

IX CONVENTION D'AUTUNNO DEI RICERCATORI IN FIBROSI CISTICA

Convention of Investigators in Cystic Fibrosis

Verona, 1-3 Dicembre 2011



*fondazione per la ricerca
sulla fibrosi cistica - onlus
Italian Cystic Fibrosis Research Foundation*

In copertina illustrazione
di Giancarlo Zucconelli (ZUC)
per il libretto informativo
“Fibrosi cistica, parliamone insieme.
L’età adulta”

*In the cover illustrations by
Giancarlo Zucconelli (ZUC)
for the booklet
“Cystic Fibrosis: let’s talk together.
The adult age”*

Illustration 1
Will they get there in time for me?!
Illustration 2
Eventually at last it will reach the goal

IX Italian Convention of Investigators in Cystic Fibrosis

IX Convention d'Autunno dei Ricercatori in Fibrosi Cistica

Verona, 1-3 dicembre 2011

Centro Medico Culturale "G. Marani", Ospedale Maggiore, Verona

Work progress of projects funded by FFC 2009-2011

Presentazione dello stato di avanzamento
dei progetti finanziati dalla Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica
2009-2011

New Therapy

•

Airway Infection

•

Airway Inflammation

•

Population screening



*fondazione per la ricerca
sulla fibrosi cistica - onlus*

Italian Cystic Fibrosis Research Foundation

Index • Indice

Bertoni G		
An outline of the Convention		7

□ ABSTRACTS		9
--------------------	--	---

PLENARY SESSIONS		9
-------------------------	--	---

Thursday December 1 - Afternoon

PLENARY SESSION 1:		
<i>CF Microbiology: towards new strategies for respiratory infection therapy</i> (part 1)		
Chairman: Gerd Döring		9
Antonio Molinaro: introductory overview		
1. Gennaro R, Di Bonaventura G, Fiscarelli E		9
Novel strategies for respiratory infection therapy in CF. Use of natural and designed antibacterial peptides (FFC Project#12/2009, concluded)		
2. Landini P, Seneci P, Bernardi A, Cutruzzolà F		10
Prevention of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> biofilm formation by inhibition of cyclic-di-GMP (c-di-GMP) metabolism (FFC Project#13/2009, concluded)		
3. Mancuso G, Andrenacci D		11
Exploring thermostable quorum quenching lactonases to counteract bacterial infections in cystic fibrosis (FFC Project#10/2010, in progress)		
4. Pini A		12
In vivo characterization of a novel branched antimicrobial peptide specific for Gram-negative bacteria. Efficacy in <i>P. aeruginosa</i> lung infection and pharmacological profile (FFC Project#14/2009, concluded)		
5. Molinaro A, Bernardini ML, Döring G		12
Development of new therapeutic approaches against microbial infection in cystic fibrosis patients: biochemical analysis of cell wall fragments (FFC Project#11/2010, in progress)		
6. Riccardi G		13
The role of RND transporters in <i>Burkholderia cenocepacia</i> life by microarray analysis (FFC Project#15/2009, concluded)		
7. Silipo A, De Soya A		14
In vitro and in vivo studies of novel antimicrobials targeting bacterial cytoskeleton and cell surface virulence markers in the treatment of <i>Burkholderia cepacia</i> complex infection (FFC Project#16/2009, concluded)		
PLENARY SESSION 2: Clinical Research		
Chairman: Roberto Buzzetti		16
Teresa Repetto: introductory overview		
8. Guarino A, Braggion C, Pardo F, Morelli L		16
Modulation of intestinal and extraintestinal inflammation in infants with cystic fibrosis by early modification of intestinal microflora (FFC Project #23/2009, concluded)		
9. Campana S		17
Impact on clinical status of cystic fibrosis patients of persistent lung infections with community acquired methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (CA-MRSA) and hospital acquired methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (HA-MRSA): a multicenter longitudinal study (FFC Project #11/2009, concluded)		
10. Repetto T		18
The cystic fibrosis newborn screening in Italy. Survey for assessment of technical-scientific, organizational and psycho-relational issues (FFC Project#23/2010, concluded)		
11. Morana G		18
DWI (Diffusion weighted Imaging) a new tool to assess inflammation in CF population with pulmonary exacerbation (FFC Project# 25/2011, new)		
12. Sorio C, Buffelli MR		19
Testing human monocytes as a new tool for clinical and preclinical research in CF (FFC Project #26/2011, new)		

Friday December 2 - Morning

PLENARY SESSION 3: Airway inflammation: new pathways

Chairman: Giorgio Berton	21
Giulio Cabrini: introductory overview	
13. Cabrini G, Pucci P	21
Mapping IL-8 gene transcription machinery in bronchial epithelial cells (FFC Project#18/2009, concluded)	
14. De Rose V, Hirsch E, Döring G	22
Genetic and pharmacological validation of PI3K γ as a drug-target for the treatment of airway inflammation in CF (FFC Project#20/2009, concluded)	
15. Chanson M, Dehecchi MC	23
Role of CFTR-Connexin interaction on PGE2 signaling and inflammation: implication for cystic fibrosis (FFC Project#19/2009, concluded)	
16. Del Porto P, Ascenzioni F, Quattrucci S	23
Mechanisms of bactericidal activity of human macrophages and the influence of CFTR mutations (FFC Project#21/2009, concluded)	
17. Romano M, Evangelista V, Collura M	24
Platelet-leukocyte interactions in cystic fibrosis inflammation: a window for therapeutical opportunities (FFC Project#22/2010, in progress)	

Friday December 2 - Afternoon

PLENARY SESSION 4: Correcting the CF basic defect

Chairman: Antonio Cao	26
Luis Galietta: introductory overview	
18. Galietta L, Millo E, Mazzei M	26
Development of small molecules to correct the defective chloride transport in cystic fibrosis (FFC Project#2/2009, concluded)	
19. Luini A, Monti M	27
Manipulating the endoplasmic reticulum export machinery allows DF508-CFTR trafficking to the plasma membrane: a new set of potential drug targets for cystic fibrosis (FFC Project#4/2010, concluded)	
20. Borgatti M, Altamura N, Baasov T	28
Novel cellular model system and therapeutic molecules for the development of a read-through approach for CF caused by stop codon mutations of the CFTR gene (FFC Project# 2/2010, concluded)	
21. Pagani F	29
Molecular pathology of the pre-mRNA splicing machinery in cystic fibrosis: mechanistic aspects and therapeutic approaches (FFC Project#9/2009, concluded)	
22. Sorio C, Melotti P, Buffelli MR	29
Functional evaluation of CFTR in blood leukocytes in human subjects as a new tool for diagnostic and clinical research applications (FFC Project #5/2009, concluded)	
23. Melotti P, Sorio C	30
Novel biomarkers for evaluation of efficacy of new therapies in cystic fibrosis (FFC Project #6/2010, in progress)	
24. Loi R	31
An induced pluripotent stem cell (iPS)-based approach for the repopulation and phenotypic correction of cystic fibrosis airway epithelium (FFC Project#3/2010, in progress)	

PLENARY SESSION 5:

CF Microbiology: towards new strategies for respiratory infection therapy (part 2)

Chairman: Gerd Döring	32
Alessandra Polissi: introductory overview	
25. Bragonzi A, Bertoni G	32
Validation of novel vaccine candidates of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (FFC Project#10/2009, concluded)	
26. Polissi A, Bolognesi M, Dehò G, Peri F, De Castro C, De Gioia L	32
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> lipopolysaccharide cell surface transport is a target process for developing new antimicrobials (FFC project #13/2010, in progress)	
27. Visca P, Leoni L	33
Non-conventional strategies against <i>Pseudomonas aeruginosa</i> infection: interference with iron homeostasis and quorum sensing (FFC Project #14/2010, in progress)	

28. Cirillo DM, Bragonzi A, Kahl B	34
Pathogenicity of <i>Staphylococcus aureus</i> and its role in the progression of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> chronic lung infection (FFC Project#9/2010, <i>in progress</i>)	
29. Pinton P	35
Calcium signal and PKC as targets of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> infection (FFC Project#12/2010, <i>in progress</i>)	

SPECIAL SESSION: *FFC Core Facilities*

<i>Chairman: Gianni Mastella</i>	37
30. Galietta L	37
Primary epithelial cell cultures	
31. Bragonzi A	37
CFaCore (Cystic Fibrosis animal Core Facility)	
32. Cabrini G, Nicolis E	38
QuantiGENE (Quantification of gene expression)	

Saturday December 3 – Morning

PLenary Session 6: *CFTR and ENaC Function / Dysfunction*

<i>Chairman: Antonio Cao</i>	39
Valeria Casavola: introductory overview	
33. Casavola V, Conese M	39
Interactome in Cystic Fibrosis: role of NHERF1 in actin cytoskeleton and tight Junction pathophysiology (FFC Project #1/2009, concluded)	
34. Mazzei M, Fossa P, Turco MC	40
The search of HSP70/HSC70 complex inhibitors useful to correct the ΔF508-CFTR (FFC Project#5/2010, <i>in progress</i>)	
35. Moran O	41
Structural features of the intracellular domains of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (FFC Project #7/2010, <i>in progress</i>)	
36. Tamanini A, Reshkin S	41
Decrease apical infection of CFTR by <i>Pseudomonas aeruginosa</i> infection: role of NHERF1 phosphorylation (FFC Project #8/2010, concluded)	
37. Bombieri C, Seia M, Lucarelli M	42
Molecular and functional study of the epithelial Na ⁺ channel (ENaC) in CF and CF-like disease (FFC Project #1/2010, concluded)	
38. Zegarra O	43
Strategies for the suppression of Na ⁺ and fluid hyperabsorption in cystic fibrosis airway disease (FFC Project #7/2009, concluded)	

PLenary Session 7: *Airway inflammation: new therapeutical perspectives*

<i>Chairman: Giorgio Berton</i>	45
Andrea Battistoni: introductory overview	
39. Battistoni A	45
Evaluation of the usefulness of therapeutic approaches aiming at increasing glutathione levels in the airways of Cystic Fibrosis patients to control lung infections and bacterial-induced damage (FFC Project #15/2010, <i>in progress</i>)	
40. Dehecchi MC, Gambari R	46
Modulation of sphingolipid metabolism as a strategy for the treatment of CF lung inflammation (FFC Project #16/2010, <i>in progress</i>)	
41. Gambari R, Dall'Acqua F	46
Molecular characterization of trimethylangelicin (TMA) and structurally-related compounds in CF lung disease: anti inflammatory effects and potentiation of the CFTR biological activity (FFC Project #17/2010, <i>in progress</i>)	
42. Garlanda C, Bragonzi A	47
Infections in cystic fibrosis: role of the long pentraxin PTX3 in host resistance and as therapeutic agent (FFC Project #18/2010, <i>in progress</i>)	
43. Montuschi P, Lucidi V, Motta A	48
Metabolomic analysis by nuclear magnetic resonance spectroscopy as a new approach to understanding inflammation and monitoring of pharmacological therapy in children and young adults with cystic fibrosis (FFC Project#19/2010, <i>in progress</i>)	

44. Naggi A, Shute J, Yates EA	49
Identification of agents with multiple favourable activities as potential treatments for cystic fibrosis (FFC Project#20/2010, <i>in progress</i>)	
45. Romani L	50
Th17 responses in Cystic fibrosis: paving the way for novel anti-inflammatory strategies and immunogenetic screening (FFC Project#21/2010, <i>in progress</i>)	

POSTER SESSIONS - Projects 2011 51

Abstracts of the in-progress projects, also presented in the Poster Sessions, are included in the Plenary Sessions

Thursday December 1 - Afternoon

POSTER SESSION 1: Inflammation	
<i>Chairman: Maria Cristina Dechechi</i>	51
46. Aiello M, Sala A, Clini C, Pisi G	51
Docosahexaenoic acid-derived anti-inflammatory mediators in exhaled breath condensate and sputum of adults with cystic fibrosis (FFC Project #17/2011, <i>new</i>)	
47. Bernardini ML, Molinaro A, Garlanda C, Abdelmounaaim A	52
Inflammasome activation and IL-1 β mediated inflammation triggered by <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : a rationale for novel therapeutic approaches in cystic fibrosis patients (FFC Project #18/2011, <i>new</i>)	
48. Cabrini G, Pinton P	53
Phospholipase C beta (PLCB) as candidate therapeutic target in CF lung proinflammatory signaling (FFC Project #19/2011, <i>new</i>)	
49. Cigana C, Colombo C	54
Host response to <i>Pseudomonas aeruginosa</i> adaptation during airway chronic infection (FFC Project #20/2011, <i>new</i>)	
50. Evangelista V, Romano M	55
Phosphodiesterases type-4 (PDE4) as a novel target to reduce neutrophilic lung inflammation in cystic fibrosis (FFC Project #21/2011, <i>new</i>)	
51. Ghidoni R	55
Targeting ceramide metabolism as a pharmacological strategy in cystic fibrosis (FFC Project #22/2011, <i>new</i>)	
52. Quaglia F, Carnuccio R	56
Polyethylenimine-engineered respirable particles delivering a decoy oligonucleotide to NF-Kb: a novel combination therapy for cystic fibrosis? (FFC Project #23/2011, <i>new</i>)	

POSTER SESSION 2: CF Microbiology	
<i>Chairman: Alessandra Bragonzi</i>	57
53. Bragonzi A, Obrecht D	57
Pulmonary delivery of inhaled peptidomimetic as novel antibiotics to control <i>Pseudomonas aeruginosa</i> infection in murine models (FFC Project #10/2011, <i>new</i>)	
54. Cocuzza CE, Cariani L, Giacomini D	58
Design, synthesis, <i>in vitro</i> biological evaluation and anti-biofilm activity of new beta-lactam and linezolid-like compounds as potential antibacterial agents against <i>Staphylococcus aureus</i> infections in cystic fibrosis patients (FFC Project#11/2011, <i>new</i>)	
55. Fani R, Tutino ML, Rovero P	59
New drugs for <i>Burkholderia cepacia</i> from Antarctic bacteria (FFC Project#12/2011, <i>new</i>)	
56. Leoni L, Imperi F	59
Identification and characterization of novel drugs suppressing <i>Pseudomonas aeruginosa</i> virulence in chronic infection (FFC Project#13/2011, <i>new</i>)	
57. Mangoni ML, Shai Y	60
Development of new host-defence like peptides and lipopeptides against lung pathogens: <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> studies (FFC Project#14/2011, <i>new</i>)	
58. Pizzo E, Varcamonti M	61
Development, production and characterization of antibacterial peptides (CAMPs) active on the sessile form of the opportunistic human pathogens <i>Pseudomonas aeruginosa</i> and <i>Burkholderia cenocepacia</i> (FFC Project#15/2011, <i>new</i>)	
59. Quattrucci S, Trancassini M, Schippa S, Nicoletti M	62
Achromobacter xylosoxidans an emerging pathogen in cystic fibrosis patients: from molecular characterization to development of innovative therapeutic strategies based on the antibacterial activities of <i>Bdellovibrio predator</i> bacteria (FFC Project#16/2011, <i>new</i>)	

60. Pini A	63
Preclinical development of the antimicrobial peptide M33. Efficacy against <i>P. aeruginosa</i> lung infections and pharmacokinetic studies in animals (FFC Project#24/2011, new)	

Friday December 2 – Morning

POSTER SESSION 3: *Approaching therapies of the basic defect*

<i>Chairman: Alberto Luini</i>	64
61. Casavola V	64
Properties of trimethylangelicin in F508del CFTR rescue (FFC Project #1/2011, new)	
62. Di Leonardo A	64
PTC124 derivatives as a novel approach to improve the readthrough of premature stop codons in the CFTR gene (FFC Project #2/2011, new)	
63. Pinna LA	65
Subverted signalling by protein kinase CK2 in ΔF508 CFTR expressing cells. Functional aspects and prospects in therapy (FFC Project #3/2011, new)	
64. Reskkin S	66
Role of spatial cAMP/PKA compartmentalization and activity in regulating CFTR function (FFC Project #4/2011, new)	

POSTER SESSION 4: *Genetic and clinical research*

<i>Chairman: Carlo Castellani</i>	67
65. Corvol H, Cabrini G	67
European Cystic Fibrosis Modifier Gene Study (FFC Project #5/2011, new)	
66. Duga S	68
CFTR mRNA analysis as a key step to understand the role of CFTR gene mutations in cystic fibrosis disease expression (FFC Project #6/2011, new)	
67. Ferrari M, Cretich M	68
New strategies for clinical application of noninvasive prenatal diagnosis of cystic fibrosis based on the analysis of fetal mutated alleles in maternal plasma (FFC Project #7/2011, new)	
68. Castellani C, Picci L	69
A field study in an area of extensive carrier screening for cystic fibrosis (FFC Project #8/2011, new)	
69. Mosconi P, Castellani C	70
Cystic fibrosis: to screen or not to screen? Involving citizens' jury in decision on carrier screening (FFC Project #9/2011,new)	

Publications and congress communications

Pubblicazioni e comunicazioni congressuali	72
--	----

FFC publications and Impact Factor

Impact factor elaborato sulle pubblicazioni FFC dal 2002 al 2011	91
--	----

Institute and Laboratory Network

Rete di istituti e laboratori	92
-------------------------------	----

International reviewers FFC Projects

Referees internazionali per i progetti FFC	95
--	----

Adopted projects (2009-2011)

Progetti 2009-2011 adottati	97
-----------------------------	----

FFC Research Funding

Finanziamento della ricerca FFC	103
---------------------------------	-----

An outline of the Convention

Giorgio Berton

The IX Autumn Convention of the investigators supported by the Italian Research Foundation for Cystic Fibrosis (FFC) (Verona 1-3 December, 2011) will certainly represent an important opportunity to monitor the progress in the main area of research supported by FFC and let the CF community to know in some details new line of research that have been positively evaluated by the Scientific Committee this last summer.

Targeting lung pathogens: new therapeutic strategies

In the last few years FFC has encouraged studies to identify new therapeutic strategies to challenge lung infection. A few interesting achievements obtained include: i) the identification of different Antimicrobial Peptides (AMPs) able to kill lung pathogens *in vitro* (Gennaro R et al.; FFC Project #12/2009) and reduce *P. aeruginosa* infection *in the mouse in vivo* (Pini A; FFC Project #14/2009); ii) the identification of new potential drugs able to inhibit biofilm formation, an important determinant of antibiotic resistance developed by lung pathogens (Landini P et al.; FFC Project #13/2009. Manco G et al.; FFC Project #10/2010); iii) the highlighting of lung pathogen surface components or cytoskeletal proteins, that are critical for microbial survival and drug resistance, as new potential target of therapeutic strategies (Molinaro A et al.; FFC Project #11/2010. Riccardi G; FFC Project #15/2009. Silipo A et al. FFC Project #16/2009; Polissi A.; FFC project #13/2010). iv) the identification of several surface protein components of *P. aeruginosa* that are under test in murine models of *P. aeruginosa* infection as potential vaccines (Bragonzi A; FFC Project#10/2009).

Clinical research

Line of research more directly linked to the clinic, will give the opportunity to assess the progress done in the amelioration of CF patient pathologies. There are reasonable expectations to see the results of studies aimed: i) to characterize the intestinal microbiota of CF patients supplemented for one year or not with probiotics and to clarify whether induced changes in intestinal microbiota result in amelioration of intestinal and extra-intestinal inflammation (Guarino A et al.; FFC Project #23/2009); ii) to establish the role of *Staphylococcus* in CF patient chronic lung infections (Campana S; FFC Project #11/2009; Visca P.; FFC Project #14/2010), iii) to evaluate how newborn screening programs are performed in the italian newborn screening centers and the impact they have on early therapeutic strategies and genetic counseling (Repetto T; FFC Project #23/2010). In this area it will be also possible to evaluate the potential significance of new strategies for the follow-up of lung inflammation and the efficacy of new drugs to improve CFTR function, exploiting new non invasive procedures. These include the use of diffusion weighted imaging in evaluation of lung inflammation (Morana G; FFC Project #25/2011), metabolomic analysis of exhaled breath condensate by NMR spectroscopy (Montuschi P; FFC Project#19/2010) and the use of freshly isolated monocytes from the blood for testing CFTR function in CF patients treated with drugs targeting CFTR (Sorio C. et al. FFC Project #5/2009; Sorio C; FFC Project #26/2011).

Cystic Fibrosis as an inflammatory disease

Another issue that has attracted the interest of several research teams in the last few years is the elucidation of

mechanisms responsible for "excessive" inflammation in the airways of CF patients and the impact this response has on tissue damage and lung fibrosis. Within this topic, a few projects are addressing the identification of new therapeutic targets based on the rational that decreasing excessive inflammation should ameliorate lung functions. Data will be presented on molecular mechanisms regulating transcription of IL-8, the major chemokine implicated in neutrophil recruitment into the airways, (Cabrini et al.; FFC Project#18/2009; Pinton P; FFC Project#12/2010), and its regulation by trimethylangelicin and its analogues (Gambari R. et al.; FFC Project #17/2010) and modulation of the inflammatory response by drugs modulating sphingolipid metabolism (Dechechci C et al.; FFC Project #16/2010), reactive oxygen species (ROS)-mediated tissue damage (Battistoni A; FFC Project #15/2010) and DNase activity (Naggi A et al.; FFC Project#20/2010). Additionally, new insights on potential mechanisms regulating leukocyte recruitment into the airways and excessive inflammation should emerge from studies addressing the role of the gamma isoform of phosphatidylinositol 3-kinase, a key enzyme in signal transduction leading to cytoskeleton dynamics and cell migration, in regulating lung inflammation in a mouse model of CF (De Rose V et al.; FFC Project#20/2009), the role of CFTR in regulating interactions between leukocytes, endothelial cells and platelets (Romano M. et al.; FFC Project#22/2010) and the role of a possible imbalance between TH17 and Treg responses in the CF airways (Romani L; FFC Project#21/2010). In the context of the complex balance between host defences and tissue damage mediated by inflammatory cells other important issues which will be addressed will be the role of CFTR in regulating macrophage microbicidal activities (Del Porto, P; (FFC Project#21/2009) and the capability of the long pentraxin PTX3, a soluble component of the innate immunity repertoire, to increase host defences in a mouse model of *P. aeruginosa* infection (Garlanda C; FFC Project #18/2010).

