Ministero della Salute – Direzione Generale della Ricerca scientifica e Tecnologica

Fondi 5 per mille ANNO 2011 - Enti della Ricerca Sanitaria
Abstract ed elenco pubblicazioni scientifiche

ENTE[1]: IRCCS materno-infantile Burlo Garofolo

Titolo del progetto: Ottimizzazione di procedure integrate cliniche e di laboratorio per la diagnosi e il follow up dei difetti complessi dell'immunità.

Abstract dei risultati ottenuti:
L'obiettivo del progetto è stato quello di ottimizzare le procedure per la diagnosi dei difetti dell'immunità, e questo ha consentito di poter inserire nell'offerta assistenziale dell'Istituto nuovi test immunocitometrici.
La prima fase del progetto ha previsto l'organizzazione dello stoccaggio dei campioni biologici umani per l'analisi di biomarcatori molecolari e/o circolanti.
Tale attività si è svolta in collaborazione con il Laboratorio per le Tecnologie delle Terapie Avanzate (LTTA)- Dipartimento di Morfologia, Chirurgia e Medicina Sperimentale dell'Università degli Studi di Ferrara.
Lo scopo di questa attività è stato quello di garantire la crioconservazione del campione e la protezione dei dati clinici/sperimentali.
Le provette contenenti i campioni sono stati depositati nei freezer e/o contenitori ad azoto liquido della Biobanca dell'LTTA, ed a ciascuno è stato associato un codice a barre che oltre a garantire l'anonimizzazione del campione ha facilitato la reperibilità.
I campioni biologici (siero, plasma, latte materno, sperma) sono stati conservati nel freezer a -80°C dopo averli trasferiti in opportune vials dotate di codici a barre, generando ove possibile delle aliquote multiple al fine di ridurre gli scongelamenti dello stesso campione per eventuali studi successivi.
Contestualmente è stato allestito un database relativo ai singoli campioni criocoservati che, grazie al software della piattaforma (Biobanking Solution; Micronic) possono essere facilmente individuati e recuperati qualora risulti necessario o di interesse condurre nuove tipologie di analisi sperimentali.

Il progetto si è articolato per sviluppare e caratterizzare diversi aspetti della ricerca e diagnostica delle immunodeficienze congenite.

I PARTE). **Diagnosi di immunodeficienze congenite.**
Definizione dei linfociti a recente derivazione timica, dei linfociti doppio-negativi alfa-beta, tipici della sindrome ALPS, delle forme di maturazione dei linfociti B memoria e di altri subset particolari di linfociti (T regolatori, T suppressor senescenti). Inoltre, sono stati sviluppati test per lo studio di espressione di proteine correlate a difetti immunitari e per lo studio funzionale della citotossicità cellulare.

- Lo studio approfondito delle sottopopolazioni linfocitarie ha permesso di definire meglio una nuova causa di immunodeficienza con iper-IgM.

Grazie all'integrazione tra le aree della gastroenterologia ed immunologia sono stati sviluppati diversi protocolli:

- Per la diagnosi di condizioni associate al difetto di IgA.
- Per la diagnosi di specifici difetti dell'immunità in soggetti con malattie infiammatorie

[1] Istituzione beneficiaria del contributo del 5 per mille.

croniche dell'intestino: malattia di Crohn, rettocolite ulcerosa, morbo di Still, malattie infiammatorie complesse di difficile inquadramento.
- Per la definizione delle reazioni linfoistiocitarie in corso di nutrizione clinica.

