto FFC #11/2006)

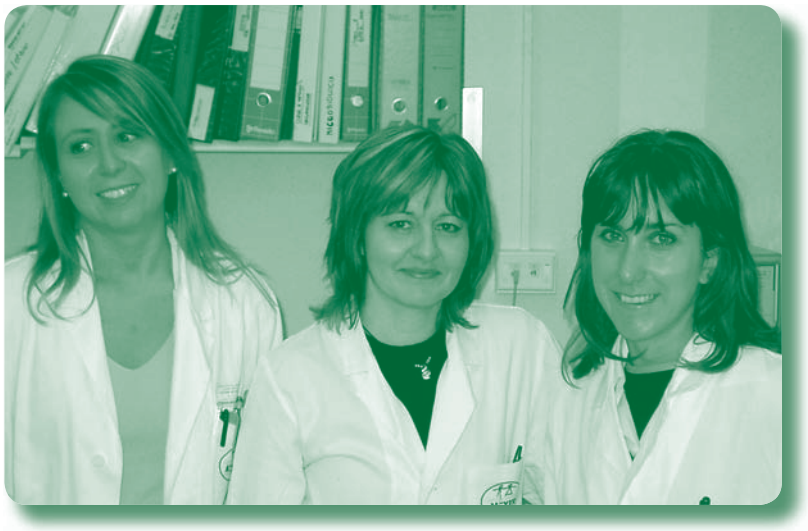
Lipopolisaccaridi (LPS) ed esopolisaccaridi (EPS) sono importanti fattori implicati nell'instaurarsi e nella persistenza d'infezioni batteriche poiché capaci di interferire con il sistema immunitario dell'ospite sia innato che specifico. La conoscenza dettagliata della loro struttura è il primo passo per la comprensione delle relazioni struttura-funzione. Ceppi clinici del complesso della *Burkholderia cepacia* producono quattro EPS diversi, di cui uno predominante. Di questi EPS è stata studiata la struttura, ma non lo schema di sostituzione con acetili, per i quali è stata ipotizzata l'importanza nell'interazione tra EPS e sistema immunitario. Riguardo gli LPS, è nota la struttura degli LPS prodotti da ceppi di *B. cenocepacia*, ma nulla si sa su *B. cepacia* e *B. multivorans*. Infine, sono disponibili solo poche informazioni sul cluster di geni coinvolti nella sintesi degli EPS in ceppi del complesso B.C.

L'obiettivo del progetto consiste nella determinazione della struttura dettagliata di EPS e LPS prodotti da ceppi di *B. cepacia, B. multivorans* e *B. cenocepacia*. Saranno quindi chiarite meglio le proprietà conformazionali del principale EPS prodotto da ceppi clinici per definire le sue capacità aggreganti che contribuiscono alla

formazione di biofilm. Infine, continuerà lo studio della struttura del cluster di geni coinvolto nella biosintesi di EPS, allo scopo di chiarire i meccanismi che determinano l'espressione del fenotipo mucoide da parte di alcuni stipiti di isolamento clinico.
Gli studi sulla struttura di LPS saranno eseguiti presso il Dip. di Chimica Organica e Biochimica dell'Univ. di Napoli (resp. Prof. Molinaro), quelli sulla struttura e le proprietà conformazionali di EPS saranno condotti presso il Dip. di Biochimica, Biofisica e Chimica delle Macromolecole dell'Univ. di Trieste (resp. Prof. Rizzo) e lo studio del cluster di geni verrà eseguito presso il Dip. di Scienze Biomediche dell'Univ. di Trieste (resp. Prof. Tonin).
I risultati attesi consistono nella definizione della struttura di EPS ed LPS dei tre ceppi di rilevanza clinica che possano dare informazioni sul loro ruolo come fattori di persistenza delle infezioni polmonari; nella definizione delle caratteristiche conformazionali dell'EPS prodotto in maggiore quantità da ceppi clinici per capire il suo ruolo nella formazione di biofilm; ed infine nella definizione della struttura del cluster di geni coinvolti nella sintesi di EPS.

3. MICROBIOLOGIA CLINICA

Campana S, Ratclif L, Cariani L, Del Pezzo M, Raia V, Favari F, Negri A, Gagliardini R, Gioffrè F, Scuteri D, Cocchi P.
Cystic Fibrosis Centre, Department Of Pediatrics, Meyer Hospital, Florence; U. O. of Pediatrics, Local CF Unit of Cerignola Hospital; Microbiology Laboratory, C.F. Regional Reference Centre of Lombardia; Microbiology Functional Area , University of Naples "Federico II; Department of Pediatrics, Cystic Fibrosis Centre, University of Naples; Microbiology Local Unit, Hospital "Civile Maggiore" of Verona; Medical Pediatrics Unit, Hospital of Livorno; CF Centre of Ancona Hospital; Clinical Laboratory, Soverato Hospital



Silvia Campana (al centro) con due collaboratrici

Community-acquired MRSA and hospital-acquired MRSA in cystic fibrosis patients: comparison with isolates from the environment and other clinica e origins in Europe

Staphylococcus aureus meticillino-resistente (MRSA) di acquisizione comunitaria (CA-MRSA) e ospedaliera (HA-MRSA) in pazienti affetti da fibrosi cistica: studio multicentrico su suscettibilità antibiotica, epidemiologia, storia naturale e rilevanza clinica. (Progetto FFC6#2005 e Progetto FFC#12/2006)

La frequenza degli isolamenti di *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA), un tipo di *Staphylococcus aures* che, a causa dell'acquisizione di un particolare frammento genico, *(mecA)* mostra un' alta resistenza ai trattamenti farmacologici, è aumentata in pazienti con infezioni ospedaliere e anche nei pazienti con fibrosi cistica (FC). La colonizzazione con MRSA può peggiorare le

condizioni cliniche, incrementare la necessità di terapia antibiotica e peggiorare la funzionalità polmonare. L'acquisizione di MRSA è stata per la prima volta documentata in pazienti ospedalizzati ma sono state recentemente descritte, con frequenza crescente, infezioni al di fuori dell'ambiente ospedaliero. I ceppi responsabili di infezioni ospedaliere, detti hospital acquired MRSA (HA-MRSA) sono caratterizzati da una alta resistenza a tutti gli agenti antimicrobici, mentre i ceppi acquisiti al di fuori dell'ambiente ospedaliero, detti di acquisizione comunitaria (CA-MRSA) sono in genere resistenti solo ai beta-lattamici, possono però essere altamente trasmissibili e virulenti a causa della produzione di una tossina detta Panton Valentin Leucocidina (PVL). I CA-MRSA sono stati recentemente segnalati quali responsabili di epidemie serie anche in alcuni reparti ospedalieri particolarmente a rischio. A livello molecolare, le differenze fra HA-MRSA e CA-MRSA sono dovute al fatto che il gene *mecA* è strutturalmente diverso nei due gruppi, si parla infatti di diversi tipi (detti cassette) del gene *mecA* (*SCCmec*) caratteristici per HA-MRSA o CA-MRSA.

La scarsità di dati in letteratura riguardo alla diffusione e all'epidemiologia di MRSA in pazienti FC ha spinto a promuovere uno studio multicentrico che coinvolge nove Centri FC di tutta Italia con lo scopo di valutare la sensibilità agli antibiotici, di studiare le caratteristiche molecolari dell' elemento genetico *SCCmec* e la rilevanza clinica dell'infezione da MRSA sul quadro clinico di pazienti FC.

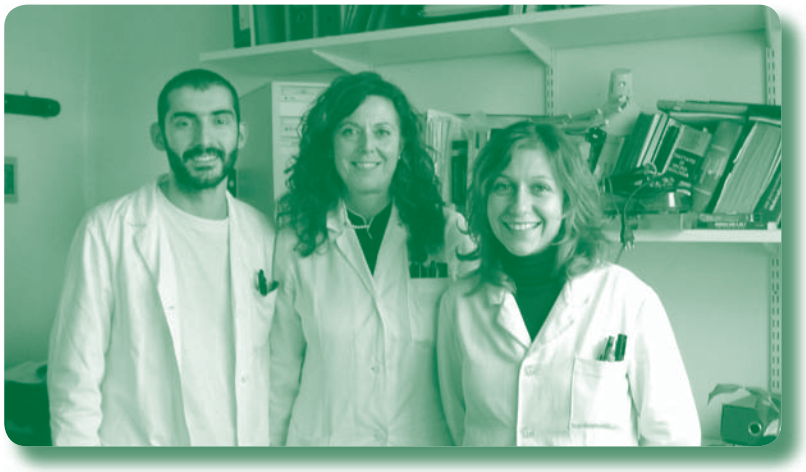
Nel corso del primo anno del progetto sono stati isolati 181 ceppi di MRSA isolati da 2362 (7,6%) pazienti che afferiscono ai centri coinvolti. Il profilo di suscettibilità agli antibiotici ha dimostrato sensibilità totale degli isolati nei confronti di linezolid, vancomicina e teicoplanina, tale profilo di sensibilità è in genere caratteristico degli CA-MRSA. Lo studio epidemiologico (condotto con tipizzazione genetica intraspecifica) ha identificato un unico clone rappresentato da 31 ceppi diffuso in 6 dei nove centri partecipanti allo studio, anche il pattern di sensibilità di tale clone è compatibile con CA-MRSA.

Un approccio preliminare allo studio della tipologia della cassetta *SCCmec*, condotto con amplificazioni *via*-PCR di specifiche porzioni del gene, ha dimostrato che dei 31 ceppi che rappresentano il clone epidemico, 24 sono caratterizzati da una cassetta *SCCmec* di tipo IV. La tipologia di cassetta SCCmec di tipo IV è caratteristica di CA-MRSA, dimostrando per la prima volta l'isolamento di ceppi CA-MRSA con caratteristiche epidemiche da pazienti FC ritenuti invece a rischio, date le frequenti ospedalizzazioni, per l'acquisizione di HA-MRSA.

Il presente studio policentrico consente di approfondire le conoscenze su MRSA, un patogeno il cui significato clinico nella FC è conosciuto solo parzialmente nonostante la frequenza degli isolamenti sia in aumento. La valutazione della prevalenza di MRSA su un ampio numero di pazienti FC e lo studio della sensibilità ai farmaci degli isolati batterici fornisce indicazioni per la strategia terapeutica da adottare. La caratterizzazione molecolare del tipo di cassetta *SCCmec* e la relazione clonale fra i ceppi forniscono importanti informazioni epidemiologiche sulla modalità di trasmissione delle infezioni da MRSA. Il progetto prevede inoltre di correlare la tipologia della cassetta *SCCmec* posseduta dagli isolati con la trasmissibilità, la virulenza (produzione di PVL), il profilo di chemiosensibilità e l'impatto clinico di tali infezioni sul paziente.

Tali conoscenze possono consentire di migliorare la prevenzione e limitare la diffusione, nei pazienti FC, delle infezioni dovute a questo importante patogeno emergente.

Graziana Manno (al centro) con collaboratori di ricerca



Manno G, Biassoni R, Debbia EA, Sangiuolo A.
University Department of Paediatrics, Laboratory for Cystic Fibrosis Microbiology; G.Gaslini Research Institute-Children's Hospital; Molecular Medicine Laboratory - G.Gaslini Children' Hospital; DISCAT Sezione di Microbiologia "C.A. Romanzi", Genova; ARPAL (Agenzia Regionale Protezione Ambiente Ligure) Dipartimento Provinciale di Genova

Genetic fingerprinting of *Pseudomonas aeruginosa* (PA) isolates from Italian cystic fibrosis (FC) patients: comparison with isolates from the environment and other clinical origins in Europe.

Tipizzazione molecolare di ceppi di Pseudomonas aeruginosa isolati da pazienti italiani FC e loro comparazione con profili presenti nel "database europeo" di ceppi clinici e ambientali (Progetto FFC #8/2005)

In questo studio è stata determinata l'epidemiologia molecolare di PA in alcuni Centri italiani FC, al fine di documentare la presenza di ceppi epidemici e/o altamente trasmissibili, e/o ceppi responsabili di infezioni crociate. Presso l'Ospedale Gaslini di Genova, è stata allestita una collezione di 340 ceppi di PA provenienti da 170 pz in cura presso 4 centri FC (Ancona, Cerignola, Genova e Soverato) scelti perché dislocati in aree geografiche diverse. Il fingerprinting molecolare è stato eseguito mediante BOX-PCR e i profili ottenuti sono stati analizzati e comparati mediante software "Gel Compar II". E' stato definito "cluster" un gruppo di pz colonizzati da PA con genotipo identico. I centri coinvolti sono stati siglati con le lettere A, B, C e D. Dall'analisi genetica è risultato che nel centro A circolano15 genotipi di PA diversi e il 90% dei pz ha un unico genotipo; nel centro B vi sono 14 genotipi, l'82% dei pz ha un unico genotipo; nel centro C sono presenti 12 genotipi e il 60% dei pz ha un unico genotipo; infine nel centro D vi sono 138 genotipi e il 72% dei pz ha un unico genotipo. I pz con genotipo di PA peculiare, cioè non condiviso con altri, sono stati 50% nel centro A, 9% in B, 47% in C e 55% in D; viceversa i pz colonizzati da PA ed appartenenti ad un cluster, sono stati: 50% nel centro A, 91% in B, 53% in C e 45% in D. Tuttavia i cluster individuati variano da gruppi di 2 ad un massimo di 5 pz. Dall'analisi incrociata di tutti i genotipi ottenuti, si è osservato che 3 ceppi ritrovati rispettivamente in 3 pz del centro A mostravano genotipi identici con 3 ceppi ritrovati in 2 pz del centro C. Dai risultati di questo studio si può escludere la presenza di PA epidemici circolanti nei centri FC italiani studiati. All'interno dei centri esaminati è risultato tuttavia elevato il numero di pz (cluster) con genotipo condiviso, indice di una possibile infezione crociata, anche se limitata a piccoli gruppi di pz. Nessun genotipo di PA italiano ha mostrato correlazione con il genotipo di ceppi epidemici europei analizzato (Clone C, Manchester e Liverpool). Inoltre dall'analisi di 35 ceppi ambientali non si è riscontrata nessuna similarità con i genotipi di PA FC esaminati. Questi risultati suggeriscono che l'acquisizione di PA nei pz FC studiati avviene in maniera significativa tramite infezione crociata, si sottolinea quindi la necessità di un'attenta osservanza delle raccomandazioni per la prevenzione ed il controllo delle infezioni da PA in FC.

