REGIONE CAMPANIA - Giunta Regionale - Seduta del 30 gennaio 2009 - Deliberazione N. 129 - Area Generale di Coordinamento N. 20 - Assistenza Sanitaria – **Programma di Ricerca "Legge 548/93 - Fibrosi Cistica" - Fondi CIPE.**

PREMESSO CHE

- la Legge 548/93: ”Disposizioni per la prevenzione e la cura della Fibrosi cistica“ prevede l’istituzione dei Centri Regionali di Riferimento per la Fibrosi Cistica con funzioni di prevenzione, diagnosi, cura, riabilitazione dei malati e ricerca sulla Fibrosi Cistica ;
- la legge suddetta prevede che gli interventi regionali siano rivolti, tra l’altro, a promuovere programmi di ricerca atti a migliorare le conoscenze cliniche e di base della malattia (art. 1, comma 2, punto f) e che tra i compiti del Centro regionale vi sia quello di effettuare la ricerca (art. 3, comma 2);
- il provvedimento normativo citato prevede, altresì, la copertura economica per tali attività, stabilendo che i finanziamenti siano ripartiti tra le Regioni in base alla consistenza numerica dei pazienti;

PREMESSO, altresì, CHE

- con delibera n. 1168 del 16 marzo 2001 la Giunta Regionale Campania istituiva, ai sensi della Legge n. 548/93 citata, presso l’Università degli Studi di Napoli “Federico II” – Dipartimento Clinico di Pediatria Generale e Specialistica ed Area Funzionale di Geriatria del Dipartimento Assistenziale di Medicina Interna , Geriatria, Patologia Cardiovascolare ed Immunologia e Cardiochirurgia – il Centro di riferimento regionale per la Fibrosi Cistica in Campania;
- con delibera n.233 del 16 febbraio 2005 nel succitato Centro di Riferimento è stato inserito il CEINGE-Biotecnologie avanzate di Napoli , società consortile senza fini di lucro il cui capitale, interamente pubblico, è detenuto per il 60% dalla Regione Campania che ha maturato una consolidata e documentata esperienza nel campo della tipizzazione molecolare della Fibrosi Cistica ed è pertanto in grado di completare le attività del Centro di riferimento regionale per la Fibrosi Cistica in Campania;
- che con Delibera CIPE del 20 dicembre 2005 veniva stanziata la somma di € 124.689,00 per progetti di ricerca sulla Fibrosi Cistica;
- che con Decreto Dirigenziale n. 169 dell’ 11 novembre 2005 veniva impegnata la suddetta somma in favore del Centro di Riferimento Regionale per la Fibrosi Cistica dell’A.O.U.P. Federico II;
- che con Delibera CIPE del 22 marzo 2006 veniva stanziata la somma di € 122.260,00 per progetti di ricerca sulla Fibrosi Cistica;
- che con Decreto Dirigenziale n. 357 del 17 dicembre 2007 veniva impegnata la suddetta somma in favore del Centro di Riferimento Regionale per la Fibrosi Cistica dell’A.O.U.P. Federico II;

VISTI

- il programma di ricerca : “Analisi del rapporto tra fattori genetici ed espressione clinica nella Fibrosi cistica.”;
- la richiesta di erogazione del finanziamento pari ad € 246.949,00 per gli anni 2004 e 2005 così come deliberato dal CIPE, firmata dai responsabili delle tre strutture che compongono il Centro di Riferimento Regionale per la Fibrosi Cistica e controfirmata dal Direttore Generale dell’A.O.U.P. Federico II;
- La Delibera CIPE del 20 dicembre 2005 con cui veniva stanziata la somma di € 124.689,00 per progetti di ricerca sulla Fibrosi Cistica;
- Delibera CIPE del 22 marzo 2006 con cui veniva stanziata la somma di € 122.260,00 per progetti di ricerca sulla Fibrosi Cistica;

CONSIDERATO CHE

- il programma di ricerca : “Analisi del rapporto tra fattori genetici ed espressione clinica nella Fibrosi Cistica.”, risponde a quanto previsto dalle disposizioni legislative vigenti;

RITENUTO, pertanto

che lo stesso sia meritevole di approvazione in quanto finalizzato alla prevenzione, diagnosi e cura della fibrosi cistica;

PROPONE e la Giunta in conformità a voti unanimi

DELIBERA

per le considerazioni in premessa indicate che qui di seguito si intendono integralmente riportate

- di approvare il programma di ricerca : "Analisi del rapporto tra fattori genetici ed espressione clinica della Fibrosi Cistica";
- di approvare, altresì, l'erogazione del finanziamento di cui alle Delibere CIPE del 20 dicembre 2005 e del 22 marzo 2006 in favore del Centro di Riferimento regionale per la Fibrosi Cistica;
- di demandare al dirigente competente l'adozione degli atti consequenziali, ivi compresa la individuazione delle modalità di erogazione della spesa ed, altresì, la specificazione di idonee procedure di rendicontazione;
- di inviare per il seguito di competenza al Settore Assistenza Sanitaria e al Settore Stampa e Documentazione.

Il Segretario
D'Elia

Il Presidente
Bassolino

LEGGE 548/93 (Ministero della Salute) – ATTIVITA' SCIENTIFICHE CHE SARANNO SVOLTE DAL CENTRO REGIONALE FIBROSI CISTICA DELLA CAMPANIA

Biennio 2004-2005 (anche in prosecuzione delle attività svolte negli anni precedenti)

Titolo: Analisi del rapporto tra fattori genetici ed espressione clinica nella Fibrosi Cistica

Strutture partecipanti: Centro Regionale Fibrosi Cistica Regione Campania c/o

1. Dipartimento di Pediatria, Università di Napoli "Federico II". Responsabile Scientifico: Prof. Salvatore Auricchio.

2. Unità Specialistica Fibrosi Cistica dell'adulto. Dipartimento di Medicina Clinica e Patologia Cardiovascolare ed Immunitaria, Cattedra di Geriatria. Università di Napoli "Federico II". Responsabile scientifico: Prof. Franco Rengo.

3. CEINGE Biotecnologie avanzate, scarl, Napoli. Responsabile scientifico: Prof. Francesco Salvatore

Background generale

La Fibrosi Cistica (CF) rappresenta la malattia genetica a prognosi grave più frequente nella popolazione caucasica. La CF ha un'incidenza nel mondo di 1:2500 nati vivi e nel Mediterraneo di circa 1:3500 nati vivi, con una frequenza di portatore di circa 1:25 individui. La CF è una malattia cronica, evolutiva, plurisistemica che interessa pancreas, intestino, fegato, tratto respiratorio, ghiandole sudoripare e apparato genitale. La caratteristica fondamentale è l'alta viscosità e secchezza delle secrezioni mucose, da cui derivano ostruzione dei dotti bronchiali associata a infezioni polmonari, ispessimento del succo pancreatico ed elevati livelli di cloruro nel sudore. Altra caratteristica della malattia è l'estrema variabilità della modalità di comparsa, dell'entità dei sintomi e del decorso. Fino a vent'anni fa la sopravvivenza non superava l'età pediatrica; da alcuni anni, con il progredire delle tecniche diagnostiche e terapeutiche, più del 50% sopravvive fino all'adolescenza e all'età adulta. Tuttavia, alcuni malati possono presentare precocemente gli aspetti polmonari della malattia (infezioni respiratorie ricorrenti) e le manifestazioni gastrointestinali, quali l'ileo da meconio alla nascita e la sindrome da malassorbimento secondaria all'insufficienza pancreatica; altri hanno sintomi respiratori modesti e contenuti fino all'adolescenza (tosse saltuaria, sinusite, poliposi nasale) e quadro digestivo normale; altri ancora manifestano soprattutto epatopatia o diabete. In età adulta, vengono diagnosticate forme di malattia che hanno come unica manifestazione l'infertilità maschile dovuta all'assenza congenita dei dotti deferenti oppure, in entrambi i sessi, episodi di pancreatite ricorrente.

