



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

Con la collaborazione



Associazione degli Industriali
della Provincia di Verona

CONVENTION D'AUTUNNO DEI RICERCATORI ITALIANI PER LA FIBROSI CISTICA

Verona 14-15 novembre 2003

Stato di avanzamento dei progetti di ricerca sostenuti dalla Fondazione nel 2002 e nel 2003

20-26 ottobre settimana della ricerca italiana per la fibrosi cistica

Vorrei.

respirare
senza tossire

fare il pilota
da grande

non fare più
fisioterapia

viaggiare senza
dovermi curare

non andare
più in ospedale

correre
a perdifiato

diventare un papà
e poi un nonno

non prendere
più medicine

guarire
dalla fibrosi cistica

I suoi sogni hanno un prezzo. Dacci il tuo contributo.



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

CONVENTION D'AUTUNNO DEI RICERCATORI ITALIANI PER LA FIBROSI CISTICA

Verona 14-15 novembre 2003

***Stato di avanzamento dei progetti di ricerca sostenuti dalla
Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica nel 2002 e nel 2003***

INDICE

Presentazione	Pag 54
FISIOPATOLOGIA MOLECOLARE E NUOVE TERAPIE FARMACOLOGICHE Moderatore: <i>G. Berton</i> (Direttore Ist. Patologia Generale, Università di Verona)	Pag 5
- Research development in drug therapy of cystic fibrosis (<i>D. Sheppard</i> , Dept of Physiology, University of Bristol, UK; lettura introduttiva)	Pag 5
- Azitromicina: possibile ruolo diverso da quello antibiotico (<i>P. Melotti</i> , Lab. Patologia Molecolare, Centro CF, Verona; prog. # 3/2002, risultati 1° anno)	Pag 7
- Nuovi mezzi di cura per la fibrosi cistica identificabili attraverso screening dei farmaci già approvati in Italia (<i>L. Galletta</i> , Lab. Genetica Molecolare, Ist. G. Gaslini, Genova; <i>M. Mazzei</i> , Scienze farmaceutiche, Univ. di Genova; <i>M. Conese</i> , Ist. Terapia Sperimentale CF, Osp. S. Raffaele, Milano; prog. # 3/2003, risultati preliminari)	Pag 8
- Identificazione di siti di legame e modelli di azione di attivatori della proteina CFTR (<i>O. Moran</i> , Ist. Biofisica CNR, Genova; <i>O. Zegarra</i> , Lab. Patologia Molecolare, Ist. G. Gaslini, Genova; <i>V. Martorana</i> , Ist. Biofisica CNR, Palermo; prog # 2 (2003, risultati preliminari)	Pag 9
- Patogenesi e trattamento della malattia epatica in fibrosi cistica (<i>M. Strazzabosco</i> , <i>C. Spirli</i> , Osped. di Bergamo e Ist. Medicina Molecolare delle Venezie, Padova; prog. # 11/2003, risultati preliminari)	Pag 9

- Proteomica del liquido di superficie delle vie aeree

(*O. Zegarra*, Lab. Patologia Molecolare, Ist. G. Gaslini, Genova;
G. Candiano, Lab. Fisiopatologia-uremia, Ist. G. Gaslini, Genova;
L. Bini, Dip. Biologia Molecolare, Univ. di Siena;
V. De Rose, Malattie Respiratorie, DipScienze Clin. e Biol.,
 Univ. di Torino; prog. # 7/2003, risultati preliminari)

Pag 10

GENETICA

Moderatore: *P.F. Pignatti*
 (Presidente Società Italiana Genetica Umana)

Pag 12

- Nuovi vettori per la terapia genica della fibrosi cistica: Micromosomi

(*F. Ascenzioni*, Dip. Biologia Cellulare, Univ. La Sapienza, Roma;
O. Zegarra, Lab. Genetica Molecolare, Ist. G. Gaslini, Genova;
M. Conese, Osp. S. Raffaele, Milano;
 prog. # 1/2002 risultati 1° anno)

Pag 12

- Nuovi vettori per la terapia genica della fibrosi cistica: Lentivirus

(*M. Conese*, Ist. Terapia Sperimentale CF, Osp. S. Raffaele, Milano;
 prog. # 2/2002, risultati 1° anno)

Pag 13

- Identificazione di geni modificatori della fibrosi cistica attraverso studio di famiglie ed analisi "microarray"

(*G. Novelli*, Dip. Biologia, Sez. Genetica, Univ. Torvergata, Roma;
P.F. Pignatti, Ist. Biologia e Genetica, Univ. Verona;
F. Salvatore, Dip. Biochimica e Biotecnologie, Univ. Napoli "Federico II";
 prog. # 4/2003, risultati preliminari)

Pag 14

- Nuove possibilità diagnostiche e terapeutiche derivanti dallo studio del "pre-mRNA splicing" in fibrosi cistica

(*F. Pagani*, Internat. Centre Genetic Engineering & Biotechnology,
 Padriciano Trieste; prog. #5/2003, risultati preliminari)

Pag 15

- Possibile utilizzazione del polimorfismo CFTR-M470V per la determinazione del rischio CF nelle famiglie con mutazioni non identificate e nelle forme di fibrosi cistica atipica

(*P.F. Pignatti* e *C. Bombieri*, Dip. Mat. - Infant., Sez. Biologia e Genetica, Univ. Verona; *C. Castellani*, Centro CF, Verona;
G. Modiano, Dip. Biologia, Università Torvergata, Roma;
 prog. # 6/2003, risultati preliminari)

Pag15

MICROBIOLOGIA E INFEZIONE POLMONARE

Moderatore: *G. Doering*
 (Presidente European CF Society)

Moderatore: *A. Cao*
 (Presidente Comitato Scientifico
 Fondazione Ricerca FC)

Pag17

- Research development on the interaction bacteria/ respiratory epithelia in CF (<i>G. Doering</i> , Tuebingen University, Germany; lettura introduttiva)	Pag 17
- Nuovi marcatori tassonomici di <i>Burkholderia cepacia</i> complex (<i>R. Fontana</i> e <i>G. Golini</i> , Lab. Microbiologia, Osped. di Verona; prog. # 4/2002, risultati definitivi)	Pag 19
- Sviluppo di un test diagnostico rapido per la discriminazione di specie e genomovars di <i>Burkholderia cepacia</i> complex nella routine clinica (<i>R. Fani</i> , Ist Biologia Animale e Genetica, Univ. Firenze; <i>G. Manno</i> , Istit. G. Gaslini, Genova; <i>G. Taccetti</i> , Centro CF, Osped. Meyer, Firenze; <i>S. Tabacchioni</i> , ENEA, Roma; prog. # 9/2003, risultati preliminari)	Pag 20
- Rilevanza del sistema di regolazione "quorum sensing" nell'infezione polmonare da <i>Burkholderia cepacia</i> e suo possibile trattamento (<i>V. Venturi</i> , Internat. Centre Genetic Engineering & Biotechnology, Padriciano Trieste; prog. # 10/2003, risultati preliminari)	Pag 21
- Mutazioni adattative di <i>Pseudomonas aeruginosa</i> in un modello di infezione polmonare cronica CF (<i>A. Bragonzi</i> e <i>G. Doering</i> , Inst. Allgemeine Hygiene und Umwelthygiene, Univ. Tuebingen; Ist. Terapia Sperimentale CF, Osp. S. Raffaele, Milano; prog. # 8/2003, risultati preliminari)	Pag 22
- Un nuovo programma informatico a supporto del Registro Italiano Fibrosi Cistica (costruzione di un ipertesto) (<i>A. Bossi</i> , Ist. Statistica Medica e Biometria, Univ. Milano; prog. 12/2003, risultati preliminari)	Pag 23
Linee di ricerca promosse e finanziate dalla Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica	Pag 24

In copertina il Manifesto della prima "Settimana della Ricerca Italiana per la Fibrosi Cistica"

PRESENTAZIONE

Non è facile oggi gestire in Italia programmi di ricerca biomedica avanzata. Non è nemmeno facile condurre programmi di ricerca clinica indipendente e ispirata a fabbisogni reali di conoscenze. Vi concorrono lo scarso investimento di risorse per la ricerca da parte dello Stato, la non rara dispersione delle risorse private, la frequente precarietà degli operatori di ricerca, lo scollamento organizzativo e talora culturale degli istituti deputati alla ricerca, pur in presenza di non secondarie potenzialità tecnologiche e di abilità scientifiche in diverse realtà italiane.

L'ambito della fibrosi cistica rientra in pieno in questo scenario nazionale e può definirsi particolarmente orfano, bisognoso di essere adottato sia scientificamente che economicamente da istituzioni di ricerca capaci di offrire nuove idee e nuove competenze da finalizzare nel medio termine a cure innovative per questa malattia.

La Fondazione per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica si è cimentata in questo scenario con la consapevolezza delle difficoltà da affrontare e della limitatezza degli strumenti economici di cui oggi dispone. Ma essa ha inteso comunque lanciare un segnale ai ricercatori e alla popolazione per creare alleanze e sinergie intorno alle tematiche emergenti della fibrosi cistica. Il segnale è stato raccolto efficacemente da molti ricercatori e sta trovando un iniziale consenso e sostegno presso la popolazione, istituzioni e associazioni di volontariato. I progetti di ricerca finanziati nel 2002 e nel 2003, selezionati attraverso una competizione monitorata da numerosi esperti indipendenti di riconosciuta competenza nello specifico dei temi proposti, rappresentano un primo tentativo di dare concretezza operativa ad una qualificata iniziativa di traino. Il futuro di questa impresa è molto legato ai risultati scientifici che queste prime iniziative sapranno produrre e alla capacità che avranno i gruppi di sostenitori a mantenere unità di strategia, contenendo le tentazioni particolaristiche e centrifughe, coniugata con un livello soddisfacente di qualità degli obiettivi e dei programmi.