Neri AS, Rossolini GM
Regional Centre of Cystic Fibrosis, Department of Pediatrics, Meyer Hospital, Firenze; University of Siena, Policlinico "Santa Maria Alle Scotte", Department of Molecular Biology, Laboratory of Microbial Physiology and Biotechnology

Longitudinal study of *Pseudomonas aeruginosa* resistance: selection and evolution of resistance mechanisms in relation to antibiotic treatment in cystic fibrosis patients

Studio longitudinale sulla selezione ed evoluzione dei meccanismi di resistenza di Pseudomonas aeruginosa in relazione al trattamento antibiotico in pazienti con fibrosi cistica (Progetto FCC #14/2006)

Anna Silvia Neri (terza da sinistra) con collaboratori e il partner di ricerca Rossolini

P. aeruginosa è il più importante patogeno opportunista nei pazienti affetti da Fibrosi Cistica (FC). I progressi registrati nella terapia antimicrobica per il trattamento delle infezioni polmonari nei soggetti FC hanno contribuito in maniera fondamentale a migliorare l'aspettativa

di vita di questi pazienti. Tuttavia, cicli antibiotici frequenti e di lunga durata influiscono sulla selezione di ceppi di *P. aeruginosa* altamente resistenti agli antibiotici. L'infezione polmonare dovuta a ceppi multiresistenti risulta di difficile trattamento ed è associata ad una prognosi più severa.

Il presente progetto si propone di studiare i meccanismi di selezione ed evoluzione delle resistenze di *P. aeruginosa* mettendoli in relazione con i diversi protocolli terapeutici adottati.

A tale fine lo studio prevede di identificare i meccanismi di resistenza nei confronti degli antibiotici più usati per la terapia dell'infezione da *P. aeruginosa* (ß-lattamici, aminoglicosidi e chinolonici) in ceppi batterici isolati da pazienti FC cronicamente colonizzati, in cura presso il Centro Regionale Toscano per la Fibrosi Cistica. Il profilo di resistenza di ogni ceppo batterico sarà correlato con la presenza di specifici meccanismi di resistenza a livello molecolare utilizzando tecniche quali PCR, tecniche di ibridazione, sequenziamento di frammenti genici e "real-time" PCR.

Nel caso in cui venga dimostrata la presenza di specifici meccanismi di resistenza, verranno inclusi nello studio tutti gli isolati disponibili provenienti dallo stesso paziente in modo da verificare se anch'essi possiedono lo stesso meccanismo di resistenza. L'insorgenza e l'evoluzione dei diversi fattori di resistenza sarà messa in relazione con la terapia antibiotica (tipo di antibiotico, modalità di somministrazione, durata della terapia) e con parametri legati allo stato clinico dei pazienti, quali indici di funzionalità respiratoria, numero e frequenza di riacutizzazioni della malattia polmonare, stato nutrizionale.

I risultati attesi del presente studio sono i seguenti:

- Approfondire la conoscenza sui meccanismi di resistenza di *P. aeruginosa*.
- Chiarire i meccanismi che portano alla selezione ed evoluzione della resistenza di *P. aeruginosa* in base al trattamento farmacologico.
- Valutare l'influenza della colonizzazione da parte di ceppi resistenti di *P. aeruginosa* sullo stato clinico dei pazienti.

Il miglioramento delle conoscenze può consentire di migliorare le strategie di trattamento delle infezioni da *P. aeruginosa* al fine di ridurre la selezione e la diffusione di ceppi resistenti, contribuendo a preservare lo stato di salute dei pazienti FC.

Roberto Fani (in piedi) con collaboratori

Fani R, Papaleo C, Russo E, Perrin E, Bronci E, Ferri L, Di Cello FP
Dip.to Biologia Animale e Genetica, Università di Firenze

A two stage strategy for early and accurate detection of *Burkholderia cepacia* complex in routine clinical analysis involving CF patients.

Identificazione di ceppi di Burkholderia cepacia complex mediante LAMP e SNuPE (Progetto FFC #13/2006).

I pazienti affetti da Fibrosi Cistica sono soggetti alla colonizzazione e all'infezione da parte di patogeni opportunisti che si rivelano estremamente insidiosi al momento di eradicare l'infezione. E' infatti consueto riscontrare infezioni precoci dovute alla particolare adesività dei batteri all'epitelio respiratorio, eventi ricorrenti resi poi cronici dall'intervento di infezioni virali che abbattono la barriera difensiva di superficie. Tra i principali responsabili delle infezioni respiratorie croniche spiccano *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Haemophilus influenzae*, e i batteri appartenenti al *Burkholderia cepacia* complex (Bcc). Alcuni di questi agenti microbici, se non tutti, risultano spesso di difficile trattamento terapeutico in conseguenza dell'elevata trasmissibilità e/o della resistenza a numerosi antibiotici. Questo è particolarmente vero per alcuni microrganismi, come quelli appartenenti al Bcc.

L' identificazione tempestiva ed inequivocabile dei batteri responsabili di una infezione rappresenta perciò una delle armi per attuare una terapia antibiotica mirata, una identificazione che, talvolta, a causa della complessità tassonomica di alcuni generi batterici, può richiedere l'uso combinato di diverse metodologie (approccio polifasico) e risultare pertanto lunga e difficoltosa e necessitare di una strumentazione che non sempre può essere disponibile in ambito locale. Questo può rendere necessario commissionare l'analisi dei ceppi a strutture esterne con notevoli ritardi nella diagnosi

Negli ultimi anni numerosi centri di ricerca si sono quindi dedicati alla messa a punto di tecniche molecolari per l'identificazione rapida dei microrganismi responsabili delle infezioni in pazienti affetti da Fibrosi Cistica. Molte di queste tecniche sono basate sull'uso della reazione a catena della polimerasi (PCR) o sull'uso combinato di più metodologie (PCR-RFLP) o ancora sull'analisi contemporanea di più marcatori molecolari (MLST, Multi Locus Sequence Typing). Più recentemente, nell'ambito di una ricerca finanziata dalla FFC, è stata sviluppata una nuova tecnologia detta SNuPE (Single Nucleotide Primer Extension) estremamente specifica e sensibile che potrebbe rappresentare un mezzo di grande rilevanza per l'identificazione dei microrganismi patogeni.

Il presente progetto, che si avvale del contributo di ceppi batterici provenienti da diversi centri italiani FC, è rivolto a completare tale ricerca integrando la strategia sperimentale con una nuova tecnologia, recentemente messa a punto, e denominata LAMP (Loop-mediated isothermal Amplification), altamente specifica, estremamente veloce, grazie alla quale è possibile identificare un qualsiasi microrganismo attraverso una variante della PCR che richiede una limitata strumentazione, reperibile in qualsiasi laboratorio di microbiologica, e che è già stata utilizzata con successo per l'identificazione di microrganismi patogeni.

4. RICERCA CLINICA ED EPIDEMIOLOGICA

Diabetes, glucose intolerance and hypoglycemia in Cystic Fibrosis

Diabete, intolleranza al glucosio ed ipoglicemia in fibrosi cistica (Progetto FFC 16/2005)

Colombo C, Battezzati A
Department of Pediatrics, CF Center, Fondazione IRCCS "Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena", University of Milan; Fondazione Centro San Raffaele del Monte Tabor, Milan

Diabete mellito e intolleranza al glucosio sono diventati complicazioni comuni della Fibrosi Cistica con il protrarsi della sopravvivenza. Tali condizioni hanno un effetto negativo sullo stato clinico e possono limitare la spettanza di vita. Per questo motivo, studi diretti a comprendere meglio la patogenesi e l'impatto del diabete secondario a Fibrosi Cistica sono da considerarsi prioritari. Evidenze preliminari suggeriscono che il trattamento insulinico precoce è utile nel diabete secondario a Fibrosi Cistica, ma mancano indicazioni chiare per la selezione dei pazienti e per il tipo di intervento.

Obiettivi del progetto sono:

1) valutare prevalenza, incidenza e rilevanza delle alterazioni del metabolismo del glucosio in FC;

2) caratterizzare tali alterazioni in termini di insulino-resistenza, deficit di secrezione insulinica e risposte controregolatorie, infiammazione, malnutrizione e storia naturale;

3) fornire evidenze per stabilire interventi terapeutici (somministrazione insulinica, trapianto di isole pancreatiche).

L'attività di ricerca finora eseguita ha portato ai seguenti risultati, basati sull'analisi della risposta glicemica e della modellizzazione di sensibilità

insulinica e risposta insulino-secretoria in corso di carichi orali di glucosio eseguiti annualmente nell'intera casistica seguita presso il centro di Milano:

1) Ipoglicemia spontanea in fibrosi cistica. L'ipoglicemia spontanea a digiuno (glicemia <60mg/dl) è presente nel 14% dei pazienti, e l'ipoglicemia reattiva dopo carico orale di glucosio (glicemia <50 mg/dl) è presente nel 15% dei pazienti. L'ipoglicemia a digiuno è possibilmente legata ad un inappropriato controllo soppressivo della secrezione insulinica nei portatori di mutazioni di classe I. Valori ipoglicemici a digiuno non escludono intolleranza al glucosio o diabete diagnosticati dopo carico orale di glucosio, e sono correlati ad un peggiore stato clinico.

2) Contributo dei difetti di sensibilità insulinica e di funzione betacellulare alla variazione della tolleranza al glucosio nel tempo. Lo stato di tolleranza al glucosio è molto variabile nel tempo negli stessi individui ed è soggetto sia a marcati peggioramenti che miglioramenti. Deficit di sensibilità insulinica e di funzione beta-cellulare sono entrambi presenti ed influenzano significativamente la tolleranza glicemica. Tuttavia, le variazioni nel tempo di tolleranza glicemica sono dovute a variazioni di sensibilità insulinica e non di funzione beta-cellulare.

Sergio Bernasconi

Bernasconi S, Volta C
Department of Paediatrics, University of Parma

New insights into insulin-resistance in cystic fibrosis: the effect of cytokines.

Nuove acquisizioni sull' insulino resistenza nella fibrosi cistica: l' effetto delle citochine. (Progetto FFC #18/2006)

E' sempre più chiaro che condizioni caratterizzate da flogosi cronica si associano ad insulino-resistenza. L'insulino-resistenza nell'età adulta si associa ad ipertensione, dislipidemia, malattie cardiovascolari e diabete. I pazienti con fibrosi cistica hanno concentrazioni sieriche aumentate di citochine proinfiammmatorie, in particolare di IL-6 e TNF-α, di cui si sono scoperti recentemente i meccanismi molecolari responsabili di insulino-resistenza. Inoltre sono stati scoperti due nuovi ormoni, l'adiponectina e la resistina, anch'essi coinvolti nel regolare la sensibilità insulinica nell'uomo. Finora si sa che i soggetti con fibrosi cistica divengono insulino-privi nel tempo e l'incidenza di diabete legato alla FC sta aumentando molto, grazie all'aumentata sopravvivenza, ma purtroppo peggiora la qualità di vita di questi pazienti. Un nostro studio ha evidenziato che i pazienti con fibrosi cistica non diabetici, con età media di 18 anni, hanno mediamente dei livelli di insulina significativamente più elevati rispetto ai controlli ed alcuni sono francamente insulino-resistenti. E' pertanto possibile che vi sia una fase di aumentata secrezione insulinica che precede il diabete e che potrebbe essere prevenuta; inoltre, l'insulino-resistenza stessa potrebbe portare a delle complicanze, peggiorando ulteriormente la qualità della vita, che potrebbero essere prevenute con adeguate terapie, possibilmente innovative (nuovi farmaci anti-citochina?, IGF-I?, IGF-I+IGFBP-3?).

Questo studio si propone attraverso lo studio di controlli sani e di 3 gruppi di età di pazienti con fibrosi cistica (dai 6 ai 25 anni) di:

a) Confermare la presenza di concentrazioni sieriche aumentate di insulina e/o la presenza di insulino-resistenza nei pazienti con fibrosi cistica;

b) Studiare e verificare un possibile ruolo dell'adiponectina e della resistina nel meccanismo di insulino-resistenza ed i loro rapporti con l' IL-6 ed il TNF-α;

c) Verificare se i bassi livelli di IGF-I descritti da noi ed in letteratura siano correlati ad insulino-resistenza come descritto recentemente;

d) Verificare i rapporti dell' insulino-resistenza con lo stato di tolleranza glucidica ed il genotipo.