Correcting the CF basic defect

Alterations in CFTR expression/localization/function are responsible for CF pathologies. Italian investigators supported by FFC gave important contributions to our understanding of CFTR domain interactions upon post-translational modifications of the protein or binding of drugs (Moran O et al.; FFC Project #7/2010), and of CFTR interaction with cytoskeletal and other cytoplasmic proteins that can regulate CFTR targeting and function (Casavola et al.; FFC Project #1/2009; Mazzei M. et al.; Project#5/2010; Tamanini et al.; FFC Project #8/2010). Strong expectations there are to see the progress in investigations aimed to correct the basic CF defect by correcting the trafficking and/or the gating defects caused by deltaF508 mutations (Galietta JLV et al.; Project#2/2009; Luini A et al.; FFC Project#4/2010), by restoring CFTR production when nonsense mutations cause premature termination codons and translation termination (Borgatti et al.; FFC Project# 2/2010) and by correcting splicing defect of the CFTR mRNA (Pagani F.; FFC Project#9/2009). Additionally, new potential strategies based on generation of induced pluripotent stem cells (iPS) from airway epithelial cells (Loi R.; FFC Project#3/2010) or modulation of sodium reabsorption by the ENaC sodium channel (Bombieri et al.; FFC Project #1/2010; Moran O.Z. et al.; FFC Project #7/2009) will be discussed.

Un profilo della Convention

La IX Convention d'Autunno dei ricercatori sostenuti dalla Fondazione per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica (Verona, 1-3 Dicembre 2011) offrirà l'opportunità di conoscere gli avanzamenti della ricerca che la Fondazione promuove e permetterà a tutta la comunità FC di essere informata in maniera approfondita sulle linee di ricerca valutate positivamente dal Comitato Scientifico la scorsa estate.

Colpire i microbi che causano la malattia polmonare FC: nuove strategie terapeutiche

Negli ultimi anni la Fondazione ha incoraggiato ricerche mirate all'identificazione di nuove strategie terapeutiche per contrastare l'infezione polmonare. Questi i risultati interessanti prodotti: i) l'identificazione di alcuni Peptidi Antimicrobici (AMPs) capaci in vitro di sopprimere i batteri patogeni polmonari (Gennaro R et al; Progetto FFC #12/2009) e ridurre in vivo nel topo l'infezione da *Pseudomonas aeruginosa* (Pini A et al; Progetto FFC #14/2009); ii) l'identificazione di nuove molecole candidate a diventare farmaci in grado di inibire la formazione del biofilm che i batteri acquisiscono per sviluppare resistenza agli antibiotici (Landini P et al; Progetto FFC #13/2009; Manco G et al; Progetto FFC #10/2010); iii) il riconoscimento come nuovi bersagli terapeutici di alcune componenti della superficie dei batteri patogeni, chiamate proteine del citoscheletro, essenziali per la loro sopravvivenza e resistenza agli antibiotici (Molinaro A et al; Progetto FFC #11/2010; Riccardi G; Progetto FFC #15/2009; Silipo A et al; Progetto FFC #16/2009; Polissi A; Progetto FFC #13/2010). iv) l'identificazione di numerose proteine di superficie di *Pseudomonas aeruginosa* che vengono utilizzate per lo studio di potenziali vaccini in modelli di topi con infezione da *Pseudomonas* (Bragonzi A; Progetto FFC #10/2009).

La Ricerca Clinica

Le linee di ricerca che sono più direttamente collegate alla clinica permettono di inquadrare i progressi avvenuti nel trattamento delle patologie del paziente FC. C'è la ragionevole aspettativa di vedere i risultati degli studi volti a: i) caratterizzare la microflora intestinale di pazienti FC ai quali per un anno sono stati somministrati preparati a base di probiotici e chiarire se i cambiamenti nella microflora intestinale migliorano lo stato d'infiammazione intestinale ed extraintestinale (Guarino et al; Progetto FFC # 23/2009); ii) stabilire il ruolo dello Stafilococco nell'infezione polmonare cronica FC (Campana S; Progetto FFC #11/2009; Visca P; Progetto FFC #14/2010), iii) valutare come sono condotti in Italia i programmi di screening neonatale e l'impatto che essi hanno sulle strategie terapeutiche e sulla consulenza genetica (Repetto T; Progetto FFC #23/2010). Sempre nell'ambito della ricerca clinica vi sono progetti che studiano nuove procedure non invasive per il monitoraggio dell'infiammazione polmonare; e per valutare l'efficacia dei nuovi farmaci diretti a migliorare il funzionamento della proteina CFTR. Tra queste nuove procedure rientra la DWI (Diffusion Weighted Imaging), una nuova tecnica diagnostica per immagini che non ricorre ai raggi X per valutare l'infiammazione polmonare (Morana G; Progetto FFC#25/2011); l'analisi dei metaboliti presenti nel condensato del respiro attraverso spettroscopia in Risonanza Magnetica Nucleare (Montuschi P; Progetto FFC #19/2010); e l'utilizzo di monociti isolati dal sangue per misurare il funzionamento della proteina CFTR nei pazienti FC trattati con farmaci che intervengono sulla proteina stessa (Sorio C. et al; Progetto FFC #5/2009; Sorio C; Progetto FFC #26/2011).

La Fibrosi Cistica come Malattia Infiammatoria

Un altro argomento che ha attratto l'interesse di parecchi gruppi di ricerca negli ultimi anni è il tentativo di conoscere i meccanismi responsabili dello stato di "eccessiva" infiammazione presente nei

polmoni FC e le conseguenze che essa provoca in termini di danno del tessuto polmonare e fibrosi. Su questo tema alcuni progetti sono rivolti all'identificazione di nuove terapie basate sul razionale che la diminuzione dell'eccessiva infiammazione porti a un miglioramento della funzionalità polmonare. Saranno presentati dati sulla IL-8 (Interleuchina-8), la più importante delle chemochine implicate nel reclutamento dei neutrofili nelle vie respiratorie, e sui meccanismi molecolari che ne regolano la trascrizione (Cabriani et al; Progetto FFC# 18/2009; Pinton P; Progetto FFC #12/2010). Tra questi la Trimetilangelicina e i suoi analoghi (Gambari R et al; Progetto FFC# 17/2010). Inoltre sempre nel campo degli interventi contro l'infiammazione, la possibilità di regolare la risposta infiammatoria attraverso farmaci che modulano il metabolismo degli sfingolipidi (Dechechci C et al; Progetto FFC# 16/2010). Ancora, nuove conoscenze sui meccanismi che regolano il reclutamento dei leucociti e l'eccessiva infiammazione possono emergere dallo studio del ruolo della proteina PI3K (fosfatidilinositol3-chinasina nell'isoforma gamma), un enzima chiave nei segnali di trasduzione che riguardano il citoscheletro della cellula e i processi di migrazione cellulare; questa proteina si è dimostrata attiva nel regolare l'infiammazione polmonare in un modello di topo FC (De Rose V et al; Progetto FFC #20/2009). Altre informazioni interessanti riguarderanno il ruolo della proteina CFTR nel regolare l'interazione fra leucociti, cellule endoteliali e piastrine (Romano M. et al; Progetto FFC# 22/2010); e l'importanza di un possibile sbilanciamento fra TH17 (una proteina infiammatoria) e la risposta Treg (linfociti regolatori dell'infiammazione) nelle vie aeree FC (Romani L; Progetto FFC #21/ 2010). Nel contesto del complesso equilibrio fra le difese dell'ospite e il danno tessutale mediato dalle cellule infiammatorie, sarà illustrata l'azione di CFTR nella regolazione delle attività microbicide dei macrofagi (Del Porto P; Progetto FFC #21/2009) e la capacità della Pentrassina lunga PTX3, una componente solubile dell'apparato dell'immunità innata, di aumentare le difese dell'ospite in un modello murino d'infezione da *Pseudomonas* (Garlanda C; Progetto FFC #18/2010).

La correzione del difetto di base FC

Le alterazioni nella espressione/localizzazione/funzione della proteina CFTR sono responsabili delle manifestazioni patologiche della fibrosi cistica. I ricercatori italiani sostenuti dalla FFC hanno dato importanti contributi alla comprensione delle interazioni che sono alla base delle modifiche post-translazionali di CFTR e del suo legame con possibili farmaci (Moran O et al; Progetto FFC #7/2010); come pure dell'interazione di CFTR con il citoscheletro e con altre proteine citoplasmatiche implicate nel suo funzionamento (Casavola et al; Progetto FFC# 1/2009; Mazzei M et al; Progetto FFC #5/2010; Tamanini et al; Progetto FFC #8/2010). Ci sono anche forti aspettative nei confronti delle ricerche condotte nel campo della correzione del difetto di base: gli studi sono rivolti in particolare alle alterazioni provocate dalla mutazione DF508 sul meccanismo di traffico intracellulare di CFTR e di apertura del canale che essa costituisce (Galietta JL et al; Progetto FFC #2/2009; Luini A et al; Progetto FFC #4/2010). Altre ricerche riguardano la possibilità di riavviare la produzione di CFTR quando è arrestata per effetto di mutazioni che introducono codoni di arresto prematuro della sintesi e blocco della translazione (Borgatti et al; Progetto FFC# 2/2010); oppure di correggere gli effetti delle mutazioni che agiscono alterando lo splicing del RNAm di CFTR (Pagani F; Progetto FFC #9/2009). Infine, avremo notizie anche su nuove strategie basate sulla possibilità di generare cellule staminali pluripotenti (iPS) da cellule dell'epitelio polmonare (Loi R; Progetto FFC #3/2010) e sulla regolazione del riassorbimento del sodio attraverso il canale ENaC (Bombieri et al; Progetto FFC #1/2010; Moran OZ et al; Progetto # 7/2009).

Questo profilo riguarda solo i progetti conclusi o in fase di sviluppo. Non riguarda invece quelli nuovi appena avviati, per i quali rinviamo agli abstracts delle Sessioni Poster, indicati con "new".

ABSTRACT

PLENARY SESSION 1

CF Microbiology: towards new strategies for respiratory infection therapy (part 1)

Chairman: Gerd Döring • Introductory overview: Antonio Molinaro

1. Novel strategies for respiratory infection therapy in CF. Use of natural and designed antibacterial peptides

Gennaro R¹, Di Bonaventura G², Fiscarelli E³

¹Dip. di Scienze della Vita, Univ. di Trieste, ²Dip. di Scienze Biomediche, Univ. di Chieti-Pescara, ³Lab. di Microbiologia della Fibrosi Cistica, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma (FFC Project#12/2009, concluded)



Da sinistra, Roberto Gennaro, Giovanni Di Bonaventura, Ersilia Fiscarelli

Background. Treatment of CF associated infections is exacerbated by the presence of MDR pathogens which, by forming biofilms, decrease the efficacy of antibiotics. Antimicrobial Peptides (AMPs) play an important role as endogenous antibiotics in animal host defence and tend not to select for resistant strains. Although their *in vitro* antimicrobial activity has been widely studied, there is scant data with respect to CF pathogens.

Objectives. To evaluate the *in vitro* and *in vivo* bactericidal and anti-biofilm activities of AMPs against CF isolates with the aim to define novel strategies for treatment of CF lung MDR infections.

Methods. BMAP-27 and BMAP-28, two animal peptides and P19(9/B), a rationally designed peptide, were synthesized and tested for antibacterial activity against planktonic and sessile forms of 25 *P. aeruginosa*, 27 *S. maltophilia*, and 15 *S. aureus* strains isolated from CF patients. MIC determination, killing kinetics assays and synergistic effects have been evaluated using both CLSI-recommended and "CF-like" conditions. BMAP-27 was comparatively assayed to Tobramycin in mice for its toxicity and for its *in vivo* activity in an experimental murine lung *P. aeruginosa* acute infection.

Main results. BMAP-27, BMAP-28, and P19(9/B) at μM showed a potent and rapid bactericidal activity on most *P. aeruginosa*, *S. maltophilia* and *S. aureus* CF isolates. Their antibacterial activity was overall comparable and, in some cas-

es, higher than that showed by Tobramycin. Contrary to the aminoglycoside antibiotics, AMPs activity did not decrease in "CF-like" conditions. In addition, all three peptides reduced both biofilm formation of all bacterial species tested and the growth of bacteria in preformed biofilms of *P. aeruginosa*, although less effectively than Tobramycin. BMAP-27, selected for preliminary *in vivo* assays, revealed to be rather toxic at 2-4 mg/kg when inoculated in mice via intratracheal. A pilot experiment using a mouse *P. aeruginosa* lung infection model indicated that any possible curative effect of BMAP-27 would be hidden by the concurrent toxic effects on the host.

Comments & Conclusions. This study shed new insights on the excellent *in vitro* antibacterial properties of these AMPs to cope with lung pathogens associated to CF. They may be useful as lead compounds for the development of novel antibiotics also able to counteract bacterial biofilm formation and eradicate preformed biofilms. The main concern is due to the acute toxicity exhibited *in vivo*, a problem that needs to be solved so as to apply these molecules in the future for early prophylactic and therapeutic treatment of CF lung disease.

Spin-off for research & clinical purposes. AMPs can be prepared in large quantities using recombinant methods. If correctly formulated to reduce clearance and toxicity they might be used in aerosol-type applications to clear pulmonary infections. They may also be useful to eradicate multi-drug-resistant pathogens from hospital equipment and/or reservoirs in hospital staff.

Nuove strategie per la terapia delle infezioni respiratorie in pazienti CF. Uso di peptidi antimicrobici naturali e progettati

Ragioni dello studio. Il trattamento delle infezioni polmonari associate alla fibrosi cistica è ostacolato dall'eccesso di muco e dalla presenza di batteri patogeni resistenti agli antibiotici, quali *P. aeruginosa*, *S. Aureus* e *S. maltophilia*. Tali microorganismi trovano un habitat ideale nei polmoni dei malati: proliferando, essi tendono a formare un biofilm, una pellicola difficilmente penetrabile che li difende dall'azione di antibiotici e altri farmaci. I Peptidi Antimicrobici sono molecole antibatteriche, prodotte naturalmente da molti organismi: possono attaccare anche batteri resistenti agli antibiotici e stimolano positivamente il sistema immunitario. Tali caratteristiche li rendono interessanti per lo sviluppo di nuove terapie antibatteriche.

Obiettivi. Valutare l'uso dei peptidi antimicrobici per il trattamento delle infezioni batteriche associate alla fibrosi cistica.

Metodi. Sono stati prodotti i peptidi antimicrobici BMAP-27, BMAP-28 e P19(9/B) ed è stata valutata *in vitro* la loro attività battericida e anti-biofilm su 25 ceppi di *P. aeruginosa*, 27 di *S. maltophilia*, e 15 di *S. aureus* isolati da pazienti FC. È stato valutato quale sia la minima concentrazione antibatterica per tali peptidi e quale sia la velocità della loro azione battericida in differenti terreni di coltura. È stata studiata inoltre la tossicità e gli effetti del peptide BMAP-27 su topi con infezione polmonare da *P. aeruginosa*, utilizzando come confronto l'antibiotico tobramicina.

Principali risultati. I peptidi BMAP-27, BMAP-28, and P19(9/B)

hanno dimostrato una notevole attività battericida anche a concentrazioni bassissime (micromolari) contro la maggior parte dei ceppi batterici (in particolare contro *P. aeruginosa*). La loro efficacia è comparabile e talvolta superiore a quella della tobramicina. Riguardo l'attività anti-biofilm, i peptidi si sono rivelati efficaci ma non più della tobramicina. Il peptide BMAP-27, l'unico provato sugli animali, ha mostrato una certa tossicità dopo essere stato somministrato a topi per via intra-tracheale in dose piuttosto consistente (2-4 mg/kg).

Commenti e conclusioni. I peptidi BMAP-27, BMAP-28, and P19(9/B), presentano un'elevata attività battericida contro batteri isolati, tuttavia uno di essi, BMAP-27, ha dimostrato di essere tossico nei topi ai dosaggi piuttosto elevati utilizzati. È possibile in futuro ridurre tali effetti dannosi modificando la struttura molecolare del peptide e riducendone la quantità somministrata. I peptidi antimicrobici sono quindi degli ottimi punti di partenza per sviluppare nuovi farmaci antibatterici.

Possibili ricadute per ricerca e clinica. I peptidi antimicrobici sono dotati di ottima attività antibatterica e sono molecole facilmente malleabili con metodiche biotecnologiche. Ciò permette di adattarli alle necessità della clinica per utilizzarli, con diverse metodiche di somministrazione, contro batteri resistenti agli antibiotici.

2. Prevention of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation by inhibition of cyclic-di-GMP (c-di-GMP) metabolism

Landini P¹, Seneci P², Bernardi A², Cutruzzolà F³

¹Dip. Scienze Biomolecolari e biotecnologiche – Univ. di Milano,

²Dipart. Chimica Industriale e Organica – Università Milano,

³Dipart. Scienze biochimiche – Università “La Sapienza”, Roma (FFC Project#13/2009, concluded)



Paolo Landini, al centro, con il suo gruppo di ricerca

Background. Colonization of the human host by pathogenic bacteria is facilitated by growth of bacteria as a biofilm, which allows them to withstand the response of the host immune system and decreases bacterial sensitivity to antibiotics. Cyclic-di-GMP (c-di-GMP), a bacterial signal molecule, triggers aggregation factor production and biofilm formation.

Objectives. The main goal of our project was to discover novel molecules that can act as anti-biofilm agents against *Pseudomonas aeruginosa* by inhibiting proteins that synthesize c-di-GMP. By blocking c-di-GMP, and thus by inhibiting biofilm, we can facilitate clearing of bacterial infections by the immune response and increase the efficacy of antibiotic treatments.

Methods. We set up a screening system for inhibitors of c-di-GMP metabolism and to test chemical libraries. Hit com-

pounds, i.e., molecules active in our screening system, were tested for their ability to prevent biofilm formation by the CF-related pathogen *P. aeruginosa*. Diguanylate cyclases (DGCs), i.e., enzymes responsible for c-di-GMP biosynthesis, were purified and enzymatic assays were performed to test potential inhibitors.

Main results. From our screening, we could identify two inhibitors of c-di-GMP biosynthesis in bacterial cells, azathioprine and sulfathiazole. Neither compound showed significant activity on *P. aeruginosa* biofilms, although they showed promising activity on other bacterial species such as pathogenic *Escherichia coli*. We purified DGCs from *P. aeruginosa* proteins and we showed that neither azathioprine nor sulfathiazole are specific DGC inhibitors, but they prevent c-di-GMP synthesis in the bacterial cell indirectly.

Comments & Conclusions. The identification of sulfathiazole and azathioprine as inhibitors of c-di-GMP in vivo, despite their lack of activity against *P. aeruginosa* biofilms, is an important achievement, since they are the first antimicrobial drugs showing to inhibit c-di-GMP biosynthesis. Their discovery provided validation of our screening approach.

Purification of DGCs from *P. aeruginosa* will be followed by structure characterization: this will provide essential information for structure-activity relationship of these enzymes and will pave the way for structure-based design of specific inhibitors.

Spin-off for research & clinical purposes. Possible applications of c-di-GMP inhibitors identified in our study for non CF-related bacterial infections. Drug design based on *P. aeruginosa* DGC protein structure.

Prevenzione della formazione di biofilm di *Pseudomonas aeruginosa* tramite inibizione del metabolismo della molecola segnale GMP-di-ciclico (c-di-GMP)

Ragioni dello studio. La colonizzazione dell'ospite umano da parte di batteri patogeni è agevolata dalla formazione del biofilm, che permette loro di tollerare la risposta immunitaria dell'ospite e diminuisce la loro sensibilità agli antibiotici. Il di-GMP ciclico (c-di-GMP), una molecola segnale batterica, stimola la produzione di fattori di aggregazione e di biofilm.

Obiettivi. L'obiettivo principale del nostro progetto era di scoprire nuove molecole con attività antibiofilm contro *Pseudomonas aeruginosa*, inibendo la sintesi del c-di-GMP. Bloccando la formazione di biofilm c-di-GMP-dipendente, si può aumentare l'efficacia di trattamenti antibiotici e facilitare la risoluzione delle infezioni batteriche.

Metodi. Abbiamo messo a punto un sistema di screening per gli inibitori del c-di-GMP. Molecole risultate attive nel nostro screening sono state saggiate con test per l'inibizione del biofilm del patogeno *P. aeruginosa*. Diguaniato ciclasi (DGC, enzimi responsabili della sintesi del c-di-GMP) sono state purificate da *P. aeruginosa* e si sono effettuati saggi enzimatici per identificare potenziali inibitori.