Questa parte del progetto ha previsto l'isolamento di sottopopolazioni cellulari da tessuti umani e la loro successiva caratterizzazione fenotipica e funzionale: tale obiettivo si è potuto raggiungere grazie al supporto da parte dell'LTTA delle tecnologie di separazione cellulare consentite dalla piattaforma AutoMacs Pro-Separator (Myltenyi Biotec) e dal Citometro e Cell Sorter (BD FACSAria II). Tramite questa strumentazione si è reso possibile l'isolamento di sottopopolazioni cellulari da sangue periferico (progenitori circolanti) o tessuti rimossi chirurgicamente (cellule endoteliali venose). Grazie a protocolli sviluppati dall'LTTA si sono ottenuti modelli cellulari rappresentativi di situazioni normali e/o patologiche rilevanti per studi ex-vivo/in vitro. Tali modelli sono stati caratterizzati:

- fenotipicamente: con approcci multi-parametrici grazie al BD FACSAria II che è dotato di 4 sorgenti laser (488nm-blu; 633nm-rosso; 405nm-violetto; 375nm-near UV), che consente di leggere fino a 9 parametri di fluorescenza.
- funzionalmente: analizzando il profilo di citochine/chemochine espresse o rilasciate.

II PARTE) Ambito reumatologico.
L'applicazione di procedure per la selezione di pazienti per studi di Next Generation Sequencing (NGS) ha permesso di migliorare l'identificazione e le cure di soggetti con malattie autoinfiammatorie.
Questa parte del progetto si è resa possibile dall'accordo di collaborazione tra il Consorzio per il Centro di Biomedicina Molecolare Scrl (CBM) e l'Istituto Burlo Garofolo, nell'ambito del quale sono state eseguite nel laboratorio CBM indicato come "Integrated Microarrays Core Facility" delle analisi per lo studio di genotipi mediante microarrays utilizzando la piattaforma Illumina HiScanSQ.
In questo contesto sono stati processati i campioni secondo il protocollo Illumina Human OmniExpress (OmniExpress) contenente SNPs ottimizzati dalle 3 fasi del progetto HapMap e selezionati per coprire gran parte delle varianti comuni. Inoltre, sono stati poi processati altri campioni secondo il protocollo Illumina Human Exome contenente SNPs localizzati in zone codificanti del genoma.
Tale analisi hanno permesso la descrizione di specifiche caratteristiche di diverse immunodeficenze tra cui ad esempio, la forma di panarterite nodosa associata al difetto dell'enzima ADA2.
Inoltre, sfruttando queste tecnologie è stato studiato il significato dell'aumento di specifiche classi di immunoglobuline nell'indirizzare il sospetto dei disturbi dell'immunità, laddove tradizionalmente questo sospetto si poneva solo per difetti anticorpali.

III PARTE). Analisi di marcatori circolanti: citochine e chemochine.
Al fine di identificare, grazie a saggi funzionali immunologici, dei validi ed efficaci marcatori circolanti, sono stati analizzati i campioni biologici raccolti e conservati presso LTTA con particolare interesse verso il TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL).

I risultati ottenuti da questa ampia casistica hanno consentito di poter caratterizzare in senso trasversale anche dei marcatori significativi in ambito onco-ematologico. Infatti, si è reso possibile analizzare campioni di sangue provenienti da casistiche di pazienti affetti da leucemia linfatica cronica (e da donatori sani di controllo), e tali campioni si sono aggiunti alla collezione già esistente presso la Biobanca di LTTA che è stata messa nel suo complesso a disposizione del laboratorio di Genetica del Burlo, unitamente al data base associato. Tali campioni sono stati caratterizzati dal punto di vista molecolare in base a marcatori prognostici classici, oltre all'avvio di nuovi studi volti ad esplorare l'incidenza (o identificazione) di nuovi pannelli di marcatori di rilevanza clinica mediante l'analisi basate sulla tecnologia dell'Ion AmpliSeq e del NGS. Gli studi

condotti presso il laboratorio di Genetica del Burlo hanno poi visto il coinvolgimento dell'LTTA anche a livello di una successiva validazione dei dati ottenuti mediante esperimenti *in vitro* in idonei modelli cellulari.

IV PARTE). Modelli di studio preclinici.

Il progetto ha consentito lo sviluppo e/o impiego di modelli murini di patologia (come ad esempio l'asma ed il diabete), in cui si è potuto valutare l'impatto di sistemi diagnostici/terapeutici basati sull'impiego di nanotecnologie (Nanoparticelle).