Per fare questo verranno reclutati 3 gruppi ed altrettanti controlli sani. Si verificheranno lo stato clinico, la funzionalità polmonare, i parametri auxologici di tutti i soggetti. La sensibilità insuiinica verrà verificata tramite test ormonali standard e tramite la concentrazione basale di

insulina e glucosio. I dosaggi ormonali sono tutti fattibili tramite dosaggi su siero. Ai partecipanti verrà richiesto un prelievo di sangue in aggiunta al test, che comunque va eseguito comunque routinariamente una volta all'anno dopo il compimento del decimo anno di vita.

Minicucci L, Haupt R
Centro Fibrosi Cistica, Istituto G. Gaslini, Genova

Efficacy of slow release insulin in cystic fibrosis patients with glucose intolerance and clinical decay

Efficacia di insulina a lento rilascio in pazienti con fibrosi cistica, intolleranza al glucosio e decadimento clinico (Progetto FFC #21/2006)

Laura Minicucci (a sinistra) con collaboratrice

La condizione di intolleranza glucidica (IG) precede l'esordio del quadro clinico conclamato di Diabete ed è frequente in Fibrosi Cistica (FC). Questa condizione spesso si accompagna a un decadimento delle condizioni generali della malattia di base, dovuto presumibilmente alla inadeguata produzione di insulina e quindi all'inefficace azione anabolizzante svolta da questo ormone. Insulina glargine è un'insulina a lento rilascio con un profilo farmacocinetico piatto, che non espone il paziente a eccessivi abbassamenti di glucosio nel sangue e non richiede quindi il monitoraggio glicemico pluriquotidiano. Questo studio ha lo scopo di valutare l'efficacia d'insulina glargine nei pazienti affetti da IG in FC. In particolare si vuole valutare se insulina glargine è efficace nel prevenire il peggioramento delle condizioni nutrizionali e della funzionalità respiratoria. I pazienti che accetteranno di entrare nello studio saranno divisi random in due gruppi. Entrambi i gruppi continueranno ad effettuare le cure necessarie per la malattia di base e seguiranno una dieta libera, ma uno solo dei due gruppi effettuerà glargine per via sottocutanea una volta al giorno. I pazienti entrati nello studio saranno sottoposti a visite trimestrali in cui saranno raccolte le necessarie informazioni sulle condizioni glicometaboliche, nutrizionali e respiratorie. Ogni paziente sarà valutato per un periodo di 18 mesi, ma uscirà dallo studio qualora si presenti un quadro conclamato di diabete, qualora non riesca a tollerare insulina anche alle dosi minime somministrabili e comunque in qualsiasi momento decida volontariamente di non voler più partecipare allo studio. Anche i dati riferiti ai pazienti usciti dal follow up verranno però considerati nelle valutazioni statistiche finali. Al termine del periodo di osservazione programmato l'andamento delle condizioni nutrizionali, respiratorie e glicometaboliche dei pazienti saranno studiate e confrontate nei due gruppi di pazienti (insulina sì, insulina no), al fine di verificare se glargine è stato utile nel contrastare il decadimento delle condizioni cliniche associato al quadro di IG. Allo stato attuale il progetto è stato approvato dal Comitato Etico locale in quasi tutti i Centri FC partecipanti. Sono attualmente in follow up 24 pazienti con un tempo medio di osservazione di 6 mesi (range 12 mesi-1 mese). Non sono stati segnalati a tutt'oggi effetti collaterali associabili al trattamento con insulina.

Alfredo Guarino

Guarino A, Colombo C, Morelli L, Bruzzese E
Department of Pediatrics, University Federico II, Naples; Department of Pediatrics, CF Center, Fondazione IRCCS "Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena", University of Milan; Advanced Analytical Technologies- Spin-off Company of the Catholic University, Piacenza.

Prevention of pulmonary exacerbations in children with cystic fibrosis through the modification of intestinal microflora

Prevenzione delle infezioni polmonari in bambini con Fibrosi Cistica attraverso la modificazione della microflora intestinale (Progetto FFC #20/2006)

La flora intestinale è il risultato di una complessa interazione tra l'ambiente esterno e quello interno all'ospite; l'apparato gastrointestinale, infatti, costituisce funzionalmente un'estensione dell'ambiente esterno. Numerosi fattori ambientali sono in grado di modificare la microflora intestinale: l'età, la dieta, il pH gastrico, la peristalsi intestinale, le terapie antibiotiche ed il sistema immunitario. Lo sviluppo del sistema immune inizia immediatamente dopo la nascita e procede in parallelo con la colonizzazione dell'intestino da parte dei batteri.

Negli ultimi anni appare sempre più chiaro che la microflora intestinale influenza in maniera attiva la risposta immune mucosale intestinale giocando un ruolo di fondamentale importanza nella difesa dalle infezioni e nello sviluppo della tolleranza verso gli alimenti.

E' ormai accertata l'efficacia della somministrazione di Lactobacillus GG (LGG) nel trattamento della gastroenterite acuta e probabilmente il meccanismo alla base di tale effetto è di tipo immunologico. In aggiunta, alcuni probiotici si sono dimostrati efficaci nel ridurre l'incidenza di diarrea acuta in speciali categorie a rischio di malnutrizione, diarrea da antibiotici e diarrea nosocomiale. A causa della interazione che esiste tra l'immunità intestinale e quella sistemica è ipotizzabile che l'effetto protettivo della microflora intestinale possa estendersi anche al tratto respiratorio. Esistono evidenze preliminari che una prolungata somministrazione di LGG a bambini di età compresa tra 1 e 6 anni li protegge contro le infezioni respiratorie.

Dati preliminari ottenuti in un gruppo limitato di bambini con fibrosi cistica hanno dimostrato che la somministrazione di LGG riduce il numero di infezioni respiratorie e di ricoveri ospedalieri in un anno e migliora la spirometria e lo stato nutrizionale. Lo scopo di questo progetto è quello di valutare l'efficacia della modifica della microflora intestinale attraverso la somministrazione di un probiotico, il Lactobacillus GG, nella prevenzione delle infezioni polmonari in pazienti affetti da Fibrosi Cistica.

I pazienti che decideranno di aderire al progetto verranno divisi in due gruppi : uno costituito da pazienti che assumeranno Lactobacillus GG per un anno in associazione alle altre terapie standard ed un altro gruppo costituito da pazienti che riceveranno un placebo (un prodotto analogo al prodotto in studio che non contiene il Lactobacillus GG) per lo stesso periodo di tempo. Al momento dell'arruolamento ed al termine dello studio verranno valutati i seguenti parametri: altezza, BMI, stadio puberale, funzionalità respiratoria (FEV1, FVC, SatO2), Rx torace, dosaggio immunoglobuline sieriche, test non invasivi di funzionalità intestinale e valutazione della microflora intestinale. Durante i dodici mesi di follow up il paziente dovrà registrare a domicilio il numero e la durata di eventuali episodi di febbre, il numero e la durata, la motivazione ed il tipo di eventuali terapie antibiotiche prescritte.

Ogni tre mesi il paziente effettuerà un controllo clinico e laboratoristico presso il Centro di Riferimento durante il quale verranno eseguiti esami del sangue ed analisi (la maggior parte delle analisi sono le stesse che vengono effettuate regolarmente al paziente con fibrosi cistica).

Nel corso delle visite previste dal protocollo sarà verificata l'eventuale variazione della sintomatologia; sarà effettuata una coltura batteriologica con prelievo di espettorato/aspirato faringeo e saranno eseguiti esami biochimici di routine.

Filippo Festini

Festini F.
University of Florence, Department of Pediatrics, Section of Sciences of Allied Health Professions, c/o Meyer University Children Hospital

Prolonging the duration on site of short peripheral venous catheters used to administer intravenous antibiotic courses in adult subjects with cystic fibrosis. A randomised controlled trial to evaluate the effect of different concentrations of antibiotic in normal saline solution

Prolungamento della durata delle agocannule utilizzate per i cicli antibiotici in adulti con FC. Studio randomizzato controllato sull'effetto di differenti concentrazioni di antibiotico in soluzione fisiologica (Progetto FFC #19/2006).

I pazienti con FC si devono sottoporre frequentemente a cicli di terapia antibiotica endovenosa. Per evitare che i pazienti ricevano un gran numero di venipunture vengono usati cateteri venosi periferici (CVP) o "*agocannule*".
A causa dell'azione irritante dei farmaci usati, spesso non è sufficiente un solo CVP per tutta la durata prevista del ciclo di terapia antibiotica (di solito 2 settimane) ed i pazienti devono essere sottoposti ad ulteriori tentativi di reperimento della vena, che provocano dolore ed ansia. Col tempo le vene diventano sempre più difficilmente reperibili e l'esecuzione dei cicli può diventare problematica e causare sofferenza per la persona. L'alternativa all'uso delle agocannule è l'inserimento di un catetere venoso centrale, che richiede però un intervento chirurgico e può essere talora controindicato. Uno studio di coorte preliminare da noi condotto ha evidenziato una correlazione tra il numero di infusioni giornaliere di antibiotico e la durata del CVP in situ, suggerendo che una maggior quantità di liquidi infusi insieme all'antibiotico potrebbe ridurre l'irritazione della vena. Questo studio si propone quindi di dimostrare che aumentando la diluizione degli antibiotici nella fisiologica usata per infonderli, è possibile ridurre l'irritazione della vena utilizzata, ridurre il rischio di flebite, prolungare la durata del CVP utilizzato e quindi ridurre il numero di venipunture necessarie per un ciclo antibiotico.
Si tratta di uno studio randomizzato, controllato, non cieco, che verrà svolto presso il reparto di degenza del Centro FC della Toscana. I pazienti che aderiranno allo studio verranno assegnati casualmente a due gruppi: ad un gruppo verranno somministrati gli antibiotici prescritti secondo la diluizione consueta (in base all'indicazione della casa farmaceutica); all'altro verranno somministrati ad una diluizione molto maggiore (ovvero in un maggior volume di soluzione fisiologica) ma nello stesso tempo. Verranno valutati ogni giorno lo stato di infiammazione della vena, il dolore locale e l'infiltrazione (con apposite scale visuali) nonchè la durata complessiva dell'agocannula usata.
Se l'ipotesi verrà confermata sarà disponibile un sistema semplice, sicuro, economico, privo di controindicazioni ed immediatamente applicabile per ridurre il numero di venipunture necessarie per eseguire un ciclo antibiotico ev.
Lo studio è nella fase iniziale (addestramento del personale infermieristico coinvolto) e durerà due anni.

Nobili R, Apolone G, Braggion C, Oprandi N, Pescini R, Spina S, Fazio D, Intermite M.
CRR Fibrosi Cistica, Ospedale Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena - Fondazione IRCCS; Mario Negri Institute for Pharmacological Research, Laboratory of Clinical Research, Dept. of Oncology; Cystic Fibrosis Center, Ospedale Meyer, Firenze; Cystic Fibrosis Center, Istituto Gaslini, Genova; Ospedale S. Luigi Gonzaga, Torino; Cystic Fibrosis Center, Policlinico Messina; CF Center, Università "La Sapienza" - Roma;

Translation and validation of a disease-specific health-related quality of life questionnaire (the cystic fibrosis questionnaire – Cfq-r)

Validazione multicentrica di un questionario malattia-specifico sulla qualità della vita (Il Questionario Fibrosi Cistica Cfq-r) (Progetto FFC #17/2005)

La crescente efficacia dei trattamenti disponibili per la fibrosi cistica (FC) aumenta anche le aspettative di vita delle persone afflitte da questa malattia. Questi progressi pongono importanti quesiti cui occorre rispondere:
a) qual è la qualità di questo tempo di vita in più rispetto al passato?
b) quali sono i benefici, dal punto di vista del paziente, di trattamenti costosi, impegnativi e che comunque devono essere proseguiti nel tempo? Obbiettivo del nostro studio è validare la traduzione in italiano, effettuata secondo una metodologia rigorosa, di un questionario quale strumento per tentare di dare queste risposte. Il processo di validazione permette di appurare se il questionario è valido, ossia misura ciò che si prefigge di misurare, ed attendibile, ossia capace di dare misurazioni stabili con il passare del tempo se le condizioni non cambiano. Il processo di validazione è multicentrico per avere un campione rappresentativo delle regioni d'Italia. Disponendo dei dati dell'omologo questionario americano possiamo limitare il numero di persone da coinvolgere in questo lavoro a 150, suddivise armonicamente tra bambini 6-11 anni, ragazzini di 12 e 13 anni, adolescenti dai 14 anni in su, genitori

di ragazzini di 6-13 anni. A tutti i partecipanti è stato spiegato lo scopo del nostro lavoro ed è stato chiesto il consenso a partecipare. Ciascuna versione del questionario è stata somministrata (6-11 anni) o auto-somministrata in occasione di un controllo clinico programmato o di una degenza in ospedale. Le risposte al questionario sono poi messe in relazione con lo stato clinico rilevato tramite una scheda clinica appositamente predisposta al fine di valutare se il questionario è in grado di discriminare tra situazioni più e meno compromesse. L'analisi dei dati sarà completata a cura di Giovanni Apolone e Paola Mosconi dell'Istituto Mario Negri. Tuttavia, un'analisi intermedia ha rilevato un'ottima capacità dello strumento di differenziare tra le situazioni. Questo dato permette di ipotizzare risultati altrettanto soddisfacenti per il gruppo nel suo complesso. Permane la nostra perplessità circa la capacità dei bambini più piccoli di comprendere esattamente i riferimenti temporali (le precedenti due settimane), rispetto ai quali viene chiesto ai bambini di esprimersi. Tuttavia questo problema, sia pur in modo più sfumato probabilmente per abitudine culturale, si è verificato anche nel campione statunitense.