Principali risultati. Dal nostro screening abbiamo potuto identificare due inibitori della biosintesi del c-di-GMP nelle cellule batteriche, azatioprina e sulfatiazolo. I due composti non hanno mostrato una significativa attività sui biofilm di *P. aeruginosa*, anche se posseggono una promettente attività su altre specie, in particolare su ceppi patogeni di *Escherichia coli*. Studi effettuati con le proteine DGC di *P. aeruginosa* suggeriscono che né l'azatioprina né il sulfatiazolo sono inibitori specifici delle DGC, ma inibiscono indirettamente la sintesi di c-di-GMP nella cellula batterica.

Commenti e conclusioni. L'identificazione di sulfatiazolo e azatioprina come inibitori di c-di-GMP in vivo, nonostante la loro mancanza di attività contro *P. aeruginosa*, è un risultato importante, in quanto sono i primi farmaci antimicrobici individuati ad essere in grado di inibire il c-di-GMP. La purificazione delle proteine DGC di *P. aeruginosa* sarà seguita dalla caratterizzazione della loro struttura, che fornirà informazioni essenziali per la progettazione di inibitori specifici (drug design).

Possibili ricadute per ricerca e clinica. Applicazioni degli inibitori sulfatiazolo e azatioprina in infezioni da biofilm non correlate con CF. Progettazione di farmaci basati sulla struttura delle proteine DGC in *P. aeruginosa*.

3. Exploring thermostable quorum quenching lactonases to counteract bacterial infections in cystic fibrosis

Manco G¹, Andrenacci D²

¹Istituto Biochimica delle Proteine, CNR Napoli;

²Istituto Genetica e Biofisica, CNR Napoli

(FFC Project#10/2010, in progress)



Giuseppe Manco, seduto al centro, con il suo gruppo di ricerca

Background. *Pseudomonas aeruginosa* is the major cause of clinically relevant infections in cystic fibrosis (CF) due to antibiotic resistance, which demands for new strategies of microbe proliferation control. Quorum sensing (QS) regulates the expression of several virulence factors, as well as the biofilm formation and QS mutant strains are attenuated for virulence in animal models. QS signalling can be disrupted by lactonases. We propose studying thermostable members of the newly identified family of phosphotriesterase-like lactonase (PLL) to counteract bacterial infections in cystic fibrosis.

Objectives. Our general aim is to develop a new strategy of infection control based on QS signals quenching, able to counteract the *Pseudomonas* growth and virulence. We propose an enzymatic technology to analyse the effect in vitro and in vivo of thermostable PLLs, their available mutants and PEGylated forms on the *P. aeruginosa* growth and infection in comparison with human PON1.

Methods. Enzymes were expressed in *E. coli* and purified with procedures routinely used in our lab. PAO1 was grown in liquid and solid cultures with generally used procedures. *Drosophila* flies were manipulated according to well consolidated procedures.

Preliminary results. We have demonstrated no effect of our thermostable enzymes on PAO1 growth but some effects were evident in reducing swimming and abolishing twitching motility. Furthermore pyocyanin expression, one of the key factor of virulence in PAO1, was substantially reduced. We have generated transgenic flies to be used as animal models harbouring four lactonase genes to test the possibility of in vivo control of the infection. We have used

a transgenic fly expressing human PON1 as a control and experiments to test the effect of our enzymes in vivo are underway.

Comments & Conclusions. We have started a good part of activities mentioned in our proposal and obtained some very interesting results confirming our general idea that our lactonases can be used against PAO1. We have to confirm the second prediction namely that thermostable enzymes are a better choice than PON enzymes.

Spin-off for research & clinical purposes. If we demonstrate that our enzymes have a better behaviour than human PON1 we would like to start similar experiments in more complex animals such as pig or rat and in primary human cell lines.

Studio di nuove molecole (lattonasi termostabili) per combattere il sistema di aggregazione di *Pseudomonas aeruginosa* in fibrosi cistica

Ragioni dello studio. *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1) è la principale causa di infezioni clinicamente rilevanti in fibrosi cistica (CF) per la resistenza agli antibiotici, che richiede nuove strategie di controllo della proliferazione del batterio. Il meccanismo di quorum sensing (QS) regola l'espressione di parecchi fattori di virulenza così come la formazione del biofilm, considerato che alcuni ceppi batterici, con mutazioni a carico del sistema del quorum sensing, risultano meno virulenti in modelli animali. La regolazione QS può essere interrotta da inibitori e enzimi come le lattonasi. In questo progetto noi ci proponiamo di studiare i membri termostabili della famiglia delle lattonasi fosfotriesterasi-simili (PLL) recentemente identificati e studiati nel nostro laboratorio.

Obiettivi. Il nostro scopo generale è di sviluppare una nuova strategia di controllo dell'infezione di *Pseudomonas* basata sulla soppressione dei segnali del QS in grado di neutralizzare lo sviluppo del biofilm e la virulenza del batterio. Proponiamo di analizzare l'effetto in vitro ed in vivo delle PLLs termostabili, dei mutanti disponibili e di forme PEGylate (per ridurre la risposta immunologica) sullo sviluppo e sull'infezione di *P. aeruginosa* rispetto alla lattonasi umana PON1.

Metodi. Gli enzimi sono stati espressi e purificati con classiche procedure usate in laboratorio. Il batterio PAO1 è stato cresciuto in terreno liquido o solido con procedure pubblicate. Mosche della specie *Drosophila* sono mantenute in laboratorio e trattate secondo procedure ben consolidate.

Principali risultati. Abbiamo dimostrato che non c'è effetto dei nostri enzimi termostabili sulla crescita di PAO1 ma alcuni effetti sono evidenti nella riduzione di un tipo di motilità conosciuta come swarming e nell'abolizione della motilità detta di twitching. Inoltre il trattamento con i nostri enzimi riduce sostanzialmente l'espressione della piocianina, uno dei fattori chiave di virulenza in PAO1. Abbiamo generato mosche transgeniche, che portano quattro geni delle nostre lattonasi, da usare come modelli animali per verificare la possibilità di controllo in vivo dell'infezione. Usando come controllo una mosca transgenica che esprime la lattonasi umana PON1, stiamo conducendo gli esperimenti per verificare l'effetto dei nostri enzimi in vivo.

Commenti e conclusioni. Nel primo anno del progetto abbiamo iniziato buona parte delle attività accennate nella nostra proposta ed ottenuto alcuni risultati molto interessanti che confermano la nostra idea generale che le lattonasi microbiche termostabili possono essere usate contro PAO1. Dobbiamo confermare la seconda previsione, ovvero che gli enzimi termostabili sono una migliore scelta rispetto a enzimi meno stabili come la PON1 umana.

Possibili ricadute per ricerca e clinica. Se dimostreremo che i nostri enzimi sono più efficienti rispetto all'enzima umano nel proteggere dall'infezione batterica, potremmo avviare studi simili in un modello più complesso quale il maiale o il ratto o in linee cellulari umane.

4. In vivo characterization of a novel branched antimicrobial peptide specific for Gram-negative bacteria. Efficacy in *P. aeruginosa* lung infection and pharmacological profile

Pini A

Dip. di Biologia Molecolare, Sezione di Chimica Biologica,
Università di Siena
(FFC Project#14/2009, concluded)



Alessandro Pini, secondo da destra, con alcuni collaboratori

Background. During the past years in the proposer laboratory a non-natural peptide sequence was identified, which showed a strong antimicrobial activity particularly against Gram-negative bacteria. This peptide was called M33 and studied for its cytotoxicity, haemolysis, mechanism of action, immunogenicity and acute toxicity. It was also preliminarily tested for its capacity to neutralize LPS-induced cytokine release and to prevent septic shock in animals infected with bacteria of clinical interest.

Objectives. The project FFC#14/2009 was aimed to the evaluation of M33 activity in lung infection animal models.

Methods. In collaboration with the FFC CFaCore Facility at the San Raffaele Institute, Milan, models of lung infections through intra-tracheal administrations have been set up and experimented with peptide M33 inoculated following different routes of administration.

Main results. We improved the synthesis and purification of peptide M33 eliminating an important element that made toxic the molecule. With the newly purified M33, and with a single topical administration of the peptide, we obtained 80% CFU reduction in lungs of animals infected with *P. aeruginosa*.

Comments & Conclusions. Results obtained confirmed the potent antibacterial activity of M33 and its possible use as a new drug for lung infections. An in-depth preclinical study and the administration of nebulized molecule is under evaluation.

Spin-off for research & clinical purposes. Companies which own licences and patents regarding M33 are managing the preclinical evaluation of the peptide in order to enter in clinical experimentations in the next years.

Sviluppo di un nuovo peptide antimicrobico specifico per batteri Gram-negativi. Studio della sua efficacia in modelli di infezione polmonare da *P. aeruginosa* e suo profilo farmacologico

Ragioni dello studio. Alcuni anni fa nel laboratorio destinatario del finanziamento FFC#14/2009 fu scoperta una nuova molecola capace di contrastare gravi infezioni dovute a batteri generalmente coinvolti nella Fibrosi Cistica. Questa molecola, un peptide ramificato chiamato M33, è stato studiato in passato per la sua

stabilità nei fluidi biologici, il meccanismo di azione, la tossicità per le cellule umane, e per altri fattori importanti per lo sviluppo di un nuovo farmaco.

Obiettivi. Questo progetto era finalizzato ad una preliminare analisi di efficacia del peptide M33 in modelli animali di infezioni polmonari dovute al batterio *Pseudomonas aeruginosa*, uno dei più importanti microrganismi coinvolti nella Fibrosi Cistica. A tal fine, e sotto suggerimento della stessa Fondazione Ricerca FC, il gruppo proponente ha iniziato una collaborazione con la CFaCore Facility FFC presso l’Ospedale San Raffaele di Milano, che ha messo a disposizione la propria esperienza sulle infezioni polmonari in animali da esperimento.

Metodi. I metodi utilizzati per la sperimentazione animale sono stati approvati dai Comitati Etici Locali. Le infezioni indotte nei topi sono avvenute mediante somministrazione intratracheale di quantità note di batteri. Il peptide è stato somministrato sperimentando più vie di inoculo.

Principali risultati. I seguenti due risultati principali sono stati raggiunti: 1) Il miglioramento dei sistemi di sintesi e purificazione del peptide M33 che hanno permesso di eliminare un importante elemento probabilmente tossico dalle preparazioni di peptide; 2) La riduzione dell’80% circa della carica batterica dai polmoni degli animali infettati. Questi preliminari esperimenti sono stati ottenuti mediante somministrazione topica (intratracheale) del peptide M33.

Commenti e conclusioni. I risultati ottenuti confermano il potenziale antibatterico del peptide M33 e aprono importanti prospettive per il suo utilizzo in infezioni polmonari. Studi più approfonditi di tossicità, farmacocinetica e biodistribuzione, insieme a metodi di somministrazione meno artificiali, dovranno essere valutati prima di iniziare una sperimentazione clinica.

Possibili ricadute per ricerca e clinica. I brevetti che coprono lo sfruttamento industriale del peptide M33 sono in possesso di aziende che, insieme al gruppo di ricerca che si è occupato di questo progetto, sono alla ricerca dei fondi necessari per la conclusione della sperimentazione preclinica e, auspicabilmente, di quella clinica.

5. Development of new therapeutic approaches against microbial infection in cystic fibrosis patients: biochemical analysis of cell wall fragments

Molinaro A¹, Bernardini ML², Döring G³

¹Dipartimento di Chimica Organica e Biochimica, Università di Napoli “Federico II”, Italia; ²Dipartimento di Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Sapienza-Università di Roma, Italia; ³Institut für General und Environmental Hygiene – University of Tübingen (FFC Project# 11/2010, in progress)



Antonio Molinaro, secondo da sinistra in basso, con il gruppo di ricerca

Background. Briefly, in the vast majority of cystic fibrosis patients chronic bacterial lung infections significantly increase lung inflammation and contribute to tissue destruction, leading to a largely reduced life expectancy of the affected CF patients.

*The bacterial factors and the molecular mechanisms which provoke full blown inflammation in CF upon host-pathogen interaction at the CF respiratory epithelium interface are mostly unclear. We have recently demonstrated by molecular studies that during chronic pulmonary infection *P. aeruginosa* clones genotypically and phenotypically adapt to the CF niche. This results in a highly diverse bacterial community which is difficult to eradicate due to rapidly acquired antibiotic resistance and structural changes in cell wall components.*

Objectives. *The overall aim of this project is to contribute to the understanding of the molecular mechanisms underlining the immune evasion strategies by CF pathogens, based on the plasticity of their main molecular elements (PAMPs), allowing them to stably colonize the airways. The study at multiple levels of the action of these PAMPs is the main frame of this project.*

Methods. *It foresees the participation of scientists with different skills, microbiology, biochemistry, immunology and medical microbiology all devoted to get an interdisciplinary and translational approach, which is the most comprehensive strategic method to the understanding of respiratory disease pathogenesis. This project is a development of the European project granted to the Coordinator "Microbial cell surface determinants of virulence as targets for new therapeutics in Cystic Fibrosis".*

Main results. *In this project we aim to investigate the structure, function and immunostimulatory activity of the cell wall components lipopolysaccharide and peptidoglycan from the CF pathogens *Pseudomonas aeruginosa* and *Prevotella intermedia*. We have extracted isolated and purified the LPS from *Prevotella intermedia* and have determined its compositional analysis. Beside the typical fatty acid of the lipid A and the core oligosaccharide residues, we have also determined the presence of a novel carbohydrate component, never isolated in a LPS before, the Kdn, a sialic acid derivative.*

Comments & Conclusions. *In the first year we have characterised a new molecule, which is the lipopolysaccharide from the anaerobe bacterium *Prevotella intermedia*, a powerful pathogen, not equipped with virulence traits, often isolated from lungs of CF patients or from their sputum.*

Spin-off for research & clinical purposes. *The consequence of this study will enable to develop novel inhibitors of bacterial cell wall synthesis with the aim to reduce lung inflammation in CF airways and to eradicate the pathogens with novel treatment strategies.*

Sviluppo di nuovi approcci terapeutici contro le infezioni microbiche nei pazienti con fibrosi cistica: analisi biochimica di frammenti di parete cellulare

Ragioni dello Studio. Nonostante i progressi nel trattamento delle malattie infettive, i microrganismi patogeni rimangono i principali e più importanti agenti pericolosi per la salute umana. Le infezioni del tratto respiratorio con malfunzionamento polmonare e mortalità sono la causa maggiore di morte in fibrosi cistica (FC). La suscettibilità dei pazienti è associata una attività antimicrobica molto bassa nelle vie aeree, loro disidratazione ed ipersecrezione di muco. I fattori batterici ed i meccanismi molecolari che provocano lo scoppio dell'infiammazione in FC a seguito dell'interazione patogeno-ospite sono essenzialmente poco chiari. Studi a livello molecolare condotti dal nostro gruppo e finanziati dalla FFC in un progetto precedente e da un progetto europeo unicamente centrato sulla FC hanno chiarito che *Pseudomonas aeruginosa* durante il cambio da infezione acuta a infezione cronica si adatta da un punto di vista chimico, cioè cambia la struttura chimica degli elementi della parete cellulare. Questo implica una comunità batterica nei polmoni altamente eterogenea difficile da sradicare a causa dei cambi continui in strutture chimiche che mistificano la presenza ed il riconoscimento dei microrganismi.

Obiettivi. In questo progetto noi definiamo la struttura, la funzione e l'attività immunostimolatoria dei componenti della parete cellulare come lipopolisaccardi e peptidoglicano dai patogeni opportunisti FC più importanti come *Pseudomonas aeruginosa* e l'anaerobio emergente *Prevotella intermedia* e che rappresentano un problema clinico molto rilevante per i pazienti FC.

Metodi. La metodologia e l'approccio per affrontare questo progetto sono interdisciplinari. L'isolamento dei componenti della parete cellulare e la determinazione della loro struttura si ottiene attraverso una combinazione di metodologie chimiche e biochimiche, nella seconda parte del progetto questi nuovi componenti verranno saggiati per la loro attività immunostimolatoria attraverso tecniche microbiologiche ed immunologiche.

Principali risultati. Nel corso del primo anno di ricerca è stato isolato e purificato il lipopolisaccaride di *Prevotella intermedia*. Abbiamo poi proceduto ad una analisi dei componenti carboidratici e lipidici di tale molecola. Da questo punto di vista la molecola si presenta assolutamente peculiare senza precedenti nel campo degli LPS, in particolare è stato trovato ed identificato un nuovo componente lipopolisaccaridico, il KDN. Il KDN è un importante derivato dell'acido sialico, carboidrato di importanza cruciale nella immunologia degli eucarioti come importante determinante della superficie delle cellule epiteliali umane.

Commenti e conclusioni. Durante il primo anno di questo nuovo progetto abbiamo isolato una nuova molecola da un "nuovo" batterio, infatti il lipopolisaccaride endotossina dall'anaerobio emergente *Prevotella intermedia* è stato isolato in forma pura e caratterizzato dal punto di vista chimico, a cui seguiranno studi.

Possibili ricadute per ricerca e clinica. Questo studio permetterà di sviluppare nuovi inibitori della sintesi della parete cellulare con lo scopo di ridurre l'infiammazione nelle vie aeree FC e sradicare i patogeni con nuove strategie di trattamento.

6. The role of RND transporters in *Burkholderia cenocepacia* life by microarray analysis

Riccardi G, Bazzini S

Dipart. Genetica e microbiologia
Università degli Studi di Pavia
(FFC Project#15/2009, concluded)



Giovanna Riccardi

Background and objectives. Our research is aimed to investigate the mechanisms of antibiotic resistance in *B. cenocepacia* J2315, an opportunistic pathogen that infects the airways of cystic fibrosis (CF) patients leading to a rapid decline of the lung function and in some cases necrotizing pneumonia and sepsis. We pay a special attention towards the Resistance nodulation cell division (RND) transporters, in order to assess their role in the high-level of intrinsic antibiotic resistance of these bacteria. Some of these efflux pumps have been shown to have a role in the colonization and persistence of bacteria in the host as well as in pathogenicity.

Objectives. In this project we pursued two aims: transcriptome analysis of *B. cenocepacia* RND deleted strains and construction of a multiple rnd genes inactivated strain. The transcriptomes of mutants deleted individually in RND-4 and RND-9 efflux systems (named D4 and D9), and a double-mutant in both efflux pumps (D4-D9), were compared to that of the wild-type strain J2315 using microarray analysis. Microarray data were confirmed by qRT-PCR, phenotypic experiments, and by Phenotype MicroArray analysis.

Main results. The data revealed that RND-4 made a significant contribution to the antibiotic resistance of *B. cenocepacia*, whereas RND-9 was only marginally involved in this process. Moreover, the double mutant D4-D9 showed a phenotype and an expression profile similar to D4. Motility and chemotaxis-related genes appeared to be upregulated in both D4 and D4-D9 strains. In contrast, these gene sets were down-regulated or expressed at levels similar to J2315 in the D9 mutant. Biofilm production was enhanced in all mutants. Overall, these results indicate that in *B. cenocepacia* RND pumps play a wider role than just in drug resistance, influencing additional phenotypic traits important for pathogenesis.

Our second purpose was the construction of a *B. cenocepacia* strain containing multiple rnd inactivated genes. In this way we succeeded in obtaining a double mutant D4-D9, which showed some similarities with D4 mutant, and a triple mutant (D4-D9-D14). In the future we hope to achieve the construction of a multiple inactivated strain which could lead to an attenuated strain, useful for the design of a vaccine.

Comments & Conclusions. CF patients often die because of *B. cenocepacia* infections. By discovering the mechanisms involved in drug resistance, we could find its Achilles' heel and be able to improve the treatment of lethal infections due to *B. cenocepacia*.

Ruolo dei trasportatori RND in *Burkholderia cenocepacia* mediante analisi con microarray

Ragioni dello studio. La nostra ricerca è volta ad identificare i meccanismi di resistenza ai farmaci in *B. cenocepacia* J2315, un patogeno opportunista che infetta le vie respiratorie dei pazienti affetti da Fibrosi Cistica (FC), portando ad un declino della funzione polmonare e, a volte, a polmonite necrotizzante e sepsi. In particolare ci siamo focalizzati sulle pompe di efflusso Resistance nodulation cell division (RND) per stabilire il loro ruolo nell'elevato livello di resistenza agli antibiotici di questi batteri. Infatti alcune di queste pompe hanno un ruolo nella colonizzazione e persistenza dei batteri nell'ospite, così come nella patogenicità.

Obiettivi. In questo progetto abbiamo perseguito due obiettivi: l'analisi trascrittonica di ceppi di *B. cenocepacia* deleti nelle pompe RND e la costruzione di un ceppo inattivato multiplo nei geni rnd.

Metodi. La trascrittonica dei mutanti deleti singolarmente nelle pompe RND-4 e RND-9 (denominati D4 e D9), e di un doppio mutante in entrambe le pompe (D4-D9), è stata confrontata con il ceppo parentale J2315 utilizzando i microarray. Questi dati sono stati confermati mediante qRT-PCR, esperimenti fenotipici e MicroArray fenotipici.

Principali risultati. I dati hanno rivelato un contributo significativo della pompa RND-4 alla resistenza agli antibiotici di *B. cenocepacia*, mentre la pompa RND-9 sembra essere coinvolta solo marginalmente in questo processo. Il fenotipo e il profilo di espressione del doppio mutante D4-D9 sono simili al mutante D4. I geni coinvolti nella motilità e nella chemiotassi erano sovraespressi nei ceppi D4 e D4-D9. Al contrario, questi geni erano sottoespressi o espressi allo stesso livello del ceppo parentale nel mutante D9. La produzione di biofilm era aumentata in tutti i ceppi. Nel complesso questi risultati indicano che le pompe RND hanno un ruolo più ampio della sola resistenza agli antibiotici in *B. cenocepacia*, influenzando tratti fenotipici importanti per la patogenesi.