La malattia è determinata da mutazioni del gene CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator), identificato nel 1989 sul braccio lungo del cromosoma 7, che codifica per una proteina di membrana ubiquitaria, coinvolta nello scambio di cloruro tra l'ambiente intracellulare e l'ambiente extracellulare. In particolare, la mancata attivazione dello scambio cloruro/bicarbonato medito da CFTR altera la normale composizione elettrolitica ed osmolare dei secreti, alterando i normali valori di pH ed idratazione degli stessi.

A tutt'oggi, sono state descritte oltre 1500 mutazioni de gene CFTR e questa marcata eterogeneità genotipica si riflette nell'ampia variabilità fenotipica osservata. Tuttavia, la correlazione tra genotipo e fenotipo clinico non è così stretta, tanto che la predittività del genotipo rispetto alla sua manifestazione clinica rimane ancora oggi prevalentemente confinata alla condizione pancreatica. Gli alleli associati ad uno stato di insufficienza pancreatica sono classificati come "severe" (gravi), quelli con sufficienza pancreatica come "mild" (lievi). I primi, in omozigosi, sono generalmente

associati ad un quadro clinico pienamente espresso, i secondi, in eterozigosi composta con un allele "severo" consentono il mantenimento di una parziale sufficienza pancreatica. Tuttavia, anche se i malati con sufficienza pancreatica presentano condizioni generali più favorevoli ed una migliore aspettativa di vita, la situazione respiratoria può variare del tutto, indipendentemente dallo stato pancreatico. Per questo motivo, studi recenti sulla correlazione genotipo-fenotipo hanno postulato l'esistenza di geni "modulatori", ereditati in maniera indipendente da CFTR, in grado di condizionare l'espressione della malattia.

Fino ad alcuni anni fa, la diagnosi di CF si basava sulla positività del test del sudore in presenza di almeno una delle seguenti condizioni: pneumopatia cronica, insufficienza pancreatica, ileo da meconio, familiarità per la malattia. Oggi, la diagnosi deve essere sospettata anche di fronte ad alcune situazioni atipiche quali: la sindrome acuta da perdita di sali o l'alcalosi metabolica cronica nel bambino piccolo, la cirrosi epatica colestatica isolata, la pancreatite ricorrente o cronica isolata, la poliposi nasale con sinusite cronica, gli equivalenti meconiali come manifestazione d'esordio, le bronchiectasie diffuse e l'infertilità maschile da azoospermia ostruttiva nell'adolescente e nell'adulto. In questi casi il test del sudore, che rimane a tutt'oggi il criterio più sensibile e più specifico per la diagnosi di conferma o di esclusione di CF, può risultare borderline o addirittura normale. In questi casi l'analisi molecolare con sistemi di scanning o di sequenziamento del gene, permette d'identificare un largo numero di mutazioni associate alle forme atipiche della malattia.

La maggiore manifestazione clinica della CF rimane la compromissione del sistema respiratorio. Gli enormi progressi della qualità di vita e della sopravvivenza negli ultimi vent'anni sono stati ottenuti grazie al trattamento sistematico e precoce delle complicanze respiratorio. Recentemente si è dimostrato che studi sulla composizione del Liquido di lavaggio Bronco Alveolare (BAL) mostrano la precocità dell'interessamento polmonare fin dai primi mesi di vita, anche in assenza di sintomatologia o di infezione respiratoria documentata. Appare quindi evidente che lo screening neonatale per CF, malattia che soddisfa ampiamente la maggior parte dei criteri per un programma di screening di massa, può trovare applicazione per questa patologia. Tuttavia, i dati della letteratura pur dimostrando che i pazienti positivi allo screening neonatale mostrino un migliore status nutrizionale, una migliore funzionalità respiratoria e una diminuita morbilità rispetto ai soggetti diagnosticati successivamente per lo sviluppo di sintomi correlabili alla CF, non sono ancora definitivamente conclusivi su eventuali vantaggi respiratori e di prognosi.

L'attività di ricerca del Centro Regionale Fibrosi Cistica Regione Campania, che prosegue le attività già avviate e in corso relative agli anni precedenti, verterà sui seguenti temi:

1) Dipartimento di Pediatria, Università di Napoli "Federico II". Responsabile Scientifico: Prof. Salvatore Auricchio.

- Studio dell'Intolleranza Glucidica nei pazienti affetti da Fibrosi Cistica mediante nuovi strumenti diagnostici e possibili implicazioni terapeutiche.
- Mutazioni CFTR e difetto di attività battericida.

2) Unità Specialistica Fibrosi Cistica dell'adulto. Dipartimento di Medicina Clinica e Patologia Cardiovascolare ed Immunitaria, Cattedra di Geriatria. Università di Napoli "Federico II". Responsabile scientifico: Prof. Franco Rengo.

- Nuove diagnosi di forme atipiche di Fibrosi Cistica in età adulta.

3) CEINGE Biotecnologie avanzate, scarl, Napoli. Responsabile scientifico: Prof. Francesco Salvatore

- Analisi di grossi riarrangiamenti genici nel gene CFTR.
- Ricerca di varianti geniche in geni codificanti interattori di CFTR.

Dipartimento di Pediatria, Università di Napoli "Federico II". Responsabile Scientifico: Prof. Salvatore Auricchio.

Tema n. 1: Studio dell' Intolleranza Glucidica nei pazienti affetti da Fibrosi Cistica mediante nuovi strumenti diagnostici e possibili implicazioni terapeutiche.

a) Premessa

Il Diabete Mellito è la più frequente complicanza tardiva della CF ed è presente in circa il 10% circa della popolazione CF di età superiore a 10 anni. La causa principale di diabete in corso di CF (Cystic Fibrosis Related Diabetes: CFRD) è da ricercarsi nell'insulinopenia secondaria alla degenerazione delle beta-cellule pancreatiche. L'importanza di una diagnosi precoce di CFRD è motivata dall'osservazione che l'insorgenza di tale complicanza si associa ad una aumentata morbilità e mortalità della malattia, presumibilmente causate dal deficit dell'azione anabolizzante dell'insulina e dall'aumentato rischio di infezioni per l'iperglicemia. Un significativo decadimento dei parametri della malattia di base, quali prove di funzionalità respiratoria e BMI, è stato ripetutamente segnalato già prima della condizione di diabete. Il quadro di CFRD è solitamente preceduto da un periodo variabile caratterizzato da Intolleranza Glucidica (IG). Tale condizione, che non sempre esita in diabete, richiede comunque un'attenta sorveglianza. La diagnosi di IG si basa sulla periodica valutazione della curva da carico orale di glucosio (OGTT). Questo test non è sempre previsto nei protocolli di follow-up standard dei Centri CF e, tuttavia, non sempre è in grado di definire l'esatto quadro di IG. Anche altri test di screening disponibili per la diagnosi di diabete ed intolleranza glucidica, quali Emoglobina glicosilata e glicemia a digiuno e dopo due ore dal pasto non riflettono esattamente le alterazioni del metabolismo glucidico nei pazienti CF. Per questo motivo s'ipotizza che sia l'IG, sia il CFRD siano complicanze sottostimate. È comunque ipotizzabile che la condizione di IG, qualsiasi sia la sua evoluzione futura, sia già un periodo a rischio per la prognosi a distanza della CF e che una terapia precoce, atta a compensare il deficit insulinico, possa far fronte alle conseguenze nutrizionali che tale deficit comporta.