Questa piccola brochure contiene brevi ed essenziali riassunti di quanto verrà presentato alla "Convention d'Autunno" da parte dei ricercatori i cui progetti sulla fibrosi cistica sono stati selezionati, con criteri di rigore, per un finanziamento da parte della Fondazione Ricerca FC. Non tutte le ricerche finanziate sono presenti alla Convention, in quanto alcune mancano ancora di risultati preliminari sufficienti per una presentazione. E' stato chiesto ai responsabili di ricerca di adottare nel riassunto uno stile che consentisse una sufficiente comprensione sia agli addetti ai lavori che ai cosiddetti "laici". Anche gli invitati stranieri hanno cercato di seguire tale criterio. In alcuni testi ciò ci è parso riuscito bene, in altri un po' meno. Ma certamente gli autori delle sintesi saranno a disposizione in vario modo per chiarire i passaggi non compresi: far capire a chi lo desidera il senso degli investimenti sociali di ricerca è un passaggio qualificante per le nuove generazioni di ricercatori.

La Fondazione per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica
Novembre 2003

FISIOPATOLOGIA MOLECOLARE E NUOVE TERAPIE FARMACOLOGICHE

Moderatore: **Giorgio Berton**

(Membro del Comitato di Consulenza
Scientifica della Fondazione Ricerca FC)

Direttore Istituto di Patologia Generale, Università di Verona



Lettura introduttiva



DAVID N. SHEPPARD

Professore del Dipartimento di Fisiologia dell'Università di Bristol (Inghilterra), leader di un gruppo di ricerca che studia la struttura, la funzione e la farmacologia del canale del cloro CFTR, con l'intento di sviluppare nuovi trattamenti per le malattie causate da mal-funzione della proteina CFTR.

DAVID N. SHEPPARD, Ph.D.
Department of Physiology, University of
Bristol, Bristol BS8 1TD, UK

Research Development in Drug Therapy for Cystic Fibrosis State of the Art and Future Research Directions

With the identification of the defective gene responsible for cystic fibrosis (CF) in 1989, the molecular abnormality responsible for the wide-ranging pathologies that characterise the disease could be investigated. The protein product of the CF gene, called the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR), forms a gated water-filled pathway (a channel) through which chloride (a component of salt) enters and leaves the cells that line ducts and tubes within the body, including those that line the air passages and intestines. Defects in the CF gene cause disease by two general mechanisms: most commonly, genetic defects prevent the correct manufacture and delivery of the protein to its normal cellular

location, the lumen-facing side of cells. However, some genetic defects disable the chloride channel function of CFTR without affecting its production and delivery to the cell surface.

Knowledge and understanding of how genetic defects cause a loss of function of CFTR are leading to rational new approaches to therapy for CF patients bearing different types of genetic defects. First, David Bedwell (University of Alabama) demonstrated that genetic defects, which cause errors in the production of CFTR protein, could be corrected with aminoglycoside drugs such as gentamicin. These drugs facilitate the production of normal CFTR protein that is delivered to the cell surface where it is functional. Second, Michael Welsh (University of Iowa) found that low temperatures could suppress genetic defects, which cause defects in protein folding. This result stimulated a search for drugs that mimic the effects of low temperature and rescue the function of CFTR at the cell surface. Excitingly, Frédéric Becq (University of Poitiers) recently identified a family of drugs called benzo(c)quinolizinium (MPB) compounds that not only rescue the cell surface localisation of CFTR, but also potentiate its function as a chloride channel. Such drugs have very great potential in the development of new therapies for CF. Third, a variety of drugs called CFTR openers have been discovered that potentiate the activity of mutant chloride channels at the cell surface. The best-studied CFTR opener is genistein, a chemical

found in many edible plants. Tzyh-Chang Hwang (University of Missouri) demonstrated that genistein potentiates greatly chloride flow through CFTR by interfering with the process of channel closing.

Other approaches to therapy seek to bypass the loss of CFTR function in CF cells. Besides CFTR, other types of chloride channels are found in the cells that line the air passages and intestine. Work by Richard Boucher (University of North Carolina) has demonstrated that the activation of receptors located on the lumen-facing side of airway cells causes a short-lived release of chloride from airway cells via calcium-activated chloride channels. Based on this observation, Inspire Pharmaceuticals, Inc., have developed drugs that cause the long-lived release of chloride from airway cells, which have significant therapeutic potential. An alternative strategy to by-pass the loss of CFTR function is to develop chemicals that form synthetic chloride transporters. Using peptides derived from a chloride channel found in the brain, John Tomich (University of Kansas) demonstrated the feasibility of this approach.

To accelerate drug discovery, several groups are taking advantage of new technologies such as high-throughput screening of libraries of chemical compounds. The success to date of Alan Verkman (University of California) and Luis Galietta (Gaslini Istituto) suggests that we should be optimistic about the prospects of developing effective drug therapies to treat CF.

Sviluppo della ricerca sulla terapia farmacologica della fibrosi cistica: stato dell'arte e future direzioni di ricerca.

Con l'identificazione del gene difettoso responsabile della fibrosi cistica (CF) nel 1989, si è potuto indagare l'anomalia molecolare che causa un vasto spettro di patologie caratteristiche di questa malat-

tia. La proteina prodotta dal gene CF, denominata "cystic fibrosis transmembrane conductance regulator" (CFTR), forma un passaggio pieno d'acqua controllato da una porta (un canale), attraverso il quale il cloro (un componente del sale comune) entra ed esce dalle cellule che tappezzano i dotti e i tubi all'interno dell'organismo, tra cui quelli delle vie aeree e dell'intestino. I difetti del gene CF causano la malattia attraverso due meccanismi generali: più comunemente, i difetti genetici impediscono la corretta costruzione e la migrazione della proteina verso la sua normale collocazione cellulare, il lato delle cellule che si affaccia al lume. Tuttavia, alcuni difetti genetici rendono inefficace la funzione di CFTR senza interferire con la sua produzione e migrazione alla superficie cellulare.

La conoscenza e la comprensione di come i difetti genetici causano una perdita di funzione CFTR stanno indirizzando a nuovi approcci razionali per la terapia di pazienti CF che portano tipi diversi di difetto genetico.

Primo, David Bedwell (Università di Alabama) dimostrò che alcuni difetti genetici, che causano errori nella produzione di proteina CFTR, potevano essere corretti con farmaci aminoglicosidici quali la gentamicina. Questi farmaci facilitano la produzione di proteina CFTR normale che viene quindi veicolata alla superficie cellulare dove essa è attiva e funzionante.

Secondo, Michel Welsh (Università di Iowa) trovò che le basse temperature potevano sopprimere i difetti genetici che causano difetti nel processo di conformazione e maturazione della proteina (folding). Questo risultato stimolò la ricerca di farmaci che potessero imitare gli effetti della bassa temperatura e recuperare la funzione di CFTR alla superficie cellulare. Con entusiasmante successo, Frédéric Becq (Università di Poitiers) ha recentemente identificato una famiglia di farmaci, denominati composti benzo(c)chinolinici (MPB), che non soltanto recuperano la localizzazione di CFTR alla superficie

cellulare ma potenziano anche la sua funzione come canale del cloro. Tali farmaci hanno una potenzialità molto grande nello sviluppo di nuove terapie per la fibrosi cistica.

Terzo, è stata scoperta una varietà di farmaci, chiamati "openers" ossia facilitanti l'apertura del canale CFTR, che potenziano l'attività di canali CFTR mutanti a livello di superficie cellulare. L' "opener" meglio studiato è la genisteina, una sostanza chimica che si trova in molti vegetali commestibili. Tzyh-Chang Hwang (Università del Missouri) ha dimostrato che la genisteina potenzia fortemente il flusso di cloro attraverso CFTR interferendo con i processi di chiusura del canale.

Altri approcci alla terapia farmacologia cercano di bypassare la perdita di funzione CFTR nelle cellule CF. Accanto a CFTR, altri tipi di canali del cloro si trovano nelle cellule che tappezzano le vie aeree e l'intestino. Il lavoro di ricerca portato avanti da Richard Boucher (Università di North Carolina) ha dimostrato che l'attivazione di recettori situati sul lato delle cellule delle vie aeree che guarda il lume causa un rilascio di cloro di breve durata dalle cellule respiratorie attraverso canali del cloro attivati dal calcio. Sulla base di questa osservazione, la Compagnia Inspire Pharmaceutical, Inc, ha sviluppato farmaci che inducono il rilascio di lunga durata di cloro dalle cellule respiratorie, e questo ha un significativo potenziale terapeutico.

Una strategia alternativa per aggirare la perdita di funzione CFTR è quella di sviluppare sostanze chimiche con caratteristiche di trasportatori sintetici di cloro. Con l'impiego di peptici derivati da un canale del cloro scoperto nel cervello, John Tomich (Università del Kansas) ha dimostrato la praticabilità di un tale approccio.