Il nostro secondo obiettivo era quello di costruire un ceppo di *B. cenocepacia* contenente inattivazioni multiple nei geni rnd. Abbiamo ottenuto un mutante doppio, D4-D9, che è molto simile al mutante D4, e un mutante triplo (D4-D9-D14). In futuro speriamo di costruire un ceppo inattivato multiplo attenuato utile per lo sviluppo di un vaccino.

Commenti e conclusioni. I pazienti FC spesso muoiono a causa delle infezioni da *B. cenocepacia*. Facendo luce sui meccanismi di resistenza ai farmaci potremmo trovare il tallone d'Achille e migliorare il trattamento delle infezioni letali da *B. cenocepacia*.

7. *In vitro and in vivo studies of novel antimicrobials targeting bacterial cytoskeleton and cell surface virulence markers in the treatment of Burkholderia cepacia complex infection*

Silipo A¹, De Soya A²

¹Dipart. Chimica organica e Biochimica – Università di Napoli;

²Department of Respiratory Medicine Freeman Hospital, Applied Immunobiology and Transplantation Group, Institute for Cellular Medicine, The Medical School University of Newcastle, UK
(FFC Project#16/2009, concluded)



Alba Silipo, quinta da sinistra, con il gruppo di ricerca

Background. Treatment of CF infections is difficult due to the inherent bacterial multidrug resistance; there is a pressing need to find new bacterial targets for antimicrobials that provide functions essential for cell growth and replication. A major component of the bacterial cytoskeleton is the actin homolog MreB that maintains bacterial cell shape and has emerged as an attractive new target for antimicrobials. In this frame, A22 and a synthetic library of A22-related compounds as Q22 are cell permeable compounds that disrupts MreB, destabilizing the bacterial cytoskeleton and altering the bacterial shape.

Objectives. This project was aimed to elucidate the *in vitro* and *in vivo* antimicrobial activity of such novel bacterial cytoskeleton inhibitors on clinically derived *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) and *Pseudomonas* strains from patients undergoing lung transplantation and to assess phenotypic changes, characteristics of sub-lethal concentrations, induced by these cytoskeleton inhibitors on virulence determinants as Lipopolysaccharide.

Methods. Production of A22 and Q22 derivatives via synthetic methodologies; antimicrobial testing of cytoskeleton inhibitors on Bacterial isolates from human subjects (mainly belonging to the Bcc). Toxicity *in vitro* testing of A22 and Q22 against a panel of human cell lines such as U937 macrophages and A549 airway epithelial cells. Isolation and structural characterization of Lipopolysaccharide via chemical, spectro-

scopic and spectrometric techniques; assessment of the pro-inflammatory activities of such isolates. In vivo assessment of A22/ Q22 in mouse model of acute and chronic infection and CF mice.

Main results. Extensive characterization of the phenotype of clinically relevant strains has been conducted after treatment of over 30 clinically important CF strains with the novel antibiotics A22 and Q22, which demonstrated to be effective against all Bcc, *Pseudomonas* and also *S. maltophilia* strains, inhibiting growth and reducing growth rate. Bcc bacteria grown in the presence of Q22 showed a number of phenotypic (cell morphology) changes associated with disruption of the *MreB* cytoskeleton. Analysis of secondary effects of these cytoskeleton inhibitors on bacterial membrane was focused to determine changes in virulence factors as lipopolysaccharides (LPS). The LPS of selected strains of Bcc bacteria grown in the presence of Q22 showed profile differences when compared to untreated bacteria. Their structural characterization demonstrated changes in the lipid A moiety, and in particular an increased acylation pattern. As for the immunostimulatory activity, the strain-specific increase in cytokine response when cells were stimulated with lysates exposed to Q22 when compared to those without treatment was in full accordance with the increased acylation pattern of the lipid A moiety in Q22 treated strains. The assessment of the in vivo antimicrobial activity and host toxicity of such novel cytoskeleton inhibitors has been performed in the CF murine model of acute and chronic infection to determine A22 and Q22 beneficial antimicrobial effects and toxicity. Results indicated that both A22 and Q22 showed signs of toxicity at all doses tested, despite their very promising behavior in vivo.

Conclusions. Despite the promising antibacterial activity in vitro of such antimicrobial cytoskeleton inhibitors, they cannot be used for clinical purposes but the highlighted high toxicity in vivo must be overcome with the design of other structurally modified homologues.

Studio in vivo e in vitro dell'azione di nuovi antibiotici diretti contro il citoscheletro batterico e marker di virulenza della superficie cellulare nel trattamento di infezioni dal *Burkholderia cepacia complex* (Bcc)

Ragioni dello studio. Le infezioni in fibrosi cistica sono difficili da trattare ed eradicare a causa dell'intrinseca resistenza agli antibiotici dei batteri infettanti, da cui la crescente necessità di trovare nuovi target molecolari batterici che siano obiettivo dell'azione di nuovi antibiotici. Uno dei componenti principali del citoscheletro batterico è un omologo dell'actina, *MreB*, che assicura la forma cellulare batterica e viene considerato come promettente target

per nuovi classi di antibiotici. In quest'ambito A22 e un suo derivato di sintesi da noi identificato, Q22, sono composti che distruggono il citoscheletro batterico e sono considerati come potenziali antibiotici contro i patogeni opportunisti coinvolti nella FC.

Obiettivi. Il presente progetto ha avuto come obiettivo di definire l'attività antimicrobica di tali inibitori del citoscheletro in vivo e in vitro contro patogeni appartenenti al *Burkholderia cepacia complex* (Bcc) isolati pre- e post trapianto polmonare e a strain di *Pseudomonas aeruginosa*. Ci siamo inoltre prefissi di definire i cambi fenotipici, caratteristici di concentrazioni sub-letali, indotti da tali molecole su determinanti di virulenza batterica quali i lipopolisaccaridi.

Metodi. Considerando la multidisciplinarità del presente progetto, abbiano seguito vari approcci. Nel dettaglio: produzione dei derivati A22 e Q22 attraverso metodologie sintetiche. Test in vivo del potenziale antimicrobico di tali inibitori del citoscheletro batterico effettuata su isolati batterici da pazienti, principalmente appartenenti al Bcc e utilizzando linee cellulari quali macrofagi e cellule epiteliali. Isolamento, purificazione e caratterizzazione strutturale di lipopolisaccaridi da isolati clinici del Bcc pre- e post trattamento con A22/Q22 attraverso NMR, spettrometria di massa e metodologie chimiche. Test di tossicità in vivo su modelli murini di infezione acuta e cronica

Principali risultati. Abbiamo condotto una estensiva caratterizzazione del fenotipo di oltre 30 ceppi clinicamente rilevanti in seguito a trattamento con Q22 e A22, che si sono effettivamente dimostrati efficaci come antibiotici contro tutto il Bcc, *Pseudomonas* e anche *S. maltophilia*, riducendone e inibendone la velocità di crescita. Abbiamo inoltre anche seguito cambi fenotipici in termini di morfologia cellulare associati in batteri Bcc alla distruzione del citoscheletro. L'analisi degli effetti secondari degli inibitori del citoscheletro sulla membrana batterica sono stati focalizzati allo studio di importanti fattori di virulenza quali i lipopolisaccaridi (LPS). Sono state selezionate diversi ceppi di *Burkholderia* isolati pre- e post-trapianto polmonare e sono state analizzate le eventuali variazioni strutturali indotte dal trattamento con A22/Q22 negli LPS. In tutti i casi analizzati il trattamento antibiotico induce variazioni strutturali pressoché esclusivamente nella porzione glicolipidica (Lipide A). Nel dettaglio, nei ceppi trattati con Q22 si evince un aumento della acilazione che è responsabile dell'aumento della produzione di citochine infiammatori indotta da LPS isolati dopo trattamento con A22/Q22. Modelli murini di infezione cronica e acuta sono stati quindi utilizzati per testare l'attività di questi composti in vivo. I risultati indicano che sia A22 che Q22 inducono forti segni di tossicità a tutte le dosi saggiate.

Commenti e conclusioni. Abbiamo effettuato una analisi dettagliata in vitro delle potenzialità antibiotiche di inibitori del citoscheletro quali A22 e Q22 che si sono dimostrati molto promettenti in termini di capacità di rallentare l'infezione. Test in vivo in modelli murini di infezione acuta e cronica hanno tuttavia evidenziato anche una notevole tossicità di A22 e Q22 che ne rende impossibile il potenziale utilizzo immediato come antibiotici. L'efficacia di tali molecole, specialmente contro ceppi di *Burkholderia*, apre comunque la strada al disegno di altri inibitori del citoscheletro, strutturalmente simili, ma che siano dotati di minore tossicità.

Clinical Research

Chairman: Roberto Buzzetti • Introductory overview: Teresa Repetto

8. Modulation of intestinal and extraintestinal inflammation in infants with cystic fibrosis by early modification of intestinal microflora

Guarino A¹, Braggion C², Pardo F³, Morelli L⁴

¹Dip. Pediatria – Università di Napoli;

²Centro Regionale fibrosi cistica – Ospedale Meyer, Firenze;

³Centro Regionale fibrosi cistica Ospedale "G. Di Cristina";

⁴Ist. Microbiologia, Università Sacro Cuore, Piacenza

(FFC Project#23/2009, concluded)



Alfredo Guarino

Background. Intestinal microflora is a complex functional unit that lives with the host in a symbiotic relationship. The “dysbiosis”, otherwise the imbalance between harmful and protective microbial species in the gut have been recently described in intestinal and extraintestinal diseases, thus suggesting a prior role of gut microbiota in systemic homeostasis. Cystic fibrosis (CF) could present a disturbed intestinal microflora, as a consequence of the abnormal intestinal microenvironment due to the impaired CFTR and the heavy load of antibiotics and pancreatic enzymes.

Objectives. To characterize intestinal microbiota in CF newborns and to investigate its relationship with intestinal and extraintestinal inflammation.

Methods. A prospective, randomized, placebo-controlled, double blind multicentric trial. CF newborns were enrolled when in a stable clinical condition (no clinical evidence of acute exacerbation, no modifications in the therapeutic regimen and no hospitalization in the last 2 weeks). They were randomly divided in 2 groups: group A received LGG (6x10⁹ CFU per day); group B assumed placebo for 12 months. Demographic, anthropometric and clinical parameters were analysed. Intestinal and systemic inflammation were also evaluated at baseline and in the follow-up. Gut microflora was characterised by DGGE analysis and FISH.

Main results. Intestinal inflammation is frequently observed in CF patients already in the first months of life, as demonstrated by increased fecal calprotectin and nitric oxide concentrations. DGGE analysis and FISH showed that intestinal microflora in CF is characterised by a reduced richness and quanti-qualitative differences. In particular bacterial load of *Bacteroides*, *F. prausnitzii* and *E. rectale* were significantly reduced in CF. A significant increase of *Bacteroides* was observed in all CF infants in one group

whereas the other group after 6 months of treatment did not show any significant modification. No significantly difference in *F. prausnitzii* counts was observed between the two groups of infants. The follow-up period is ongoing. At now, two patients finished the trial and the last visit will happen on April 2012.

Comments & Conclusions. Intestinal microecology is altered in CF and its abnormalities appear early in life. Modifications of gut microbiota in the first months of life, for example by probiotics, may reduce intestinal and extraintestinal inflammation with beneficial clinical effects.

Spin-off for research & clinical purposes. This trial represents an important evidence of early modifications in gut microecology in CF. Thus it could stimulate a wide research on factors modifying gut microecology with the aim at clarifying the pathogenesis of CF and finally improving the quality of life of CF patients.

Effetti della modificazione precoce della microflora intestinale sull'infiammazione intestinale ed extraintestinale in lattanti con fibrosi cistica.

Ragioni dello studio. La microflora intestinale è un insieme composito di microrganismi (microbiota) che popolano il tratto gastrointestinale e vivono con l'ospite in un rapporto simbiotico. Recenti evidenze hanno mostrato che un microbiota equilibrato può proteggere da disordini intestinali ed extraintestinali e viceversa un microbiota alterato è descritto in affezioni intestinali e non. La fibrosi cistica (FC) è una patologia intestinale e respiratoria in cui la microflora intestinale è verosimilmente alterata sia per l'alterazione geneticamente determinata del CFTR sia per fattori ambientali come l'assunzione di antibiotici ed estratti pancreatici.

Obiettivi. Caratterizzare la microflora intestinale in neonati con FC e investigare l'eventuale relazione tra microflora e infiammazione intestinale e sistemica in tali pazienti.

Metodi. Trial prospettico randomizzato multicentrico in doppio cieco. Popolazione in studio: Neonati con FC in condizioni cliniche stabili al momento dell'arruolamento (assenza di esacerbazioni acute, modifiche del regime terapeutico e ospedalizzazioni nelle 2 settimane precedenti). Disegno dello studio: il paziente è assegnato random al gruppo placebo o al gruppo probiotico (LGG capsule), assumendo 1 capsula/die del prodotto per 12 mesi. È prevista la valutazione di parametri demografici, antropometrici, clinici, dell'infiammazione sistemica e intestinale e la caratterizzazione della microflora intestinale.

Principali risultati. I dati ottenuti hanno confermato che l'infiammazione intestinale è tipica della FC già nei primi mesi di vita, come dimostrato dal riscontro di concentrazioni elevate di calprotectina fecale e di ossido nitrico rettale. La microflora intestinale è alterata nella FC, meno ricca e con differenze quanti-qualitative di specie micobiche rispetto ai soggetti sani. A sei mesi di trattamento i due gruppi mostrano differenze significative in termini di composizione microbica intestinale con un aumento significativo dei *Bacteroides* in un gruppo rispetto ad un altro. Gli altri dati relativi al follow-up sono in corso di analisi ed elaborazione. L'ultima visita di controllo è prevista ad aprile 2012.

Commenti e conclusioni. La microecologia intestinale nella FC è alterata e tali modifiche sono riscontrabili già nelle prime fasi della vita. La somministrazione di fattori modificanti la microflora intestinale, come il probiotico LGG, potrebbe apportare benefici riducendo l'infiammazione intestinale ed extraintestinale e rallentando la progressione del danno a livello respiratorio.

Possibili ricadute per ricerca e clinica. Tale trial apre nuovi scenari di ricerca per lo studio di fattori che modificando preconcemente il microambiente intestinale in pazienti con FC possano migliorarne la qualità della vita.

9. Impact of persistent lung infections with community acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) and hospital acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (HA-MRSA) on the clinical status of cystic fibrosis patients: a multicenter longitudinal study

Campana S

Dipart. di Pediatria, Centro Regionale FC, Azienda Ospedaliera Universitaria Meyer, Firenze
(FFC Project#11/2009, concluded)



Silvia Campana

Background. The prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections in cystic fibrosis patients (CF) has increased. Persistent infection with MRSA affects the rate of decline in lung function and survival, but there is no consensus about MRSA infection treatment. Hospital-acquired MRSA (HA-MRSA) are responsible for infections in hospitalized patients, however highly virulent community-acquired MRSA (CA-MRSA) are increasing worldwide.

Objectives. The goal of this project is to analyze the impact of persistent infections with CA-MRSA and HA-MRSA on the clinical status of patients.

Methods. MRSA strains and clinical data have been collected from persistently colonized patients attending 10 Italian CF centers over a period of four years. All strains have been characterized to evaluate whether they represent HA-MRSA or CA-MRSA (SCCmec typing) and they have been genotyped with Multi-Locus-Sequence-Typing (MLST).

Main results. MRSA strains from 230 patients have been collected. Characterization of 44 strains isolated from the first infection episodes revealed that 61.4% represented CA-MRSA, furthermore 7 strains belonged to known epidemic lineages. The mean age at the first infection was 9 and 19 years in patients infected with CA-MRSA and HA-MRSA respectively. During the studied period 82 patients persistently infected by MRSA have been enrolled. MLST analysis of strains isolated from these patients indicated that many isolates belonged to

known epidemic clones. Clinical data of 114 patients have been collected. Longitudinal data relating to 23 patients revealed a higher median yearly decrease of FEV1 in patients persistently infected by CA-MRSA.

Comments&Conclusions. CA-MRSA are responsible of a high number of first infection episodes and lead to an earlier onset of the first pulmonary infection. Persistent colonization with CA-MRSA seems cause greater damage to respiratory function compared to HA-MRSA. MRSA clones responsible for epidemics worldwide are involved in the first and persistent infections.

Spin-off for research & clinical purposes. Identification of dangerous MRSA strains and clarification of their role in the pathogenesis of pulmonary damage in CF patients will lead to improved segregation strategies. Monitoring and treatment of MRSA infections in CF patients could be optimized by carrying out specific eradication treatment against pathogenic MRSA strains.

Impatto dell'infezione persistente da *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente di acquisizione comunitaria (CA-MRSA) e di acquisizione ospedaliera (HA-MRSA) sullo stato clinico dei pazienti con fibrosi cistica: uno studio multicentrico longitudinale

Ragioni dello studio. Le infezioni da *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA) sono in aumento e l'infezione persistente può influenzare la funzionalità polmonare e la sopravvivenza nei pazienti FC. Ad oggi non vi è una strategia terapeutica approvata per il trattamento di tali patogeni. In genere le infezioni ospedaliere sono dovute a MRSA denominati "di acquisizione ospedaliera" (HA-MRSA), tuttavia un'altra tipologia nota per causare gravi infezioni nelle comunità (CA-MRSA) sta attualmente rimpiazzando i ceppi HA-MRSA.

Obiettivi. Lo scopo di questo progetto è di valutare l'impatto clinico dell'infezione persistente da CA-MRSA e HA-MRSA sui pazienti con fibrosi cistica.

Metodi. I ceppi di MRSA e i dati clinici vengono raccolti dai pazienti che presentano una infezione persistente da MRSA afferenti a 10 centri di cura Italiani, per un periodo di 4 anni. Tutti i ceppi raccolti sono caratterizzati per vedere se rappresentano HA-MRSA o CA-MRSA, inoltre sono analizzati con una tecnica specifica per valutare se appartengono a tipi di MRSA già noti per aver causato epidemie .

Principali risultati. Sono stati raccolti i ceppi di MRSA da 230 pazienti. L'analisi degli MRSA responsabili delle prime infezioni ha rivelato che 62% rappresentano CA-MRSA, inoltre 7 di essi appartengono a tipologie epidemiche note. L'età media alla prima infezione è 9 anni per CA-MRSA e 19 anni per HA-MRSA. Sono stati studiati 82 pazienti con infezione persistente da MRSA. La tipizzazione dei ceppi di MRSA di questi pazienti ha evidenziato che molti rappresentano tipi epidemici noti. L'analisi preliminare dei dati clinici ha evidenziato una maggior diminuzione annuale della funzionalità polmonare nei pazienti colonizzati persistentemente da CA-MRSA.

Commenti e conclusioni. Questi risultati dimostrano che CA-MRSA sono responsabili di molte prime infezioni e sono più virulenti di HA-MRSA perché infettano più precocemente i pazienti. La colonizzazione persistente con CA-MRSA sembra aver maggiore influenza sulla funzionalità respiratoria. Ceppi di MRSA noti per la loro virulenza sono responsabili sia delle prime infezioni che delle infezioni persistenti.

Possibili ricadute per ricerca e clinica. La caratterizzazione dei ceppi potenzialmente più pericolosi può migliorare le norme di prevenzione. L'identificazione precoce dei tipi di MRSA potenzialmente patogeni può portare ad ottimizzare la terapia effettuando un trattamento eradicante tempestivo e mirato.

10. The cystic fibrosis newborn screening in Italy. Survey for assessment of technical-scientific, organizational and psycho-relational issues

Repetto T

A.O.U. "A. Meyer", Centro Regionale Toscano Fibrosi Cistica, Firenze
(FFC Project# 23/2010, concluded)



Teresa Repetto

Background. There are different regional approaches to CF newborn screening (CFNBS) in Italy and within the same region where multiple Newborn Screening Centres or CF Care Centres coexist.

Objectives. The primary aim of this study was to describe the state of the art of CFNBS programs in Italy and to assess the appropriateness of providing it, by comparing the current practices with CFNBS international guidelines. The secondary aim was to produce an overview of the main international recommendations about CFNBS.

Methods. This is a survey national audit study in which 15/15 Newborn Screening Center and 16/21 CF Care Center were involved. A questionnaire relative to technical, organizational and clinical CFNBS aspects was developed and sent to Newborn Screening Center (by SIMMESN) and to CF Care Center, these were checked by 3 research assistants trained in audit visits. 37 outcomes were identified.

Main results. In the year 2009 15/20 regions performed CFNBS covering 78% of Italian population. 5 different panels were utilised, 8/15 labs employed CF molecular test (range number of mutation tested 32-57). 8/15 labs were involved in external quality programs; 9/15 had educational programs for populations, and primary care team. This study included 124 CF infants born in 2009 and diagnosed by CFNBS within the first year of life; 104 were classified as classic CF and 19 as atypical CF. 17 out of 124 had meconium ileus. Median age at diagnosis was 56 days (25° centile = 31, 75° centile = 94). 46 days (29, 67 days) for classic CF, 121 days (100, 170 days) for atypical CF; median time between the positive sweat test results and the date the infant entered at CF Care Center was 7 days, median age at first visit was 67 days. Genetic counselling was offered to 89% of CF affected's families. In the first year of life 26,6 % of CF was infected by Pseudomonas aeruginosa, 20,8% presented stunting, 25% wasting. 8,1% was lost at follow up.