Nel corso dell'ultima riunione internazionale dei gruppi che lavorano alle diverse versioni del questionario in lingue europee e nelle diverse varianti di inglese parlate in Inghilterra, Australia e Stati Uniti, il leader del progetto ha sollecitato tutti i gruppi nazionali a procedere secondo la metodologia adottata nel nostro studio a garanzia della qualità dei risultati.

5. INFIAMMAZIONE

Dechecchi MC, Becq F, Gambari R,
Laboratorio di Patologia Molecolare, Azienda Ospedaliera di Verona (PI); Institut de Physiologie et Biologie Cellulaires, UMR CNRS, Universitè de Poitiers; Dipartimento di Biochimica e Biologia Molecolare, Università di Ferrara

Effect of correctors of defective CFTR on the *Pseudomonas aeruginosa* - dependent inflammatory response in respiratory epithelial cells

Effetto di correttori di proteina CFTR difettosa sulla risposta infiammatoria Pseudomonas aeruginosa-dipendente in cellule respiratorie (Progetto FFC # 14/2004 e Progetto FFC #16/2006)

Maria Cristina Dechecchi (terza da sinistra nel gruppo in alto) ed i partners Frederik Becq (a sinistra) e Roberto Gambari (a destra)

Approcci anti-infiammatori sono un bersaglio terapeutico molto rilevante in FC, essendo l'infiammazione cronica la causa del progressivo danno polmonare nei pazienti. Il processo infiammatorio è caratterizzato da persistente colonizzazione da *P. aeruginosa* e infiltrati di neutrofili richiamati tramite fattori solubili e molecole adesive. La risposta infiammatoria

appare esagerata nei pazienti FC e sembra originare dalle cellule superficiali delle vie aeree esprimenti la proteina CFTR difettosa, attraverso meccanismi ancora da chiarire. Questo progetto si propone di studiare la relazione tra CFTR mutata e infiammazione, valutando la possibilità di modularla attraverso l'uso di correttori del difetto di maturazione di CFTR. Grazie al finanziamento del progetto appena concluso (ffc #14/2004), abbiamo dimostrato che il correttore benzochinolizinico (MPB)-07 riduce la risposta infiammatoria indotta da *P. aeruginosa*, ceppo PAO1, e parallelamente ripristina la funzione di trasporto del cloro CFTR-dipendente, a favore dell'ipotesi che l'accumulo di proteina CFTR mutata per difettosa maturazione sia responsabile della esaltata attivazione dei processi infiammatori. La prosecuzione dello studio prevede: la selezione di correttori del difetto di maturazione di CFTR mutata analizzando librerie di composti chimici di nuova sintesi o già disponibili; lo screening dell'effetto di tali composti sulla risposta all'infezione in cellule respiratorie FC; lo studio funzionale di CFTR in cellule FC trattate con i correttori che mostrano effetto anti-infiammatorio; l'analisi delle vie di attivazione del fattore di trascrizione NF-kB, deputato alla trscrizione dei geni infiammatori, in cellule trattate con i correttori che hanno un effetto anti-infiammatorio; la valutazione dell'effetto di tali composti sul legame di proteine NF-kB ai promotori dei geni regolati. La strategia di controllare la risposta infiammatoria utilizzando correttori del difetto di maturazione di CFTR mutata potrebbe contribuire a comprendere i meccanismi molecolari responsabili del fenotipo iper-infiammatorio dei pazienti FC e fornire indicazioni terapeutiche utili per ridurlo.

Zazzeroni F.
Department of Experimental Medicine,
University of L'Aquila, L'Aquila

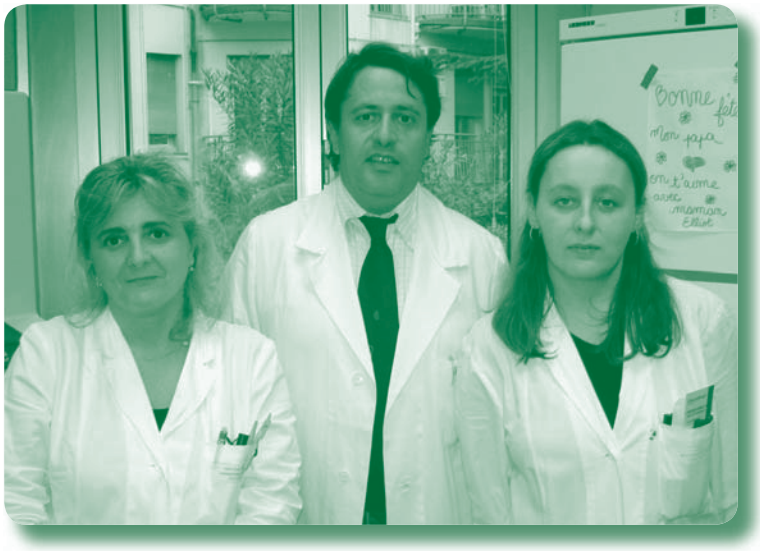
Francesca Zazzeroni (seconda da destra) con i suoi collaboratori di ricerca

Inflammation and apoptosis in CF airway epithelium: role of NFkB and its target genes

Infiammazione ed apoptosi nell'epitelio delle vie aeree in fibrosi cistica: ruolo di NF-kB e dei suoi geni bersaglio (FFC #17/2004)

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 dimostrato che le cellule epiteliali mutate per il gene cftr sono meno sensibili all'apoptosi rispetto alle cellule epiteliali normali, lasciando ipotizzare che una ridotta clearance dei germi invasori possa essere, almeno in parte, responsabile delle manifestazioni polmonari in corso di FC.
I fattori di trascrizione della famiglia NF-kB sono importanti regolatori delle risposte infiammatoria ed apoptotica, ed è stato riportato che NF-kB è cronicamente attivo nelle cellule FC. Dato che l'infiammazione gioca un ruolo fondamentale nelle manifestazioni polmonari della FC, terapie immunomodulatorie volte ad inibire NF-kB sono state da tempo proposte. Tuttavia, oltre a regolare le risposte flogistiche, NF-kB coordina anche la risposta immunitaria ed è coinvolto nel controllo della proliferazione cellulare, del differenziamento e dell'apoptosi. Terapie mirate verso specifici geni target di NF-kB possono disaccoppiare queste diverse e fondamentali funzioni. In linea di principio è quindi possibile identificare trattamenti capaci di modulare specifici set di geni attivati da NF-kB nelle cellule FC senza compromettere la funzione della barriera epiteliale o la risposta infiammatoria dell'ospite a tutti i patogeni respiratori.
Al fine di valutare il ruolo di NF-kB e dei suoi geni target nel processo apoptotico delle cellule CF e di identificare geni regolati da NF-kB coinvolti nelle risposte infiammatoria ed apoptotica, abbiamo

generato un sistema cellulare CF, ed uno WT di controllo, in cui NF-kB viene stabilmente inibito, utilizzando un retrovirus esprimente IkBaM, una forma mutata dell'inibitore fisiologico di NF-kB, che non essendo fosforilabile lega stabilmente il fattore di trascrizione e lo sequestra a livello citoplasmatico inibendone la funzione. Queste cellule sono state utilizzate per valutare parametri cellulari e molecolari di infiammazione ed apoptosi delle cellule CF rispetto alle cellule che esprimono un CFTR normale, e per determinare se una diversa sensibilità delle cellule CF all'apoptosi fosse dipendente da NF-kB.



Roberto Biassoni con due collaboratrici

Biassoni R, Melioli G, Candiano G
Istituto Giannina Gaslini/Lab Molecular Medicine, Genova; Istituto Giannina Gaslini/Lab Centrali Analisi, Genova; Istituto Giannina Gaslini/Lab Pathophysiology of Uremia, Genova

Functional and biochemical analysis of anti-microbial proteins in airway surface lining fluid (ASL).

Analisi biochimica e funzionale di proteine ad attivita' antibatterica presenti nel fluido di superficie del rivestimento delle vie aeree (ASL) (Progetto FFC #13/2005)

La maggiore causa di morbidità e mortalità nei pazienti affetti da FC è l'infiammazione cronica indotta da infezioni batteriche croniche prevalentemente causate da *Pseudomonas aeruginosa.* La capacità di controllare l'infezione e la proliferazione di microorganismi patogeni è principalmente a carico del sistema di immunità innata, che risponde in tempi estremamente più rapidi della risposta adattativa. L'immnunità naturale, per svolgere le sue funzioni, utilizza sia componenti cellulari che fattori solubili, e fra questi ultimi differenti proteine/peptidi ad attività antimicrobica sono stati caratterizzati in questi ultimi anni. Una di queste proteine, con possibile utilizzo farmacologico, è BPI (Bactericidal Permeability Increasing Protein), che è prodotta da una sottopopolazione di globuli bianchi neutrofili e dalle stesse cellule epiteliali delle mucose delle vie respiratorie. Proteine ricombinanti derivate da BPI e suoi frammenti peptidici sintetici sono già in fase di avanzata sperimentazione su pazienti dove si è osservato possano svolgere un effetto diretto antibatterico e di potenziamento (sinergismo) dell'azione di antibiotici. Dati preliminari di proteomica eseguiti sul fluido di superficie del rivestimento delle vie aeree (ASL) ci hanno permesso l'identificazione di altre due proteine con potenziale attività antimicrobica: "vonEbner Minor salivary Gland Protein" (VEMSGP) e "human intelectin" (hIntL). La prima è una proteina che ha una elevata omologia di sequenza con la proteina BPI ed è codificata da un gene appartenente ad una famiglia genica codificante per proteine note per funzioni antimicrobiche ed antiinfiammatorie fra cui BPI stessa. VEMSGP presenta omologie strutturali e di sequenza con quest'ultima ed è pertanto plausibile che svolga funzioni analoghe. La hIntL è invece nota per la capacità di riconoscere e legare batteri gram-negativi.

Il progetto quindi prevedeva la produzione di proteine ricombinanti mediante la generazione di linee cellulari stabilmente producenti le proteine in oggetto, la purificazione delle stesse e lo studio delle loro attivita' antibatteriche. Per la produzione e purificazione di VEMSGP sono stati generati 2 differenti costrutti: il primo produceva una proteina di fusione tra la vonEbner ed il frammento cristallizzabile delle immunoglobuline, la seconda solo la VEMSGP legata a due piccole sequenze necessarie per la identificazione e la purificazione (epitopo FLAG e esa-Istidine). La valutazione dell'attività antibatterica è stata eseguita valutando il numero di colonie batteriche (CFU) dopo trattamento con differenti dosi e tempi d'incubazione con le proteine ricombinanti e valutando come riferimento proteine non strutturalmente relate.

Romano M, Iapichino L
Dipartimento di Scienze Biomediche, Università "G. D'Annunzio", Chieti–Pescara, Laboratorio di Medicina Molecolare; Centro di riferimento regionale fibrosi cistica - 2° Unità di Pediatria, Ospedale dei bambini -G. Di Cristina -Palermo

Mario Romano

Lipoxin A_4 formation and signalling in cystic fibrosis

La lipoxina A_4 nella fibrosi cistica: biosintesi e trasduzione del segnale (Progetto FFC #12/2005)

L'infiammazione polmonare rappresenta una causa primaria di mortalità e morbilità in pazienti affetti da fibrosi cistica (FC). Scopo del nostro studio è stato quello di determinare se nella FC si verifichino alterazioni dei meccanismi di risoluzione della risposta infiammatoria e in quale relazione esse siano con la mutazione ΔF508 CFTR. Abbiamo focalizzato la nostra attenzione sul lipide anti-infiammatorio lipoxina A_4, generato attraverso il metabolisno lipossigenasico dell'acido arachidonico, e sul suo recettore FPRL1/ALX. Abbiamo inoltre esaminato le relazioni tra gene CFTR e recettori della famiglia Toll-like, i quali svolgono un ruolo centrale nelle infezioni delle vie respiratorie.

Abbiamo inizialmente valutato in cellule di epitelio respiratorio umano, normali o con la mutazione ΔF508 CFTR:

1. Espressione ed attività di enzimi della cascata dell'acido arachidonico, quali 5-, 12-, 15-lipossigenasi (LO) e leukotriene A_4 idrolasi.
2. Espressione di FPRL1/ALX e dei recettori Toll-like 2, 4 e 5

Le cellule con la mutazione ΔF508 CFTR presentano elevati livelli e attività dell'enzima pro-infiammatorio 5-LO e livelli molto bassi del recettore anti-infiammatorio FPRL1/ALX. Le cellule FC presentano inoltre una elevata espressione di TLR-4, TLR-2 e TLR-5. Per determinare eventuali relazioni dirette tra le anomalie sopraindicate e l'espressione del gene CFTR, abbiamo silenziato CFTR nelle cellule epiteliali normali, mediante interferenza a RNA (RNAi). Tale procedura ha determinato una riduzione dei livelli di espressione di FPRL1/ALX e un incremento di quelli di TRL-2.

Per stabilire se i risultati ottenuti con le cellule epiteliali respiratorie potessero riflettere una condizione più generalizzata, abbiamo valutato espressione e funzione di LOs in polimorfonucleati neutrofili (PMNs) e monociti isolati da 5 soggetti normali, 5 pazienti omozigoti e 5 eterozigoti per la mutazione ΔF508 CFTR e 5 pazienti con sindrome di Kartagener. Abbiamo osservato che i PMNs e i monociti dei pazienti con FC presentavano una più elevata attività 5-LO rispetto ai soggeti normali.

Queste osservazioni supportano il concetto che difetti del gene CFTR possano determinare una riduzione del potenziale anti-infiammatorio endogeno insieme a un assetto recettoriale che favorisce il danno da colonizzazione batterica.