In questo ambito a esempio, in un modello murino di asma allergica, è stato studiato tramite la tecnologia Luminex (disponibile presso LTTA) il ruolo di proteine circolanti (citochine/chemochine proinfiammatorie) nell'andamento della malattia a seguito del trattamento terapeutico con TRAIL ricombinante. Lo studio ha previsto anche il monitoraggio in diversi fluidi biologici (BAL e plasma) di specifiche sottopopolazioni cellulari indotte dalla patologia/trattamento terapeutico mediante protocolli citofluorimetrici multiparametrici (Servio di Citofluorimetria e Cell Sorting) che permettono di analizzare fino a 9 antigeni (parametri di fluorescenza) identificando simultaneamente diverse sottopopolazioni cellulari anche in campioni biologici i cui volumi sono molto limitati.

Prodotti della Ricerca (correlati al progetto):
Elenco pubblicazioni su riviste indicizzate

Agnoletto C, Melloni E, Casciano F, Rigolin GM, Rimondi E, Celeghini C, Brunelli L, Cuneo A, Secchiero P, Zauli G. *Sodium dichloroacetate exhibits anti-leukemic activity in B-chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) and synergizes with the p53 activator Nutlin-3.* Oncotarget. 2014;5(12):4347-60.

Agnoletto C, Brunelli L, Melloni E, Pastorelli R, Casciano F, Rimondi E, Rigolin GM, Cuneo A, Secchiero P, Zauli G. *The anti-leukemic activity of sodium dichloroacetate in p53mutated/null cells is mediated by a p53-independent ILF3/p21 pathway.* Oncotarget. 2015; 6(4):2385-96.

Athanasakis E, Melloni E, Gian Matteo Rigolin GM, Agnoletto C, Voltan R, Vozzi D, Piscianz E, Segat L, Dal Monego S, Cuneo A, Secchiero P, Zauli G. *The p53 transcriptional pathway is preserved in ATMmutated and NOTCH1mutated chronic lymphocytic leukemias.* Oncotarget. 2014;5(24):12635-45.

Bernardi S, Fabris B, Thomas M, Toffoli B, Tikellis C, Candido R, Catena C, Mulatero P, Barbone F, Radillo O, Zauli G, Secchiero P. *Osteoprotegerin increases in metabolic syndrome and promotes adipose tissue proinflammatory changes.* Mol Cell Endocrinol. 2014. pii: S0303-7207(14)00178-6.

Bianco AM, Girardelli M, Tommasini A. *Genetics of inflammatory bowel disease from multifactorial to monogenic forms*. World J Gastroenterol. 2015;21(43):12296-310.

Biffi S, Petrizza L, Rampazzo E, Voltan R, Sgarzi M, Garrovo C, Prodi L, Andolfi L, Agnoletto C, Zauli G, Secchiero P. *Multiple dye-doped NIR-emitting silica nanoparticles for both flow cytometry and in vivo imaging.* RCS advances. 2014;4(35):18278-18285.

Biffi S, Voltan R, Rampazzo E, Prodi L, Zauli G, Secchiero P. *Applications of nanoparticles in cancer medicine and beyond: optical and multimodal in vivo imaging, tissue targeting and drug delivery.* Expert Opin Drug Deliv. 2015;12(12):1837-49.

Biffi S, Voltan R, Bortot B, Zauli G, Secchiero P. *Actively targeted nanocarriers for drug delivery to cancer cells*. Expert Opin Drug Deliv. 2019;16(5):481-496.

Bossi F, Bernardi S, Zauli G, Secchiero P, Fabris B. *TRAIL modulates the immune system and protects against the development of diabetes.* J Immunol Res. 2015; 2015:680749.