Comments & Conclusions. This study showed a great variability in the management of newborn screening program and care of infants diagnosed following CFNBS.

Spin-off for research & clinical purposes. The analysis of this data may guide the implementation of screening programs and will form the basis of national consensus guidelines.

Lo screening neonatale per Fibrosi Cistica in Italia. Indagine sugli aspetti tecnico-scientifici, organizzativi e relazionali

Ragioni dello studio. In Italia ci sono differenti approcci regionali allo screening per la Fibrosi Cistica (CFNBS), anche nella stessa regione dove coesistono più centri.

Obiettivi. Obiettivo primario dello studio è stato descrivere lo stato dell'arte dello screening FC in Italia e confrontarlo con le raccomandazioni internazionali; obiettivo secondario è stato quello di produrre una sintesi delle principali raccomandazioni internazionali.

Metodi. Studio di audit, cui hanno partecipato 15/15 Centri Screening e 16/21 Centri di Cura FC italiani. Per la rilevazione è stato messo a punto un questionario relativo a dati tecnici, organizzativi e clinici dello CFNBS e inviato alla SIMMESN (Società Italiana per gli Screening Metabolici Neonatali), per la compilazione da parte dei Centri Screening, e ai Centri di cura FC. Per quest'ultimi è stata impiegata la supervisione di monitor opportunamente addestrati. Sono stati individuati 37 indicatori.

Principali risultati. Nel 2009 si è eseguito CFNBS in 15/20 regioni, con una copertura del 78% della popolazione italiana. Gli algoritmi usati sono stati 5; 8/15 laboratori hanno impiegato anche test molecolare (range del numero mutazioni testate 32-57). 8/15 centri hanno partecipato a un programma di controllo qualità esterno; 9/15 avevano un programma di informazione per le famiglie. In questo studio sono compresi 124 bambini con FC diagnosticati per screening nel 2009: 104 classificati come FC classica, 19 come FC atipica; 17 con ileo da meconio. Il valore mediano dell'età alla diagnosi era 56 giorni (25° centile = 31, 75° centile = 94). I valori differiscono, per mediana, 25° e 75° centile, tra forme classiche (46, 29, 67 giorni rispettivamente) e "atipiche" (131, 100, 170 giorni); il tempo mediano tra comunicazione di positività del test del sudore e prima visita era di 7 giorni; il valore mediano dell'età alla prima visita 67 giorni. Il counselling genetico è stato offerto all'89% delle famiglie dei bambini affetti. Nel primo anno di vita 26,6% di questi bambini FC è andato incontro a infezione da *Pseudomonas aeruginosa*; il 20,8% presentava deficit staturale e il 25% deficit ponderale. L'8,1% dei bambini risultano persi al follow up.

Commenti e conclusioni. Emerge un'ampia variabilità fra protocolli di screening tra centri di screening e procedure di presa in carico dei neonati positivi tra centri di cura.

Possibili ricadute per ricerca e clinica. L'analisi di questi dati fornisce elementi per l'implementazione di programmi di screening e può costituire la base per la stesura di linee guida nazionali e internazionali.

11. DWI (Diffusion weighted Imaging) a new tool to assess inflammation in CF population with pulmonary exacerbation

Morana G

Servizio Fibrosi Cistica, Ospedale Ca' Foncello, Treviso
(FFC Project# 25/2011, new)



Giovanni Morana, primo da destra seduto, assieme al suo gruppo di ricerca

Background. Currently, no sensitive, radiation-free methods are available to localize and quantify lung inflammation in CF. DWI is a MR sequence promising to detect inflammation sites in the lung. DWI strictly depends on water movement in the extracellular compartment, that is altered in the presence of inflammation, as it has already been proven in various organs such as brain, liver and intestine.

Hypothesis and objectives. The hypothesis of the present study is that DWI can help in the differential diagnosis of pulmonary consolidations, frequently seen in patients with CF, thus giving useful information for patient management. The objective of the present study is to formally assess the correlation between DWI findings and lung disease in CF patients, both at the onset and after resolution of an acute exacerbation episode.

Methods. This study will enroll 30 consecutive adults with CF hospitalized for pulmonary exacerbations. Another group of 30 adult patients, appropriately matched for age and pulmonary function but without pulmonary exacerbations, will also be enrolled to obtain comparative data in stable conditions. Upon admission, patients will undergo all diagnostic procedures as per standard hospital protocol plus a 4-sequence MRI of approximately 20 minutes total duration to be repeated after 2 weeks. For each case, the next suitable match without pulmonary exacerbation will be invited to participate in the study, with the same MR protocol.

Expected results. We expect the lung DWI signal in patients to be high at the outset and to get lower after resolution of the exacerbation episode. We expect the DWI signal not to change in controls between the first and second examination.

Spin-off for research & clinical purposes. New method to evaluate inflammatory conditions of the lung, with a better differential diagnosis from other pulmonary consolidations. The present study may improve CF care by allowing better understanding of lung inflammation and by improving our diagnostic capabilities with imaging systems like NMR that does not expose patients to ionizing radiation.

DWI (diffusion weighted imaging), un nuovo metodo per valutare l'infiammazione nella popolazione FC con esacerbazione polmonare

Ragioni dello studio. Attualmente non sono disponibili tecniche sensibili non ionizzanti in grado di localizzare e quantificare l'infezione polmonare nei pazienti con FC. La DWI è una sequenza RM che appare promettente nella identificazione dei focolai infiammatori polmonari. La DWI è fortemente dipendente dal movimento delle molecole d'acqua nello spazio extra-cellulare, che è alterato nel corso della infiammazione, come è già stato dimostrato in altri organi, come l'encefalo, il fegato e l'intestino.

Ipotesi ed obiettivi. L'ipotesi del presente studio è che la DWI sia in grado di aiutare nella diagnosi differenziale degli addensamenti polmonari, frequentemente riscontrati nei Pazienti con FC, fornendo in tal modo informazioni utili alla loro gestione. L'obiettivo del presente studio è di valutare la correlazione tra le informazioni DWI e le patologie polmonari nei Pazienti FC, sia all'inizio di un episodio di esacerbazione che alla sua risoluzione clinica.

Metodi. Il presente studio prevede l'arruolamento di 30 Pazienti FC in grado di effettuare una indagine RM, ospedalizzati per un episodio di esacerbazione polmonare. Un altro gruppo di 30 Pazienti FC, equivalenti per età e funzione polmonare ma senza esacerbazione, verrà arruolato per ottenere informazioni comparative in condizioni stabili. Una volta arruolati, i pazienti effettueranno le procedure diagnostiche previste di routine più uno studio RM con protocollo di 4 sequenze (circa 20 minuti di indagine), che verrà ripetuto dopo 2 settimane. Per ogni paziente in fase acuta verrà selezionato un analogo paziente senza esacerbazione polmonare, cui verrà effettuato lo stesso protocollo RM.

Risultati attesi. Si prevede che il segnale DWI nei pazienti in fase acuta sia elevato alla indagine iniziale per abbassarsi alla risoluzione dell'episodio acuto, mentre nei pazienti non in fase acuta il segnale DWI non dovrebbe presentare significative variazioni tra le due indagini.

Possibili ricadute per ricerca e clinica. L'obiettivo dello studio è quello di poter validare una nuova metodica per la valutazione delle lesioni infiammatorie polmonari, tale da permettere una miglior gestione dei Pazienti FC grazie ad una miglior comprensione delle condizioni infiammatorie polmonari, migliorando le nostre capacità diagnostiche con sistemi di Imaging come la RM che non espongono il Paziente a radiazioni ionizzanti.

12. Testing human monocytes as a new tool for clinical and preclinical research in CF

Sorio C¹, Buffelli MR²

¹Dip. di Patologia e Diagnostica, Università degli Studi di Verona; ²Dip. Scienze Neurologiche, Neuropsicologiche, Morfologiche e Motorie, Università degli Studi di Verona (FFC Project #26/2011, new)



Claudio Sorio, secondo da destra, con i collaboratori coinvolti nel progetto

Background. Functional CFTR is currently directly evaluated in humans using two procedures: rectal biopsies followed by Ussing chamber analysis and nasal potential difference analysis (NPD). Both can be considered invasive, as they require either the removal of tissue (the former) or the use of small catheters in the nostrils (the latter). For this and other practical reasons, for both rectal biopsies and (although to a lesser extent) NPD analysis, the possibility to be repeated multiple times on the same subject, in particular younger subjects, is not practically feasible.

Hypothesis and objectives. Our published data confirm the possibility to apply a well described single-cell fluorescence imaging approach to human monocytes, thus making possible to evaluate CFTR functionality in blood cells. This approach permit to work on with a minimally invasive methodology (a venous blood drawn of 5-10 cc) facilitating the evaluation of CFTR activity in all the cases of relevance in research and clinic, possibly including the evaluation of drugs affecting CFTR function.

Methods. These monocytes will be analyzed for CFTR expression levels (western blot and flow cytometry), cell membrane depolarization assay and patch clamp, a highly complex technique that is capable to record the current from single channels present on the cell membrane and represents the gold standard in ion channel research.

Expected results. Our project is the extension of the FFC#05/2009 project and aims at the evaluation of the monocyte assay on a population of subjects affected by lung disease other than CF and the evaluation ex vivo, on monocyte of CF subjects for the first time, the response to drugs targeting the basic defect of CF, including VX809 and PTC124. It is important to underline the fact that we will have the unique opportunity to evaluate the response to a novel drug, PTC

124, now undergoing a multicentric phase 3 clinical trial in the CF Center in Verona on 15 subjects. Importantly, we have already obtained clearance from the local ethical commettee and from PTC Therapeutics that is organizing this multicenter clinical trial that has recognized the potential of this test for improving the efficacy of future clinical trials.

Spin-off for research & clinical purposes. Eventually, a faster access of the patients to new drugs might be envisaged as this application, once properly validated, might expedite the organization and evaluation of clinical trials based on the use of drugs targeting the CFTR defect.

Valutazione funzionale dei monociti umani come nuovo strumento per la ricerca clinica e preclinica in Fibrosi Cistica

Ragioni dello studio. L'attività funzionale del CFTR è oggi giorno direttamente valutata negli esseri umani usando due metodi: biopsie rettali mediante l'analisi con la camera di Ussing e l'analisi della differenza dei potenziali nasali (NPD). Entrambe possono essere considerate invasive in quanto richiedono o la rimozione di tessuto (il primo) o l'uso di sonde nella mucosa nasale (il secondo). Per queste ed altre ragioni pratiche, sia per le biopsie rettali che per l'analisi NPD, la possibilità di essere ripetute sullo stesso paziente, in particolare NPD in giovani soggetti, non è praticamente realizzabile.

Ipotesi e obiettivi. La possibilità di applicare un approccio di analisi su monociti umani, che abbiamo recentemente descritto,

renderebbe possibile valutare la funzionalità di CFTR nei monociti. La minima invasività di tale approccio (un prelievo di sangue venoso di 5-10 cc) potrebbe facilitare enormemente la valutazione dell'attività del CFTR in tutti i casi rilevanti in ricerca e in clinica, includendo la valutazione di farmaci che agiscono sulla funzione di CFTR. Il nostro progetto rappresenta una prosecuzione ed estensione del progetto FFC#05/2009, il cui scopo sarà la valutazione della risposta a farmaci (VX809 e PTC124), aventi come bersaglio il difetto base della FC, su monociti di soggetti affetti da tale patologia.

Metodi. I monociti dei pazienti saranno studiati per valutare l'espressione di CFTR e la funzione del canale anche mediante la tecnica "patch clamp", capace di registrare la corrente di singoli canali presenti sulla membrana cellulare e rappresenta il metodo d'elezione per lo studio dei canali ionici.

Risultati attesi. Avremo un'opportunità unica nel valutare la risposta a nuovi farmaci in quanto per il correttore PTC124 (Ataluren), è attualmente in corso la fase 3 di un Trial Clinico nel Centro FC di Verona in 15 pazienti. Abbiamo già ottenuto il permesso dal comitato etico locale e dalla ditta "PTC Therapeutics", che sta organizzando questo Trial Clinico internazionale multicentrico e che ha riconosciuto il potenziale di questo test al fine di migliorare anche l'efficienza di futuri studi clinici.

Possibili ricadute per ricerca e clinica. Tale tipologia di analisi effettuata su sangue periferico, superati i passaggi necessari per una sua più approfondita validazione, potrebbe accelerare significativamente l'accesso dei pazienti ai nuovi farmaci facilitando la valutazione dei test clinici basati sull'uso di farmaci correttori dei difetti di CFTR.

Airway inflammation: new pathways

Chairman: Giorgio Berton • Introductory overview: Giulio Cabrini

13. Mapping IL-8 gene transcription machinery in bronchial epithelial cells

Cabrini G¹, Gambari R², Pucci P³

¹ Lab. Patologia Molecolare, AOUI Verona; ²Dip. Biochimica e Biol. Molec. – Univ. Ferrara; ³CEINCE Biotecnologie Avanzate, Università "Federico II", Napoli
(FFC Project#18/2009, concluded)



Foto sopra, Giulio Cabrini, secondo da destra, con il suo gruppo.
Sotto, Pietro Pucci, secondo da sinistra, e il suo gruppo di ricerca

Background. The hallmark in CF airway pathology is a characteristic neutrophil (PMN)-dominated inflammation. PMNs, continuously activated by bacterial products, release Reactive Oxygen Species and proteases, that are the major contributors of CF lung tissue injury. Broad-spectrum anti-inflammatory drugs showed major limitation in intervening on the chronic tissue damage in CF lungs. Reduction of PMN infiltrates is now considered a CF-specific anti-inflammatory target. However, the precise mechanisms of transcription of Interleukin 8 (IL-8), the main chemokine released by epithelial respiratory cells to recruit PMNs in CF lungs, are not fully understood, thus limiting the possibility of tailoring novel well-targeted anti-inflammatory molecules.

Objectives. The objective of this research project was to fully explore the transcriptional machinery of IL-8 in respiratory epithelial cells exposed to pro-inflammatory stimuli specific of CF lung disease.

Methods. The role of the different nuclear transcription factors and the major transmembrane signals leading to the activation of the multimeric transcriptional complex of IL-8 gene has been investigated. A transcriptomic approach has been expanded from cellular to molecular technologies. During the project we studied the potential role of nuclear tran-

scription factors, that are the proteins that bind directly to the regulatory elements of the IL-8 gene (the IL-8 gene promoter).

Main results. In bronchial epithelial cells, *P. aeruginosa* increased the basal phosphorylation of the ERK1/2 pathway components RSK1/2, MSK2, of the p38 MAPK pathway components p38a/d/g and HSP27. The involvement of these kinases in the expression of IL-8 gene was confirmed with pharmacological inhibitors of ERK1/2, RSK, p38 and HSP27 both at transcription and secretion levels. Transfection of TF decoy oligodeoxynucleotides (ODNs), designed to interfere with the interaction of the TFs NF- κ B, NF-IL6, AP-1, CREB and CHOP with the corresponding consensus sequences identified in the IL-8 promoter, reduced the *P. aeruginosa*-dependent transcription of IL-8, suggesting their participation in the transcriptional machinery. Stimulation of IB3-1 cells with IL-1 β led to a similar pattern of activation whereas the pattern of phosphoproteins and of TFs modulated by TNF-alpha differentiated sharply.

Comments & Conclusions. In conclusion, we widened and consolidated the present knowledge on the molecular components regulating the expression of IL-8.

Spin-off for research & clinical purposes. This project may pave the way to the application of pharmacological modulators directed towards the kinases and transcription factors identified here, to regulate the excessive inflammatory response, which is a key process leading to the deterioration of lung tissue in patients affected by cystic fibrosis.

Regolazione trascrizionale di interleuchina 8 in cellule epiteliali respiratorie

Ragioni dello studio. La caratteristica distintiva della malattia polmonare dei pazienti affetti da fibrosi cistica è una infiammazione cronica dominata dalla presenza di una grande quantità di neutrofili polimorfonucleati (PMN). I neutrofili nei bronchi e bronchioli dei pazienti sono continuamente attivati da prodotti della degradazione dei batteri e rilasciano radicali tossici dell'ossigeno ed enzimi che degradano le proteine del tessuto polmonare (proteasi), essendo i neutrofili i principali responsabili, assieme ai batteri, del danno progressivo dei polmoni. Farmaci anti-infiammatori ad ampio spettro, pur ottenendo un parziale effetto migliorativo, hanno mostrato grossi limiti nel rallentare il danneggiamento polmonare. Attualmente la riduzione della quantità di PMN nei polmoni dei pazienti è considerato uno dei bersagli rilevanti per la terapia anti-infiammatoria nella fibrosi cistica.

A questo riguardo, il preciso meccanismo di espressione della interleuchina 8 (IL-8), la principale molecola che guida il reclutamento (chemiotassi) dei PMN dal circolo alla mucosa bronchiale, non è sufficientemente conosciuto, limitando quindi la possibilità di disegnare nuove molecole anti-infiammatorie, ben indirizzate a questo meccanismo peculiare della infiammazione polmonare in fibrosi cistica.

L'obiettivo di questo progetto di ricerca è stato di approfondire estesamente il meccanismo della espressione di IL-8 nelle cellule epiteliali respiratorie esposte a stimoli pro-infiammatori tipici della malattia polmonare nella fibrosi cistica.

Nel corso del progetto biennale è stato studiato il ruolo di fattori di trascrizione nucleare, ossia quelle proteine che, legandosi direttamente alle strutture regolatrici della espressione del gene della IL-8 (promotore del gene), inducono la sua espressione.

Nelle cellule epiteliali bronchiali, che rivestono la superficie delle vie aeree, coltivate in vitro ed esposte al patogeno tipicamente coinvolto nella infezione delle vie aeree in fibrosi cistica, *Pseudomonas aeruginosa*. Nelle cellule che rivestono l'epitelio bron-

chiale, che hanno un ruolo fondamentale nel sostenere la risposta infiammatoria polmonare, *P. aeruginosa* aumenta la fosforilazione basale di componenti della via attivatoria di MAP kinasi ERK1/2, RSK1/2, MSK2, e di p38, quali p38 $\alpha/\delta/\gamma$ e HSP27.

Il coinvolgimento di queste kinasi sulla espressione di IL-8 è stata confermata con inibitori farmacologici, sia a livello di trascrizione che di secrezione proteica. La trasfazione di oligodeossinucleotidi "esca" per fattori di trascrizione nucleare NF-kB, NF-IL6, AP-1, CREB e CHOP, disegnati in modo da interferire con il legame di questi fattori di trascrizione con le corrispondenti sequenze di consenso nel promotore del gene IL-8, hanno ridotto significativamente la trascrizione e secrezione di IL-8, indicando il loro coinvolgimento nel complesso trascrizionale. L'esposizione delle cellule epiteliali bronchiali a IL-1beta hanno portato ad un simile modello attivatorio mentre lo stimolo con TNF-alfa si differenzia più marcatamente. In conclusione, abbiamo ampliato e consolidato le attuali conoscenze sui componenti molecolari che regolano l'espressione e secrezione della chemochina IL-8 da parte delle cellule epiteliali bronchiali.

Questo progetto apre quindi la strada alla applicazione di modulatori farmacologici diretti verso le protein kinasi ed i fattori di trascrizione nucleare qui identificati, allo scopo di regolare la eccessiva risposta infiammatoria, uno dei processi critici che porta al progressivo deterioramento del tessuto polmonare dei pazienti affetti da fibrosi cistica.

14. Genetic and pharmacological validation of PI3K γ as a drug-target for the treatment of airway inflammation in CF

De Rose V¹, Hirsch E², Döring G³

¹Dipart. Scienze cliniche e biologiche – Università di Torino;

²Centro di biotecnologia molecolare – Università di Torino;

³Institut for General and Environmental Hygiene – University of Tübingen

(FFC Project#20/2009, concluded)



Virginia De Rose con Emilio Hirsch

Background. Progressive lung disease, characterized by chronic airway infection and inflammation, is the major cause of morbidity and mortality in cystic fibrosis (CF). Neutrophil-dominated airway inflammation has been implicated as a key feature of progressive lung damage. Thus, reducing airway inflammation is a major goal in CF to prevent lung damage and maintain lung function. Traditional therapeutic strategies which aim to reduce the excessive inflammatory response to infection in the airways of CF patients have been largely unsuccessful.

Objectives. Aim of our study was to assess the role of the kinase PI3K γ , which mediates leukocyte migration and activation, in mouse models of CF and to evaluate the efficacy and safety of a PI3K γ inhibitor as an anti-inflammatory strategy in patients with CF.

Methods. β ENaC overexpressing mice and CF-FAB mice were backcrossed with PI3K γ -/- mice. Tissue damage was

assessed by histology and inflammatory cell number was evaluated in bronchoalveolar lavage (BAL). Neutrophil accumulation in the airway lumen was also assessed by indirect immunofluorescence in a small number of animals. Furthermore, we assessed the effect of a specific PI3K γ inhibitor (AS-605240) on inflammatory cell number in BAL.

Main results. We have shown that deletion of PI3K γ in β ENaCtg mice induces a reduction of emphysema and a decrease of neutrophil number into the airway lumen and in bronchoalveolar lavage. We have also shown that treatment of β ENaC mice with a PI3K γ inhibitor decreases the number of neutrophils in BAL, reproducing the effect observed with genetic deletion of the enzyme.