Pompella A
Dip. Patologia Sperimentale, Biotecnologie, Mediche, Infettivologia ed Epidemiologia, University of Pisa

Alfonso Pompella (secondo da sinistra) con i suoi ricercatori

Chronic oxidative lung injury in cystic fibrosis: protective roles of gamma-glutamiltransferase and ascorbic acid.

Danno ossidativo cronico in fibrosi cistica: ruolo protettivo di gamma-glutamiltransferasi ed acido ascorbico (Progetto FFC #11/2005)

Le condizioni di infiammazione cronica che presto o tardi si instaurano nelle vie respiratorie dei pazienti affetti da fibrosi cistica (FC) costituiscono il principale aspetto della malattia, ossia quello che nelle fasi tardive più contribuisce alla perdita di funzione respiratoria.

Tutti gli interventi miranti ad alleviare gli effetti dell'infiammazione sono quindi potenzialmente in grado di apportare benefici terapeutici. Nei nostri laboratori è stato recentemente scoperto un nuovo meccanismo con il quale il glutatione (GSH) e l'enzima gamma-glutamiltransferasi (GGT) possono modulare l'assorbimento nelle cellule di un importante antiossidante, la Vitamina C (acido ascorbico). Tanto il GSH che la GGT sono normalmente presenti nei fluidi polmonari, alla superficie degli epiteli respiratori, ma per motivi ancora poco chiari nei pazienti FC i loro livelli sono significativamente ridotti. E' possibile dunque che il ripristino di questi fattori possa consentire un più adeguato rifornimento di Vit. C negli epiteli respiratori dei pazienti FC, aumentando le loro difese nei confronti del danno infiammatorio.

Gli studi in corso presso i nostri laboratori mirano ad approfondire la natura di questi processi, al fine di sviluppare opportune strategie terapeutiche. Il primo anno di progetto ha permesso di ottenere una prima serie di importanti risultati. Innanzitutto, con procedure di ingegneria genetica è stata ottenuta una linea di cellule respiratorie umane esprimenti alti livelli dell'enzima GGT (gamma-glutamil-tranferasi). Sono stati poi valutati gli effetti dell'azione enzimatica sull'ambiente extra- ed intracellulare. E' stato così osservato che: 1) l'espressione di GGT comporta un abbassamento dei livelli intracellulari di GSH (glutatione) e cisteina, con conseguente diminuzione delle difese antiossidanti della cellula; 2) le cellule esprimenti GGT inoltre consumano il GSH presente nell'ambiente esterno, trasformandolo nel metabolito assai più reattivo cisteinil-glicina; 3) l'azione enzimatica produce modificazioni ossidative nei gruppi sulfidrilici delle proteine della superficie cellulare, dove probabilmente anche la proteina CFTR può rimanere coinvolta (ad es. da processi di S-tiolazione) e subire effetti modulatori sulla sua funzione.

A fronte di questi dati biochimici, è stato dunque possibile confermare che:

1) l'espressione di GGT consente alle cellule respiratorie di rifornirsi prontamente di Vit. C, e che 2) anche l'enzima GGT esogeno, aggiunto cioè dall'esterno a cellule che non lo esprimono, produce lo stesso effetto facilitante. Quest'ultimo dato dimostra per la prima volta che la funzione – finora ignota – della GGT presente nei fluidi polmonari potrebbe consistere proprio nel garantire un efficace rifornimento di Vit. C nelle cellule respiratorie. E' anzi probabile che proprio questi fenomeni possano spiegare i promettenti risultati recentemente descritti in seguito a trattamenti con glutatione per via aerosol: essendone substrato, il GSH infatti fortemente stimola l'azione dell'enzima GGT. I nostri studi proseguono ora anche con l'impiego di linee cellulari provenienti da pazienti FC, al fine di verificare il grado di resistenza conferito alle cellule dagli incrementi di Vit. C GSH/GGT-dipendenti, e di caratterizzare i meccanismi con i quali le cellule che la esprimono secernono GGT nei fluidi polmonari.

Andrea Battistoni

Battistoni A.
Dipartimento di Biologia, Università di Roma Tor Vergata

Contribution of alteration in metal and glutathione homeostasis to the bacterial infections typical of cystic fibrosis and examination of the possible protective role of lactoferrin and antioxidants

Contributo delle alterazioni nell'omeostasi dei metalli e del glutatione alle infezioni batteriche tipiche della Fibrosi cistica ed esame del possibile ruolo protettivo della lattoferrina e di antiossidanti (Progetto FFC #15/2006)

Una caratteristica distintiva della Fibrosi Cistica sono le ricorrenti infezioni polmonari, spesso ad esito fatale. Queste sono causate da batteri capaci di produrre biofilm, una struttura di natura polisaccaridica che conferisce a questi microorganismi una straordinaria resistenza agli antibiotici e ai meccanismi di difesa dell'ospite. Studi recenti hanno evidenziato modificazioni dei liquidi che rivestono le superfici degli epiteli polmonari che potrebbero causare danni ai tessuti e favorire la colonizzazione polmonare da parte di batteri quali *P. aeruginosa* e *B. cenocepacia*. In particolare, è stato osservato un aumento nella

concentrazione del ferro (associata ad una generale alterazione nelle concentrazioni tissutali di diversi metalli di transizione) ed una diminuita capacità di mantenere un elevato livello extracellulare di glutatione, un'importante molecola antiossidante coinvolta nella difesa nei confronti dei radicali dell'ossigeno e nella risposta alle infezioni batteriche e virali. E' probabile che tali alterazioni agiscano in modo sinergico nel determinare molte delle caratteristiche patologiche tipiche della malattia. Infatti, un aumento della concentrazione di ferro nelle secrezioni polmonari può favorire la produzione di radicali dell'ossigeno, potenziale causa di danno ai polmoni, e stimolare la formazione del biofilm da parte dei batteri.
Il nostro obiettivo è quello di studiare in dettaglio le alterazioni nello stato dei metalli di transizione (ferro, rame e zinco) e del glutatione nelle cellule prive della proteina CFTR e come queste possano favorire le infezioni batteriche. Inoltre, ci proponiamo di valutare se strategie mirate al controllo della concentrazione di ferro e glutatione extracellulari possano ridurre l'impatto delle infezioni microbiche in questa malattia. A questo scopo, studieremo il possibile utilizzo della lattoferrina, una glicoproteina con forte azione battericida presente nelle secrezioni umane, per rimuovere l'eccesso di ferro e ostacolare la formazione di biofilm. Queste ricerche possono quindi favorire la messa a punto di nuove strategie antibatteriche capaci di contrastare le infezioni polmonari nei pazienti affetti da Fibrosi Cistica.

Melotti P, Mauri P, Sorio C, Cigana C.
Centro Fibrosi Cistica, Azienda Ospedaliera di Verona; Dipartimento di Patologia, Università di Verona; Istituti Tecnologie Biomediche, ITB-CNR, Milano;

Roles of azithromycin other than bactericidal: relevance for therapy of cystic fibrosis

Ruoli non antibiotici dell'azitromicina: rilevanza per la terapia della fibrosi cistica (Progetto FFC#10/2005, Progetto FFC#17/2006)

Paola Melotti con i partners di ricerca Mauri e Sorio

Questo progetto consiste nel proseguimento della ricerca dei meccanismi d'azione di un antibiotico, l'azitromicina (AZM) di cui si riportano promettenti effetti terapeutici in pazienti affetti da fibrosi cistica (FC).
Essendo stato proposto come meccanismo d'azione per l'AZM il ripristino delle funzioni della proteina difettosa in fibrosi cistica (CFTR) mediante produzione di altre molecole simili come possibili "supplenti", si sono messi a punto modelli sperimentali utili allo studio di tale possibilità. I dati ottenuti non sono in accordo con tale ipotesi. Tuttavia lo studio effettuato in cellule di epitelio respiratorio con caratteristiche della FC ha messo in evidenza effetti anti-infiammatori dell'AZM. Essi consistono nella riduzione dei livelli di molecole pro-infiammatorie come l'interleuchina 8 (IL-8) ed il Tumor Necrosis Factor alpha (TNFα), risultate espresse a livelli particolarmente elevati in cellule FC. Si sono ottenute anche indicazioni sui possibili meccanismi molecolari di questi effetti. Si sta valutando su larga scala l'effetto dell'AZM sulla secrezione di proteine effettuando analisi proteomica mediante spettrometria di massa multidimensionale. Si è approfondito l'effetto dell'AZM su altre molecole coinvolte nel processo infiammatorio individuate nel corso del progetto mediante analisi con microarrays. A tale proposito si sta focalizzando in particolare l'interesse sul sistema cellulare che utilizza il glutatione di cui viene segnalata sempre maggior rilevanza per la FC.
Inoltre sono stati messi a punto modelli sperimentali con stimoli infiammatori caratteristici della FC come ad esempio TNFα e prodotti batterici derivati da Pseudomonas aeruginosa, utilizzando anche microorganismi isolati da pazienti affetti da FC. In questi modelli si analizzeranno gli effetti dell'azitromicina sia sulla risposta infiammatoria che su altre funzioni cellulari. Si utilizzeranno tecnologie originali e particolarmente sofisticate messe a punto dai partners coinvolti ed in fase di applicazione ai modelli sperimentali allestiti per la FC in questo progetto.
Poichè l'AZM è ormai largamente utilizzata per la terapia della FC e si conosce ancora poco sui suoi meccanismi di azione, si considera di particolare interesse continuare

a ricercare i suoi bersagli rilevanti per la FC. Il conseguimento di maggiori conoscenze sugli effetti di questo antibiotico potrebbe permettere l'ottimizzazione del suo utilizzo. Questo studio sta anche contribuendo alla miglior comprensione di processi peculiari della FC che stanno alla base delle manifestazioni della malattia. Esso potrebbe così permettere di proporre per la terapia della FC altre molecole che possano avere effetti simili, possibilmente superiori, a quelli dell'AZM.

6. GENETICA APPLICATA

Castaldo G, Castellani C, Bombieri C, Sangiuolo F
CEINGE-Advanced Biotechnologies, Dept. Of Biochemistry and Medical Biotechnologies, University of Naples "Federico II"; Veneto Regional CF Center, Verona Hospital; Section of Biology and Genetics, Department of Mother and Child and Biology-Genetics, University of Verona; Section of Genetics, University of Roma-Tor Vergata.

Giovanni Castaldo (al centro) con il suo gruppo di ricerca

Screening of CFTR gene rearrangements in Italian CF patients

Screening delle mutazioni di riarrangiamento del gene CFTR in pazienti CF italiani (Progetto FFC #5/2004)

Conoscere l'epidemiologia delle mutazioni del gene CFTR è di importanza fondamentale per la diagnosi molecolare e la consulenza genetica, poichè permette di calcolare in maniera precisa il rischio residuo di essere portatore anche dopo aver effettuato l'analisi molecolare.

Attualmente, lo studio dell'intera regione codificante del gene CF, anche se effettuato con tecniche sofisticate, quali DGGE, DHPLC o sequenziamento diretto, permette di identificare fino al 90% degli allelli portatori di mutazioni responsabili di CF.

Negli ultimi anni, in altre popolazioni (Audrezet MP, et al. Hum Mutat. 2004, Lerer et al. Hum Mutat 1999) sono stati identificati grandi riarrangiamenti del gene CFTR evidenziati perchè presenti in omozigosi e con tecniche laboriose e di difficile applicazione su larga scala (es., Southern blotting).

Lo scopo di questo progetto è stato quello di definire, in pazienti CF di origine italiana, la presenza di macrodelezioni tra gli alleli CF non ancora caratterizzati e di mettere a punto metodiche di diagnostica molecolare di semplice esecuzione, per poter estendere l'analisi a più ampie popolazioni.

Sono stati studiati 131 pazienti affetti dalla forma classica di CF non imparentati tra loro e selezionati dalle U.O. partecipanti al progetto (per un totale del 45% circa di alleli CF portatori di mutazioni non note anche dopo lo scanning dell'intera regione codificante del gene CFTR). Il DNA di ogni paziente è stato analizzato usando due diverse metodiche basate sulla tecnica della PCR quantitativa (QMPSF ed MLPA SALSA kit).

Lo studio ha permesso di identificare sette tipi di macrodelezioni, tutte precedentemente descritte in altre popolazioni (Chevalier-Porst F, et al. Hum Mutat.) i.e., dele 1, dele 2-3, dele 14b-17b, dele 17a-17b, dele 17a-17b-18, dele 22-23 e dele 22-23-24.

Sono state identificate macrodelezioni nel 20% di alleli CF non caratterizzati appartenenti a pazienti affetti dalla forma classica della malattia ed originari del sud e nord Italia. Considerando che gli alleli non noti rappresentano il 9% circa di tutti gli alleli CF della popolazione analizzata,

l'incidenza globale delle macrodelezioni nel gene CFTR è circa il 2-3% di tutte le mutazioni CF.
L'U.O. del CEINGE-Biotecnologie Avanzate ha analizzato un gruppo di soggetti con forme atipiche di CF (50 CBAVD, 20 con pancreatiti ricorrenti e 10 con bronchiectasie). Tutti questi soggetti sono stati precedentemente analizzati per lo scanning dell'intera regione codificante del gene CFTR mediante il sequenziamento diretto. Sono stati così caratterizzati circa il 70% degli alleli appartenenti a soggetti con forme atipiche CF ma in nessuno degli alleli non caratterizzati sono state identificate macrodelezioni.
Dal confronto tra i differenti metodi usati per l'analisi delle macrodelezioni (QMPSF ed MLPA SALSA kit) è risultato che il kit commerciale basato su PCR quantitativa seguita da elettroforesi capillare (MLPA SALSA kit) è la metodica più sensibile e rapida. Comunque, poichè tutte e sette le macrodelezioni identificate presentano lo stesso breakpoint, è stata messa a punto una metodica di analisi diretta mediante PCR per lo studio dei breakpoint così da poter rendere disponibile l'analisi a tutti i laboratori di biologia molecolare.
La ricerca delle macrodelezioni può essere considerata "di secondo livello" e deve essere effettuata solo dopo aver effettuato le indagini di "primo livello" basate sulla ricerca delle mutazioni più frequenti. Le indagini di secondo livello devono essere effettuate nei casi in cui è necessario raggiungere un detection rate elevato (ed è già stato effettuato lo scanning di tutto il gene), i.e., partner di un portatore CF.