Al fine di accelerare la scoperta di farmaci utili, alcuni gruppi stanno sfruttando nuove tecnologie quale quella dello screening su vasta scala di librerie di

composti chimici. Il successo sinora ottenuto da Alan Verkman (Università di California) e Luis Galletta (Istituto "G. Gaslini" di Genova) suggerisce che noi dovremmo essere ottimisti sulla prospettiva di sviluppare terapie farmacologiche efficaci per il trattamento della fibrosi cistica.

Azitromicina: ruoli non battericidi e rilevanza per la terapia della fibrosi cistica



PAOLA MELOTTI
Responsabile del progetto

P. Melotti, E. Nicolis, C. Cigana, U. Pradal, V. Casotti, F. Quiri, P. Benedetti

(Laboratorio di Patologia Molecolare, Centro Fibrosi Cistica, Verona); M. Negri, M. Ferracin (Centro Ricerca sul Cancro, Università di Ferrara). Prog. # 3/2002.

Mentre si stanno accumulando evidenze sugli incoraggianti effetti terapeutici dell'azitromicina (AZM) in pazienti affetti da fibrosi cistica (FC), rimangono ancora aperte diverse ipotesi sul meccanismo d'azione di questo macrolide.

Dal luglio 2002 nel Laboratorio di Patologia Molecolare del Centro Fibrosi Cistica di Verona è in corso uno studio finanziato dalla Fondazione per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica sui meccanismi non battericidi dell'azitromicina rilevanti per la terapia della FC.

Al miglioramento clinico in alcuni soggetti sottoposti a terapia con AZM risulterebbero associati sia una variazione di differenza dei potenziali nasali sia un aumento di espressione del gene multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1), ap-

partenente alla famiglia delle ATP binding protein di cui fa parte anche il gene cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). E' stato così ipotizzato che l'aumentata espressione di MRP1 possa compensare, almeno parzialmente, il difetto presente nella FC.

Il primo risultato ottenuto consiste nel riscontro di un polimorfismo del numero delle triplette GCC incluse nella regione regolatrice al lato 5' del gene MRP1 nei 27 pazienti finora studiati. Ci si propone ora di conoscere la risposta all'AZM degli stessi pazienti in termini di regolazione dell'espressione di MRP1 mRNA e di differenza dei potenziali nasali. Sarà così possibile determinare se la variabilità di tali risposte da soggetto a soggetto è associata a qualche specifica ripetizione di triplette identificata nel promotore di MRP1.

Sono stati inoltre avviati studi in vitro per determinare l'effetto dell'AZM sull'espressione genica in linee cellulari derivate da epitelio bronchiale con fenotipo FC e non FC. A tal fine si è messa a punto la quantificazione di mRNA con il metodo di trascrizione inversa seguita da "real-time" PCR. Con tale tecnica si è avviata anche la quantificazione di MRP1 mRNA in cellule di epitelio nasale di pazienti FC.

Si è rilevata una maggior espressione di MRP1 e della molecola pro-infiammatoria interleuchina 8 (IL-8) in vitro in cellule FC rispetto a quelle non FC. Indagando l'ipotizzato effetto anti-infiammatorio dell'AZM si è riscontrata un'inibizione dell'espressione di IL-8 da parte di questo macrolide in una linea cellulare FC.

Utilizzando poi dei "microarrays" si sono prese in considerazione le sequenze di migliaia di geni, la cui espressione differenziale in presenza o meno di AZM è in corso di valutazione. Per svolgere questa fase del progetto si è instaurata una collaborazione con il dott. Massimo Negrini, Direttore del Centro Interdipartimentale

per la Ricerca sul Cancro dell'Università di Ferrara.

Analisi su vasta scala di principi attivi approvati per uso umano per l'identificazione di nuovi farmaci per la terapia della fibrosi cistica



LUIS GALIETTA
Coordinatore del progetto multicentrico

Luis J.V. Galietta (1), Nicoletta Pedemonte (1), Chiara Folli (1), Emanuela Caci (1), Olga Zegarra-Moran (1), Massimo Conese (2), Gemma Migneco (2), Erika Nieddu (3), Mauro Mazzei (3).

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

(2) *H.S. Raffaele, Milano*

(3) *Dip. di Scienze Farmaceutiche, Università di Genova*

Prog. # 3/2003.

Molte delle mutazioni che causano la fibrosi cistica (FC) alterano il trasporto di cloruro attraverso due tipi di meccanismi. Un tipo di mutazioni riduce la capacità della proteina CFTR di trasportare ioni cloruro (difetto di "gating"). Un altro tipo di mutazioni invece impedisce alla proteina CFTR di raggiungere la membrana plasmatica (difetto di "trafficking" o di maturazione). La mutazione più frequente nei pazienti FC, la delezione della fenilalanina in posizione 508 (deltaF508), causa entrambi i difetti.

La correzione del difetto di base nella fibrosi cistica (FC) può essere teoricamente ottenuta mediante l'uso di farmaci che ristabiliscano il funzionamento della pro-

teina CFTR mutata o che stimolino l'attività di canali del cloruro alternativi. Per trovare questi farmaci si possono effettuare delle analisi su vasta scala di migliaia di composti chimici di nuova sintesi. Progetti di questo tipo sono in effetti in corso in alcuni laboratori tra cui il nostro. Tuttavia, prima che questi composti possano essere provati su pazienti nell'ambito di sperimentazioni cliniche, bisognerà determinarne su modelli animali e su cellule in vitro le proprietà farmacologiche e l'eventuale tossicità. Ciò potrebbe richiedere diversi anni con risultati anche negativi. Un approccio complementare può essere quello di provare l'efficacia di farmaci già conosciuti e che sono stati approvati per la cura nell'uomo di altre malattie. Infatti l'identificazione di un composto attivo all'interno di questo gruppo di farmaci potrebbe portare più velocemente all'uso su pazienti FC.

Il nostro progetto si propone di effettuare lo studio di 1.079 farmaci approvati per uso umano in Italia allo scopo di trovare uno o più composti che correggano il difetto di base o che riducano il processo infiammatorio nei pazienti FC.

Attivatori del trasporto ionico mediato dalla CFTR: Identificazione e modellistica molecolare dei siti di legame.



OSCAR MORAN
Coordinatore del progetto multicentrico

Oscar Moran¹, Chiara Pincin¹, Vincenzo Martorana², Olga Zegarra-Moran³

¹Istituto di Biofisica, CNR, Genova, ²Istituto di Biofisica, CNR, Sezione de Palermo,

³Laboratorio di Genetica Molecolare, Istituto G. Gaslini, Genova. Prog. # 2/2003

Nonostante non esista ancora una terapia risolutiva per la fibrosi cistica, sono stati individuati dei farmaci, considerati buoni candidati per la terapia dei pazienti, in grado di attivare la proteina CFTR. Questi composti chimici recentemente identificati, sono capaci di attivare la CFTR, anche quando questa ha funzione ridotta per la presenza di alcuni tipi di mutazioni; rimane però sconosciuto il meccanismo coinvolto in questa attivazione. Alcune evidenze sembrano indicare che, per fare il loro effetto, gli attivatori si debbano legare ad una regione definita della proteina, chiamata dominio di legame dei nucleotidi (NBD). Mediante la modellistica molecolare, un approccio nuovo e molto efficace, cerchiamo d'identificare le regioni dei NBD che sono importanti per il legame e l'azione degli attivatori della CFTR. In primo luogo, abbiamo sviluppato un modello molecolare del NBD, e ora stiamo lavorando per identificare i possibili siti di legame dei farmaci su questa struttura, sia con metodi teorici che mediante il confronto con dati sperimentali. Questo tipo di approccio ci sarà molto utile per definire nuovi bersagli nello sviluppo di farmaci, per migliorare il potenziale terapeutico degli attivatori della CFTR, e anche per progettare farmaci specifici per mutazioni individuali che causano la fibrosi cistica.

Patogenesi e trattamento della patologia epatica correlata alla Fibrosi Cistica



MARIO STRAZZABOSCO
Responsabile del Progetto

Mario Strazzabosco, Carlo Spirlì.

U.O. di Gastroenterologia, Ospedali Riuniti di Bergamo; Istituto Veneto di Medicina Molecolare, Padova. Prog. # 11/2003.

La fibrosi cistica, una malattia genetica causata da una mutazione a carico del CFTR, una proteina di membrana che media l'efflusso di cloro dalla cellula, è la più comune malattia genetica letale che colpisce il ceppo caucasico. Le manifestazioni cliniche a livello epatico sono presenti nel 30% dei pazienti con fibrosi cistica e ne compromettono la sopravvivenza e la qualità di vita. La terapia farmacologica per le complicanze epatiche in corso di fibrosi cistica è attualmente insoddisfacente. Inoltre, nel fegato, i protocolli di terapia genica sono meno attuabili rispetto al polmone.

Il nostro gruppo di ricerca è impegnato da anni nello studio della fisiologia e fisiopatologia dell'epitelio biliare con l'intento di chiarire come il malfunzionamento del CFTR porti ad una diminuita secrezione di bicarbonato ed ad un danno anatomico del fegato e nello studio di possibili approcci farmacologici per il trattamento della malattia epatica correlata a fibrosi cistica. Attualmente stiamo utilizzando dei modelli in vitro per mettere a punto nuovi approcci terapeutici per trattare le patologie epatiche correlate alla fibrosi cistica.

Una strategia che potrebbe rivelarsi molto utile è quella di stimolare la secrezione biliare sfruttando vie secretorie alternative a quella del CFTR.