Comments and conclusions. Studies are still ongoing to confirm the effect of the PI3K γ inhibitor in CF-FAB mice, as well as to assess its effect on susceptibility to *P. aeruginosa* infection; in fact, while our study suggests that genetic and pharmacological inhibition of PI3K γ might interfere with excessive neutrophil recruitment into the airway lumen in CF, it also raises the concern that a reduced neutrophil number in the airways might facilitate bacterial infection.

Spin-off for research & clinical purposes. By assessing the effect of the PI3K γ inhibitor on susceptibility to *P. aeruginosa* infection, our study will provide an answer to the important question with regard to potential adverse effects of this molecule in the context of CF.

Validazione genetica e farmacologica di PI3K come target per il trattamento dell'infiammazione delle vie aeree nella fibrosi cistica

Ragioni dello studio. Nella fibrosi cistica (FC) la malattia polmonare, caratterizzata da infezione e infiammazione bronchiale cronica, è in larga misura responsabile della morbilità e mortalità associate alla malattia. Il processo infiammatorio a livello delle vie aeree, ed in particolare il marcato e persistente reclutamento di neutrofili, contribuisce in maniera determinante al danno polmonare.

Obiettivi. In questo progetto ci siamo proposti di studiare il ruolo di PI3K γ kinasi coinvolta nel reclutamento e nell'attivazione dei leucociti, in modelli murini di FC e il potenziale impiego di un inibitore specifico di PI3K γ come terapia antiinfiammatoria nella malattia, con l'intento finale di definire approcci terapeutici innovativi, in grado di superare le limitazioni degli attuali trattamenti antiinfiammatori.

A questo scopo abbiamo generato due modelli murini di FC geneticamente privati di PI3K γ (β ENaCtg/PI3K γ KO e CF-FAB/ PI3K γ KO) e abbiamo valutato se la mancanza dell'enzima era in grado di ridurre il reclutamento delle cellule infiammatorie nelle vie aeree ed il danno polmonare. Inoltre, abbiamo valutato l'effetto di un inibitore di PI3K γ sul processo infiammatorio ed è in corso di valutazione l'effetto sulla suscettibilità all'infezione da *P. aeruginosa* nei modelli murini di FC.

Principali risultati. Abbiamo evidenziato che, in assenza di PI3K γ , i topi β ENaCtg presentano una riduzione delle alterazioni di tipo enfisematoso nel parenchima polmonare ed un ridotto numero di neutrofili nel lume delle vie aeree. Abbiamo inoltre osservato che la somministrazione di un inibitore farmacologico specifico di PI3K γ era in grado di ridurre il numero dei neutrofili nel lavaggio broncoalveolare dei topi fino ad ora trattati (β ENaCtg).

Commenti e conclusioni. Sono ancora in corso ulteriori esperimenti per confermare l'effetto dell'inibitore dell'enzima PI3K γ sull'altro modello murino di FC (topi CF-FAB) e soprattutto per valutare l'effetto dell'inibitore sulla suscettibilità all'infezione da *P. aeruginosa*. Infatti, se da un lato i risultati ottenuti suggeriscono che la mancanza o l'inibizione dell'enzima riduce il processo infiammatorio neutrofilico nelle vie aeree, dall'altro pongono il quesito se questo effetto possa favorire la suscettibilità all'infezione batterica.

Ricadute per la ricerca e prospettive cliniche. La valutazione dell'effetto dell'inibitore sulla suscettibilità all'infezione da *P. aeruginosa* darà anche una risposta in merito a tale importante quesito relativo agli eventuali effetti avversi di tale molecola in patologie quali la fibrosi cistica.

15. Role of CFTR-Connexin interaction on PGE2 signaling and inflammation: implication for cystic fibrosis

Chanson M¹, Dechechchi MC², Losa D¹

¹Laboratoire d'Investigation Clinique III, Depart. de Pédiatrie, Hôpitaux Universitaires et Faculté de Médecine de Genève, Suisse; ²Lab. di Patologia Molecolare e Lab. di Chimica Clinica ed Ematologia, Az. Ospedaliera-Universitaria di Verona (FFC Project#19/2009, concluded)



Marc Chanson, terzo da sinistra, con il gruppo di ricerca

Background. Gap junctions are tunnel-like channels between cells in contact. These tunnels allow the rapid propagation of signals between cells, a process referred to as gap junctional intercellular communication (GJIC). Gap junctions are present between airway epithelial cells and they have been involved in the regulation of cilia beating. Whether these channels play a role in glandular secreting cells, which are also targets of cystic fibrosis (CF), is not known.

Objectives. In this project, we sought to determine if gap junction channels were involved in glandular airway epithelial cells response to *Pseudomonas aeruginosa* infection.

Methods. We used the glandular airway epithelial Calu-3 cell line that form a polarized epithelium when grown on Transwell inserts. Under these conditions, Calu-3 cells express the gap junction protein connexin43 (Cx43) as well as CFTR. We combined electrophysiological, biochemical, imaging and molecular biology approaches to monitor the response of Calu-3 cells to PAO1 (a *Pseudomonas aeruginosa* laboratory strain) infection.

Main results. We observed that Cx43 expression and GJIC increased in response to PAO1 infection. These effects were mediated by activation of the pathogen-specific receptor Toll-like 5 by bacteria's flagellin. We also identified that Cx43 expression was dependent on increased transcription of the Cx43 gene and activation of the c-Jun N-terminal kinase (JNK). CFTR-dependent chloride secretion is a key transport mechanism for airway surface liquid (ASL) volume regulation. We found that open gap junctions are critical for the propagation of signals activating CFTR and enhancing ASL volume.

Comments & Conclusions. The results indicate that gap junctions represent a defense mechanism of the airway epithelium against *P. aeruginosa* infection by activating CFTR and fluid transport. Our next goal is to determine if modulation of GJIC also affects the inflammatory response of Calu-3 cells to *P. aeruginosa* infection. To this end, we have developed new tools to silence Cx43 in these polarized cells. In addition, we will silence CFTR to determine if the regulation of Cx43 by PAO1 is altered in CF-like conditions.

Spin-off for research & clinical purposes. Connexins represent novel pharmacological targets in inflammatory pathologies. A better understanding of the role of GJIC in airway epithelial cell function may allow developing strategies to modulate the innate immune response to pathogen infection in diseases like CF.

Ruolo della interazioni CFTR-connessina nelle vie di segnale di PGE2 e nella infiammazione: implicazioni per la fibrosi cistica

Ragioni dello studio. Le connessine formano giunzioni gap (GJ – gap junction), canali simili a tunnel che collegano due cellule adiacenti. Questi canali consentono un rapido scambio di segnali tra cellule, un processo definito comunicazione intercellulare mediata da GJ. Le GJ sono presenti nelle cellule epiteliali bronchiali e sono coinvolte nella regolazione del battito ciliare. Tuttavia, non è chiaro quale sia il loro ruolo nelle cellule bronchiali ghiandolari, che producono muco e hanno una proteina CFTR alterata nei pazienti con fibrosi cistica (FC).

Obiettivi. Lo scopo di questo progetto era definire il ruolo delle GJ nei meccanismi di difesa delle cellule bronchiali ghiandolari contro l'infezione da *Pseudomonas aeruginosa* (Pa).

Metodi. Per riprodurre in vitro le stesse caratteristiche delle cellule bronchiali ghiandolari, abbiamo utilizzato la linea cellulare Calu-3, che in coltura esprime la connessina43 (Cx43) e il CFTR. Combinando tecniche di elettrofisiologia, microscopia, biochimica e biologia molecolare, abbiamo monitorato la risposta delle cellule all'infezione da PAO1, un ceppo di Pa.

Risultati principali. In risposta all'infezione di PAO1, abbiamo osservato un aumento dell'espressione della Cx43 e un aumento della comunicazione cellulare mediata da GJ. Questi effetti sono dovuti al recettore per patogeni Toll-like 5, che riconosce la flagellina dei batteri. L'espressione della Cx43 dipendeva da un incremento della trascrizione del gene per la Cx43 ed era modulata dalla protein chinasi JNK. Inoltre, abbiamo scoperto che le GJ permettono la propagazione di segnali che attivano il CFTR ed aumentano il volume del liquido di superficie delle vie aeree, entrambi importanti per eliminare i batteri dai polmoni.

Commenti & Conclusioni. I risultati indicano che le GJ partecipano alla difesa delle vie aeree contro l'infezione da Pa attivando il CFTR e l'idratazione del muco. L'obiettivo successivo è determinare se l'inibizione delle GJ influisce sulla risposta infiammatoria delle cellule Calu-3 all'infezione. A questo scopo, stiamo sviluppando dei nuovi metodi per inibire l'espressione della Cx43 in queste cellule; con gli stessi strumenti cercheremo di ottenere cellule che non esprimano il CFTR per studiare se, in condizioni simili alla patologia CF, le GJ sono alterate.

Ricadute per la ricerca & prospettive cliniche. Le connessine rappresentano un nuovo target farmacologico per le patologie infiammatorie. Per questo, comprendere il ruolo delle GJ nell'epiteli respiratorio potrebbe portare a sviluppare nuove strategie per ridurre l'infiammazione e l'infezione nei pazienti FC.

16. Mechanisms of bactericidal activity of human macrophages and the influence of CFTR mutations

Del Porto P¹, Ascenziioni F², Quattrucci S³

¹Dip. Biol. Cellulare e dello Sviluppo – Univ. La Sapienza, Roma;

²Centro FC Regione Lazio, Dip. Pediatria, Univ. La Sapienza, Roma
(FFC Project#21/2009, concluded)



Paola Del Porto

Background. Chronic inflammation of the lung, as a consequence of persistent bacterial infections by several opportunistic pathogens, represents the main cause of morbidity and mortality in patients affected by cystic fibrosis (CF). At present the inability of CF patients to eradicate lung bacterial infections have been mainly ascribed to dysfunctions in the defence mechanisms mediated by airway epithelial cells. More recently the involvement of CFTR in the activity of immune cells, including macrophages has emerged. Indeed, in Cfr-deficient mice defective bactericidal activity of macrophages has been reported and it has been associated with impairments of either the oxidative or the non-oxidative mechanisms of bacterial killing.

Objectives. Based on the hypothesis that dysfunctional CFTR alters the bactericidal activity of macrophages we compared: i) the killing capacity of human monocyte derived and lung macrophages against *Pseudomonas aeruginosa* and ii) the contribution of reactive oxygen species in the bacterial killing.

Methods. In human monocyte-derived and lung macrophages, intracellular bacterial survival and the contribution of oxidative mechanisms were assessed by antibiotic protection assay and ROS inhibition.

Main results. Enumeration of surviving bacteria within monocyte-derived cells and lung macrophages revealed that the percentages of bacteria recovered from CF cells were significantly higher than those from non-CF samples confirming the reduced ability of human CF macrophages to kill *P. aeruginosa*. Additionally, inhibition of ROS production in non-CF MDM and lung macrophages infected by *P. aeruginosa*, resulted in a significant increase in the survival of intracellular bacteria. Similar results were obtained when ROS production was inhibited in CF samples.

Comments & Conclusion. Our results support the hypothesis that CFTR, directly contributes to microbicidal functions of phagocytes. In addition they demonstrate that the oxidative mechanisms contribute to the elimination of the intracellular bacteria in non-CF as well as in CF cells, at least under the experimental conditions we have tested.

Spin-off for research & clinical purposes. The elucidation of the molecular mechanisms involved in the bactericidal activity of human macrophages might reveal new therapeutic targets to improve the immune defence of CF patients.

Meccanismi dell'attività battericida dei macrofagi umani e ruolo delle mutazioni di CFTR

Ragioni dello studio. L'inflammazione cronica delle vie aeree causata da infezioni persistenti da parte di patogeni opportunistici, rappresenta una delle maggiori cause di malattia e mortalità nei pazienti affetti da fibrosi cistica. Finora le cause della ridotta capacità dei pazienti CF di eradicare le infezioni batteriche sono state attribuite a disfunzioni delle difese medicate dalle cellule epiteliali. Più recentemente il CFTR è stato coinvolto anche nei meccanismi di difesa mediati dai macrofagi. Infatti nel modello murino l'assenza di CFTR determina una ridotta capacità battericida dei macrofagi alveolari. Tale difetto è stato associato ad alterazione dei meccanismi di uccisione dei batteri di tipo ossidativo e/o non ossidativo.

Obiettivi. Partendo dall'ipotesi che disfunzioni di CFTR possono alterare la capacità battericida dei macrofagi umani, abbiamo analizzato: i) la capacità dei macrofagi umani derivati dai monociti o isolati dal polmone di uccidere *P. aeruginosa* e ii) il contributo delle specie reattive dell'ossigeno nell'uccisione del batterio.

Metodi. Attraverso saggi di protezione con l'antibiotico e l'utilizzo di inibitori dei ROS è stata valutata la sopravvivenza di *P. aeruginosa* nei macrofagi derivati dai monociti o polmonari.

Principali risultati. L'analisi della sopravvivenza dei batteri in entrambi i tipi di macrofagi ha dimostrato che una percentuale significativamente più elevata di batteri sopravviveva all'interno delle cellule CF. Inoltre esperimenti di inibizione della produ-

zione dei ROS nei macrofagi umani di controllo derivati dai monociti o polmonari infettati da *P. aeruginosa* hanno dimostrato un significativo aumento della sopravvivenza batterica. Simili risultati sono stati ottenuti inibendo la produzione di ROS nei macrofagi CF.

Commenti e conclusioni. I nostri dati supportano l'ipotesi che il CFTR contribuisce alle funzioni microbicida dei macrofagi e dimostrano che i meccanismi ossidativi, coinvolti nella eliminazione di *P. aeruginosa*, sono preservati nelle cellule CF.

Possibili ricadute per ricerca e clinica. La definizione dei meccanismi molecolari coinvolti nell'attività battericida dei macrofagi umani potrebbe contribuire all'identificazione di nuovi bersagli terapeutici.

17. Platelet-leukocyte interactions in cystic fibrosis inflammation: a window for therapeutical opportunities

Romano M¹, Evangelista V², Collura M³

¹Dip. Scienze Biomediche, Lab. Med. Molecolare – Univ. G. D'Annunzio - Chieti; ²Dip. Farmacol. Translaz. – Consorzio Mario Negri Sud, Chieti; ³Centro Regionale FC – Osp. G. di Cristina, Palermo
(FFC Project#22/2010, in progress)



Mario Romano, al centro, con il suo gruppo di ricerca

Background. Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) has been unveiled in leukocytes, indicating that these cells may be primarily affected by the molecular defect of CF, which may switch their phenotype to a pro-inflammatory profile. Interactions of these cells with vascular endothelium and platelets, which also express CFTR and, therefore, may be dysfunctional in CF, can be altered in CF. Targeting these pathways may represent an alternative or complementary approach to combat CF inflammation.

Objectives. 1. To define the impact of CFTR dysfunction on: a) Leukocyte and endothelial functions; b) Leukocyte signaling. 2. To evaluate the pharmacological modulation of deranged leukocyte and endothelial activities in CF.

Methods. Leukocyte/endothelium/platelet interactions were examined in a flow system apparatus, which monitors in real time a number of parameters including morphology, cell blebbing, number of cells recruited for unit of surface, rate of cell movement, shear resistance of the adherent cells, etc. Protein expression and phosphorylation was analyzed by western blotting. Neutrophil traps (NETs) were analyzed by confocal microscopy and spectrofluorimetry following DNase treatment. Endothelial nitric oxide (NO) synthase activity was evaluated by conversion of radiolabeled arginine into citrulline.

Preliminary results. We have obtained direct evidence that human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) ex-

press a functional CFTR. CFTR blockade determined dramatic morphological changes of these cells under flow, characterized by detachment, retraction, blebbing. These changes were corrected by phosphodiesterase 4 (PDE4) inhibitors. We also found that CFTR inhibition suppressed NO production by HUVEC. CFTR inhibition in polymorpho-nuclear neutrophils (PMN) upregulated the expression of the activated form of Mac-1. Moreover, it slightly enhanced NETs formation. Both events were completely corrected by PDE4 inhibition.

Comments & Conclusion. We observed that a number of key pathways of the immune inflammatory and anti-microbial response involving endothelial cells and leukocytes are regulated by CFTR and, therefore, likely to be deranged in CF. These observations, together with our previous studies with platelets (Mattoscio et al., FASEB J., 2010) and with lymphocyte subpopulations (manuscript in preparation), support the view that the molecular defect of CF affects, in addition to respiratory cells, immuno-inflammatory cells and that the correction of these defects may be beneficial to combat CF inflammation. In this respect, results with PDE4 inhibitors are encouraging and await validation in preclinical testing.

Spin-off for research & clinical purposes. PDE4 inhibitors are already being used in COPD. Our studies are finalized to determine whether these drugs may be helpful to combat CF inflammation.

Interazioni tra piastrine e leucociti nell'infiammazione della fibrosi cistica: possibili sbocchi terapeutici

Ragioni dello studio. Il CFTR, gene responsabile della fibrosi cistica (FC) è espresso dai leucociti che quindi possono essere colpiti direttamente dal difetto molecolare della FC che né può alterare il fenotipo in senso pro-infiammatorio. Le interazioni di queste cellule con l'endotelio vascolare e le piastrine, anch'esse esprimenti il CFTR e quindi potenzialmente disfunzionali nella FC, possono essere anormali nella FC. La correzione di questi meccanismi può rappresentare un approccio complementare e/o alternativo per combattere l'infiammazione nella FC.

Obiettivi. 1. Definire l'impatto della disfunzione del CFTR su:

a) attività di leucociti e cellule endoteliali b) signaling leucocitario.
2. Correggere farmacologicamente le attività di endotelio e leucociti alterate nella FC.

Metodi. Le interazioni tra leucociti, endotelio e piastrine sono state studiate in un sistema a flusso, in grado di monitorare in tempo reale un numero di parametri quali morfologia, rilascio di frammenti cellulari, numero di cellule reclutate per unità di superficie, velocità di movimento, forza di adesione etc. Espressione e fosforilazione proteica sono state analizzate mediante western blotting. Le trappole di DNA (NETs) rilasciate dai leucociti neutrofili sono state esaminate mediante microscopia confocale e fluorimetria dopo trattamento con DNAsi. La produzione di ossido nitrico da parte dell'endotelio è stata valutata misurando la conversione di arginina radiomarcata in citrullina.

Risultati preliminari. Abbiamo osservato che le cellule endoteliali da cordoni ombelicali umani (HUVEC) esprimono un CFTR funzionale, il cui blocco determina notevoli variazioni morfologiche di queste cellule sotto flusso, caratterizzate da retrazione, distacco, rilascio di frammenti cellulari. Queste variazioni sono state corrette da inibitori delle fosfodiesterasi di tipo 4 (PDE4). Abbiamo inoltre osservato che l'inibizione del CFTR sopprime la produzione di ossido nitrico da parte delle HUVEC. Nei leucociti neutrofili, l'inibizione del CFTR stimola l'espressione della forma attivata della molecola di adesione Mac-1. Inoltre, aumenta la formazione di NETs. Entrambi questi eventi sono stati completamente corretti da inibitori delle fosfodiesterasi.

Commenti e conclusioni. Abbiamo osservato che alcuni meccanismi chiave della risposta immuno-infiammatoria e antimicrobica che coinvolgono cellule endoteliali e leucociti sono regolati dal CFTR e quindi sono probabilmente alterati nella FC. Queste osservazioni insieme ai nostri studi precedenti sulle piastrine (Mattoscio et al., FASEB J., 2010) e con le sottopopolazioni linfocitarie (manoscritto in preparazione), supportano il concetto che il difetto molecolare della FC colpisce, oltre alle cellule epiteliali respiratorie, cellule della risposta immuno-infiammatoria e che la correzione di questi difetti può essere utile nella lotta contro l'infiammazione nella FC. A questo riguardo, i nostri risultati con i gli inibitori delle PDE4 sono incoraggianti e attendono convalida in studi preclinici.

Possibili ricadute per ricerca e clinica. Gli inibitori delle PDE4 sono già utilizzati in clinica per la broncopatia cronica ostruttiva. I nostri studi sono finalizzati a determinare se questi farmaci possono essere anche utili per combattere l'infiammazione respiratoria nella FC.

Correcting the CF basic defect

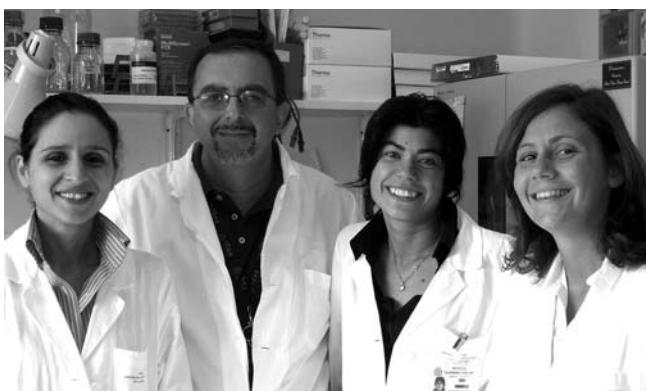
Chairman: Antonio Cao • Introductory overview: Luis Galietta

18. Development of small molecules to correct the defective chloride transport in cystic fibrosis

Galietta JLV¹, Millo E², Mazzei M³

¹Lab. Genetica Molecolare – Istituto G. Gaslini, Genova;

²Dipart. Medicina Sperimentale – Lab. Biochimica – Università degli Studi, Genova; ³Dipart. di Scienze Farmaceutiche – Università degli Studi, Genova
(FFC Project#2/2009, concluded)



Luis Galietta e il suo gruppo di ricerca

Background. Cystic fibrosis (CF) is caused by mutations affecting CFTR protein, which works in epithelial cells as a channel for chloride ions. In the lungs, CFTR loss of function causes dehydration of airway surface and therefore colonization by bacteria that become resistant to antibiotic treatment. There are various types of CF mutations that impair CFTR function with different mechanisms. Rescue of mutant CFTR activity may require the development of mutation-specific drugs.