Rosatelli MC, Baffico M, Castellani C, Seia M, Torricelli F, Santostasi T, Faa V.
Laboratorio Genetica Molecolare Dipartimento di Scienze Biomediche e Biotecnologie, Sezione di Clinica e Biologia dell'Età evolutiva, Università degli Studi di Cagliari; Laboratorio di Genetica E.O. Ospedali Galliera Genova; Centro Fibrosi Cistica - Azienda Ospedaliera di Verona; IRCCS Fondazione Policlinico Mangiagalli e Regina Elena, Milano; Dipartimento Diagnostica di Laboratorio Servizio di Diagnostica Genetica, Azienda Ospedaliero Universitaria Careggi, Firenze; U.O. Paediatric "S. Maggiore", Policlinico Hospital of Bari.

Characterization of the unknown CFTR mutations in Italian CF patients and assessment of their pathogenic role: a prerequisite for prevention of Cystic Fibrosis by carrier screening and prenatal diagnosis

Caratterizzazione delle mutazioni CFTR sconosciute in pazienti CF italiani e valutazione del loro ruolo patogenetico: prerequisito per la prevenzione della fibrosi cistica attraverso lo screening dei portatori e la diagnosi prenatale (Progetto FFC#24/2006)

Maria Cristina Rosatelli

Il progetto ha lo scopo di definire i difetti molecolari rari o sconosciuti del gene della fibrosi cistica (gene CFTR) in pazienti italiani e di studiarne eventuali nuovi meccanismi di espressione. Si tratta di un progetto collaborativo che coinvolge 6 centri italiani. Sono stati selezionati pazienti affetti da fibrosi cistica classica ma genotipo non definito. Tutti i pazienti selezionati sono risultati negativi al test molecolare di primo livello che ricerca le mutazioni più frequenti nella popolazione italiana. Alcuni di questi verranno avviati ad uno screening di secondo livello che prevede l'analisi DHPLC e sequenziamento del gene CFTR. Altri pazienti, già risultati negativi allo screening di secondo livello, verranno studiati per la ricerca di grandi delezioni o riarrangiamenti del gene sia mediante l'analisi del DNA che dell'RNA. Lo studio dell'RNA risulta essere un efficace strumento di analisi che permette di evidenziare sia grandi delezioni del gene che difetti nei processi di splicing. Questo tipo di studio già eseguito, tra il 2004 e il 2005, su 280 pazienti CF ha permesso di definire il genotipo di 318 alleli patologici. Tra le mutazioni identificate, 14 non sono mai state descritte in letteratura. In particolare una di queste, che consiste nella delezione-inserzione di un tratto di gene che comprende l'esone 2 e parte delle sequenze introniche fiancheggianti, ha una frequenza del 3,4% nella popolazione sarda.
Verranno inoltre eseguiti studi in vitro per stabilire gli effetti che eventuali nuove mutazioni identificate nel corso del progetto possono avere sull'espressione del gene CF. Questi studi potrebbero portare all'ampliamento delle nostre conoscenze sui meccanismi molecolari che regolano la funzione e il grado di espressione del gene CF, meccanismi

che sono tuttora solo parzialmente conosciuti.
Da un punto di vista puramente diagnostico, i risultati di questo studio consentiranno di sviluppare kit diagnostici che permettano l'identificazione rapida dei soggetti portatori tra i familiari dei pazienti affetti. Sarà inoltre possibile tracciare una accurata mappa delle mutazioni del gene CFTR in Italia e porre così le basi per l'avvio, a livello nazionale, di un programma di prevenzione della malattia nelle coppie in età fertile.

Franco Pagani (primo a destra) con i suoi ricercatori

Goina E, Lewandowska M, Salotti G, Bussani E, Pagani F
Human Molecular Genetics, ICGEB, Trieste, Italia

Splicing affecting genomic variants in CFTR: diagnostic and therapeutic aspects

Varianti genomiche che modificano lo splicing: aspetti diagnostici e terapeutici nella fibrosi cistica (Progetto FFC #15/2005)

La valutazione della patogenicità di mutazioni a carico del gene CFTR può presentare difficoltà diagnostiche poichè tali mutazioni possono causare inaspettatamente un difetto di "splicing", cioè un difetto nel processamento dell'RNA messaggero. Infatti, come abbiamo recentemente dimostrato nel caso dell'esone 12, mutazioni sinonime, cioè mutazioni che non modificano la sequenza aminoacidica e che vengono frequentemente considerate silenti, possono al contrario indurre splicing aberrante. La identificazione dei meccanismi di base implicati nello "splicing" e lo studio delle alterazioni patologiche connesse risulta di fondamentale importanza per sviluppare nuove strategie diagnostiche e terapeutiche nella Fibrosi Cistica. Nella maggior parte dei casi il difetto di processamento consiste in una esclusione totale o parziale di un esone (exon skipping o salto dell'esone) con conseguente produzione di un messaggero tronco e di una proteina CF non funzionale. In particolare, la esclusione dell'esone 9 o 12 dal pre-mRNA è stata associata a forme di fibrosi cistica con espressione fenotipica variabile. Nella regolazione dello splicing di questi esoni abbiamo identificato una serie di fattori di splicing nucleari, con funzione sia inibitoria che attivatoria sullo splicing stesso, che mediano il loro effetto attraverso il legame con l'RNA. Le mutazioni possono alterare questo legame inducendo salto dell'esone. Abbiamo studiato l'effetto di singoli fattori sullo splicing aberrante mediante interferenza dell'RNA (RNA interference), una metodica che consente di ridurre la concentrazione *in vivo* di questi fattori di splicing. Lo studio dell'esone 9 ha portato alla identificazione di un nuovo bersaglio terapeutico, la proteina TDP43 che è implicata nei difetti di splicing del gene CFTR. Si è dimostrato che la riduzione di TDP43, ottenuta mediante "RNA interference", è in grado di correggere il difetto di splicing. Tale recupero dello splicing ha una azione dominante nei confronti delle altre regioni e/o sulle interazioni con i rispettivi trans acting elements. La metodica dell'RNA interference viene inoltre esplorata per studiare il ruolo (inibitorio o attivatorio) dei vari fattori di splicing precedentemente identificati e come questi interagiscono nel regolare il processamento dell' RNA messaggero. La delucidazione del loro coinvolgimento diretto nelle mutazioni che causano exon skipping potrebbe essere utile per sviluppare nuovi approcci per correggere i difetti di splicing.

Giuseppe Novelli

Novelli G, Pignatti P, Strom R. *Dipartimento di Biopatologie e Diagnostica per Immagini, Sezione Genetica, Università di Roma Tor Vergata, Roma; Dipartimento Materno Infantile e di Biologia-Genetica, Università di Verona Sezione di Biologia e Genetica; Clinical Biochemistry Section – Dep. of Cellular Biotechnologies and Haematology – University of Rome "La Sapienza" – c/o Azienda Policlinico Umberto I*

Causes, evolution and progression of nasal polyps: role of modifier genes and a new approach through CGH array

Cause, evoluzione e progressione dei polipi nasali: ruolo di geni modificatori e nuovo approccio mediante CGH array (Progetto FFC #23/2006)

I polipi nasali derivano da un edema (processo infiammatorio) della mucosa che riveste la parete alta delle fosse nasali. Da questa area originano i polipi, che tendono ad espandersi e quindi ad ostruire le cellule etmoidali, i seni paranasali e le fosse nasali. La poliposi nasale è una malattia che si riscontra nel 1–4% della popolazione, ma tale incidenza aumenta notevolmente nei soggetti affetti da Fibrosi Cistica (FC). I meccanismi patogenetici della poliposi nasale non sono ancora stati chiariti. Questo progetto vuole approfondire le conoscenze sui meccanismi alla base della poliposi nasale in pazienti affetti e non da Fibrosi Cistica . L'obiettivo e' quello di stabilire il contributo ed il ruolo di alcune differenti forme di alterazioni molecolari, mediante:

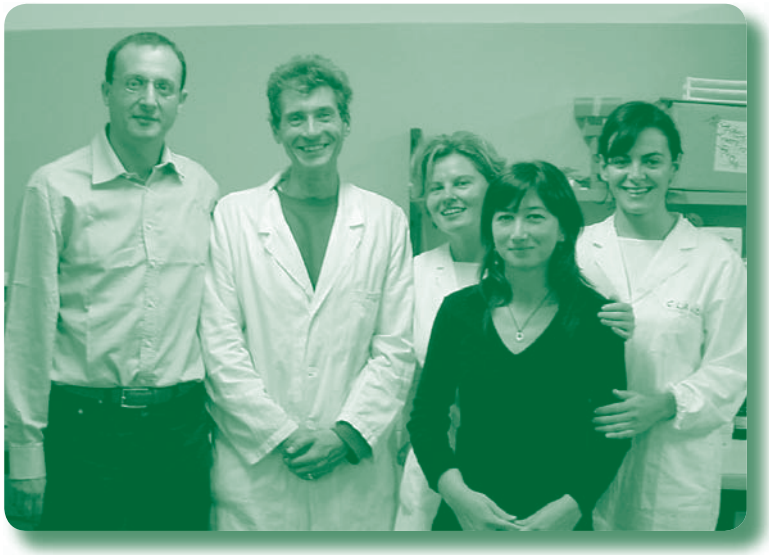
- studio di associazione tra polimorfismi presenti in geni identificati come potenziali modificatori in uno studio precedente finanziato dalla fondazione FFC. In particolare, saranno analizzate mutazioni del gene CFTR, sia classiche che rare, oltre a regioni polimorfe con un ruolo patogenetico ben stabilito(PolyT nell'introne 8), e varianti genomiche in altri geni come SPINK5, il cui prodotto può modificare l'espressione del CFTR od interagire direttamente con il prodotto proteico. Inoltre, verrà eseguita ricerca di anomalie cromosomiche nel tessuto polipoide con la tecnica della CGH array. Questo consentirà di analizzare, per ciascun paziente, l'intero genoma con una risoluzione di 75 Kb mediante oltre 5000 cloni spottati su un microchip costruito *ad hoc*.

A tale scopo abbiamo riunito le esperienze di tre diversi gruppi di ricerca con conoscenze specifiche sulla Fibrosi Cistica e sulla poliposi nasale. L'identificazione di questi fattori è di fondamentale importanza per comprendere alcuni meccanismi molecolari che inducono la poliposi nasale, e può far luce sullo sviluppo di terapie farmacologiche adeguate.

Gasparini P, Cabrini G
Department of Reproductive and Developmental Sciences of the University of Trieste; Laboratorio Patologia Molecolare/Centro Fibrosi Cistica/Azienda Ospedaliera di Verona

Genetic factors involved in the innate immunity influencing pulmonary disease in cystic fibrosis patients.

Fattori genetici coinvolti nell'immunità innata e possibilmente influenti sulla malattia polmonare nei pazienti con fibrosi cistica (Progetto FFC #22/2006)



Paolo Gasparini (primo a sinistra) con i compagni di ricerca di Trieste

I pazienti affetti da Fibrosi cistica sono caratterizzati da una notevole eterogeneità del fenotipo clinico polmonare soprattutto in termini di età di colonizzazione da parte di batteri e gravità dell' infiammazione, tanto che mostrano gradi diversi di compromissione delle funzioni respiratorie.

La notevole eterogeneità del fenotipo polmonare, osservata in pazienti caratterizzati dalla stessa mutazione in omozigosi a carico del gene responsabile della Fibrosi Cistica, CFTR, suggerisce che la perdita progressiva e diversificata delle funzioni respiratorie può essere attribuita solo in parte al genotipo CFTR.

Tra i vari geni candidati per avere un ruolo importante nella modulazione del fenotipo polmonare, quelli coinvolti nella regolazione della risposta immunitaria innata a livello delle vie respiratorie meritano sicuramente un'attenzione particolare.

Nel nostro progetto di ricerca verranno analizzati una serie di polimorfismi a carico di geni coinvolti nell'insorgenza di colonizzazione batterica, nella chemotassi dei leucociti, nella risposta proinfiammatoria e nell'omeostasi dei liquidi delle vie respiratorie. Verrà studiata una coorte di 250 pazienti affetti da fibrosi cistica caratterizzati da omogeneità genetica (omozigoti DeltaF508) suddivisa in fenotipi "mild" e "severe" sulla base dei dati clinici relativi al fenotipo polmonare. I risultati attesi riguardano l'identificazione di polimorfismi

genetici a carico dei geni dell'immunità innata correlabili con l'evoluzione positiva o negativa del fenotipo polmonare. Se i risultati ottenuti saranno significativi un ulteriore obiettivo è quello di estendere l'analisi ad altre coorti di pazienti CF di dimensioni numeriche maggiori.