Campioni D, Zauli G, Gambetti S, Campo G, Cuneo A, Ferrari R, Secchiero P. *In vitro characterization of circulating endothelial progenitor cells isolated from patients with acute coronary*

syndrome. PLoS One. 2013;8(2):e56377.

Campioni D, Voltan R, Tisato V, Zauli G. *Heterogeneity of mesenchymal stromal cells in lymphoproliferative disorders.* Front Biosci (Landmark Ed). 2014;1(19):139-51.

Caorsi R, Penco F, Grossi A, Insalaco A, Omenetti A, Alessio M, Conti G, Marchetti F, Picco P, Tommasini A, Martino S, Malattia C, Gallizi R, Podda RA, Salis A, Falcini F, Schena F, Garbarino F, Morreale A, Pardeo M, Ventrici C, Passarelli C, Zhou Q, Severino M, Gandolfo C, Damonte G, Martini A, Ravelli A, Aksentijevich I, Ceccherini I, Gattorno M. *ADA2 deficiency (DADA2) as an unrecognised cause of early onset polyarteritis nodosa and stroke: a multicentre national study.* Ann Rheum Dis. 2017;76(10):1648-1656.

Celeghini C, Not T, Norcio A, Monasta L, Secchiero P. *Levels of circulating TNF-related apoptosis-inducing ligand in celiac disease.* .Exp Ther Med. 2014;8(6):1906-1908.

Cervellati C, Secchiero P, Bonaccorsi G, Celeghini C, Zauli G. *Association of serum tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand with body fat distribution as assessed by dual X-rays absorptiometry.* Mediators Inflamm. 2014 2014:306848.

Copetti V, Pastore S, De Pieri C, Radillo O, Taddio A, Ventura A, Tommasini A. *Clinical significance of hyper-IgA in a paediatric laboratory series.* Arch Dis Child. 2014;99(12):1114-6.

Davanzo R, Zauli G, Monasta L, Vecchi Brumatti L, Abate MV, Ventura G, Rimondi E, Secchiero P, Demarini S. *Human colostrum and breast milk contain high levels of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)*. J Hum Lact. 2013;29(1):23-5.

Della Libera I, Martelossi S, Tommasini A. *Selective IgA deficiency: ruling out coeliac disease and selective antibody deficiency to polysaccharides.* J Clin Immunol. 2013;33(7):1149.

De Pieri C, Taddio A, Insalaco A, Barbi E, Lepore L, Ventura A, Tommasini A. *Different presentations of mevalonate kinase deficiency: a case series.* Clin Exp Rheumatol. 2015;33(3):437-42.

De Pieri C, Vuch J, De Martino E, Bianco AM, Ronfani L, Athanasakis E, Bortot B, Crovella S, Taddio A, Severini GM, Tommasini A. *Genetic profiling of autoinflammatory disorders in patients with periodic fever: a prospective study.* Pediatr Rheumatol Online J. 2015;13:11.

De Pieri C, Vuch J, Athanasakis E, Severini GM, Crovella S, Bianco AM, Tommasini A. *F402L*

variant in NLRP12 in subjects with undiagnosed periodic fevers and in healthy controls. Clin Exp Rheumatol. 2014;32(6):993-4.

Girardelli M, Arrigo S, Barabino A, Loganes C, Morreale G, Crovella S, Tommasini A, Bianco AM. *The diagnostic challenge of very early-onset enterocolitis in an infant with XIAP deficiency.* BMC Pediatr. 2015;15:208.

Lougaris V, Faletra F, Lanzi G, Vozzi D, Marcuzzi A, Valencic E, Piscianz E, Bianco A, Girardelli M, Baronio M, Loganes C, Fasth A, Salvini F, Trizzino A, Moratto D, Facchetti F, Giliani S, Plebani A, Tommasini A. *Altered germinal center reaction and abnormal B cell peripheral maturation in PI3KR1-mutated patients presenting with HIGM-like phenotype.* Clin Immunol. 2015;159(1):33-6.