Objectives. In our project, we have considered two different targets to develop possible drugs: mutant CFTR and the TMEM16A chloride channel protein.

Methods. We have used functional and biochemical assays to study mutant CFTR and TMEM16A protein in stable transfected cell lines and primary cultures of bronchial epithelial cells from CF patients.

Main results. 1) identification and characterization of aminoarylthiazoles as dual-acting compounds, i.e. molecules correcting both the trafficking and gating defects caused by ΔF508 mutation. 2) Identification and evaluation of 1,4-dihydropyridines (DHPs) with high selectivity for mutant CFTR as potentiatore. 3) Characterization of TMEM16A protein in epithelial cells: regulation by alternative splicing and pharmacological sensitivity. 4) Characterization of mechanisms underlying rescue of ΔF508-CFTR by different maneuvers.

Comments & Conclusions. Our research has identified a possible strategy to address the trafficking and gating defects caused by ΔF508 mutation using a single molecule.

However, the extent of maximal ΔF508 correction reached with dual-acting molecules or “conventional” correctors is still suboptimal. Rescue of ΔF508-CFTR appears as a difficult goal due to the existence of multiple checkpoints leading to early mutant protein degradation. Therefore, elucidation of the molecular mechanisms responsible for ΔF508-CFTR mistrafficking will be important to design more effective treatments.

Spin-off for research & clinical purposes. Aminoarylthiazoles and 1,4-DHPs represent promising classes of compounds to recover the activity of mutant CFTR. On the other hand, the pharmacological stimulation of TMEM16A, a main component of calcium-activated chloride channels, may be a strategy to correct the chloride transport defect in all CF patients.

Sviluppo di nuove molecole per la correzione del difetto di trasporto di cloruro nella fibrosi cistica

Ragioni dello studio. La fibrosi cistica (FC) è causata da mutazioni a carico della proteina CFTR, la cui funzione nelle cellule epiteliali è quella di trasportare ioni cloruro. Nei polmoni, la perdita di funzione della proteina CFTR causa la disidratazione della superficie delle vie aeree con conseguente colonizzazione batterica. Esistono varie classi di mutazioni FC che provocano la perdita di funzione della proteina CFTR con meccanismi diversi. Il recupero della funzione della proteina mutata può richiedere lo sviluppo di farmaci specifici per ciascuna classe di mutazioni.

Obiettivi. Per il possibile sviluppo di una strategia farmacologica rivolta al recupero del trasporto di cloruro abbiamo considerato due bersagli: la proteina CFTR mutata e la proteina TMEM16A.

Metodi. Abbiamo utilizzato diversi tipi di saggi, sia funzionali sia biochimici, per lo studio delle proteine CFTR e TMEM16A in linee cellulari e in colture primarie di pazienti FC.

Principali risultati. 1) Identificazione e caratterizzazione di aminoariltiazoli quali composti con duplice azione sulla mutazione ΔF508. Tali composti avrebbero sia attività di correttore sia attività di potenziatore. 2) Identificazione e valutazione di 1,4-diidropiridine con alta selettività verso la proteina CFTR come potenziatori. 3) Caratterizzazione della proteina TMEM16A in cellule epiteliali: regolazione mediante “splicing” alternativo e sensibilità farmacologica. 4) Caratterizzazione dei meccanismi responsabili della correzione del difetto di maturazione causato dalla mutazione ΔF508.

Commenti e conclusioni. La nostra ricerca ha identificato una possibile strategia per correggere, con una singola molecola, il duplice difetto causato dalla mutazione ΔF508, sostituendo quindi correttori e potenziatori. Comunque il livello massimo di maturazione della proteina ΔF508 raggiungibile con un singolo composto non è ancora ottimale. Questo può essere dovuto all'esistenza di diversi sistemi di controllo cellulari responsabili della degradazione precoce della proteina CFTR mutata. Una migliore comprensione di questi meccanismi potrà essere utile per lo sviluppo di trattamenti dotati di maggiore efficacia.

Possibili ricadute per ricerca e clinica. Gli aminoariltiazoli e le 1,4-diidropiridine costituiscono due famiglie di composti interessanti per il recupero di funzione della proteina CFTR mutata. Una strategia alternativa, di cui potrebbero beneficiare tutti i pazienti FC, sarebbe la stimolazione della proteina TMEM16A, che appare il componente principale dei canali del cloruro attivati da calcio.

19. Manipulating the endoplasmic reticulum export machinery allows DF508-CFTR trafficking to the plasma membrane: a new set of potential drug targets for cystic fibrosis

Luini A¹, Monti M²

¹TIGEM Telethon Institute of Genetics and Medicine, Napoli;

²CEINGE Bioteconomie avanzate s.c.a.r.l, Napoli

(FFC Project#4/2010, concluded)



Alberto Luini, quarto da sinistra, con i collaboratori del laboratorio coinvolti nel progetto

Background. The most common mutation in cystic fibrosis is a deletion of a phenylalanine in position 508 of the protein CFTR (DF508-CFTR). The D508 mutant is unable to fold properly and is retained, and then degraded, in the endoplasmic reticulum (ER). Only a small fraction of the CFTR is exported out of the ER and reaches the plasma membrane, where it normally functions as a channel. The key problem here is therefore a folding/trafficking defect of DF508-CFTR.

Objectives. The two main goals of this project were as follows: a) to analyse the mechanisms that control the ER retention and degradation, as well as the export, of the DF508-CFTR mutant; and, b) to use this analysis to identify potential pharmacological targets that might help to correct the folding/trafficking defect of DF508-CFTR.

Methods. We have used three approaches: a) we have analysed the effects of manipulations of the COPII machinery on ER retention or export of DF508-CFTR; b) we have analysed the interactors of DF508-CFTR; and, c) we have studied the molecular pathways involved in the regulation of ER retention and export mechanisms for DF508-CFTR.

Main Results. Regarding the COPII manipulations, we find that the depletion of components of the COPII machinery, which is normally considered essential for export of secretory proteins, can result in a paradoxical effect, namely, the exit of DF508-CFTR from the ER and in its arrival to the plasma membrane. The features of this effect suggest that it might be due to a transport mechanism called unconventional secretion. We are continuing the characterization of this potentially useful corrective effect. Concerning the interactors of DF508-CFTR, we have used immunoprecipitation and mass spectrometry to identify these interactors under normal conditions and under conditions of interest, such as treatments with drugs known to induce a partial correction of the folding/trafficking defect. We find that most of the interactors are proteins involved in protein folding, as expected; some, however, are unexpected, and might be of great interest in our project. Finally, with regard to the regulatory machinery

that might facilitate correction, we have used bioinformatic approaches to indentify molecular networks that might be involved in the correction of the DF508-CFTR pathological behavior. We have then focussed on one of these networks, a kinase cascade, and found that specific chemical blockers of this cascade partially corrects the folding/trafficking defect of DF508-CFTR.

Comments and conclusions. In brief, we report a) evidence that CFTR may move via unconventional transport pathways, and b) that regulatory networks exist that may induce the CFTR mutant protein to reach the cell surface.

Spin-off for research & clinical purposes. We plan to characterize the above kinase inhibitors as potential therapeutic agents in cystic fibrosis and in other conformational diseases.

Identificazione di possibili bersagli farmacologici per la correzione del difetto della proteina mutante DF508-CFTR responsabile della fibrosi cistica: i meccanismi di degradazione e trasporto intracellulare delle proteine

Ragioni dello studio. La mutazione genetica più comune nella fibrosi cistica è la perdita di un aminoacido in una proteina, detta CFTR, in posizione 508 (DF508-CFTR). La proteina mutata è incapace di assumere una giusta conformazione e viene intrappolata e degradata nell'organello dove è prodotta, il reticolo endoplasmico (ER), invece di essere portata verso la superficie cellulare dove normalmente funziona come canale ionico. La malattia è quindi dovuta a un difetto di conformazione e poi di trasporto intracellulare della proteina mutata.

Obiettivi. La nostra ricerca ha avuto due scopi: 1. analizzare i meccanismi che inducono la degradazione della proteina mutata; 2. identificare metodi per correggere il difetto di conformazione e di trasporto della proteina mutata.

Metodi. Abbiamo usato tre approcci sperimentali: 1) l'analisi delle proteine che interagiscono con la proteina mutata; 2) la manipolazione delle reti molecolari che eseguono la degradazione e il trasporto intracellulare di proteine; 3) l'analisi dei meccanismi cellulari che regolano la degradazione e il trasporto intracellulare di proteine.

Principali risultati. Relativamente all'obiettivo (1), abbiamo usato la spettrometria di massa per identificare proteine capaci di legarsi alla proteina mutata. Alcune di queste proteine sono di notevole interesse, e daranno luogo a ulteriori ricerche sul meccanismo della degradazione della proteina mutata. Circa il punto (2), abbiamo ridotto la quantità di proteine che sono normalmente essenziali per il trasporto, e notato che ciò ha un effetto paradosso, in quanto migliora la capacità della proteina CFTR mutata di raggiungere la superficie cellulare. Questo suggerisce che la proteina CFTR utilizza un meccanismo di trasporto non-convenzionale. Stiamo continuando lo studio di questo potenzialmente utile meccanismo correttivo. Inoltre (punto 3. in metodi), abbiamo usato inizialmente metodi bioinformatici per identificare reti molecolari con effetto regolatorio sulla degradazione e il trasporto della proteina mutata. Abbiamo quindi studiato una di queste reti, formata da una serie di chinasi (proteine capaci di modificare l'attività di altre proteine) che agiscono sequenzialmente, e la abbiamo validata sperimentalmente. Abbiamo infine usato inibitori chimici di queste chinasi e abbiamo trovato che essi correggono parzialmente il difetto di conformazione e trasporto della proteina CFTR mutata.

Commenti e conclusioni. I risultati più interessanti dal punto di vista della possibile applicabilità terapeutica sono arrivati dallo studio della rete molecolare formata da chinasi e dotata di una azione regolatoria sulla degradazione della proteina mutata.

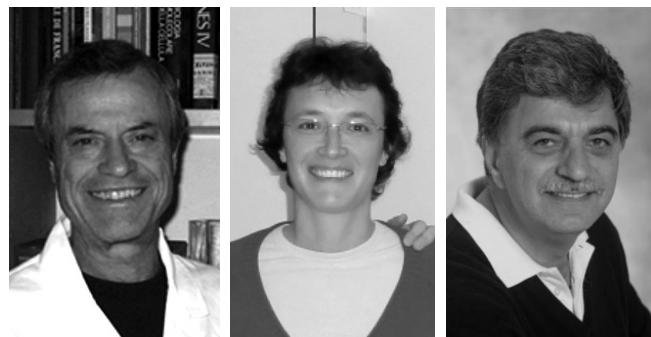
Possibili ricadute per ricerca e clinica. Attualmente stiamo iniziando la caratterizzazione degli inibitori delle chinasi menzionate sopra come possibili agenti terapeutici nella fibrosi cistica.

20. Novel cellular model system and therapeutic molecules for the development of a read-through approach for CF caused by stop codon mutations of the CFTR gene

Borgatti M¹, Altamura N², Baasov T³, Breveglieri G¹, Finotti

A¹, Salvatori F¹, Zuccato C¹, Castaldo R², Belakhov V³

¹Biochemistry and Molecular Biology Department - Ferrara University, Ferrara; ²Institute of Biomembrane and Bioenergetics, CNR, Bari; ³Schulich Faculty of Chemistry, Technion – Israel Institute of Technology, Haifa, Israel (FFC Project# 2/2010, concluded)



Monica Borgatti, al centro, e i due partner: Nicola Altamura a sinistra e Timor Baasov a destra

Background. Nonsense mutations generate premature termination codons (PTCs) that result in a premature translational termination and are the leading cause of approximately 30% of inherited diseases, including cystic fibrosis. Premature arrest of translation may involve the synthesis of truncated abnormal proteins that can be toxic to cells through dominant negative or gain-of-function effects. The functional consequences of stop mutations are minimized by the nonsense-mediated RNA decay pathway (NMD), a cellular mechanism, aimed to detect and degrade PTC containing mRNA. In the last few years, it has been demonstrated that drugs (like aminoglycoside antibiotics) can be designed and produced to suppress premature translation termination by inducing a ribosomal read-through of the premature, but not the natural termination codons and restoring CFTR function.

Objectives. The general objective of the project is to optimize the pharmacological approach leading to restoration of the CFTR production in cystic fibrosis caused by PTCs.

Methods. The read-through activity has been investigated in *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains having NMD activity (NMD+) or not (NMD-) and transformed with the Renilla and Firefly dual luciferase reporter plasmid carrying a nonsense codon between the luciferase genes. Moreover RNA silencing has been performed using synthetic siRNAs and lentivirus vectors for shRNA in cellular CF model IB3-1.

Results. Three novel aminoglycosides NB54, NB74 and NB84 exhibit read-through effects on CFTR mRNA carry-

ing stop codon mutations in yeast cellular model. In particular, at same concentrations, NB54 is the most efficient aminoglycoside for readthrough activity, followed by NB74 and NB84 in both the NMD+ and NMD- strains. Moreover G418 and NB compounds act on NMD mechanism unlike other aminoglycosides (e.g. Tobramycin) that have read-through activity only on PTCs. In order to modulate the NMD, we have silenced the UPF1 gene by UPF1 siRNA and we have developed lentivirus vectors carrying plasmid for the production of UPF1 shRNAs.

Comments & conclusions. To the best of our knowledge, this is the first example of a cellular model useful to investigate and discriminate the different read-through activity in different genetic contexts in which NMD activity is functional or abolished and, in addition, this is the first result about the specific activity of these aminoglycosides on NMD mechanism. Our goal will be: (a) the identification of the best strategy to decrease the cellular content of the NMD-regulating proteins UPF1 and abolish NMD mechanism; (b) identification of the optimal cocktail (using read-through molecules and NMD inhibitors) sustaining the maximal levels of CFTR production.

Spin-off for research & clinical purposes. Manuscripts in preparation: 1. Baasov T et al. Analysis of read-through activity for novel aminoglycosides in yeast strains with controlled NMD mechanism; 2. Altamura N et al. An experimental system based on *Saccharomyces cerevisiae* to discriminate read-through activity on NMD mechanism. 3. Borgatti M et al. Study of read-through activity of the orphan drug Tobramycin.

Nuovo sistema cellulare e nuove molecole terapeutiche per lo sviluppo di un approccio read-through per la CF causata da mutazioni per codoni di stop del gene CFTR

Ragioni dello studio. Le mutazioni del gene CFTR di "stop" (o "non senso"), che rappresentano circa il 10% di tutte le mutazioni del gene CFTR, bloccano prematuramente la sintesi della proteina CFTR con attivazione di un meccanismo cellulare (detto decadimento mediato da un "non senso" o NMD) che prevede la degradazione degli mRNA CFTR che contengono queste mutazioni di "stop". Negli ultimi anni, alcuni farmaci, come gli antibiotici aminoglicosidici, sono stati studiati per sopprimere tale blocco e indurre un riavvio (read-through) del meccanismo che porta alla sintesi completa della proteina. Perciò tale strategia rappresenta un nuovo approccio farmacologico promettente per la cura della fibrosi cistica.

Obiettivi e Metodi. Questo progetto è rivolto alla ricerca di nuove molecole in grado di svolgere questa azione di superamento del blocco e riavvio della produzione di CFTR funzionante in modelli cellulari di lievito e umani.

Principali risultati. Tre nuovi aminoglicosidi (NB54, NB74 e NB84) sono risultati interessanti nei nostri modelli cellulari e con un'efficacia maggiore del PTC124. Inoltre abbiamo messo a punto una strategia per abolire il meccanismo NMD da utilizzare in futuro in combinazione con gli aminoglicosidi studiati.

Commenti e conclusioni. Il modello cellulare basato sui lieviti ci permette di analizzare l'attività e il meccanismo d'azione di nuove molecole in grado di riattivare la sintesi di CFTR funzionante. In futuro sarà utile trovare la combinazione migliore tra queste molecole e le strategie per abolire il meccanismo NMD.

21. Molecular pathology of the pre-mRNA splicing machinery in cystic fibrosis: mechanistic aspects and therapeutic approaches

Pagani F

International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB), Trieste
(FFC Project #9/2009, concluded)



Franco Pagani, primo da destra, con il suo gruppo di ricerca

Background. Several CFTR mutations identified in patients with Cystic Fibrosis can induce a splicing defect. This defect can severely affect the RNA molecule, which is not able to code for a functional CFTR protein. One of the most common event is represented by the so called exon skipping, in which part of coding sequence of CFTR corresponding to an "exon" is not correctly inserted in the mature transcript.

Objectives & main results. We showed that several types of mutation, either in the exon or in the intron can induce exon skipping. Focusing on CFTR exon 12 provides a novel strategy to correct different types of natural splicing mutations in CFTR exon 12 using Exon Specific U1 snRNAs (ExSpeU1). ExSpeU1s bind by complementarity to intronic sequences downstream of the exon and rescue different types of splicing defects associated to exon skipping. Interestingly, a single ExSpeU1 appropriately loaded by complementarity to intronic sequences downstream of the exon 12 rescues correct splicing impaired by different mutations located either at the 5'ss mutations and in exonic regulatory elements. Our analysis also show that the ExSpeU1 interfere with a peculiar intronic RNA secondary structure located just downstream the 5'ss.

Conclusions. ExSpeU1s constitute a promising novel therapeutic strategy to correct splicing defects associated to defective exon definition.

Patologia molecolare del meccanismo dello splicing: aspetti meccanicistici ed approcci terapeutici

Ragioni dello studio. Numerose mutazioni identificate nei pazienti con Fibrosi Cistica possono indurre un difetto di "splicing". Questo difetto avviene a livello nucleare nella cellula e può compromettere la sintesi dell'RNA, che non è più in grado di codificare per una proteina CFTR funzionale. Uno degli eventi più comuni delle mutazioni di splicing è rappresentato dal salto dell'esone, nel quale parte della sequenza del CFTR corrispondente ad un "esone" non è correttamente inserita nel trascritto maturo. I nostri studi hanno identificato una serie di mutazioni localizzate sia nell'esone 12 che nell'introne fiancheggiante che inducono salto dell'esone stesso.

Obiettivi e principali risultati. Utilizzando delle molecole di U1 modificato abbiamo sviluppato una strategia innovativa che ha permesso di correggere in vitro la maggior parte di questi

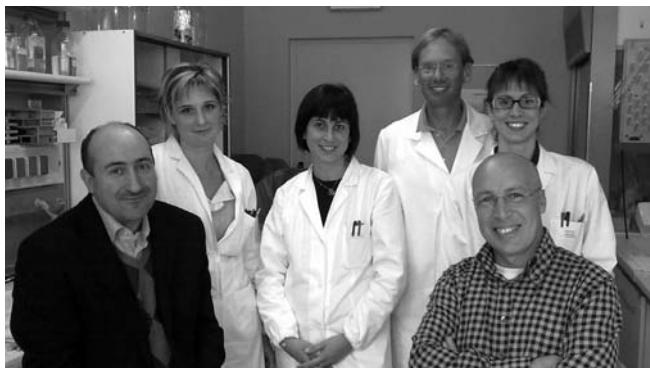
difetti di splicing. Infatti, nell'esone 12 è stata identificata una unica molecola chiamata "Exon Specific U1 snRNAs (ExSpeU1)" che interagendo con una sequenza intronica con struttura secondaria è in grado di correggere diversi difetti splicing.

Conclusioni. Questi ExSpeU1 rappresentano una nuova strategia terapeutica utile per correzioni di difetti di splicing associati ad una mancata definizione dell'esone.

22. Functional evaluation of CFTR in blood leukocytes in human subjects as a new tool for diagnostic and clinical research applications

Sorio C¹, Melotti P², Buffelli MR³

¹Dip. Patologia – Sez. Patologia generale – Università di Verona; ²Centro Reg. FC – AO Verona; ³Dip. di Scienze Neurologiche e della Visione – Università di Verona
(FFC Project #5/2009, concluded)



Claudio Sorio, primo a destra, e il suo gruppo di ricerca

Background. Evaluation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) functional activity to assess new therapies and define diagnosis of cystic fibrosis (CF) is cumbersome, in part due to the relative inaccessibility of the lower respiratory tract. It is known that leukocytes express detectable levels of CFTR but the molecule has not been characterized in these cells.

Objectives. In this study we aimed at setting up and validating a blood test to evaluate CFTR expression and function in leukocytes.

Methods. Western blot, PCR, immunofluorescence and cell membrane depolarization analysis by single-cell fluorescence imaging, using the potential-sensitive DiSBAC2(3) probe were utilized.

Main results. Expression of PKA phosphorylated, cell membrane-localized CFTR was detected in non-CF monocytes, being undetectable or present in truncated form in monocytes derived from CF patients presenting with nonsense mutations. CFTR agonist administration induced membrane depolarization in monocytes isolated from non-CF donors (31 subjects) and, to a lesser extent, obligate CFTR heterozygous carriers (HTZ: 15 subjects), but it failed in monocytes from CF patients (44 subjects).