A tale scopo stiamo studiando i meccanismi molecolari alla base degli effetti coleretici della Glibenclamide, un composto della famiglia delle sulfoniluree abitualmente utilizzato nella terapia del diabete. I nostri risultati dimostrano come la glibenclamide stimoli il flusso biliare a livello dei dotti biliari tramite un peculiare meccanismo di trasporto vescicolare. Ma ancora più di notevole interesse è il risultato che la glibenclamide è in grado di ri-

stabilire la secrezione di fluidi in frammenti dei dotti biliari isolati da topi knock-out per il CFTR, nei quali la secrezione cAMP-mediata è significativamente inibita.

Proteomica del liquido di superficie delle vie aeree



OLGA ZEGARRA
Coordinatrice del Progetto Multicentrico

Olga Zegarra-Moran¹, Giovanni Candiano² e Luca Bini³

¹ *Laboratorio di Genetica Molecolare, Istituto Giannina Gaslini,* ² *Laboratorio di Fisiopatologia dell'Uremia, Istituto Giannina Gaslini,* ³ *Dipartimento di Biologia Molecolare, Univ. Degli Studi di Siena. Prog. # 7/2003.*

Nella Fibrosi Cistica (FC) il difetto primario, la mutazione del canale permeabile al cloruro CFTR, porta ad un'alterazione nella produzione di fluido nell'epitelio delle vie aeree e secondariamente a colonizzazione batterica e ad un massiccio processo infiammatorio. Il meccanismo che porta alla colonizzazione batterica è ignoto, ma è possibile che il difetto primario provochi la perdita o la modificazione di un fattore importante nel sistema di difesa delle vie aeree.

Noi stiamo proponendo un nuovo approccio, la proteomica, come metodo per identificare le proteine che l'epitelio delle vie aeree secerne in condizioni normali e nei processi infiammatori. Il nostro progetto si propone di recuperare ed analizzare il fluido che bagna la superficie delle vie aeree di un modello sperimentale di

cellule bronchiali e anche quello che ricopre un epitelio di cellule ghiandolari, in presenza oppure in assenza di stimoli infiammatori simili a quelli presenti nei bronchi dei pazienti con FC.

Studieremo inoltre il fluido d'epiteli ottenuti da pazienti con FC. Dal confronto di queste situazioni noi potremmo identificare quelle proteine la cui secrezione è

modificata da stimoli infiammatori e che possono avere un ruolo antiinfiammatorio o antibatterico. Potremmo inoltre cercare differenze nello spettro di proteine prodotte in epiteli FC e non-FC che possano spiegare la persistenza dello stato

infiammatorio nei pazienti.

Il coinvolgimento delle proteine identificate nei fenomeni infiammatori sarà poi confermato con metodi biochimici ed, in certi casi, misurando il loro effetto sull'attività batterica.

Crediamo che questo approccio porterà all'identificazione di fattori coinvolti nei meccanismi alla base della malattia polmonare nella FC.

Inoltre, le proteine identificate potranno servire come bersaglio nello sviluppo di nuovi farmaci antiinfiammatori e/o antibatterici selettivi.

GENETICA



Moderatore: **Pierfranco Pignatti**
 Presidente della Società Italiana di Genetica Umana
 Direttore Istituto di Genetica Umana, Università di Verona

Minicromosomi: un nuovo approccio per la terapia genica della Fibrosi Cistica



FIorentina ASCENZIONI
 Coordinatrice del progetto multicentrico

Cristina Auriche, Elisabetta Testa, Salvatore Carrabino¹, Sante Di Gioia¹, Nicoletta Pedemonte², Massimo Conese¹, Olga Zegarra-Moran², and Fiorentina Ascenzioni.

Istituto Pasteur-Fondazione Cenci Bolognetti, c/o Dipartimento di Biologia Cellulare e dello Sviluppo. Università di Roma "La Sapienza"

¹*Institute for Experimental Treatment of Cystic Fibrosis, H.S. Raffaele, Milano*

²*Laboratorio di Genetica Molecolare, Istituto G. Gaslini, Genova. Prog. # 1/2002*

La terapia genica intesa come "sostituzione del gene malato con quello sano" rappresenta, almeno concettualmente, il migliore intervento terapeutico oggi pensabile per il trattamento di patologie genetiche monosomatiche. Studi pilota di terapia genica applicata alla fibrosi cistica, come ad altre malattie genetiche, hanno

però rivelato una serie di importanti problematiche che attualmente limitano l'applicazione di questa tecnica. Uno dei problemi più rilevanti è senza dubbio quello relativo alla disponibilità di un vettore adeguato per l'introduzione del gene sano nella cellula bersaglio. Questa considerazione ci ha spinto ad investigare la possibilità di utilizzare un cromosoma come vettore per i geni terapeutici. Tale scelta è motivata dal fatto che i cromosomi sono i naturali vettori dei nostri geni e che oggi disponiamo delle tecniche per modificare opportunamente i cromosomi in modo da ridurne le dimensioni, rimuovere i geni non correlati con la patologia in esame ed inserirvi il gene appropriato.

Utilizzando come vettore il minicromosoma MC1, un piccolo cromosoma umano di 5,5 Mb derivato dal cromosoma 1 ed ampiamente caratterizzato in un precedente studio, abbiamo costruito MC1-CFTR. Tale costruito contiene l'intero locus genico CFTR ed i suoi elementi di controllo. La funzionalità del gene CFTR è stata quindi studiata nelle stesse cellule in cui è stato assemblato il minicromosoma (cellule di hamster CHO). Queste analisi hanno dimostrato che tre cloni indipendenti esprimevano il gene CFTR e tra questi il clone P39 mostrava i migliori livelli di espressione sia a livello molecolare (mRNA e proteina) che funzionale. Questo clone è stato pertanto scelto per i successivi saggi di attività funzionale del canale e di persistenza del cromosoma nell'ospite. Abbiamo infatti potuto dimo-

strare che sottocloni derivanti da singole cellule del clone originale P39 avevano le stesse caratteristiche molecolari e funzionali del clone originale. Inoltre studi di stabilità mitotica hanno dimostrato che il cromosoma si mantiene in una frazione elevata di cellule anche in assenza di selezione.

Stiamo attualmente lavorando per trasferire MC1-CFTR/39 in modelli cellulari CF in vitro per studiarne il possibile effetto terapeutico. A tale scopo abbiamo intrapreso l'analisi di una serie di modelli cellulari CF per mettere a punto nei nostri laboratori le condizioni sperimentali adatte a rivelare l'attività di MC1-CFTR. Infatti un ostacolo al nostro obiettivo è rappresentato dal fatto che la maggior parte delle linee immortalizzate CF sono aneuploidi e caratterizzate da un elevato numero di copie del cromosoma 7 e conseguentemente da un elevato numero di copie mutate del gene CFTR. Tale situazione potrebbe risolversi in un effetto dominante del gene mutato sulla gene corretto.

Abbiamo inoltre voluto verificare che i modelli cellulari prescelti formassero, nelle opportune condizioni sperimentali, epitelio polarizzati che permettono la determinazione dell'attività del canale CFTR mediante metodi elettrofisiologici.

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



MASSIMO CONESE
Responsabile del progetto

Elena Copreni, Annalisa Bagnacani, Marianna Penzo, Massimo Conese
Institute for Experimental Treatment of Cystic Fibrosis, H. S. Raffaele, Milano.
Prog. # 2/2002

Tra i vettori virali quelli basati sui lentivirus presentano delle caratteristiche che permettono di considerarli come promettenti per la terapia genica della malattia polmonare FC. I lentivirus consentono un'espressione duratura del gene terapeutico in quanto capaci di integrare il transgene nel genoma della cellula e possono infettare cellule con un basso indice di proliferazione, una proprietà molto importante dal momento che l'epitelio respiratorio si rinnova completamente dopo alcuni mesi. Lo scopo primario di questo progetto è quello di verificare l'efficienza e l'efficacia di vettori lentivirali di ultima generazione in modelli in vitro e pre-clinici di epitelio respiratorio adeguati per la Fibrosi Cistica.

Esperimenti condotti su topi C57Bl/6 mediante instillazione intra-tracheale di lentivirus che esprimono il gene marcatore Green Fluorescent Protein (GFP), ottenuti dai Dott. A. Follenzi e L. Naldini (TIGET, HSR, Milano), hanno dimostrato che l'espressione genica è localizzata a livello sia delle vie di conduzione (bronchi) che della zona respiratoria (alveoli). Al fine di verificare che la trasduzione dell'epitelio murino non sia dovuta ad una "tossicità" intrinseca al lentivirus, è in corso uno studio in vitro su linee cellulari epiteliali respiratorie polarizzate. Gli esperimenti prevedono l'aggiunta del lentivirus ricombinante dal lato apicale o basolaterale e la verifica dell'efficienza di trasduzione mediante la percentuale di cellule positive per la GFP. Inoltre verrà valutata la resistenza transepiteliale, un indice dell'integrità dell'epitelio, prima e dopo l'infezione.