A tutt'oggi, l'unica terapia accreditata per il trattamento di CFRD è la terapia insulinica con protocollo a multiple iniezioni giornaliere. Da alcuni anni viene suggerita, sulla base di alcune linee guida internazionali, la necessità di somministrare insulina "Glargine", ossia una insulina sintetica a lento rilascio, anche ai pazienti con IG e con decadimento delle condizioni generali. Tale terapia potrebbe contribuire ad una maggiore efficacia ed accettabilità di un programma terapeutico sostitutivo senza ulteriore aggravio per i pazienti. Infatti, l'insulina Glargine richiede un'unica somministrazione giornaliera, non necessita di un monitoraggio pluri-quotidiano delle glicemia e

potrebbe comunque migliorare il compenso glucometabolico nei pazienti CF che necessitino di questa terapia.

Dati preliminari recenti dimostrano che il profilo glicemico può essere approfonditamente valutato mediante il sistema di monitoraggio continuo del glucosio (CGMS).

Studi preliminari del nostro gruppo di lavoro hanno dimostrato, in accordo a quanto pubblicato in recenti lavori, che alterazioni, anche minime, dell'omeostasi del glucosio possono essere cruciali per lo stato di salute del paziente e che il trattamento con insulina deve essere iniziato il più precocemente possibile. Sulla base di tali considerazioni appare fondamentale definire esattamente le alterazioni del metabolismo glucidico mediante il CGMS che consente di effettuare le determinazioni della glicemia dilazionando i prelievi nell'arco di 3-5 giorni.

b) Obiettivo

L'obiettivo è l'utilizzo della tecnica CGMS in pazienti CF di età superiore ai 10 anni per la diagnosi precoce d'IG e inizio di terapia con insulina a lento rilascio. Il precoce compenso metabolico può migliorare lo stato di funzionalità polmonare e lo stato nutrizionale, migliorando la qualità e l'attesa di vita per questi pazienti.

c) Metodologie:

Lo studio sarà effettuato su tutti pazienti che afferiscono al Dipartimento di Pediatria con presenza di sintomi suggestivi di CF tipica e atipica.

La diagnosi sarà confermata dal test del sudore, effettuato mediante ionoforesi pilocarpinica di Gibson e Cooke. La concentrazione del Cloruro e del Sodio e il rapporto Cloruro/Sodio saranno riferiti ai valori di riferimento classici; nei casi di valori borderline sarà effettuata l'analisi di mutazioni.

Il grado di compromissione polmonare sarà definito mediante Rx del torace, esame TAC polmonare e dei seni paranasali, studi microbiologici del tratto respiratorio e studi di funzionalità respiratoria. Nella presentazione atipica, verranno utilizzati anche test non invasivi della funzionalità pancreatica quali dosaggio dell'elastasi fecale e della steatorrea mediante steatocrito.

<u>Disegno:</u>

- Studio clinico osservazionale trasversale: numero di pazienti arruolati >100.
- Terapia insulinica: in caso di dimostrata IG, s'inizierà terapia insulinica con il Glargine (Lantus). Il farmaco sarà somministrato con un'unica iniezione intradermica, al dosaggio di 0,1-0,2 U/kg/die, monitorando gli effetti collaterali. Ogni paziente continuerà la terapia di

supporto per CF già in atto al momento dell'ingresso nello studio. È permessa qualsiasi terapia all'occorrenza decisa dal medico responsabile del Centro CF.

Criteri di eleggibilità ed esclusione:

Sono considerati eleggibili, i pazienti che corrispondono a tutti i seguenti requisiti:

- Diagnosi accertata di CF;
- Età ≥ 10 anni;
- Intolleranza glucidica: OGTT patologiche.

Saranno esclusi i pazienti che presentino controindicazioni specifiche all'utilizzo di Glargine.

Procedure di valutazione all'ingresso nello studio e nel follow-up.

Si assume che tutti i pazienti potenzialmente eleggibili per lo studio siano in regolare follow-up presso il proprio centro CF di riferimento e che eseguano regolarmente valutazione di curva da carico, prove di funzionalità respiratoria e valutazione antropometrica.

Gestione dei dati e conservazione della documentazione

I dati dei pazienti saranno registrati mediante un database.

Monitoraggio del paziente a domicilio e in corso delle visite presso il Centro di Riferimento

Il paziente stesso registrerà i valori di glicemia.

Durante le visite ospedaliere saranno valutati parametri ematochimici e strumentali.

d) Risultati attesi

Il risultato atteso è la diagnosi tempestiva d'IG che potrà avere ricadute sulla qualità di vita e sulla prognosi.

Tema n. 2: Mutazioni CFTR e difetto di attività battericida

a) Premessa

CFTR è una proteina di membrana ubiquitaria, coinvolta nello scambio di cloruro tra l'ambiente intracellulare e l'ambiente extracellulare, coinvolta nella patogenesi della Fibrosi Cistica (CF). La sua localizzazione sembra essere principalmente ristretta agli epiteli ma, recentemente, è

stata dimostrata la sua espressione anche in tessuti non epiteliali come i miociti cardiaci e, nel topo, in macrofagi di origine alveolare e peritoneale (Di A. et al., Nat Cell Biol 2006; 8:933-944). Nei macrofagi, oltre alla consueta localizzazione superficiale di CFTR, si è dimostrata una sua localizzazione nel compartimento vescicolare, dove partecipa al processo di acidificazione delle vescicole lisosomiali. I macrofagi alveolari derivati da topi CFTR knockout presentano lisosomi meno acidificati e non sono in grado di uccidere i batteri internalizzati. Questo meccanismo potrebbe giustificare una delle alterazioni più caratteristiche e meno curabili descritte nella CF: la maggiore suscettibilità alle infezioni ed, in particolare, all'infezione da *Pseudomonas aeruginosa*, che sembra essere piuttosto sensibile alle variazioni di pH. Allo stato delle nostre conoscenze non è ben chiaro se altre cellule della linea ematica esprimano CFTR, ma soprattutto non è ancora stato investigato se le mutazioni responsabili della malattia possano essere associate alla mancata acidificazione dei lisosomi in queste cellule. Più in generale, non è chiaro se CFTR partecipi al processo di acidificazione dei lisosomi nelle cellule che regolarmente esprimono il canale.

Studi recenti mostrano la cascata di eventi molecolari che porta all'istaurarsi del circolo vizioso ostruzione bronchiale-infezione ed infiammazione sia da considerarsi obsoleta. Tale considerazione è supportata da nuovi dati che indicano un deficit immune insito nella condizione CF. In particolare, è stato descritto uno stato d'infiammazione basale negli epiteli polmonare ed intestinale, per cui è possibile ipotizzare che un ulteriore sintomo di CF sia un'alterata risposta immune ad agenti patogeni.

L'alterazione della risposta immune potrebbe essere determinata dalla mancata acidificazione dei lisosomi, meccanismo essenziale per l'eliminazione di batteri patogeni a livello alveolare, ma è anche possibile che il deficit di CFTR interferisca con meccanismi di difesa diversi dall'azione dei macrofagi.

b) Obiettivi, tempi e metodologie

Nella prima fase del progetto si valuterà la possibilità che altre linee cellulari, in particolare quella ematopoietica, esprimano CFTR e che abbia una funzione nell'acidificazione dei lisosomi. A tale scopo, le cellule dendritiche possono rappresentare un compartimento cellulare interessante da investigare. Infatti, poiché le cellule dendritiche possono essere differenziate in vitro, è possibile valutare l'espressione di CFTR nei vari stadi di differenziamento da monocita a macrofago.

Una volta isolati i monociti dal sangue di soggetti normali e con CF si valuterà la presenza del messaggero di CFTR mediante Real-Time PCR e della proteina mediante Western-Blot della proteina immunoprecipitata con specifici anticorpi, tecnica che si è rivelata molto sensibile per la valutazione dell'espressione di questa proteina.