Laura Cremonesi (seconda da sinistra) con il suo gruppo di ricerca

Cremonesi L[1], Torri A[1], Galbiati S[1], Restagno G[2], Mari C[2], Sbaiz L[2], Seia M[3], Travi M[3], Castellani C[4], Ferrari M[1,5,6].

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

New approaches for noninvasive prenatal diagnosis of cystic fibrosis by fetal DNA analysis in maternal plasma

Nuovi approcci per la diagnosi prenatale non invasiva di fibrosi cistica mediante analisi del DNA fetale nel plasma materno (Progetto FFC #14/2005)

Negli ultimi dieci anni è stata dimostrata la presenza del DNA fetale libero nel plasma materno, che costituisce una fonte di materiale genetico ottenibile senza rischi per il feto e può essere utilizzato per la diagnosi prenatale non invasiva.

Ci proponiamo di sviluppare una strategia per l'identificazione delle mutazioni e dei polimorfismi fetali nel gene CFTR ereditate per via paterna nelle coppie a rischio per fibrosi cistica. Il DNA fetale è rilevabile nel plasma materno a concentrazioni molto basse e si trova in presenza di un eccesso di DNA materno che compete con il DNA fetale durante il processo di amplificazione. Per superare questo ostacolo stiamo impiegando delle metodiche avanzate altamente sensibili, quali un microchip microelettronico e il pyrosequencing, associate ad una strategia di arricchimento dell'allele fetale mutato minoritario basata sul clamping dell'allele wild-type (prevalentemente materno) da parte di peptide nucleic acids (PNAs).

Nel corso del primo anno di progetto abbiamo valutato vari protocolli di estrazione del DNA da plasma e abbiamo identificato la metodica che permette un recupero maggiore di DNA. Abbiamo considerato la possibilità di introdurre nelle reazioni di PCR un sistema anticontaminazione (Uracil-N-glicosilasi, UNG); dato che questa procedura richiede condizioni operative che non permettono una inibizione efficiente dell'allele wild-type, tale protocollo è stato abbandonato.

Abbiamo quindi messo a punto le condizioni di PCR per 7 mutazioni (deltaF508, N1303K, G542X, 2183AA->G, 1717-1G->A, W1282X, R1162X) e 4 polimorfismi (M470V, 4006-200G/A, 4521G/A, 2694T/G) del gene CFTR da analizzare con microchip e pyrosequencing.

Sul microchip abbiamo valutato l'efficienza delle sonde disegnate con formato universale. Analizzando campioni di plasma provenienti da pazienti diversi abbiamo individuato le scale di PNA che permettono una buona inibizione dell'allelle wild-type in modo riproducibile per le mutazioni deltaF508, N1303K, G542X e 2183AA->G; stiamo lavorando per individuare le scale per l'inibizione dell'allele wild-type per le restanti mutazioni e per l'inibizione di entrambe le forme alleliche dei polimorfismi.

Per il pyrosequencing sono state ottimizzate le condizioni per l'analisi delle mutazioni deltaF508, N1303K, G542X, 2183AA->G, 1717-1G>A, R1162X, W1282X e dei polimorfismi M470V, 4006-200 G/A, 4521 G/A, 2694 T/G.

I saggi sviluppati durante questo primo anno possono quindi essere valutati per l'applicazione alle diagnosi prenatali non invasive raccolte presso i centri di Milano, Verona e Torino.

I PROGETTI FFC FINORA ADOTTATI

Dei 77 progetti selezionati e finanziati dalla Fondazione FFC dal 2002 al 2006, 47 sono stati adottati, totalmente o parzialmente, da Aziende, Fondazioni Bancarie, Associazioni FC, Delegazioni FFC, Scuole e Privati. Di seguito, la lista dei progetti adottati e di coloro che li hanno fatti propri, con un grazie particolare dalla Fondazione.

FFC #1/2002 -Minicromosomi: un nuovo approccio per la terapia genica della Fibrosi Cistica.
Responsabile: Prof. Fiorentina Ascenzioni
(Univ. La Sapienza - Roma);
Costo: 131.000 Euro.
Adottato totalmente da:
La Bottega delle donne - Delegazione FFC di TV

FFC #3/2003 - Screening di farmaci già approvati per uso umano al fine di identificare nuovi mezzi farmacologici per la fibrosi cistica.
Responsabile Dr. Galietta
(Ospedale G. Gaslini, Genova);
Costo: 60.000 Euro.
Adottato parzialmente da:
Fondazione Cariverona (51.645 Euro)

FFC #8/2003 - Regolazione genica e mutazioni adattative di Pseudomonas aeruginosa in un modello di infezione polmonare cronica per la fibrosi cistica.
Responsabile Dr.ssa Bragonzi
(Osp. San Raffaele, Milano);
Costo: 45.000 Euro.
Adottato totalmente da:
Delegazione FFC di Bologna

FFC #11/2003 - Patogenesi e trattamento della malattia epatica in fibrosi cistica.
Responsabile Dr. Strazzabosco
(Ospedali Riuniti, Bergamo);
Costo: 60.000 Euro.
Adottato parzialmente da:
Fondazione Cariverona (51.645 Euro)

FFC #1/2004 - Dissezione di processi di conformazione della proteina CFTR in cellule CFTR normali e con mutazione ΔF508. Uso di tossine disarmate per colpire le molecole "chaperones"ed assistere la conformazione e l'espressione di DF508-CFTR
Responsabile Prof. Colombatti
(Dip. Patologia - Univ. Verona);
Costo: 18.000 Euro.
Adottato parzialmente da:
Liceo Scientifico Messedaglia - VR (2.680 Euro)

FFC #2/2004 - Meccanismi di regolazione del canale CFTR e dei fenomeni secretori ad esso correlati.
Responsabile Prof. Osculati
(Dip. Scienze Morfol. Biom. - Univ. Verona);
Costo: 15.000 Euro.
Adottato parzialmente da:
Istituto "Fermi" di Verona (3.677 Euro) e Istituto Comprensivo "Santini" - Noventa Padovana (461 Euro)

FFC #4/2004 - Ruolo dei recettori di Adenovirus nell'attivazione dei percorsi della protein-chinasi attivata da fitogeni e del fattore nucleare –kB nelle cellule epiteliali delle vie respiratorie umane.
Responsabile Dr.ssa Tamanini
(Centro Fibrosi Cistica - Verona);
Costo: 15.000 Euro.
Adottato totalmente da:
Associazione Veneta FC

FFC #5/2004 - Screening delle mutazioni di riarrangiamento genomico CFTR in pazienti CF italiani.
Responsabile Prof. Castaldo
(Univ. Federico II - Napoli);
Costo: 45.000 Euro.
Adottato totalmente da:
Verona Fiere

FFC #6/2004 - Le persone con iperossaluria e ipocitraturia che formano calcoli renali calcarei rappresentano un nuovo disordine correlato alla Fibrosi Cistica?
Responsabile Prof. Lupo
(Dip. Nefrologia - Osp. Maggiore, VR);
Costo: 18.000 Euro.
Adottato totalmente da:
Fondazione "Zanotto" - VR

FFC #7/2004 - Mappa delle mutazioni del gene CFTR in Italia: distribuzione regionale nel contesto europeo.
Responsabile Prof. Piazza
(Dip. Genetica e Biochimica - Univ. Torino);
Costo: 18.000 Euro.
Adottato totalmente da:
Delegazione FFC di Belluno

FFC #8/2004 - Caratterizzazione delle mutazioni sconosciute nei pazienti italiani e valutazione del loro ruolo patogeno.
Responsabile Prof.ssa Rosatelli
(Osp. Microcitemici - Cagliari);
Costo: 25.000 Euro.
Adottato totalmente da:
Gruppo Alimentare Rossetto - VR

FFC #10/2004 - Identificazione su tutto il genoma di un target di geni per disegnare antibiotici non convenzionali contro i patogeni correlati alla fibrosi cistica.
Responsabile Dr. Bertoni
(Dip. Scienze Biomolec. E Biotecn. - Univ. Milano);
Costo: 45.000 Euro.
Adottato totalmente da:
Valentino Gruppo Marzotto SpA- MI

FFC #11/2004 - Valutazione della patogenicità di ceppi ambientali e clinici di Burkholderia cepacia complex isolati ed in presenza di Ps. aeruginosa.
Responsabile Dr.ssa Bevivino
(ENEA – Casaccia – Roma);
Costo: 30.000 Euro.
Adottato parzialmente da:
Associazione Laziale (15.000 Euro) e Lombarda FC (4.000 Euro)

FFC #12/2004 - Resistenza antimicrobica in ceppi di Burkholderia cepacia complex isolati da pazienti fibrocistici: identificazione, caratterizzazione e ruolo dei trasportatori di efflusso nella resistenza intrinseca ed acquisita ai farmaci.
Responsabile Dr.ssa Riccardi
(Dip. Genetica e Microbiol. - Univ. Pavia);
Costo: 18.000 Euro.
Adottato totalmente da:
Mauro Furlini e Sigg. Zini (14.600 Euro) e

Delegazione FFC Trento (5.400 Euro)
in ricordo di "Sara"

FFC #13/2004 - Ruolo di SOCS3 nelle cellule infiammatorie in risposta a stimoli di origine batterica.
Responsabile Dr.ssa Bazzoni
(Dip. Patologia - Univ. Verona);
Costo: 18.000 Euro.
Adottato parzialmente da:
Liceo Scienze Umane "Montanari" - VR
(2.780 Euro)

FFC #14/2004 - Interazione in vitro tra batteri patogeni della fibrosi cistica e cellule epiteliali che esprimono la proteina CFTR.
Responsabile Dr.ssa Dechecchi
(Centro Fibrosi Cistica - Verona);
Costo: 45.000 Euro.
Adottato totalmente da:
Associazione Veneta FC

FFC #16/2004 - Polipi nasali di pazienti FC come modello ex vivo per studiare l'infiammazione e la sua modulazione attraverso l'inibizione del percorso di p-38 MAP-kinase: implicazioni per la terapia
Responsabile:
Univ. Federico II - Napoli;
Costo: 20.000 Euro.
Adottato totalmente da:
Delegazione FFC di Latina in ricordo di "Saretta"

FFC #17/2004 - Infiammazione ed apoptosi nell'epitelio delle vie aeree in fibrosi cistica: ruolo di NF-kB e dei suoi geni bersaglio.
Responsabile Dr.ssa Zazzeroni
(Dip. Medicina Sperimentale - Univ. Dell'Aquila);
Costo: 60.000 Euro.
Adottato totalmente da:
Associazione Siciliana FC

FFC #18/2004 - Eradicazione precoce di Pseudomonas aeruginosa e sua successiva colonizzazione in pazienti con fibrosi cistica.
Responsabile Dr. Taccetti
(Centro Fibrosi Cistica - Osp. A. Meyer, Firenze);
Costo: 15.000 Euro.
Adottato totalmente da:
Milior S.p.A. - Prato

FFC #19/2004 - Aggiornamento e controllo di qualità dei dati del Registro Italiano della fibrosi cistica: un punto di partenza per analizzare i dati clinici e divulgare i risultati.
Responsabile Dr.ssa Bossi
(Istituto di Statistica Medica e Biometria - MI);
Costo: 20.000 Euro.
Adottato parzialmente da:
Uovador S.p.A. - VR (7.000 Euro)

FFC #1/2005 - Ruolo della proteina di interazione NHERF nella regolazione dell'attività e della espressione della proteina – canale CFTR
Responsabile: Prof. Valeria Casavola
(Università di Bari)
Costo: 60.000 Euro.
Adottato parzialmente da:
Comitato Provinciale FC di Agrigento - Associazione Siciliana FC (8.000 Euro)

FFC # 2/2005 - Effetto degli antibiotici macrolidi sul trasporto ionico attraverso la proteina – canale CFTR
Responsabile: Emanuele Giordano
Istituto Nazionale di Ricerca Cardiovascolare – Università di Bologna/Cesena)
Costo: 25.000 Euro.
Adottato totalmente da:
Delegazione FFC di Torino

FFC #3/2005 - Valutazione di un polimero cationico, la polietilenimina, per il trasferimento di vettori genomici (minicromosomi) a epiteli respiratori in vitro e in vivo
Responsabile: Prof. Fiorentina Ascenzioni
(Università "La Sapienza" – Roma)
Costo: 30.000 Euro.
Adottato totalmente da:
Delegazione FFC di Vicenza

FFC # 4/2005 - Vettori lentivirali di nuova generazione per la terapia genica della fibrosi cistica: valutazione del potenziale infiammatorio.
Responsabile: Giulio Cabrini
Centro Fibrosi Cistica – Osp. Maggiore,
Costo: 30.000 Euro.
Adottato totalmente da:
Delegazione FFC del Lago di Garda e di Bergamo

FFC # 5/2005 - Protocolli di terapia genica del gene CFTR in cellule staminali embrionali umane utilizzando la tecnica SFHR (rimpiazzo di piccoli frammenti di DNA omologo)
Responsabile:Federica Sangiuolo
(Università Tor Vergata, Roma)
Costo: 60.000 Euro.
Adottato parzialmente da:
Medusa Film Roma (38.000 Euro)

FFC # 6/2005 - Stafilococco aureo multiresistente (MRSA) acquisito nella comunità o acquisito in ospedale in pazienti affetti da fibrosi cistica: studio multicentrico su sensibilità agli antibiotici, epidemiologia, storia naturale e rilevanza clinica.
Responsabile:Silvia Campana
Centro Fibrosi Cistica - Ospedale A. Meyer, Firenze
Costo: 15.000 Euro.
Adottato totalmente da:
Latteria Montello Treviso