Nei pazienti FC, la malattia polmonare è caratterizzata da infezioni respiratorie causate da batteri opportunisti (principal-

mente *Pseudomonas aeruginosa*). Allo scopo di valutare l'efficacia dei lentivirus nei confronti dell'infezione respiratoria, è stato utilizzato il modello di crescita dell'epitelio respiratorio umano fetale trapiantato in topi immunodeficienti (modello scid-hu). Un numero noto di colonie di *P. aeruginosa* (102-107) è stato inoculato direttamente nel parenchima polmonare o nel lume tracheale. Sono stati quindi valutati sia il burden batterico (ovvero il numero di colonie vitali) sia l'internalizzazione batterica da parte delle cellule respiratorie. A 24-72 ore dall'instillazione, si è riscontrato un aumento del numero di colonie per ciascun inoculo. I livelli di internalizzazione batterica erano molto bassi (0,025-0,35% del totale) e comunque il burden batterico sembra essere correlato negativamente alla percentuale di batteri internalizzati. E' in corso di analisi la composizione cellulare fenotipica delle sospensioni cellulari ottenute in tali condizioni sperimentali e quali cellule sono responsabili dell'internalizzazione batterica. Inoltre, è in corso di studio come il muco prodotto dagli xenotrapianti possa influenzare l'adesione e l'internalizzazione batterica con cellule respiratorie epiteliali coltivate in vitro.

Finanziato in parte dall'Associazione Lombarda Fibrosi Cistica ONLUS.

Identificazione di geni modificatori della fibrosi cistica attraverso studio di famiglie ed analisi "microarray"



GIUSEPPE NOVELLI
Coordinatore del progetto multicentrico

G. Novelli (1), P.F. Pignatti (2), F. Salvatore(3).

(1) *Dip. Biologia, Sez. Genetica, Univ. Tor Vergata, Roma;*

(2) *Ist. Biologia e Genetica, Univ. Verona;*

(3) *Dip. Biochimica e Biotecnologie, Univ. Napoli "Federico II". Prog. # 4/2003*

La Fibrosi Cistica (FC; OMIM #219700) è una malattia monogenica, autosomica recessiva, con una frequenza, nella popolazione Caucasica, di 1 individuo su 2500 nati vivi. È dovuta a mutazioni nel gene CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), un gene codificante per un canale del cloro, responsabile di molte funzioni indispensabili per la fisiologia cellulare, ed espresso nella maggior parte dei tessuti epiteliali. Una sua alterata funzione porta a fenotipi diversi per tipologia e gravità in differenti organi. Infatti, analogamente a molte altre patologie dovute a difetti di singoli geni, dimostra espressività variabile ed eterogeneità clinica, a causa della presenza di geni modificatori e di fattori ambientali diversi peraltro non definiti. Benché sia stato prodotto uno sforzo scientifico considerevole, i meccanismi patogenetici precisi della FC non sono ancora chiari, e il ruolo dei geni modificatori totalmente sconosciuto.

L'obiettivo di questo progetto è l'identificazione dei geni di suscettibilità in grado di influenzare la gravità del fenotipo della malattia. A tale scopo abbiamo riunito le esperienze di tre gruppi di ricerca diversi con conoscenze specifiche sulla genetica e la genomica della FC. Per l'identificazione dei geni modificatori attivi nella FC viene utilizzata la metodologia dei microarray a cDNA, che consente di studiare contemporaneamente il livello di espressione di centinaia di geni selezionati per la dimostrata e/o supposta interazione fisica e/o funzionale con il gene CFTR. Tale livello di espressione è esaminato in biopsie di epitelio nasale proveniente da pazienti FC, comparabili per

sesso ed età, con uguale genotipo CFTR e differenti manifestazioni cliniche. Parallelamente all'analisi del profilo di espressione di geni di interesse, vengono condotti studi di associazione tra alcuni geni candidati e i parametri respiratori e gastrointestinali di pazienti FC con differenti manifestazioni cliniche. Eventuali variazioni di sequenze nei geni modificatori analizzati, sono esaminati accuratamente mediante lo studio funzionale e strutturale dei peptidi mutati codificati, per comprendere così sia in vivo che in vitro, il problema causato alla normale fisiologia della cellula studiata.

Questo approccio multiplo sarà fondamentale per comprendere alcuni meccanismi molecolari che inducono variabilità fenotipica e per lo sviluppo di terapie farmacologiche adeguate.

La patologia dello splicing nella fibrosi cistica: distinzione tra varianti benigne e mutazioni che causano la malattia

Franco Pagani, Elisa Goina & Francisco Baralle

International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, Molecular Pathology Dept., Padriciano 99, Trieste 34012, Italy. Prog. # 5/2003

La corretta valutazione del significato patologico di varianti nella sequenza di DNA nel gene della Fibrosi Cistica (CFTR), può non essere immediatamente evidente. In genere, l'effetto di singole mutazioni sulla espressione genica viene relazionato alla loro localizzazione. Le mutazioni esoniche vengono analizzate principalmente per il loro effetto sulla sequenza codificante, e le mutazioni introniche lontane dai siti canonici di splicing sono largamente ignorate. Varianti silenti non sono considerate patogene, varianti mis-

senso o nonsense sono studiate per il loro effetto a livello proteico.

In questo studio abbiamo identificato che alcune mutazioni nel gene CFTR causano un difetto nello splicing alterando nuovi elementi regolatori dello splicing. Variazioni nucleotidiche singole nella sequenza dell'esone 12 inducono, indipendentemente dal loro effetto sulla proteina, un salto dell'esone con la conseguente produzione di un messaggero non funzionale. L'elemento non-canonicali identificato e' rappresentato dal Composite Exonic Regulatory Element of Splicing (CERES). Inoltre, utilizzando modelli sperimentali appropriati e' stato evidenziato che numerose sostituzioni sinonime causano una modulazione della efficienza di splicing dell'esone. Questo dato indica che anche il piu' "innocente" polimorfismo può in realta rivelarsi patologico poiche' altera il processo di splicing.

Pertanto, e' necessario che test funzionali specifici, in grado di distinguere tra varianti benigne e patologiche, vengano inclusi negli screening del gene della CF.

Studio del possibile utilizzo del polimorfismo CFTR-M470V per la determinazione del rischio di FC



CRISTINA BOMBIERI
Collaboratrice principale di Pierfranco Pignatti, Coordinatore del Progetto multicentrico

PF Pignatti, C Bombieri, A Begnini, F Belpinati, G Malerba – *Sez. Biologia e Genetica; Dip. Mat. Infant. e di Biol-Genet, Univ. Verona*; C. Castellani, A Bonizzato –

Centro Reg. Veneto Fibrosi Cistica, Ospedale Maggiore Verona; G Modiano, BM Ciminelli, F Pompei, C Ciccacci, G Bancone – Dip. Biologia "E. Caffè", Univ. Roma Tor Vergata. Prog. # 6/2003

Recentemente, in uno studio condotto su un campione di soggetti sani della popolazione italiana, con screening completo del gene, abbiamo evidenziato che le mutazioni (intese come variazioni di sequenza del DNA) del gene CFTR si trovano più frequentemente nei cromosomi che presentano la variante M del polimorfismo comune M470V.

La nostra ipotesi è che gli alleli CFTR con la variante M abbiano un rischio aumentato, rispetto a quelli con la variante V, di presentare in altra posizione del gene anche le mutazioni causa di fibrosi cistica (FC).

In tal caso la probabilità per una coppia di essere a rischio di fibrosi cistica sarebbe maggiore quando almeno uno dei membri della coppia fosse portatore dell'allele M o omozigote per questa variante. Per verificare questa ipotesi ci proponiamo di analizzare il polimorfismo M470V nelle famiglie di pazienti affetti da fibrosi cistica.

Il lavoro è iniziato solo da poche settimane, nelle quali abbiamo raccolto 93 famiglie costituite dai genitori e da un figlio affetto da fibrosi cistica. Da ogni individuo è stato prelevato un campione di sangue, dal quale verrà estratto il DNA. Verranno quindi analizzate le principali mutazioni causa di FC nella nostra popolazione. Data la stretta associazione già nota tra la mutazione F508del e l'allele M, saranno escluse dallo studio le famiglie con figli omozigoti per la F508del. Nei casi in cui non saranno state identificate le mutazioni FC sarà analizzato il gene CFTR mediante elettroforesi in gradiente denaturante (DGGE). Ci proponiamo di raccogliere almeno 150 famiglie nelle quali sarà analizzato il polimorfismo M470V. Procederemo quindi all'analisi statistica dei dati ottenuti. La conferma della presenza preferenziale di mutazioni causa di FC nei geni CFTR con la variante M sarebbe molto utile, in particolare per le famiglie nelle quali una o più mutazioni non siano state identificate con i normali metodi in uso, per i casi atipici di fibrosi cistica, nei quali possono essere presenti una grande varietà di mutazioni, o come primo approccio di screening del portatore nella popolazione generale, o infine per iniziare le indagini in paesi economicamente meno sviluppati, data la semplicità del test e i suoi costi contenuti.

MICROBIOLOGIA E INFEZIONE POLMONARE

Moderatore: Antonio Cao

(Presidente Comitato di Consulenza Scientifica
della Fondazione Ricerca FC)

Direttore Istituto CNR di Neurogenetica e Neurofarmacologia,
Università di Cagliari



Moderatore: Gerd Doering

(Presidente European CF Society)

Professore di Igiene Sperimentale e di Microbiologia Sperimentale,
Istituto di Igiene dell'Università di Tuebingen, Germania.
Attività di ricerca in microbiologia, immunologia, nutrizione
ed epidemiologia della Fibrosi cistica.
Presidente dell'European Cystic Fibrosis Society dal 1998.