Le cellule che esprimono la proteina verranno valutate per la loro capacità di acidificare i lisosomi. Esistono varie tecniche che consentono di valutare questo parametro: alcune si basano sull'uso di sostanze fluorescenti che vengono fagocitate e cambiano colore con l'aumentare del pH, altre si basano sul quencing della fluoresceina che perde fluorescenza in maniera dipendente del pH. In tutti i casi la valutazione si effettua in microscopia confocale sia statica che in "time lapse". Una volta stabilita la capacità di acidificare i lisosomi delle cellule derivate da soggetto normale, sarà valutato questo parametro in cellule derivate da soggetti patologici. Dal confronto dei dati ottenuti sarà possibile descrivere se in pazienti CF questo fenomeno sia alterato ed eventualmente valutare il suo ruolo nella ridotta capacità di rispondere alle infezioni di questi soggetti.

Nella seconda fase del progetto si valuterà se il ruolo di CFTR nell'acidificazione dei lisosomi possa interferire con altre funzioni delle cellule immunitarie come ad esempio la capacità di produrre citochine proinfammatorie, la presentazione antigenica o la capacità di rispondere a stimoli chemiotattici. Tali valutazioni saranno effettuate sui monoliti isolati da sangue periferico .

La valutazione dell'espressione di citochine proinfiammatorie IL15 e TNF-alfa rappresenta un indice di "balance" infiammatorio. I livelli di tali citochine verranno valutati sia con PCR semiquantitativa che quantitativa. Inoltre, si potranno valutare i marcatori di maturazione delle cellule dendritiche, sia con tecniche che valutano l'espressione di proteine specifiche (FACS o ELISA), sia con tecniche che valutano i livelli dei messaggeri delle citochine in esame (PCR semiquantitativa e quantitativa).

Caratteristica peculiare dei monociti è la loro capacità migratoria a seguito di uno stimolo chemiotattico. Pertanto, si studierà la risposta chemiotattica di monociti isolati da pazienti CF in camere per chemiotassi tipo Transwell™.

In caso di presenza di alterata chemiotassi ci si propone di studiare eventuali alterazioni del citoscheletro e della morfologia di queste cellule.

Budget totale richiesto per il biennio anno: 85.000 euro

Ripartizione del budget:

Attrezzature	10%
Personale a contratto	30%
Missioni e viaggi di studio	5%
Reagenti e consumabili	45%
Spese generali	10%

Personale impegnato

1. Prof. Riccardo Troncone, Professore Ordinario di Pediatria
2. Dott. Valeria Raia, Ricercatore
3. Dott . Maria Vittoria Barone, Ricercatore
4. Dott. Angela Sepe, contrattista

Qualificazione della Struttura

Il Centro Specializzato di Riferimento della Fibrosi Cistica per la Regione Campania ha rappresentato presso il Dipartimento di Pediatria per più di vent'anni l'unico riferimento per la cura della CF in Campania e per pazienti delle regioni limitrofe. Attualmente l'attività assistenziale consiste in ricoveri in regime di day-hospital, in regime ordinario di degenza, controlli ambulatoriali, ricoveri d'urgenza secondo le disposizioni del Centro di Emergenza Regionale e collaborazione con i Centri Chirurgici Italiani specializzati per il trapianto polmonare ed epatico. Il Centro attualmente rappresenta per numero di pazienti assistiti, come si evince dai dati epidemiologici riportati dal Registro Italiano dell'Istituto di Statistica Medica e Biometria di Milano, il I Centro per l'Italia Meridionale; attualmente, presso l'Unità Specialistica Pediatrica, sono seguiti in regolare follow-up 200 pazienti affetti da CF. Presso il Dipartimento di Pediatria sono disponibili servizi dedicati alla cura dei pazienti quali il laboratorio che dispone di un'area di circa 1400 mq, le unità specialistiche di gastroenterologia, cardiologia, endocrinologia, chirurgia pediatrica, epatologia, endoscopia e motilità gastro-intestinale, radiologia pediatrica. Si avvale, inoltre, di servizi collegati entro l'Azienda Ospedaliera Universitaria quali Clinica Ostetrica e Ginecologica, Neuroradiologia, Clinica ORL, Neuropsichiatria infantile, Area Funzionale di Microbiologia, Servizio di Igiene Dentale, con competenze specifiche acquisite per l'assistenza ai pazienti con CF. Da anni collabora con il Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche/CEINGE per la caratterizzazione genotipica dei pazienti, per la diagnosi dei casi atipici, per studi sulla correlazione genotipo-fenotipo, per la diagnosi prenatale, per la consulenza genetica. Provvede, inoltre, anche a compiti di tipo assistenziale garantiti per tutti i pazienti con CF quali prescrizione di farmaci, presidi sanitari e quanto altro necessario per la cura e l'assistenza ai malati secondo le disposizioni della Legge nazionale 548/93, organizzazione dell'assistenza domiciliare; organizzazione del servizio di psicologia per i pazienti e le famiglie; rapporti con le associazioni di volontariato; attività di formazione e aggiornamento sulla CF degli operatori sanitari della Regione Campania. Svolge, inoltre, da alcuni anni di progetti di ricerca sulla modulazione della risposta

infiammatoria a stimoli antigenici batterici o alimentari mediante studi di coltura in vivo su tessuto respiratorio ed intestinale, con possibili implicazioni terapeutiche. Il personale dedicato all'assistenza ai pazienti con CF consta di 3 medici, 2 fisioterapisti della riabilitazione respiratoria, 1 assistente sociale, 1 dietista,1 neuropsichiatra, 1 personale dedicato alla segreteria sociale e all'archiviazione ed elaborazione dei dati dei pazienti mediante specifici data-base.

PUBBLICAZIONI RECENTI NEL CAMPO DELLA FIBROSI CISTICA

1) V. Raia, L. Maiuri, G.de Ritis, B. De Vizia, L. Vacca, R. Conte, S. Auricchio, M. Londei
Evidence of chronic inflammation in morphologically normal small intestine in cystic fibrosis patients
Pediatr. Res. 2000; 47:344-50

2) L. Maiuri, C. Ciacci, V. Raia, L. Vacca, I. Ricciardelli, F. Raimondi, S. Auricchio, S. Quaratino, M. Londei
FAS engagement drives apoptosis of enterocytes of coeliac patients.
Gut 2001; 48: 418-24.

3) Raia V, Maiuri L, de Ritis G, de Vizia B, Vacca L, Conte R, Auricchio S, Londei M.
Evidence of chronic inflammation in morphologocally normal small intestine of cystic fibrosis patients.
Pediatr Research 2000; 47:344-350

4) De Vizia B, Raia V, Spanò C, Pavlidis C, Coruzzo A, Alessio M.
Effect of an 8-month treatment with omega-3 fatty acids (eicosapentaenoic and docosahexaenoic) in patients with cystic fibrosis.
J Parenter Enteral Nutr 2003; 27: 52-7

5) Cimmino M, Cavaliere M, Nardone M, Plantulli A, Orefice A, Esposito V, Raia V.
Clinical characteristics and genotype analysis of patients with cystic fibrosis and nasal polyposis
Clin Otolaryngol 2003; 28: 125-32

6) Maiuri L, Ciacci C, Ricciardelli I, Vacca L, Raia V, Auricchio S, Picard J, Osman M, Quaratino S, Londei M.
Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in coeliac disease.
Lancet 2003; 362:30-7

7) Bruzzese E, Raia V, Gaudiello G, Polito G, Buccigrossi V, Formicola V, Guarino A.
Intestinal inflammation is a frequent feature of cystic fibrosis and is reduced by probiotic administration
Aliment Pharmacol Ther 2004; 20: 813-9