Naselli A, Penco F, Cantarini L, Insalaco A, Alessio M, Tommasini A, Maggio C, Obici L, Gallizi R, Cimmino M, Signa S, Lucherini OM, Carta S, Caroli F, Martini A, Rubartelli A, Ceccherini I, Gattorno M. *Clinical Characteristics of Patients Carrying the Q703K Variant of the NLRP3 Gene: A 10-year Multicentric National Study.* J Rheumatol. 2016;43(6):1093-100.

Naviglio S, Arrigo S, Martelossi S, Villanacci V, Tommasini A, Loganes C, Fabretto A, Vignola S, Lonardi S, Ventura A. *Severe inflammatory bowel disease associated with congenital alteration of transforming growth factor beta signaling.* J Crohns Colitis. 2014;8(8):770-4.

Paloni G, Pastore S, Tommasini A, Lepore L, Taddio A. *Delayed reactivation of chronic infantile neurologic, cutaneous, articular syndrome (CINCA) in a patient with somatic mosaicism of CIAS1/NLRP3 gene after withdrawal of anti-IL-1 beta therapy*. Clin Exp Rheumatol. 2015;33(5):766.

Pascolo L, Gianoncelli A, Rizzardi C, Tisato V, Salomé M, Calligaro C, Salvi F, Paterson D, Zamboni P. *Calcium micro-depositions in jugular truncular venous malformations revealed by Synchrotron-based XRF imaging*. Sci Rep. 2014;4:6540.

Pastore S, Barbieri F, Di Leo G, Valencic E, Tommasini A, Ventura A. *Hemophagocytic lymphohistiocytosis in total parenteral nutrition dependent children: description of 5 cases and practical tips for management.* J Pediatr Hematol Oncol. 2014;36(7):e440-2.

Perri P, Zauli G, Gonelli A, Milani D, Celeghini C, Lamberti G, Secchiero P. *TNF-related apoptosis inducing ligand in ocular cancers and ocular diabetic complications.* Biomed Res Int. 2015;2015:424019.

Rampazzo E, Voltan R, Petrizza L, Zaccheroni N, Prodi L, Casciano F, Zauli G, Secchiero P. *Proper design of silica nanoparticles combines high brightness, lack of cytotoxicity and efficient cell endocytosis*.

Nanoscale. 2013;5(17):7897-905.

Rusmini M, Federici S, Caroli F, Grossi A, Baldi M, Obici L, Insalaco A, Tommasini A, Caorsi R, Gallo E, Olivieri AN, Marzano A, Coviello D, Ravazzolo R, Martini A, Gattorno M, Ceccherini I. *Next-generation sequencing and its initial applications for molecular diagnosis of systemic auto-inflammatory diseases*. Ann Rheum Dis. 2016;75(8):1550-7.

Secchiero P, Rimondi E, di Iasio MG, Agnoletto C, Melloni E, Volpi I, Zauli G. *C-Reactive protein downregulates TRAIL expression in human peripheral monocytes via an Egr-1-dependent pathway.* Clin Cancer Res. 2013;19(8):1949-59.

Secchiero P, Toffoli B, Melloni E, Agnoletto C, Monasta L, Zauli G. *The MDM2 inhibitor Nutlin-3 attenuates streptozotocin-induced diabetes mellitus and increases serum level of IL-12p40.* Acta Diabetol. 2013;50(6):899-906.

Tisato V, Zauli G, Gianesini S, Menegatti E, Brunelli L, Manfredini R, Zamboni P, Secchiero P. *Modulation of circulating cytokine-chemokine profile in patients affected by chronic venous insufficiency undergoing surgical hemodynamic correction.* J Immunol Res. 2014 2014:473765.

Tisato V, Zamboni P, Menegatti E, Gianesini S, Volpi I, Zauli G, Secchiero P. *Endothelial PDGF-BB produced ex vivo correlates with relevant hemodynamic parameters in patients affected by chronic venous disease.* Cytokine. 2013;63(2):92-6.