FFC # 7/2005 - Stenotrophomonas maltophilia, un batterio emergente nei malati di fibrosi cistica: identificazione, caratterizzazione molecolare dei determinanti di virulenza, terapie antimicrobiche alternative, analisi proteomica e genomica comparativa
Responsabile: Bianca Colonna
Univ. "La Sapienza" , Roma
Costo: 50.000 Euro.
Adottato totalmente da:
Famiglia Pizzinato - Pordenone

FFC # 8/2005 - Tipizzazione molecolare (studio del DNA) di ceppi di Pseudomonas aeruginosa isolati da pazienti italiani FC e loro comparazione con profili presenti nel "database europeo" di ceppi clinici e ambientali.
Responsabile: Graziana Manno
Lab. Microbiologia; Istituto G. Gaslini, Genova
Costo: 30.000 Euro.
Adottato totalmente da:
Aziende Prov. di FE e BO (20.650 Euro) (*)
Delegazione FFC di Ferrara (5.850 Euro)

In Job Verona (3.500 Euro)

FFC # 9/2005 - Studio dei sistemi di "quorum sensing" di Pseudomonas aeruginosa e Burkholderia cepacia complex.
Responsabile: Vittorio Venturi
Centro Internazionale per l'Ingegneria Genetica e Biotecnologie, ICGEB – Trieste
Costo: 50.000 Euro.
Adottato totalmente da:
Delegazione FFC di Vicenza

FFC #10/2005 - Ruoli dell' azitromicina diversi da quelli antibatterici: rilevanza per la terapia della fibrosi cistica
Responsabile: Paola Melotti
Centro Fibrosi Cistica – Osp. Maggiore, Verona
Costo: 30.000 Euro.
Adottato da:
18 Istituti Scolastici Veronesi (27.411 Euro) (**)

FFC #11/2005 - Danno infiammatorio cronico in corso di fibrosi cistica: ruoli protettivi della gamma-glutamiltransferasi e dell'acido ascorbico.
Responsabile: Alfonso Pompella
Scuola Medica – Università di Pisa
Costo: 28.000 Euro.
Adottato totalmente da:
Associazione Trentina FC
(Gruppo di sostegno FFC di Trento)

FFC #12/2005 - La lipoxina A4 nella fibrosi cistica: biosintesi e trasduzione del segnale.
Responsabile: Mario Romano
Univ. "G. D'Annunzio", Chieti
Costo: 40.000 Euro.
Adottato totalmente da:
Associazione Siciliana FC

FFC#13/2005-Identificazione e caratterizzazione biochimica di proteine ad attività antibatterica prodotte nel fluido che bagna la superficie delle vie aeree.
Responsabile: Roberto Biassoni
Lab. Medicina Molecolare - Istituto "G. Gaslini", Genova
Costo: 25.000 Euro.
Adottato totalmente da:
Mondadori Printing Verona

FFC #14/2005 - Nuovi approcci per la diagnosi prenatale non invasiva di fibrosi cistica mediante analisi del DNA fetale nel plasma materno.
Responsabile: Laura Cremonesi Fondazione Centro San Raffaele del Monte Tabor, Milano
Costo: 50.000 Euro.
Adottato totalmente da:
Compagnia di S.Paolo - TO (38.000 Euro)
Ass.Im.P. - Verona (12.000 Euro)

FFC #15/2005 - Varianti genomiche che modificano lo splicing. Studio degli aspetti diagnostici e terapeutici nella fibrosi cistica.
Responsabile: Franco Pagani
Centro Internazionale per l'Ingegneria Genetica e Biotecnologie, ICGEB – Trieste
Costo: 60.000 Euro.
Adottato totalmente da:
Delegazione FFC Bottega delle Donne Montebelluna - Tv

FFC #16/2005
Diabete, intolleranza al glucosio e ipoglicemia in pazienti con fibrosi cistica.
Responsabile: Carla Colombo
Centro Fibrosi Cistica - Fondazione IRCCS, Milano
Costo: 25.000 Euro.
Adottato parzialmente da:
CRCF Foundation Pa (U.S.A.) (12.600 Euro)

FFC #17/2005
Validazione multicentrica di un questionario sulla qualità di vita specificamente orientato alla fibrosi cistica e centrato sullo stato di salute.
Responsabile: Rita Nobili
Centro Fibrosi Cistica - Fondazione IRCCS, Milano
Costo: 6.000 Euro.
Adottato totalmente da:
Delegazione FFC di Rovigo "A Francesca"

Progetto FFC #3/2006
Identificazione, ottimizzazione e convalidazione di composti chimici per la terapia farmacologia della fibrosi cistica.
Responsabile: Luis Galietta (Istituto G. Gaslini - Laboratorio Genetica Molecolare – Genova)
Partners: Mauro Mazzei (Università di Genova, Dip. Scienze Farmaceutiche); Oscar Moran (Istituto di Biofisica, CNR, Genova)
Ricercatori coinvolti: 11. Durata: 2 anni
Finanziamento: € 60.000
Adottato totalmente da Delegazione FFC "La Bottega delle Donne" Montebelluna

Progetto FFC #5/2006
Meccanismi di reclutamento di cellule staminali derivate dal midollo osseo nell'epitelio polmonare normale o affetto da fibrosi cistica.
Responsabile: Roberto Loi (Università di Cagliari - Dip. Tossicologia - Sez. Patologia e Oncologia Molecolare)
Ricercatori coinvolti: 4. Durata: 2 anni
Finanziamento: € 30.000
Adottato totalmente da Dr Sandro Veronesi (Calzedonia) e Montblanc Italia

Progetto FFC #7/2006
Influenza di Pseudomonas aeruginosa e dell'ospite FC sulla patogenicità di Burkholderia cenocepacia.
Responsabile: Annamaria Bevivino (ENEA Casaccia - Dip.to Biotecnologie, Roma)
Partners: Fiorentina Ascenzioni (Università La Sapienza, Dip. Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Roma); Alessandra Bragonzi (Istituto per il trattamento sperimentale della fibrosi cistica, Ospedale S. Raffaele, Milano)
Ricercatori coinvolti: 14. Durata: 2 anni
Finanziamento: € 35.000
Adottato totalmente da Delegazione FFC di Latina

Progetto FFC #9/2006
Uno screening biologico per nuove classi di agenti antimicrobici contro Pseudomonas aeruginosa inibitori dei segnali cellulari che presiedono alla formazione del biofilm.
Responsabile: Paolo Landini (Università di Milano - Dip.to Scienze Biomolecolari e Biotecnologie)
Partners: A. Bernardi (Università di Milano, Dip. Chimica Organica ed Industriale); P. Seneci (Università di Milano, Dip. Chimica Organica e Indust.)
Ricercatori coinvolti: 3. Durata: 2 anni
Finanziamento: € 30.000
Adottato totalmente da
Delegazione FFC
di Belluno

Progetto FFC #12/2006
Stafilococco aureo multiresistente (MRSA) acquisito in comunità o in ospedale da pazienti affetti di fibrosi cistica: studio multicentrico su suscettibilità antibiotica, epidemiologia, storia e rilevanza clinica
Responsabile: Silvia Campana (Centro Fibrosi Cistica - Ospedale Meyer - Firenze)
Ricercatori coinvolti: 22. Durata: 1 anno
Finanziamento: € 17.000
Adottato totalmente da
Lega Italiana Fibrosi Cistica - Associazione Veneta

Progetto FFC #14/2006
Studio longitudinale sulla selezione ed evoluzione dei meccanismi di resistenza di Pseudomonas aeruginosa in relazione al trattamento antibiotico in pazienti con fibrosi cistica.
Responsabile: Anna Silvia Neri (Ospedale Meyer - Centro FC, Dip.to Pediatria – Firenze)
Partner: Gian Maria Rossolini (Università di Siena, Dip. Biologia Molecolare)
Ricercatori coinvolti: 12. Durata 2 anni
Finanziamento: € 20.000
Adottato totalmente da: Sig. Roberto Danieli (Asolo TV); Sig. Alberto Vaccari (Thiene VI); Sig. Antonio Pavan (Costabissara VI)

Progetto FFC#16/2006
Effetto di correttori del difetto di maturazione di CFTR sulla risposta infiammatoria all' infezione da Pseudomonas aeruginosa in cellule epiteliali respiratorie.
Responsabile: Maria Cristina Dechecchi (Laboratorio di Analisi Chimico Cliniche ed Ematologiche, Ospedale Civile Maggiore, Verona)
Partners: Frederic Becq (Institut de Physiologie et Biologie Cellulaires, Poitiers, FR) ; Roberto Gambari (Università di Ferrara, Dip. Biochimica e Biologia Molecolare)
Ricercatori coinvolti: 13. Durata: 2 anni
Finanziamento: € 43.000
Adottato totalmente da Lega Italiana Fibrosi Cistica - Associazione Veneta

Progetto FFC#17/2006
Ruoli non antibiotici dell'azitromicina: rilevanza per la terapia della fibrosi cistica.
Responsabile: dr.ssa Paola Melotti (Centro Fibrosi Cistica, Ospedale Civile Maggiore, Verona)
Partners: dr. Pierluigi Mauri (Istituto per le Tecnologie Biomediche, Segrate - MI) ; dr. Carlo Sorio (Università di Verona, Dip. Patologia Generale)
Ricercatori coinvolti: 15 Durata: 2 anni
Finanziamento: € 30.000
Adottato parzialmente da Gruppo di Sostegno FFC "Rita Callegari" (€ 8.000) e da
"In Job Verona" con "Printing Informa-house Organ" di Mondadori Printing (€ 10.000).

Progetto FFC #20/2006
Prevenzione delle esacerbazioni polmonari in pazienti con fibrosi cistica attraverso modulazione della flora batterica intestinale.
Responsabile: Alfredo Guarino (Università Federico II di Napoli, Dip.to Pediatria)
Partners: Carla Colombo (Fondazione IRCCS, Policlinico Mangiagalli e Regina Elena, Dip. Pediatria, Milano); Lorenzo Morelli (Università di Piacenza, Tecnologie Analitiche Avanzate)
Ricercatori coinvolti: 12. Durata: 2 anni
Finanziamento: € 20.000
Adottato totalmente da Latteria Montello (TV)

Progetto FFC #21/2006
Efficacia di insulina a lento rilascio (glargine) nei pazienti affetti da Fibrosi Cistica e da intolleranza al glucosio con decadimento clinico.
Responsabile: Laura Minicucci (Istituto G. Gaslini - Dip.to Pediatria - Centro FC, Genova)
Partner: Riccardo Haupt (Istituto G. Gaslini, Sezione di Epidemiologia e Biostatistica, Genova)
Ricercatori coinvolti: 52. Durata: 2 anni
Finanziamento: € 25.000
Adottato totalmente da
Delegazione FFC di Bologna

(*) **Gruppo Aziende Provincie di Ferrara e Bologna**

- *Studio Tecnico Ing. Luigi Giuliani*
- *Zagatti Wiliam snc*
- *Ferramenta Chendi snc*
- *Moda Service sas di Argentesi*
- *Trw Automotive Italia S.p.A.*
- *L.T.E. Lift Truck Equipment S.p.A.*
- *Officine Meccaniche Sirio srl*
- *G.R.B. S.p.A.*
- *H.T.S. High Technology Services*
- *OMI snc*

(**) **Istituti scolastici veronesi**

- *Liceo Scientifico Messedaglia*
- *Istituto Agrario Bentegodi*
- *Istituto Fermi*
- *Liceo Tecn. Anti*
- *Liceo Primo Levi*
- *Istituto Comprensivo Ascheri*
- *Istituto Pindemonte*
- *Liceo Scienze Umane Montanari*
- *Isa Nani – Liceo Artistico Boccioni*
- *Liceo Classico Maffei*
- *Istituto Sanmicheli*
- *Istituto Dal Cero*
- *Liceo Scientifico Fracastoro*
- *Istituto Agrario Stefani*
- *Istituto Tecnico Comm. Bolisani*
- *Liceo Guarino Veronese*
- *Istituto Cangrande*
- *Liceo Leonardo Da Vinci*

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

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

Presidenza e Segreteria
Tel. 045 8123438 – fax 045 8123568
e-mail: fondazione.ricercafc@azosp.vr.it.
Codice fiscale 93100600233

Consiglio di Amministrazione

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

Direzione Scientifica
Tel. 045 8123567 cell. 347 6287890
Direttore Scientifico: Gianni Mastella
e-mail: gianni.mastella@azosp.vr.it.

Comitato di Consulenza Scientifica

Presidente:	Antonio Cao
Consiglieri:	Giorgio Berton
	Roberto Buzzetti
	Lucio Luzzatto
	Nello Martini

Per donazioni:

- Conto corrente postale n. 18841379
- Conto corrente Unicredit Banca
  n. 9465517 - ABI 2008 - CAB 11718 - CIN N
- Conto corrente Banco Popolare Verona
  n. 48829 - ABI 5188 - CAB 11708 - CIN V
- On-line sul sito: www.fibrosicisticaricerca.it

www.fibrosicisticaricerca.it

Impaginazione:
Paolo Tosi

Stampato il 14 novembre 2006
Tipografia Artigiana - S. Giovanni Lupatoto (VR)

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

Ospedale Maggiore - Piazzale Stefani, 1 37126 (VR)
Tel. 045 8123438 - Fax 045 8123568
e-mail: fondazione.ricercafc@azosp.it
www.fibrosicisticaricerca.it