8) Lombardi F, Raia V, Spagnolo MI, Nugnes R, Valerio G, Ciccarelli G, Franzese A.
Diabetes in an infant with cystic fibrosis
Pediatr Diabetes 2004; 5: 199-201

9) Raia V, Maiuri L, Ciacci C, Ricciardelli I, Vacca L, Auricchio S, Cimmino M, Cavaliere M, Nardone M , Cesaro A, Malcom J, Quaratino S, Londei M.
Inhibition of p38 mitogen activated protein kinase controls airway inflammation in cystic fibrosis.
Thorax 2005; 60: 773-780

10) Cimmino M, Cavaliere M, Nardone M, Plantulli A, Sepe A, Esposito V, Mazzarella G, Raia V.
Dornase Alfa as postoperative therapy in CF sinonasal disease
Arch Otolaryngol Head Neck Surg 2005;131:1097-101

11) Maiuri L, Ciacci C, Ricciardelli I, Vacca L, Raia V, Rispo A, Griffin M, Issekutz T, Quaratino S and Londei M.
Unexpected role of surface transglutaminase type II in celiac disease.
Gastroenterology 2005; 129:1400-13

12) Castaldo G, Polizzi A, Tomaiuolo R, Cazeneuve C, Girodon E, Santostasi T, Salvatore D, Raia V, Rigillo N, Goossens M, Salvatore F.
Comprehensive cystic fibrosis mutation epidemiology and haplotype characterization in a southern Italian population
Ann Hum Genet 2005; 69:15-24

13) Franzese A, Spagnolo MI, Sepe A, Valerio G, Mozzillo E, Raia V.
Can glargine reduce the number of lung infections in patients with cystic fibrosis?
Diabetes Care 2005; 28: 2333

14) Lambiase A,Raia V, Del Pezzo M, Sepe A, Carnevale V, Rossano F.
Microbiology of airway disease in a cohort of patients with cystic fibrosis
BMC Infect Dis 2006;6:4

Unità Specialistica Fibrosi Cistica dell'adulto. Dipartimento di Medicina Clinica e Patologia Cardiovascolare ed Immunitaria, Cattedra di Geriatria. Università di Napoli "Federico II". Responsabile scientifico: Prof. Franco Rengo.

Tema progettuale: Identificazione di pazienti con diagnosi tipica e atipica di Fibrosi Cistica e definizione del loro genotipo.

Unità Specialistica Fibrosi Cistica dell'adulto. Dipartimento di Medicina Clinica e Patologia Cardiovascolare ed Immunitaria, Cattedra di Geriatria. Università di Napoli "Federico II". Responsabile scientifico: Prof. Franco Rengo.

Tema progettuale: Identificazione di pazienti con diagnosi tipica e atipica di Fibrosi Cistica e definizione del loro genotipo.

a) Premessa

Negli ultimi anni, le diagnosi di Fibrosi Cistica (CF) in età adulta, di forme tipiche ad espressione completa e di forme atipiche pauci o monosintomatiche sono notevolmente aumentate grazie al miglioramento delle metodiche clinico-strumentali e all'aumentata attenzione dei medici nei confronti della patologia (1-3). Molti pazienti adulti, in particolare quelli affetti da forme atipiche o paucisintomatiche di CF, vengono visitati da Specialisti di varie discipline senza ottenere una corretta diagnosi (4). Tutto ciò si ripercuote sulla possibilità di ricevere, presso un centro di cura specializzato, terapie mediche e fisioterapiche che si traducano in un aumento della sopravvivenza, in un miglioramento della qualità della vita di questi pazienti ed ad un minor numero e gravità di complicanze (5).

Riferimenti bibliografici:

1. Groman JD, Meyer ME, Wilmott RW, Zeitlin PL, Cutting GR. Variant cystic fibrosis phenotypes in the absence of CFTR mutations. N Engl J Med 2002;8;347:401-7.
2. Boyle MP. Nonclassic cystic fibrosis and CFTR-related diseases. Curr Opin Pulm Med 2003;9:498-503.
3. Castaldo G, Tomaiuolo R, Vanacore B, Ferrara P, Del Vecchio S, Carnovale V, Abete P, Rengo F, Salvatore F. Phenotypic discordance in three siblings affected by atypical cystic fibrosis with the F508del/D614G genotype. J Cyst Fibros 2006;5:193-5.
4. Rabinowitz I. Diagnosis of cystic fibrosis and celiac disease in an adult: one patient, two diseases, and three reminders. Respir Care 2005;50:644-5.
5. Southern KW, Peckham D. Establishing a diagnosis of cystic fibrosis. Chron Respir Dis 2004;1:205-10.

b) Obiettivo:

Individuazione di nuovi pazienti adulti affetti da forme tipiche o atipiche di Fibrosi Cistica nella Regione Campania.

c) Metodi:

È stato avviato, con i maggiori Centri di Pneumologia ed i laboratori di fisiopatogia respiratoria della Regione Campania, un percorso di divulgazione sui segni e sintomi caratteristici della patologia, al fine di sensibilizzare il personale medico afferente agli ambulatori pneumologici della Regione Campania. I pazienti con caratteristiche suggestive saranno inviati al nostro Centro. Dopo una valutazione anamnestica e clinica, il paziente sarà sottoposto all'indagine per l'identificazione del genotipo. La diagnosi sarà confermata successivamente dal test del sudore, effettuato mediante iontoforesi pilocarpinica secondo Gibson e Cooke, che a tutt'oggi rappresenta il test diagnostico più sensibile. La misurazione del Cloruro e del Sodio e il rapporto Cloruro/Sodio saranno riferiti ai valori di riferimento classici.

Nei casi in cui sarà posta diagnosi di patologia, il paziente sarà avviato ad un iter diagnostico clinico-strumentale per definire il grado di compromissione multiorgano. Tale iter prevedrà lo studio morfologico e funzionale dell'apparato respiratorio, gastroenterico e genito-urinario e lo studio microbiologico del tratto respiratorio. Nella presentazione atipica, verranno utilizzati anche test non invasivi della funzionalità pancreatica quali dosaggio dell'elastasi fecale e della steatorrea mediante steatocrito.

Disegno dello studio:

Studio clinico longitudinale in collaborazione con i principali Centri ed ambulatori di Pneumologia della Regione Campania.

Criteri di sospetto diagnostico:

sintomi respiratori:

- bronchiti ricorrenti
- bronchite acuta o cronica da pseudomonas
- anomalie radiologiche del torace persistenti (bronchiectasie, atelettasie, polmoniti, enfisema)
- sinusite cronica
- poliposi nasale
- pneumotorace spontaneo
- broncopneumopatia bronchiectasica
- aspergillosi broncopolmonare allergica (abpa)
- asma bronchiale allergico
- ippocratismo digitale

sintomi gastrointestinali:

- pancreatite acuta recidivante o cronica (idiopatica)

- insufficienza pancreatica esocrina (maldigestione)
- steatosi epatica
- litiasi biliare precoce
- cirrosi epatica con o senza ipertensione portale (idiopatica)
- sindrome di occlusione intestinale distale (dios)
- diabete non di tipo I (o intolleranza al glucosio)

sintomi genito-urinari:

- infertilita' maschile: azoospermia ostruttiva (cbavd); oligospermia (CUAVD)
- litiasi renale

sintomi osteoarticolari:

- osteopenia o osteoporosi
- osteoartrite

Gestione dei dati e conservazione della documentazione

I dati dei pazienti saranno registrati mediante un database.