Lettura introduttiva

GERD DOERING
Tuebingen University, Germany

Research development on the interaction between bacteria and respiratory tract epithelia in cystic fibrosis

Current theories of CF pathogenesis predict different predisposing "local environmental" conditions and sites of bacterial infection within CF airways. We have shown that *P. aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* in CF patients with established lung disease are located within hypoxic mucopurulent masses in airway lumens. In vitro studies reveal that CF-specific increases in epithelial O₂ consumption, linked to increased airway surface liquid volume absorption and mucus stasis, generate steep hypoxic gradients within thickened mucus on CF epithelial surfaces prior to infection.

Motile *P. aeruginosa* deposited on CF air-

way surfaces penetrates into hypoxic mucus zones and responds to this environment with increased alginate production. Further in vitro studies reveal that strains of *P. aeruginosa*, *S. aureus* and *Burkholderia cepacia* significantly increase exopolysaccharide production upon anaerobiosis. Anaerobic conditions strongly impairs the killing capacity of neutrophils concerning *P. aeruginosa*, *S. aureus* and *B. cepacia*. Viscous mucus also impairs the migration of neutrophils through viscous CF mucus. Taken together, current data demonstrate that several bacterial pathogens survive in CF airways due to their ability to produce biofilms which is triggered by a CF-specific anaerobic environment on the respiratory epithelium.

In further studies in vitro, in an animal of chronic *P. aeruginosa* lung infection and in CF patients, we showed that the sigma factor *algU*, *algD* and *muc* genes of the non-mucoid strain PAO1 were up-regulated under anaerobic conditions within 2h,

that in murine lungs, mucoid PAO1 variants were detectable 24 h after challenge in anaerobic agar beads, and that mutation in the muc cluster was absent in mucoid *P. aeruginosa* isolates. The data show that anaerobiosis rapidly induces a conversion to mucoidy in *P. aeruginosa*, that this pathophysiological trait is dominated by gene regulation for prolonged periods of time, before stable mucoid variants are selected by adaptive mutation in genes other than the muc cluster.

These studies indicate that novel therapies for CF include removal of hypoxic mucus plaques, antibiotics effective against *P. aeruginosa* adapted to anaerobic environments and vaccination against major CF pathogens.

Stato della ricerca su interazione batteri/epitelio respiratorio in fibrosi cistica

Le teorie correnti sulla patogenesi della fibrosi cistica (CF) prevedono diverse condizioni ambientali locali e siti che predispongono all'infezione batterica entro le vie aeree. Noi abbiamo dimostrato che *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* in pazienti CF con malattia polmonare consolidata sono localizzati all'interno di masse mucopurulente ipossiche (carenti in ossigeno) nel lume delle vie aeree. Studi in vitro hanno rivelato che l'aumentato consumo epiteliale di ossigeno specifico di CF, legato a sua volta all'aumentato assorbimento del volume di liquido di superficie e alla stasi del muco, generano prima dell'infezione eccessivi gradienti ipossici entro il muco ispessito sulla superficie dell'epitelio respiratorio CF. La *Pseudomonas aeruginosa* mobile, che si deposita sulle superfici delle vie aeree, penetra all'interno delle zone di muco ipossico e risponde a questo ambiente con un aumento di produzione di alginato (componente fondamentale della pellicola autoprotettiva prodotta da *Ps. aeruginosa*). Ulteriori studi in vitro hanno rivelato che ceppi di *P. aeruginosa*, *St.*

aureus e *Burkholderia cepacia* in condizioni di anaerobiosi (mancanza di ossigeno) aumentano significativamente la produzione di esopolisaccaridi (costituenti della pellicola gelatinosa prodotta dai batteri). Le condizioni di anaerobiosi compromettono poi fortemente la capacità di killing (di uccidere i batteri) da parte dei globuli bianchi neutrofili, per quanto concerne *P. aeruginosa*, *St. aureus* e *B. cepacia*. Il muco vischioso che si ha nella fibrosi cistica compromette anche la migrazione dei neutrofili attraverso di esso. I dati oggi a disposizione, presi nel loro insieme, dimostrano che parecchi patogeni batterici sopravvivono nelle vie aeree CF a causa della loro attitudine a produrre un biofilm (pellicola gelatinosa), che viene generato attraverso un ambiente anaerobico CF-specifico sull'epitelio respiratorio.

Attraverso ulteriori studi in vitro, in animali con infezione polmonare cronica da *Ps. aeruginosa* e in pazienti CF, noi abbiamo dimostrato che il fattore sigma algU e algD nonché i geni muc (deputati alla sintesi di mucine) del ceppo non mucoide PAO1 erano sovraregolati (attivati in eccesso) entro 24 ore di permanenza in condizioni anaerobiche. Inoltre, nei polmoni di topo, varianti mucoidi PAO1 erano svelabili 24 ore dopo essere stati cimentati in perline anaerobiche di agar, mentre la mutazione nel gruppo muc era assente negli isolati di *Ps. aeruginosa* mucoide. Questi dati dimostrano che l'anaerobiosi induce rapidamente una conversione alla condizione mucoide nella *Ps. aeruginosa*, che questo tratto fisiopatologico è dominato dalla regolazione genica del batterio per protratti periodi di tempo, prima che siano stati selezionati varianti mucoidi stabili attraverso mutazioni adattative in geni diversi da quelli del gruppo muc.

Questi studi indicano che le nuove terapie per la fibrosi cistica debbono includere la rimozione delle placche di muco ipossico, antibiotici efficaci contro la *Ps.*

aeruginosa adattata agli ambienti anaerobici nonché vaccinazioni contro i maggiori patogeni di questa malattia.

Marker tassonomici e di virulenza di ceppi di *Burkholderia cepacia* associati alle infezioni respiratorie di pazienti con fibrosi cistica



GRAZIA GOLINI

Collaboratrice principale di Roberta Fontana, Responsabile del Progetto

Grazia Golini, Roberta Fontana

Sezione di Microbiologia, Dipartimento di Patologia Università di Verona / Servizio di Microbiologia Azienda Ospedaliera di Verona. Prog. # 4/2002

L'infezione da *Burkholderia cepacia* (B. c.) rappresenta uno degli eventi problematici per il paziente affetto da fibrosi cistica (FC) per le pesanti conseguenze in termini sia di morbilità sia di mortalità. La riduzione dell'incidenza di tali infezioni si è avuta quando, dimostrando la possibilità di infezioni crociate fra i pazienti di uno stesso centro, si sono adottate, di conseguenza, strette misure di controllo e di segregazione fra pazienti.

La precisa identificazione di B.c. è pertanto fondamentale per la corretta gestione del paziente FC. Nonostante siano stati messi a punto numerosi terreni e protocolli per la coltura e identificazione di questo microrganismo, nessuno garantisce la sua univoca identificazione ed altri batteri gram-negativi vengono frequentemente ed erroneamente identificati come B.c. Recentemente tecniche di analisi molecolare sono state applicate alla tassonomia di B.c. portando all'identificazione di di-

stinti genomovar (termine coniato per contraddistinguere ceppi fenotipicamente simili ma genotipicamente distinti) e nuove specie.

Obiettivo del progetto è stato l'applicazione delle tecniche di biologia molecolare allo studio dell'epidemiologia dei diversi genomovar e/o specie di *B.cepacia* complex nei pazienti FC del Centro di Verona e della correlazione tra genomovar e maggiore patogenicità e trasmissibilità dell'infezione.

163 ceppi isolati da 82 pazienti e identificati come B.c. mediante prove biochimiche sono stati riidentificati mediante analisi dei profili di restrizione del gene dell'rRNA 16S generati dall'enzima *Ddel* e del gene *recA* generati dagli enzimi *HaeIII* e *MnII*

Un'elevata percentuale (26%) di ceppi biochimicamente identificati in precedenza come B.c. non sono stati confermati come tali dall'indagine genetica, suggerendo la necessità di estendere quest'ultimo tipo di indagine a tutti i batteri gram-negativi non fermentanti isolati da pazienti FC. I nostri risultati indicano che le maggiori incongruenze si sono riscontrate per *A.xilosoxidans*, *S. maltophilia* e *B. gladioli*. Inoltre, l'analisi dei RFLP del gene *recA* dei 121 ceppi geneticamente confermati come appartenenti a B.c. complex ha permesso la seguente suddivisione: genomovar I 8.3%, genomovar II 5.8%, genomovar III-A 37.2%, genomovar III-B 47.10% e genomovar V 1.6%. Nessun ceppo possedeva il marker di virulenza *cblA*, associato alla produzione del pilo cavo, mentre il 37.9% possedeva il marker BCESM riscontrato in ceppi virulenti epidemici.

I genomovar III-A e III-B si sono confermati come i più diffusi nella popolazione FC afferente al Centro di Verona, risultato in linea con l'andamento epidemiologico di altri centri nazionali ed internazionali. Il nostro studio ha anche confermato l'elevato grado di resistenza agli antibiotici dei ceppi appartenenti al genomovar III, caratteristica questa associabile alla maggiore gravità delle infezioni da questi causate.