Tisato V, Zauli G, Rimondi E, Gianesini S, Brunelli L, Menegatti E, Zamboni P,Secchiero P. *Inhibitory effect of natural anti-inflammatory compounds on cytokines released by chronic venous disease patient-derived endothelial cells.* Mediators Inflamm. 2013 2013:423407.

Tisato V, Secchiero P, Rimondi E, Gianesini S, Menegatti E, Casciano F, Zamboni P, Zauli G. *GM-CSF exhibits anti-inflammatory activity on endothelial cells derived from chronic venous disease patients.* Mediators Inflamm. 2013 2013:561689.

Tisato V, Perri P, Rimondi E, Melloni E, Lamberti G, Milani D, Secchiero P, Zauli G. *Kinetic Profiles of Inflammatory Mediators in the Conjunctival Sac Fluid of Patients upon Photorefractive Keratectomy.* Mediators Inflamm. 2015; 2015:942948.

Tisato V, Garrovo C, Biffi S, Petrera F, Voltan R, Casciano F, Meroni G, Agnoletto C, Zauli G, Secchiero P. *Intranasal administration of recombinant TRAIL down-regulates CXCL-1/KC in an*

ovalbumin-induced airway inflammation murine model. PLoS One. 2014;9(12):e115387.

Tornese G, Tisato V, Monasta L, Vecchi Brumatti L, Zauli G, Secchiero P. *Serum TRAIL levels increase shortly after insulin therapy and metabolic stabilization in children with type 1 diabetes mellitus*. Acta Diabetol. 2015;52(5):1003-6.

Tornese G, Iafusco D, Monasta L, Agnoletto C, Tisato V, Ventura A, Zauli G, Secchiero P. *The levels of circulating TRAIL at the onset of type 1 diabetes are markedly decreased in patients with ketoacidosis and with the highest insulin requirement*. Acta Diabetol. 2014;51(2):239-46.

Voltan R, Secchiero P, Ruozi B, Caruso L, Forni F, Palomba M, Zauli G, Vandelli MA. *Nanoparticles loaded with Nutlin-3 display cytotoxicity towards p53(wild-type) JVM-2 but not towards p53(mutated) BJAB leukemic cells.* Curr Med Chem. 2013;20(21):2712-22.

Voltan R, Zauli G, Rizzo P, Fucili A, Pannella M, Marci R, Tisato V, Ferrari R, Secchiero P. *In vitro endothelial cell proliferation assay reveals distinct levels of proangiogenic cytokines characterizing sera of healthy subjects and of patients with heart failure.* Mediators Inflamm. 2014 2014:257081.

Zauli G, Monasta L, Rimondi E, Vecchi Brumatti L, Davanzo R, Demarini S, Secchiero P. *Levels of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) show a long-term stability in the breast milk of mothers of preterm infants.* .J Hum Lact. 2013;29(3):350-3.

Zauli G, Monasta L, Vecchi Brumatti L, Agnoletto C, Volpi P, Secchiero P. *The circulating levels of TRAIL are extremely low after delivery but rapidly recover in both mothers and newborns.* Cytokine. 2013;64(1):51-3.

Zauli G, Tisato V, Melloni E, Volpato S, Cervellati C, Bonaccorsi G, Radillo O, Marci R, Secchiero P. *Inverse correlation between circulating levels of TNF-related apoptosis-inducing ligand and 17β-estradiol.* J Clin Endocrinol Metab. 2014;99(4):E659-64.

Zauli G, Celeghini C, Monasta L, Martinelli M, Luppi S, Gonelli A, Grill V, Ricci G, Secchiero P. *Soluble TRAIL is present at high concentrations in seminal plasma and promotes spermatozoa survival.* Reproduction. 2014;148(2):191-8.

Data della firma digitale

Il Direttore Scientifico

Prof.Fabio Barbone

Si autorizza al trattamento dei dati ai sensi del d.lgs. 196/2003

Il Direttore Scientifico

Prof.Fabio Barbone