d) Risultati attesi

- identificazione di pazienti con diagnosi tipica e atipica di Fibrosi Cistica e definizione del loro genotipo.
- sensibile incremento del numero di diagnosi di forme tipiche ed atipiche di Fibrosi Cistica in età adulta, mediante il coinvolgimento e la sensibilizzazione degli specialisti coinvolti nello studio sulle problematiche legate alla diagnosi delle varie espressioni della Fibrosi Cistica.

e) Tempi previsti per lo svolgimento della ricerca

- Durata complessiva del progetto: 2 anni

Budget totale richiesto per il biennio anno: 85.000 euro

Ripartizione del budget:

Attrezzature	20%
Personale a contratto	30%

Missioni e viaggi di studio	5%
Materiali di consumo	45%
Spese generali	0%

Personale impegnato e ripartizione delle attività per le strutture coinvolte

1) Prof. Franco Rengo, Professore Ordinario di Geriatria
2) Dott. Giusto Gerundo, Funzionario Tecnico EP
3) Dott . Vincenzo Carnovale, Medico Specialista Ambulatoriale
4) Dott. ssa Stefania del Vecchio, Contrattista
1. Dott. ssa Veronica De Crescenzo, Medico volontario

Qualificazione delle Strutture proponenti e partecipanti

Il Centro Specializzato di Riferimento della Fibrosi Cistica dell'adulto per la Regione Campania, presso la Cattedra di Geriatria del Dipartimento di Medicina Clinica e Patologia Cardiovascolare ed Immunitaria dell'Università Federico II di Napoli, da 12 anni rappresenta il riferimento per la cura della CF dell'adulto in Campania e per pazienti delle regioni limitrofe. Attualmente l'attività assistenziale consiste in ricoveri in regime di day-hospital, in regime ordinario di degenza, controlli ambulatoriali, ricoveri d'urgenza secondo le disposizioni del Centro di Emergenza Regionale e collaborazione con i Centri Chirurgici Italiani specializzati per il trapianto polmonare ed epatico. Il Centro attualmente rappresenta per numero di pazienti assistiti, come si evince dai dati epidemiologici riportati dal Registro Italiano dell'Istituto di Statistica Medica e Biometria di Milano, uno dei maggiori Centri per l'Italia Meridionale; attualmente, presso l'Unità Specialistica dell'adulto, sono seguiti in regolare follow-up poco più di 100 pazienti affetti da CF. Il nostro Centro si avvale, inoltre, di tutti servizi specialistici collegati dell'Azienda Ospedaliera Universitaria "Federico II". Da anni collabora con il Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche/CEINGE per la caratterizzazione genotipica dei pazienti, per la diagnosi dei casi atipici, per studi sulla correlazione genotipo-fenotipo e per la consulenza genetica. Provvede, inoltre, anche a compiti di tipo assistenziale garantiti per tutti i pazienti con CF quali prescrizione di farmaci, presidi sanitari e quanto altro necessario per la cura e l'assistenza ai malati secondo le disposizioni della Legge nazionale 548/93, organizzazione dell'assistenza domiciliare; organizzazione del servizio di psicologia per i pazienti e le famiglie; rapporti con le associazioni di volontariato; attività di formazione e aggiornamento sulla CF degli operatori sanitari della Regione Campania. Il personale dedicato all'assistenza ai pazienti con CF consta di 4 medici, 3 fisioterapisti

della riabilitazione respiratoria, 1 assistente sociale, 1 dietista, 1 psicologa, 1 personale dedicato alla segreteria sociale e all'archiviazione ed elaborazione dei dati dei pazienti mediante specifici data-base.

PUBBLICAZIONI RECENTI NEL CAMPO DELLA FIBROSI CISTICA

1) FACTORS INCREASING THE RISK FOR STONE FORMATION IN ADULT PATIENTS WITH CYSTIC FIBROSIS. M.Terribile , M. Capuano, G. Cangiano, V. Carnovale, P. Ferrara, M. Petrarulo, M. Marangella. Nephrol Dial Transplant. 2006;21:1870-5.

2) PHENOTYPIC DISCORDANCE IN THREE SIBLINGS AFFECTED BY ATYPICAL CYSTIC FIBROSIS WITH THE F508DEL/D614G GENOTYPE. Castaldo G, Tomaiuolo R, Vanacore B, Ferrara P, DEL Vecchio S, Carnovale V, Abete P, Rengo F, Salvatore F. J Cyst Fibros. 2006;5:193-5.

3) MICROBIOLOGY OF AIRWAY DISEASE IN A COHORT OF PATIENTS WITH CYSTIC FIBROSIS. Lambiase A, Raia V, Del Pezzo M, Sepe A, Carnovale V, Rossano F. BMC Infect Dis. 2006;11;6:4.

4) L'ADULTO AFFETTO DA FIBROSI CISTICA: UN PAZIENTE GERIATRICO IN ETA' ADULTA. Carnovale V, De Crescenzo V, del Vecchio S, Vozza D, Varvella M, d'Ippolito M, Schiano di Cola G, Iovino V, Esposito F.M., Raucci C, Coletta V, Gerundo G. Orizzonti CF 2006; 2:12-16.

5) PNX SPONTANEO NELL'ADULTO CON FIBROSI CISTICA. V. Carnovale, G. De Luca, A. Luciano, S. Galzerano, S. del Vecchio, M. Varvella, M. d'Ippolito, G. Schiano di Cola, M. Gentile. Giornate scientifiche interpolo – Polo delle Scienze e delle Tecnologie per la vita – Facoltà di Medicina e Chirurgia, Farmacia, Medicina Veterinaria, Agraria, Scienze matematiche Fisiche Naturali, Ingegneria. Napoli 26-27 Maggio 2005

6) FIBROSI CISTICA DELL'ADULTO: "DIAGNOSI ATIPICHE" DI FORME TIPICHE. V. Carnovale, P. Ferrara.CEINGE – Biotecnologie Avanzate. Azienda Ospedaliera Universitaria "Federico II" di Napoli. Napoli 22 ottobre 2004

7) LA FIBROSI CISTICA DELL'ADULTO: UN PAZIENTE GERIATRICO IN ETÀ ADULTA.V. Carnovale, P. Ferrara, M. Varvella, M. d'Ippolito, P. Abete, F. Rengo. Acta Pediatrica Mediterranea 2004; XX.

8) RUOLO PREDITTIVO DEL CLORO SIERICO NELLA RIACUTIZZAZIONE BRONCOPOLMONARE NEI PAZIENTI ADULTI AFFETTI DA FIBROSI CISTICA. P. Ferrara, L. Viati, V. Carnovale, P. Capaccio, R. Calvanese, T. Paragliola, G. Testa, S. del Vecchio, G. Galizia, L. Tanturri De Horatio, G. Gerundo, P. Abete, F. Rengo. Minerva Pediatrica 2003;55: Suppl. 1 n°6.

CEINGE Biotecnologie avanzate, scarl, Napoli. Responsabile scientifico: Prof. Francesco Salvatore

Tema n. 1: Analisi di grossi riarrangiamenti genici nel gene CFTR

Tema n. 2: Ricerca di varianti geniche in geni codificanti interattori di CFTR

CEINGE Biotecnologie avanzate, scarl, Napoli. Responsabile scientifico: Prof. Francesco Salvatore

Tema n. 1: Analisi di grossi riarrangiamenti genici nel gene CFTR

a) Premessa

Conoscere le mutazioni del gene CFTR più frequenti in un ambito etnico geografico è essenziale, poiché permette di definire i pannelli di mutazioni da studiare nella diagnostica molecolare routinaria e permette di calcolare in maniera precisa il rischio residuo di essere portatore dopo aver effettuato l'analisi molecolare. Lo studio dell'intera regione codificante del gene CF, anche se effettuato con tecniche sensibili quali DGGE, DHPLC o sequenziamento diretto, permette di identificare fino al 90% circa degli allelli portatori di mutazioni responsabili di CF. Ad esempio, uno studio condotto dal gruppo proponente in 371 pazienti CF del sud-Italia, studiati con DGGE ha permesso di identificare mutazioni in circa il 92% degli alleli. Se si fa riferimento alle forme "atipiche" di CF (CBAVD, pancreatiti ricorrenti ed altre), la percentuale di alleli CF identificati è ancora più bassa (circa 75%).