Sviluppo di un test diagnostico per la discriminazione di specie e genomovars di *Burkholderia cepacia* complex nella routine clinica



RENATO FANI
Coordinatore del Progetto multicentrico

Renato Fani¹, Graziana Manno³, Giovanni Taccetti⁴, Silvia Tabacchioni²

¹Dipartimento di Biologia Animale e Genetica, Via Romana 17-19, 50125 Firenze

²ENEA Casaccia, BIOTEC-GEN, Via Anguillarese 301, S. Maria di Galeria, 00060 Roma

³Lab. di Ricerca Diagnostica Infettivologica, Istituto G. Gaslini, L.go G. Gaslini 5, 16147, Genova

⁴ Divisione di Pediatria, Malattie infettive, Fibrosi Cistica, Ospedale Pediatrico Anna Meyer, via L. Giordano 13, 50132, Firenze Prog. # 9/2003

Il *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) comprende batteri patogeni opportunisti estremamente importanti nella fibrosi cistica (FC), responsabili in alcuni casi della condizione clinica conosciuta come "cepacia syndrome" che determina un drastico peggioramento del quadro clinico del paziente. I diversi componenti del complex mostrano un differente grado di patogenicità e sono spesso di difficile trattamento terapeutico a causa dell'elevata trasmissibilità e delle numerose resistenze agli antibiotici di alcuni ceppi. Inoltre, il Bcc è ampiamente diffuso nel suolo e nella rizofera, suggerendo l'ipotesi che l'ambiente naturale possa costituire una riserva di ceppi potenzialmente patogeni.

Il *B. cepacia* complex è costituito da nove

diverse specie genomiche, o genomovars, otto delle quali recentemente hanno acquisito lo status di specie vera e propria (*B. multivorans*, *B. cenocepacia*, *B. stabilis*, *B. vietnamiensis*, *B. dolosa*, *B. ambifaria*, *B. anthina* e *B. pyrrocinia*). La complessità ed il continuo sviluppo della tassonomia del complex rendono particolarmente difficoltosa ed elaborata l'identificazione dei batteri che vi appartengono. Pertanto, per contrastare un'infezione dovuta a ceppi appartenenti al Bcc è di fondamentale importanza possedere gli strumenti per effettuare una diagnosi corretta e veloce che consenta di identificare il batterio responsabile dell'infezione in atto.

Attualmente gli isolati del Bcc possono essere identificati usando tecniche basate sull'analisi del polimorfismo del gene *recA*, quali RFLP o PCR-specie specifiche, sebbene non sia insolito avere dei risultati di difficile lettura e non esenti da errori.

Lo scopo del progetto è quello di mettere a punto un nuovo sistema d'identificazione basato sull'analisi SNP (Single Nucleotide Polymorphism) che permetta di discriminare le diverse specie del complex e che possa essere facilmente utilizzato in ambito ospedaliero. Dato il non ancora chiarito ruolo della frazione ambientale, sono stati presi in esame ceppi di diversa provenienza. In particolare, la nostra attenzione si è focalizzata sulla specie *B. cenocepacia* che, oltre ad essere ampiamente diffusa sia tra i pazienti FC che nell'ambiente naturale, comprende anche i ceppi più virulenti e trasmissibili. *B. cenocepacia* presenta una notevole complessità tassonomica, essendo suddiviso, sulla base del polimorfismo di *recA*, in quattro linee filogenetiche che presentano una diversa distribuzione in ambiente clinico e naturale.

La strategia sperimentale prevede una prima fase in cui tramite un'attenta analisi comparativa delle sequenze nucleotidiche del gene *recA* di ceppi appartenenti al complex registrate in banca dati devono

essere ricercate delle "mutazioni puntiformi" che caratterizzino in modo univoco una specie dall'altra. Sulla base delle informazioni raccolte in banca dati, integrate dai primi risultati ottenuti dai nostri risultati ottenuti dal sequenziamento del gene *recA* su un panel di ceppi di diverse specie e diversa origine, è stato disegnato un primo set di primers che consentirebbe di identificare le diverse linee filogenetiche del *B. cenocepacia*.

Attualmente abbiamo a disposizione alcuni dati sperimentali che ci hanno permesso di accertare la potenzialità del sistema e di valutare in modo più appropriato quelle che saranno le successive tappe del lavoro.

Rilevanza del sistema di regolazione "quorum sensing" nell'infezione polmonare da *Burkholderia cepacia* e suo possibile trattamento



VITTORIO VENTURI
Responsabile del Progetto

Vittorio Venturi

Bacteriology Group, International Centre for Genetic Engineering & Biotechnology, Area Science Park, Padriciano 99, 34012 Trieste. Prog. # 10/2003.

I ceppi appartenenti al complesso *Burkholderia cepacia* sono stati descritti inizialmente come patogeni della piante, ma ultimamente questo batterio è stato individuato anche nell'albero respiratorio di pazienti affetti da fibrosi cistica (Middleton et al., 2002) ed esso è stato riconosciuto come patogeno opportunisto umano. Una sua infezione, insieme a quelle

dovute ad altri microrganismi, come ad es. *Pseudomonas aeruginosa*, risulta spesso dannoso per persone immunodepresse o debilitate da particolari patologie, come per esempio la fibrosi cistica. Il nostro laboratorio è interessato allo studio del sistema "quorum sensing" in *Burkholderia cepacia*.

Il sistema quorum sensing è un meccanismo di regolazione globale dipendente dalla densità cellulare, esso regola infatti il comportamento dei batteri quando essi sono molto numerosi. Il quorum sensing in batteri gram negativi si basa generalmente su molecole segnale (chiamate anche autoinduttori), appartenenti alla famiglia dei lattoni omoserinici (HSL), che vengono sintetizzate da una proteina sintetasi. Le molecole di lattone diffondono liberamente attraverso la membrana batterica e all'aumentare della popolazione di microrganismi aumenta anche la loro concentrazione. Quando questa raggiunge un certo livello le molecole omoseriniche si combinano con una proteina regolatrice (recettore del segnale) e questo nuovo complesso attiva o reprime l'espressione di geni sottoposti a regolazione da parte del quorum sensing. Quindi, questo modello di regolazione si spiega attraverso i complessi fra autoinduttore e recettore che si formano solamente quando le concentrazioni intracellulari di autoinduttore raggiungono un certo livello, illustrando l'importanza di raggiungere un 'quorum' di batteri. I batteri patogeni per animali e piante si pensa che formino microcolonie, per esempio un biofilm, all'interno dell'ospite e qui si potrebbero raggiungere le elevate densità cellulari necessarie a innescare il meccanismo di regolazione.

In diversi batteri i geni controllati dal quorum sensing risultano essere quelli coinvolti nella produzione di biofilm, nella produzione di antibiotici, nella motilità cellulare, nella capacità di trasferire materiale genetico da una cellula all'altra, e nella produzione dei fattori di virulenza che rendono questi batteri aggressivi e

nocivi per l'uomo. Per quel che riguarda *Burkholderia cepacia* in particolare, e' stato dimostrato sperimentalmente il coinvolgimento del sistema quorum sensing nella produzione di biofilm e nella motilita' cellulare (Huber et al., 2001). Il nostro lavoro ha portato fino ad ora all'individuazione in *B. cepacia* del sistema di quorum sensing (Aguilar et al., 2003). Inoltre abbiamo messo a punto un sistema che ha reso possibile individuare i geni sottoposti al controllo da parte del quorum sensing (Aguilar et al., 2003b). Prossimi obiettivi del progetto riguardano l'individuazione degli altri geni sottoposti a regolazione da parte del quorum sensing, la caratterizzazione di quelli gia' individuati, e lo studio di un'eventuale integrazione del sistema con altri meccanismi di regolazione globale. Interferire con il sistema di regolazione basato sul quorum sensing costituirebbe un sistema probabilmente molto efficace e nuovo per "controllare" le popolazioni batteriche rendendole innocue.

Geni per l'alginato in *Pseudomonas aeruginosa*: regolazione e mutazioni nelle infezioni croniche respiratorie.



ALESSANDRA BRAGONZI
Responsabile del Progetto

Alessandra Bragonzi

Institute for General and Environmental Hygiene, Tübingen, Germany e Institute for Experimental Treatment of Cystic Fibrosis, Milano, Italy Prog. # 8/2003

Il difetto genetico della Fibrosi Cistica (FC) e' la causa primaria di anormali secrezioni viscosse caratterizzate da locale assenza di ossigeno nelle vie aeree. Questa condizio-

ne predispone la grande maggioranza dei pazienti FC ad infezioni dell'epitelio respiratorio causate da patogeni opportunisti tra cui *Pseudomonas aeruginosa*. Il batterio, inizialmente acquisito dall'ambiente e caratterizzato da un fenotipo non-mucoide, si adatta alle condizioni di stress imposte dall'epitelio respiratorio cambiando il fenotipo in mucoide ed acquisendo mutazioni in geni (*mucABD*) coinvolti nella regolazione dell'alginato. L'alginato e' il principale componente della capsula batterica di ceppi mucoidi e protegge la cellula dalle difese immunitarie del paziente e da trattamenti antibiotici, impedendone l'eradicazione. I dettagli di questa risposta microbiologica in relazione alle condizioni di stress imposte dall'epitelio respiratorio sono sconosciuti ed estremamente difficili da studiare nei pazienti FC. I microrganismi presenti nei campioni biologici e ricresciuti in laboratorio (*in vitro*), spesso perdono le caratteristiche che avevano nel polmone (*in vivo*) e quindi non ne riflettono la situazione reale.

Abbiamo recentemente messo a punto un modello animale murino per investigare in dettaglio la cinetica della conversione di *P. aeruginosa* da non-mucoide a mucoide durante la progressione della malattia FC da una fase acuta ad una cronica. In questo modello *P. aeruginosa* viene inclusa in sfere di agar e veicolata nel polmone murino tramite iniezione intratracheale. Abbiamo dimostrato che le sfere di agar riflettono la situazione del muco FC e sono caratterizzate da parziale assenza di ossigeno (anaerobiosi), costituendo un buon modello per lo studio seguente. *P. aeruginosa* sottoposta a stress anaerobico nel polmone murino, cresce formando macro-colonie ed attiva la regolazione genica inducendo espressione di alginato. Il processo di regolazione genica e' rapido ed attivato entro 24 ore *in vivo*, come rilevato con specifici anticorpi contro l'alginato, ma non detectabile quando *P. aeruginosa* e' riscreciuta *in vitro*.

Dal punto di vista clinico questi risultati implicano che ceppi mucoidi di *P. aerugi-*

nosa potrebbero essere presenti nell'epitelio respiratorio dei pazienti dopo pochi giorni dalla colonizzazione ma non sono identificabili con test microbiologici di routine. La sopravvivenza delle cellule batteriche, assicurata da questo processo di regolazione genica, e' mantenuta per due settimane fino a quando l'acquisizione di mutazioni determina un fenotipo stabile e diventa rilevabile anche *in vitro*. Il fenotipo mucoide di *P. aeruginosa* è stato fino ad ora attribuito a mutazioni in geni *mucABD*. Analisi di sequenza di ceppi mucoidi murini e di pazienti FC, collezionati in una fase iniziale dell'infezione, ha rivelato che questo fenotipo e' selezionato *in vivo* indipendentemente da mutazioni in *mucABD*. Mutazioni nel gene *mucA* vengono acquisite in una fase tardiva della malattia ma comunque non sono completamente associate al fenotipo mucoide.

Questi dati indicano che altri geni, ad oggi sconosciuti, intervengono nella regolazione genica dell'alginato. Ulteriori studi ci permetteranno di identificare questi nuovi geni e determinare nuovi processi coinvolti nell'infezione cronica da *P. aeruginosa* in FC.

Un nuovo programma informatico a supporto del Registro Italiano Fibrosi Cistica



ANNA BOSSI
Responsabile del Progetto

A. Bossi¹, I. Cortinovis¹, S. Milani¹, R. Padoan², L. Viviani¹

1) Istituto di Statistica Medica e Biometria, Università degli Studi di Milano

2) CRR AO Istituti Clinici di Perfezionamento, Milano. Prog. # 12/2003

Introduzione: Il Registro Italiano per la Fibrosi Cistica si è rivelato essere un utile strumento per studiare la storia naturale della malattia e per valutare sia l'efficacia di programmi di diagnosi precoce, sia l'effetto di nuove terapie. Il personale medico e paramedico dei Centri Fibrosi Cistica (FC) non può però accedere direttamente ai dati del Registro per ottenere una risposta a quesiti di natura clinica od epidemiologica di suo interesse.

Scopo del progetto: Per questo si è pensato di realizzare un software che fornisca a ciascun Centro FC (o Servizio di Supporto) la possibilità di disporre direttamente delle elaborazioni solitamente richieste ai ricercatori dell'Istituto di Statistica Medica e Biometria dell'Università degli Studi di Milano (che dal 1988 gestiscono il Registro). Tale software sarà distribuito a mezzo Compact Disk (CD).

Descrizione del programma: Tramite un menù iniziale sarà possibile richiedere elaborazioni e descrizioni delle variabili archiviate, e stabilire se riportare i risultati sotto forma di tabella o grafico. Compatibilmente con la natura delle variabili, saranno fornite anche alcune misure di sintesi delle variabili selezionate (media, mediana, deviazione standard, coefficiente di correlazione, ecc.), e brevi commenti a quanto ottenuto. A scopo esemplificativo, si supponga di voler conoscere l'andamento negli anni dell'età alla diagnosi; sarà possibile selezionare le variabili "età alla diagnosi" e "anno della diagnosi" e scegliere, per ciascuna, il raggruppamento dei valori in classi.

Il software fornirà un file con il risultato dell'analisi richiesta, che potrà essere stampato sotto forma di grafico o tabella, in base alla richiesta dell'utente. Le elaborazioni saranno disponibili aggregate a livello nazionale o regionale, ma ogni operatore potrà disporre anche delle elaborazioni aggregate a livello del proprio Centro FC. In seguito all'aggiornamento annuale del Registro, sarà possibile inviare a ciascun Centro il CD contenente le elaborazioni aggiornate.

LE LINEE DI RICERCA PROMOSSE E FINANZIATE DALLA FONDAZIONE

LINEE DI RICERCA	PROGETTI FINANZIATI NEL 2002	PROGETTI FINANZIATI NEL 2003	Necessità per Progetti 2004
1. Conoscere i geni coalizzati con o contrastanti quello della fibrosi cistica (geni modificatori): per spiegare i diversi modi di manifestarsi della malattia e per curarla eventualmente attraverso questi geni.		- I geni modificatori: studio multicentrico basato su analisi di famiglie e tecniche genetiche innovative (Prof. G. Novelli, Roma, Verona, Napoli: - € 30.000)	€ 150.000
2. Eradicare i batteri che aggrediscono i polmoni: conoscere quali sono, come sono fatti, si trasmettono, agiscono nell'infezione e come interferisce sulla loro sopravvivenza e sulla loro trasmissione nonché sulla prevenzione dell'infezione polmonare.	- Burkholderia cepacia: batterio emergente, riconoscerlo per trattarlo efficacemente (Prof. R. Fontana, Verona: - € 18.000)	- Pseudomonas aeruginosa. (Dr.ssa A. Bragonzi, Milano, Tubingen: - € 45.000). - Test diagnostico rapido per identificare le varianti di B.cepacia. (Dr R.Fani, Firenze, Genova, Roma: - € 30.000) - Il sistema di regolazione di B.cepacia nell'infezione polmonare CF. (Dr V. Venturi, Trieste: - € 30.000)	€ 300.000
3. Contrastare l'infiammazione dei polmoni: conoscere i complicati processi che infiammano il polmone, determinandone la progressiva distruzione, per individuare cure adeguate per controllarli.	- Aziticomicina: un antibiotico con effetti molteplici, da conoscere, potenzialmente prezioso per la cura della malattia polmonare CF (Dott. P. Melotti, Verona: € 211.000)	- Proteomica dei fluidi del tratto respiratorio. (Dr.ssa O.Zegarra, Genova, Siena, Torino: € 55.000) - Possibile effetto dell'acido folico sulla stabilità di membrana di cellule respiratorie, sull'infiammazione e sulla funzione CFTR (Prof. L.M. Bambara, Verona: studio pilota, finanziamento fuori concorso: € 8.000)	€ 350.000
4. Sviluppare nuovi farmaci e nuove strategie che colpiscano il difetto di base della malattia: per giungere a cure risolutive prima dello sviluppo di complicanze senza ritorno o per attenuare comunque il decorso della malattia.		- Screening di tutti i farmaci già approvati per identificare quelli eventualmente curativi del difetto di base CF (Dr L. Galietta, Genova, Milano: - € 60.000) - Studio farmacologico di sostanze attrattive del trasporto ionico: Dr. O. Moran, Genova, Palermo: € 60.000)	€ 350.000
5. Dare impulso a studi di trasferimento del gene CFTR normale: per curare alla radice le cellule CF incapaci di produrre la proteina CFTR normale.	- Minicromosomi: nuovi vettori artificiali per la terapia genica della fibrosi cistica (Prof. F. Ascension, Roma, Genova, Milano: € 131.000) - Lentivirus: nuovo vettore virale per la terapia genica della fibrosi cistica (Dott. M. Conese, Milano: € 132.000)		€ 200.000
6. Sviluppare nuovi metodi per identificare agevolmente tutte le mutazioni e le varianti del gene CFTR: per diagnosticare correttamente anche le forme minori o atipiche e per supportare adeguatamente la consulenza genetica alle famiglie.		- Lo stato di portatore predetto tramite la variante M470V del gene CFTR. (Prof. PF. Pignatti, Verona, Roma: € 20.000). - Errori nel passaggio da DNA a mRNA (pre-mRNA splicing). (Dr. F. Pagani, Trieste: € 40.000)	€ 150.000
7. La proteina CFTR: difettosa o mancante, come funziona e non funziona, come viene regolata, come ne soffrono gli organi colpiti.		- Regolazione della proteina CFTR (interazione con altre proteine). (Dr.ssa V. Casavola, Bari, Padova: € 50.000) - Patogenesi e trattamento della malattia epatica in CF. (Dr. M. Strazzabosco, Padova, Bergamo: € 60.000)	€ 400.000
8. Epidemiologia della fibrosi cistica: conoscere l'evoluzione della malattia e l'effetto delle cure su larga popolazione di malati.		- Un programma informatico per gestire il Registro Nazionale Fibrosi Cistica (Dr.ssa A. Bossi, Milano: € 20.000)	€ 100.000
	FINANZIAMENTO IMPEGNATO NEL 2002: € 492.000	FINANZIAMENTO IMPEGNATO NEL 2003: € 508.000	FINANZIAMENTO INECCESSARIO NEL 2004: € 2.000.000

fondazione per la ricerca sulla fibrosi cistica - onlus

Sede: Ospedale Maggiore - Piazzale Stefani, 1 - 37126 Verona

Tel. 045 8073604 - Fax 045 8073568

www.fibrosicisticaricerca.it

e-mail: fondazione.ricercafc@azosp.vr.it