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), e studi preliminari condotti anche in Italia hanno confermato che circa un 3% di alleli CF è dovuto a grossi riarrangiamenti del gene.

b) Obiettivi

- definire la frequenza ed il tipo di macrodelezioni del gene CFTR tra gli alleli non ancora caratterizzati da pazienti CF o con forme atipiche di CF;
- sviluppare tecnologie di diagnostica molecolare di semplice esecuzione per l'analisi delle macrodelezioni, per poter effettuare l'analisi routinariamente.

c) Pazienti e metodi:

Lo studio sarà effettuato (anche attraverso collaborazioni con Centri Clinici CF di altre Regioni del sud-Italia) su almeno 100 pazienti affetti dalla forma classica della malattia, ed almeno 50 affetti da forme atipiche (CBAVD, pancreatiti ricorrenti, bronchiectasie). I pazienti devono essere non imparentati tra loro, e presentare, dopo l'analisi di scanning genomico del gene CFTR 1 o entrambe le mutazioni non note.

Il DNA di ogni paziente sarà analizzato usando la tecnica della PCR quantitativa con rivelazione in elettroforesi capillare (MLPA SALSA kit) e il sequenziamento diretto del gene per identificare i breakpoint di eventuali macrodelezioni identificate. Nel caso vengano identificate le stesse macrodelezioni in più pazienti, oltre all'analisi dei breakpoint verranno analizzati i marcatori polimorfici associati al gene CFTR per valutare se si tratta di mutazioni ricorrenti o legate ad un singolo evento mutazionale. Una volta definite le macrodelezioni più frequenti nel gene CFTR dei pazienti del sud-Italia, verranno sviluppate metodiche per l'analisi su ampia scala (enzimi di restrizione, ibridazione, etc.).

Tema n. 2: Ricerca di varianti geniche in geni codificanti interattori di CFTR

a) Premessa

La famiglia SLC26 (Solute Linked Carrier) è una famiglia genica di scambiatori ionici altamente versatili. Attualmente, circa 10 proteine sono state incluse in questa famiglia (Mount and Romero, Pflugers Arch. 2004). Gli scambiatori SLC26 trasportano un considerevole numero di anioni monovalenti e bivalenti come SO_4^{2-}, $C_2O_4^{2-}$, Cl^-, I^-, $HCOO^-$, OH^- e HCO_3^- (Mount and Romero, 2004). La regione citoplasmatica C-terminale di tutte e 10 le proteine include il dominio "STAS-like" (Sulfate Transporter and Anti Sigma), chiamato così per l'omologia tra la famiglia genica SLC26 e gli antagonisti batterici del fattore anti-sigma.

Questo progetto prende avvio dopo la pubblicazione di due articoli, entrambi apparsi su Nature Cell Biology nel 2004 (Gray MA, Nature Cell Biology 2004; 6: 292-294; Ko et al., Nature Cell Biology 2004; 6: 343-350). Questi due articoli mostrano come il dominio "STAS-like" ed il dominio PDZ della proteina SLC26A3 abbiano un ruolo fondamentale nella sua attivazione e nella secrezione del bicarbonato. Tale meccanismo secretorio richiede la presenza della proteina CFTR (proteina alterata in corso di Fibrosi Cistica, CF). Fondamentalmente, questi studi hanno dimostrato che il trasporto del Cl^- e la modulazione dello scambio Cl^-/HCO_3^- sono attività distinte e separate di CFTR. Nello studio successivo (Ko et al., Nature Cell Biology 2004;6:343-350) si è avuta chiara evidenza di una diretta interazione molecolare tra CFTR e SLC26A3. Il legame tra i due trasportatori risulta in un'unica, reciproca up-regolazione delle loro attività di trasporto, cosa che spiega come mai la secrezione di fluidi e bicarbonato dipenda dall'espressione di entrambe le proteine. Gli autori hanno usato una serie di eleganti esperimenti molecolari, biochimici e elettrofisiologici per dimostrare che l'interazione tra CFTR e i membri della famiglia SLC26 è mediata dal legame del dominio regolatorio (R) di CFTR e il dominio "STAS-like" di SLC26. L'interazione è aumentata dalla fosforilazione del dominio R di CFTR da parte della PKA ed è

modulata da proteine scaffold leganti il dominio PDZ di CFTR e di SLC26A3 (come EBP50 e E3KARP), che legano le due proteine in un unico complesso multimerico. L'interazione non è solo di tipo funzionale. Gli autori dimostrano anche una reciproca regolazione, in base a cui l'espressione di SLC26A3 provoca una nuova up-regolazione dell'attività di CFTR. Inoltre, i livelli di espressione di SLC26A3 dipendendono da CFTR in molte cellule epiteliali (Greeley et al., Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2001; 281: G1301-1308), suggerendo che CFTR regola l'espressione dei geni SLC26. Esperimenti di patch-clamp mostrano un aumento di 6 volte dell'attività PKA mediata di CFTR in cellule HEK293 che coesprimono scambiatori SLC26 e CFTR, rispetto a cellule che esprimono unicamente CFTR. L'aumento di attività di CFTR richiede che il domini R di CFTR e il dominio "STAS-like" di SLC26 siano intatti. Il dominio "STAS-like" di SLC26A3 purificato è capace, da solo, d'indurre l'aumento di attività di CFTR. Sebbene in questi esperimenti sono state usate cellule trasfettate in coltura, e quindi *in vitro*, simili risultati sono ottenuti in cellule epiteliali native che esprimono livelli fisiologici di CFTR e quindi *in vivo*. Queste condizioni di necessità e opzionalità si riflettono nell'osservazione che tutti i 10 membri finora identificati della famiglia SLC26 esprimono un dominio "STAS-like", mentre solo 5 (SLC26A3, SLC26A6, SLC26A7, SLC26A8 e SLC26A9) terminano con un motivo PDZ di classe I. È anche interessante l'osservazione dell'espressione tissutale di queste 5 proteine: A3 si esprime nell'intestino, A6 nel pancreas, A7 nel rene, A8 nel testicolo e A9 nel polmone.

b) Obiettivi:

a) valutare se mutazioni nel gene SLC26A3 possano ridurre la sintesi della proteina (mutazioni di tipo nonsenso, di splicing, frameshift, etc.) o l'interazione con CFTR (mutazioni che producano alterazioni strutturali nei domini di SLC26A3 interattori di CFTR). Queste mutazioni potrebbero agire da fattori causali di CF o di forme atipiche di CF (CBAVD, pancreatiti ricorrenti, bronchiectasie, etc.).
b) valutare se varianti geniche di SLC26A3 o nei geni codificanti gli altri canali SLC26A6, SLC26A8 e SLC26A9, possano determinare una riduzione (o an aumento) dell'attivazione di CFTR, eventualmente anche in maniera tessuto-specifica. Questi geni potrebbero quindi avere il ruolo di geni modulatori del fenotipo CF.

c) Procedure:

Per valutare la I ipotesi, saranno selezionati soggetti affetti da CF o da forme atipiche di CF (pancreatiti ricorrenti, bronchiectasie, agenesia bilaterale dei dotti deferenti – CBAVD) in cui

l'analisi di scanning genomico di CFTR non ha evidenziato una o entrambe le mutazioni causali di CF.

Per testare la II ipotesi, saranno selezionati pazienti CF con diverso fenotipo clinico.

Su questi due gruppi di pazienti, mediante sequenziamento diretto, analizzeremo i geni SLC26A3, 6, 8, 9. I pazienti saranno così suddivisi:

- pazienti con CF classica, con una o nessuna mutazione identificata dopo l'analisi di scanning del gene CFTR mediante DGGE/sequenziamento diretto. E' possibile ipotizzare che la seconda mutazione (o entrambe le mutazioni) causali di malattia siano presenti in uno dei geni SLC26;
- pazienti con CF atipica monosintomatica (Pancreatici ricorrenti) ed una o nessuna mutazione CFTR identificata;
- pazienti con CF atipica monosintomatica (CBAVD) ed una o nessuna mutazione CFTR identificata;
- pazienti con problemi di sterilità ed una o nessuna mutazione CFTR identificata.
- pazienti con CF classica, con entrambe le mutazioni CFTR note, che hanno presentato alla nascita ileo da meconio, per valutare l'eventuale influenza di mutazioni nei geni SLC26 in rapporto alla presenza di ileo da meconio in CF; i controlli senza ileo da meconio sono presenti nelle altre categorie di pazienti;
- pazienti con CF classica, con una o entrambe le mutazioni CFTR note, che presentano sufficienza pancreatica; anche qui i controlli con insufficienza pancreatica sono presenti nelle altre categorie di pazienti;
- pazienti con CF atipica monosintomatica (Bronchiectasie) ed una o nessuna mutazione CFTR identificata;

Budget totale richiesto per il biennio anno: 85.000 euro

Ripartizione del budget:

Attrezzature	0%
Personale a contratto	40%
Missioni e viaggi di studio	5%
Materiali di consumo	35%
Spese generali	20%

Personale impegnato e ripartizione delle attività per le strutture coinvolte

1) Prof. Francesco Salvatore, Professore Ordinario di Biochimica Umana
2) Prof. Giuseppe Castaldo, Professore Ordinario di Medicina di Laboratorio
3) Dott.ssa Rossella Tomaiuolo, Ricercatore Universitario
4) Dott. Giuseppe Cardillo, Contrattista
5) Dott.ssa Ausilia Elce, Dottorando

Qualificazione delle Strutture proponenti e partecipanti

Il CEINGE-Biotecnologie avanzate di Napoli, anche in collaborazione con il Dipartimento Assistenziale di Medicina di Laboratorio dell'AUO "Federico II" si occupa da oltre 10 anni della caratterizzazione genotipica dei pazienti CF, nonché dell'analisi dei portatori e della diagnosi prenatale su DNA estratto da villi coriali o amniociti. E' inoltre impegnato nella diagnostica molecolare delle forme atipiche della malattia e nella diagnostica molecolare finalizzata alla prevenzione della malattia (ad esempio nelle coppie di consanguinei, nelle coppie che ricorrono a tecniche di fecondazione assistita, etc.). In stretta intesa con le strutture cliniche si occupa anche di attuare la consulenza genetica multidisciplinare ai pazienti CF e alle famiglie. Ad oggi il CEINGE, che è tra l'altro il "Centro di riferimento regionale per la biologia molecolare clinica, genetica di laboratorio e diagnostica molecolare di malattie congenite del metabolismo" effettua oltre 1500 diagnosi molecolari all'anno di CF, per pazienti della regione Campania ma anche (in particolare diagnosi prenatali, diagnosi di linkage e ricerca di mutazioni rare) per diverse altre Regioni (Basilicata, Puglia, Molise, etc.). Nel campo della ricerca il CEINGE collabora attivamente con altre strutture italiane (Istituto Superiore di Sanità, Centri regionali CF delle regioni Veneto, Lombardia, Lazio, Basilicata, Puglia) anche attraverso progetti di ricerca finanziati da numerosi Enti pubblici e privati (Ministero della Salute, ISS, MIUR, Consorzio Interuniversitario Biotecnologie, Fondazione Veneta CF, Regione Molise) su progetti relativi allo studio di correlazioni tra genotipo ed espressione clinica della malattia, geni modulatori del fenotipo CF, ricerca di macrodelezioni del gene CFTR e ricerca di mutazioni introniche, sviluppo di metodologie innovative per la diagnostica molecolare, sviluppo del controllo di qualità interlaboratorio, etc., che hanno consentito, negli ultimi anni di pervenire a numerose pubblicazioni su riviste internazionali, alcune delle quali qui di seguito elencate.

PUBBLICAZIONI RECENTI NEL CAMPO DELLA FIBROSI CISTICA

1) Salvatore F., Scudiero O., Castaldo G.
Genotype-phenotype correlation in Cystic Fibrosis: the role of modifier genes.
Am J Med Genet. 2002; 111:88-95. Review

2) Tomaiuolo R., Spina M., Castaldo G.
Molecular diagnosis of Cystic Fibrosis: comparison of four analytical procedures.
Clin Chem Lab Med. 2003; 41:26-32.

3) Taruscio D., Falbo V., Floridia G., Salvatore M., Pescucci C., Cantafora A., Marongiu C., Baroncini A., Calzolari E., Cao A., Castaldo G., Dagna Bricarelli F., Guanti G., Nitsch L., Pignatti PF., Rosatelli C., Salvatore F., Zuffardi O.
Quality assessment in cytogenetic and molecular genetic tests in Italy.
Clin Chem Lab Med 2004; 42:915-21

4) Salvatore D., Tomaiuolo R., Abate R., Vanacore B., Manieri S., Mirauda MP., Scavone A., Schiavo MV., Castaldo G., Salvatore F.
Cystic fibrosis presenting as metabolic alkalosis with hypochloremia in a boy with the rare D579G mutation.
J Cyst Fibrosis 2004; 3:135-6.

5) Castaldo G., Polizzi A., Tomaiuolo R., Cazeneuve C., Girodon E., Santostasi T., Salvatore D., Raia V., Rigillo N., Goossens M., Salvatore F.
Comprehensive cystic fibrosis mutation epidemiology and haplotype characterization in southern Italy population.
Ann Hum Genet. 2005; 69:15-24.

6) Polizzi A, Francavilla R, Castaldo G, Santostasi T, Tomaiuolo R, Manca A, De Robertis F, Mappa L, Oliverio FP, Salvatore F, Rigillo N.
Phenotypic expression of genotype-phenotype correlation in cystic fibrosis patients carrying the 852del22 mutation.
Am J Med Genet. 2005; 132:434-40.

7) Salvatore D., Tomaiuolo R., Vanacore B., Elce A., Castaldo G., Salvatore F.
Isolated elevated sweat chloride concentrations in the presence of the rare mutation S1455X: an extremely mild form of CFTR dysfunction?
Am J Med Genet. 2005; 133:207-8.

8) Vankeerberghen A., Scudiero O., Salvatore F., Macek M., Castaldo G., Pignatti PF., De Boeck K., Cassiman JJ., Cuppens H.
Distribution of human beta-defensin polymorphisms in different control and cystic fibrosis populations.
Genomics 2005; 85:574-81.

9) Salvatore M, Falbo V, Floridia G, Censi F, Tosto F, Bombieri C, Castaldo G, Pignatti PF, Taruscio D.
The Italian external quality control programme for cystic fibrosis molecular diagnosis: four years of activity.
Clin Chem Lab Med 2006;

10) Castaldo G., Tomaiuolo R., Vanacore B., Ferrara P., Del Vecchio S., Carnovale V., Abete P., Rengo F., Salvatore F.

Phenotypic discordance in three siblings affected by atypical cystic fibrosis with the f508del/D614G genotype.
J Cyst Fibros 2006;5:193-5