We propose an index, which values in CF patients are significantly ($p<0.001$) lower than in the other two groups. Nasal Potential Difference, measured in selected subjects had concordant results with monocytes assay (Kappa statistic 0.93, 95%CI: 0.80-1.00)

Comments & Conclusions. CFTR is detectable and is functional in human monocytes. We also showed that CFTR-associated activity can be evaluated in 5 ml of peripheral blood.

Spin-off for research & clinical purposes. We devise an

index potentially applicable for diagnostic purposes and both basic and translational research: from drug development to evaluation of functional outcomes in clinical trials.

Valutazione funzionale di CFTR nei leucociti circolanti di soggetti umani: un nuovo strumento per la diagnostica e la ricerca clinica

Ragioni dello studio. La misurazione dell'attività funzionale della proteina CFTR al fine di valutare nuove terapie e definire una diagnosi di fibrosi cistica risulta complessa nel paziente anche e soprattutto per la relativa inaccessibilità delle vie aeree inferiori. È noto che i leucociti esprimono livelli rilevabili di CFTR, ma in queste cellule la molecola non è ancora stata caratterizzata dettagliatamente.

Obiettivi. In questo studio il nostro obiettivo era realizzare e validare un test, attraverso un esame del sangue, che permettesse di valutare l'espressione e la funzione di CFTR nei leucociti.

Metodi. I metodi utilizzati a questo scopo sono stati diversi: Western Blot, PCR, immunofluorescenza e analisi della depolarizzazione della membrana cellulare su singola cellula attraverso immagini di fluorescenza, utilizzando la sonda voltaggio dipendente DiSBAC2 (3).

Principali risultati. L'espressione CFTR è stata rilevata nei monociti non-CF, mentre non è rilevabile o presente nella forma tronca in monociti derivati da pazienti con fibrosi cistica con mutazioni nonsenso. L'aggiunta di un agonista di CFTR induce la depolarizzazione della membrana dei monociti isolati da donatori non-CF (31 soggetti) e, in misura minore, dei portatori CFTR eterozigoti (HTZ: 15 soggetti), ma non nei monociti di pazienti CF (44 soggetti). Noi proponiamo un indice, il cui valore in pazienti FC è significativamente ($p < 0,001$) più basso rispetto agli altri due gruppi. La differenza dei potenziali nasali (NDP), un test funzionale utilizzato per dirimere quesiti diagnostici, ha dato risultati concordanti con il test monociti.

Commenti e conclusioni. CFTR è rilevabile e funzionale nei monociti umani. Inoltre abbiamo dimostrato che le attività associate a CFTR possono essere valutato partendo da 5 ml di sangue periferico.

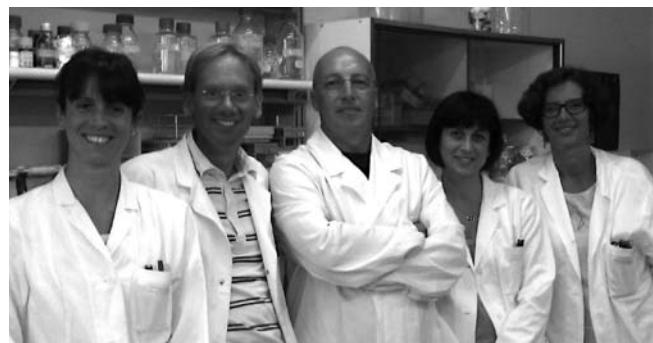
Spin-off per scopi di ricerca e clinica. È stato proposto un indice potenzialmente applicabile per uso diagnostico e di ricerca di base e traslazionale. Tale approccio potrebbe in futuro trovare applicazione sia come test intermedio utile alla selezione di nuovi farmaci che nella valutazione dei risultati funzionali negli studi clinici.

23. Novel biomarkers for evaluation of efficacy of new therapies in cystic fibrosis

Melotti P¹, Sorio C²

¹Centro Reg. FC – AOU Integrata Verona;

²Dip. Patologia – Sez. Patologia generale – Università di Verona (FFC Project#6/2010, in progress)



Paola Melotti, prima a destra, con il partner Claudio Sorio, al centro, e alcuni collaboratori

Background. It is difficult to follow, in the short time and with little invasive methods, the effects of commonly used treatments, and even more the new proposed ones to cor-

rect the basic defect, in patients with cystic fibrosis.

Objectives. This study was aimed at identifying useful indicators to monitor the effect of drugs, in some cases directly considering issues associated with the mechanism of action of completely innovative therapies. Therefore, molecules involved in inflammation were analyzed at the beginning and at the end of the routine treatment performed during hospitalization at the Cystic Fibrosis Center of Verona.

Methods. We evaluated with innovative methods the defective channel function in cystic fibrosis (CFTR) and the expression of this protein in patients participating in the multicenter trial of the molecule PTC124 (ataluren). Patients were required, on the occasion of a blood test already planned for medical reasons or for PTC124 trials, to provide for this project a limited amount of blood. Collection is continuing to test for the effects of routine treatment during hospitalization: it was planned to be available at the end of this project lasting for two years data on 50 patients.

Project status. At the end of the first year we have about 80% of the total samples that we intend to analyze. We are also collecting and analyzing samples for this particular project of all patients who are participating in the clinical trial of PTC124 and recently completed the transition to the experimental phase in which all take the drug. The initial phase was rather double-blind: a group of individuals, unknown to both operators and patients, has not taken the experimental drug, but a compound called placebo, without the active ingredient. The collaboration is continuing in a very constructive way between the Cystic Fibrosis Center of Verona and researchers analyzing the samples in the laboratory. This interaction is considered essential in order not to miss the various aspects of clinical research, ranging from the usual therapies to the most innovative ones. We are promoting the use of sophisticated technologies and original analysis with minimally invasive approaches for the patient.

Nuovi marcatori biologici per la valutazione dell'efficacia di nuove terapie della fibrosi cistica

Ragioni dello studio. Seguendo i pazienti affetti da fibrosi cistica è difficile stabilire, a breve tempo e con metodi poco invasivi, gli effetti dei trattamenti comunemente utilizzati ed ancor più dei nuovi proposti per correggere il difetto di base.

Obiettivi. Questo studio si è proposto di individuare degli indicatori utili per monitorare l'effetto dei farmaci, in alcuni casi valutando aspetti direttamente associati al meccanismo d'azione di terapie completamente innovative. Vengono pertanto analizzate molecole coinvolte nell'infiammazione all'inizio ed alla fine del trattamento di routine eseguito durante il ricovero presso il Centro Fibrosi Cistica di Verona. Si valutano invece con metodi innovativi la funzione del canale difettoso in fibrosi cistica (CFTR) e l'espressione di questa proteina in pazienti che partecipano alla sperimentazione multacentrica della molecola PTC124 (Ataluren). Ai pazienti viene richiesto, in occasione di un prelievo già programmato per motivi clinici o per sperimentazione PTC124, di mettere a disposizione per questo progetto una limitata quantità di sangue.

Stato del progetto. Sta proseguendo la raccolta dei campioni per individuare gli effetti del trattamento di routine in regime di ricovero: è stato previsto di avere a disposizione alla fine del progetto biennale i dati relativi a 50 pazienti. Al termine del primo anno abbiamo a disposizione circa 80% dei campioni totali che dovremo analizzare. Stiamo inoltre raccogliendo ed analizzando per questo specifico progetto i campioni di tutti i pazienti che stanno partecipando al trial clinico PTC124 e che recentemente hanno completato il passaggio alla fase di sperimentazione in cui tutti i pazienti in studio assumono il farmaco (fase in aperto). La fase iniziale è stata invece in doppio cieco: un gruppo di soggetti, ignoto sia agli operatori che ai pazienti, non ha assunto il farmaco sperimentale ma un composto, definito placebo, privo del principio attivo. La collaborazione sta proseguendo in maniera molto costruttiva tra chi segue i pazienti al Centro Fibrosi Cistica di Verona ed i ricercatori che in laboratorio analizzano i campioni. Tale interazione viene considerata essenziale per non far mancare

la ricerca ai vari aspetti della clinica, spaziando dalle terapie più consuete a quelle più innovative. Si sta promuovendo l'utilizzo di analisi originali e tecnologie sofisticate con approcci minimamente invasivi per il paziente.

24. An induced pluripotent stem cell (iPS)-based approach for the repopulation and phenotypic correction of cystic fibrosis airway epithelium

Loi R

Dip. Tossicologia, Sez. Oncologia e Pat. Molecolare, Università di Cagliari. (FFC Project#3/2010, in progress)



Roberto Loi, al centro, e il gruppo di ricerca

Background. In cystic fibrosis, the repopulation of diseased airway epithelium with cells expressing functional CFTR represents an option that may be available in the future to reduce morbidity and mortality of this disease. The recently developed induced pluripotent stem cells (iPS) allowed the generation of patient-specific stem cells that may be useful for cell therapy approaches. For instance, in cystic fibrosis, diseased lung epithelium could potentially be replaced by functional epithelial cells derived from iPS. The iPS could be generated from the patient's somatic cells, and the gene defect could be corrected *in vitro*. Then, iPS could be induced to differentiate *in vitro* into airway epithelial cells and these cells could be infused to the same patient, thus avoiding immune rejection, to repopulate the diseased airway epithelium with normal cells. This is a very ambitious goal, and many issues need to be solved before this approach becomes applicable to human treatment in the future. The induction of differentiation of iPS into bronchial epithelial cells still represents a difficult task, since our knowledge of the mechanisms that guide this differentiation process are still limited. Recent studies suggest that iPS cells derived from airway epithelial cells may possess a stronger differentiation potential towards airway epithelial lineages than iPS cells derived from other cell types.

Objectives. We proposed to derive iPS cells from airway epithelial cells, either normal or from patients affected by cystic fibrosis

Project status. Within the first year of the project we induced the reprogramming of human airway epithelial cells, normal and CF, that should determine the development of iPS cells. We are now at the end of the first year of the project and we are involved in the analysis of the cell cultures for the presence of iPS colonies, that will be isolated and characterized. During the second year we will induce the differentiation of iPS cells into airway epithelial cells.

Spin-off for research & clinical purposes. This study should clarify whether iPS cells derived from airway epithelial cells have a higher differentiation potential towards lung epithelium. This knowledge is relevant for a potential future application of iPS cells in the repopulation of CF lung epithelium with functional cells.

Un approccio basato sulle cellule staminali pluripotenti indotte (iPS) per il ripopolamento e la correzione fenotipica dell'epitelio polmonare affetto da fibrosi cistica

Ragioni dello studio. Nella fibrosi cistica il ripopolamento dell'epitelio delle vie aeree malato con cellule esprimenti la proteina CFTR funzionante potrebbe rappresentare in futuro una possibile opzione per ridurre la morbidità e la mortalità di questa malattia. Lo sviluppo delle cellule staminali pluripotenti indotte (iPS) ha permesso la generazione di cellule staminali specifiche per il paziente, potenzialmente utili in approcci di terapia cellulare. Ad esempio, nella fibrosi cistica l'epitelio delle vie aeree malato potrebbe essere potenzialmente ripopolato con cellule epiteliali funzionali derivate da cellule iPS. Le iPS potrebbero essere generate a partire da cellule somatiche del paziente, ed il difetto genico corretto *in vitro*. In seguito, si potrebbe indurre il differenziamento delle cellule iPS in cellule epiteliali delle vie aeree e somministrare queste cellule allo stesso paziente, evitando così il loro rigetto immunitario, per ripopolare l'epitelio polmonare malato con cellule normali. Sono ancora numerosi gli ostacoli da superare prima che si arrivi in futuro ad una applicazione delle cellule iPS alla patologia umana. L'induzione del differenziamento di cellule iPS in cellule epiteliali bronchiali rappresenta un passaggio critico, essendo limitata la nostra comprensione dei meccanismi che guidano questo differenziamento. Secondo recenti studi cellule iPS derivate da cellule epiteliali delle vie aeree avrebbero una maggiore propensione a re-differenziarsi nel tessuto di origine, cioè l'epitelio delle vie aeree.

Obiettivi. Ci siamo proposti di derivare cellule iPS a partire da cellule epiteliali bronchiali delle vie aeree, sia normali che isolate da pazienti affetti da fibrosi cistica.

Stato del progetto. Nel corso del primo anno abbiamo indotto il processo di riprogrammazione nelle cellule umane dell'epitelio bronchiale, normali e CF, che determinerà lo sviluppo delle cellule staminali iPS. Mentre ci troviamo al termine del primo anno del progetto stiamo esaminando le colture cellulari per la presenza di colonie di cellule iPS, che verranno isolate e caratterizzate. Durante il secondo anno indurremo il differenziamento delle cellule iPS in epitelio delle vie aeree.

Possibili ricadute. Questo studio dovrebbe stabilire se cellule iPS derivate da cellule epiteliali bronchiali hanno un superiore potenziale differenziativo verso l'epitelio polmonare. Questa nuova conoscenza è rilevante per un potenziale futuro utilizzo delle cellule iPS nel ripopolamento dell'epitelio polmonare CF con cellule funzionali.

CF Microbiology: towards new strategies for respiratory infection therapy (part 2)

Chairman: Gerd Döring • Introductory overview: Alessandra Polissi

25. Validation of novel vaccine candidates of *Pseudomonas aeruginosa*

Bragonzi A¹, Bertoni G², Bianconi I¹, Beatriz Alcalà-Franco¹

¹Divisione di Immunologia, Trapianti e Malattie infettive, Infections and Cystic Fibrosis Unit, Istituto San Raffaele, Milano; ²Dipartimento di Scienze Biomolecolari e Biotecnologie, Università di Milano
(FFC Project#10/2009, concluded)



Alessandra Bragonzi, terza da sinistra, e i ricercatori coinvolti nel progetto

Background. High incidence, severity and increasing antibiotic resistance characterize *P. aeruginosa* chronic lung infections in CF patients, highlighting the need of new therapeutic options. Vaccination strategies to prevent or limit *P. aeruginosa* infection represent a rational approach to positively impact the clinical status of CF patients.

Objectives. The rationale of this project is to validate novel vaccine candidates of *P. aeruginosa*, selected by integrated genomic approaches for their immunogenic potential as it was done previously in other relevant bacterial pathogens.

Methods and main results. A Genome-derived *P. aeruginosa* Antigens (GPA) database has been developed having identified novel vaccine candidates on the basis of their putative localization on the cell surface by "reverse vaccinology" and by a combination of advanced genomic approaches. All listed targets in GDA have been grouped by ranking score after their validation by an homology search of seven *P. aeruginosa* database. Targets with homology with human genome were excluded. Vaccination protocols have been established in murine models of *P. aeruginosa* acute and chronic infection. According to our murine models, protection against lethal doses of *P. aeruginosa* and reduction in bacterial load is currently under evaluation in mice immunized with purified antigens. So far, 27 proteins were tested and three different proteins and two cocktails of proteins had statistically different survival curves respect the negative control group. Evaluation of animal sera showed good antibody response.

Comments & Conclusions. The results of the project may contribute to settle the basis of a novel immunotherapy to

contrast *P. aeruginosa* lung infections in CF patients.

Spin-off for research & clinical purposes. In the next year this project will continue with the collaboration of Novartis-Vaccine. This collaboration aims to identify and provide pre-clinical validation of novel vaccine with higher efficacy compared to those used so far.

Validazione di nuovi candidati vaccini di *Pseudomonas aeruginosa*

Ragioni dello studio. L'elevata incidenza, la prevalenza ed una crescente resistenza ai trattamenti antibiotici fanno delle infezioni croniche respiratorie da *P. aeruginosa* la principale causa di malattia in pazienti con fibrosi cistica (FC).

Obiettivi. Questi dati evidenziano la necessità assoluta di nuove opzioni terapeutiche. Le strategie di vaccinazione rappresentano un approccio razionale per prevenire o limitare l'infezione da *P. aeruginosa* e migliorare lo stato clinico dei pazienti con FC.

Metodi e principali risultati. In questo progetto abbiamo generato una lista di tutti gli antigeni proteici di *P. aeruginosa* che hanno la maggior probabilità di essere buoni candidati vaccini. La lista di candidati vaccini (Genome-derived *P. aeruginosa* Antigens (GPA)) è stata generata applicando una combinazione di avanzati approcci genomici e sulla base della presunta localizzazione sulla superficie cellulare. Tutti i candidati vaccini elencati nel GDA sono stati validati per analisi comparativa con sette genomi di *P. aeruginosa*. In questa fase, abbiamo escluso proteine con epitopi simili ad antigeni umani. Stiamo valutando l'immunogenicità di alcuni di questi candidati vaccini in protocolli di vaccinazione messi a punto in modelli murini di infezione acuta e cronica da *P. aeruginosa*. Questi modelli permettono di valutare la protezione di antigeni purificati contro dosi letali di *P. aeruginosa* in modelli di infezione acuta e la riduzione della carica batterica in modelli di infezione cronica. Fino ad ora abbiamo testato 27 nuovi antigeni in modelli murini. Tra questi, tre diversi antigeni e due combinazioni di antigeni hanno mostrato un aumento significativo della sopravvivenza rispetto al gruppo di controllo. In aggiunta, questi antigeni hanno permesso di rilevare una buona risposta anticorpale negli animali.

Commenti e conclusioni. I risultati del progetto potranno contribuire a disegnare nuove strategie di intervento e trattamenti terapeutici per contrastare le infezioni polmonari da *P. aeruginosa* in pazienti con FC.

26. *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide cell surface transport is a target process for developing new antimicrobials

Polissi A¹, Bolognesi M², Dehò G², Peri F¹, De Castro C³, De Gioia L¹

¹Dip. Biotecnologie e Bioscienze, Università Bicocca Milano;

²Dip. Scienze Biomolecolari e Biotecnologie, Università di Milano;

³Dip. di Chimica e Biochimica Organica, Università Federico II - Complesso Universitario Monte Sant'Angelo Napoli

(FFC project #13/2010, in progress)



Alessandra Polissi, quarta da destra, con i ricercatori del laboratorio coinvolti nel progetto

Background. Lipopolysaccharide (LPS) biogenesis is an ideal target for the development of novel antimicrobial compounds. Firstly, it is an essential structural component of the outer membrane (OM) and thus it is required for virulence and cell viability. Secondly, details on the mechanisms of its assembly to the cell surface have only recently emerged. LPS is transported by a molecular machinery composed of seven essential Lpt proteins spanning the inner and outer membrane thus forming a trans-envelope complex. Therefore, this pathway has been underexploited so far and may thus represent a good source of unscreened new targets.

Objectives. Aim of this proposal is to exploit LPS transport as a process for the development of novel antimicrobials. This multi-faceted cellular target can be exploited by different approaches for drug discovery. We will target not only two key *P. aeruginosa* proteins LptA and LptC of the Lpt machinery but also their assembly pathway into the LPS multiprotein transport complex and their binding to LPS. Based on structural information already obtained in this interdisciplinary project, we will design and synthesize inhibitors to be tested in vivo and in vitro.

Methods. Genetic, biochemical and biophysical methods are being employed to characterize the target LptA and LptC proteins and to obtain structural information. For structure-function studies of LptC we have exploited the fact that *E. coli* lptC mutants are not complemented by the orthologous *P. aeruginosa* gene.

Preliminary results. We have identified three sequence motifs in the LptC proteins exhibiting different degrees of conservation in the two species. By swapping *E. coli* and *P. aeruginosa* LptC motifs we constructed chimeric proteins and tested their ability to bind LptA. By this approach we assessed that motif 3 seems to be involved in interaction to LptA thus defining the LptC region containing the determinants for binding to LptA. None of the chimeric constructs, however, complemented LptC-depleted *E. coli*, suggesting that other species-specific motifs may be required for a productive interaction with LptA and/or other components of the Lpt machine. We also produced radiolabelled LPS and performed LPS binding assays with LptA and LptC.

Comments and conclusions. Our results seem to reinforce the current view that LptC has a higher affinity for purified LPS than LptA in line with the sequential LPS recognition and transfer by Lpt proteins to the cell surface. The structural information obtained on the proteins of the LPS transport machinery will be used for the design of potential LPS biogenesis inhibitors.

Il trasporto di un componente della membrana cellulare (lipopolisaccaride) di *Pseudomonas aeruginosa* come bersaglio per lo sviluppo di nuovi farmaci antibatterici

Ragioni dello studio. Le infezioni polmonari causate da *Pseudomonas aeruginosa* sono una delle principali cause di malattia e morte di pazienti affetti da fibrosi cistica. *P. aeruginosa* è un pato-

geno resistente alla maggior parte dei farmaci convenzionali e ciò rende difficile il trattamento delle infezioni. E' quindi urgente ideare e saggiare farmaci antibatterici nuovi e specifici. Il lipopolisaccaride è un componente essenziale della membrana esterna, la struttura di rivestimento dei batteri Gram-negativi. Esso media diverse interazioni con l'ambiente e l'organismo ospite ed è responsabile dell'elevata resistenza intrinseca agli antibiotici. In questi ultimi anni sono stati fatti molti progressi per comprendere come questa molecola venga trasportata dal sito di sintesi (citoplasma e membrana interna) verso la membrana esterna, sua destinazione finale. Grazie a recenti studi fatti nel nostro ed in altri laboratori è stato individuato e caratterizzato il macchinario proteico (Lpt) responsabile del trasporto del LPS alla membrana esterna. Pensiamo quindi che la biogenesi del lipopolisaccaride rappresenti un bersaglio ideale non ancora sfruttato per sviluppare farmaci innovativi tramite progettazione razionale. La "progettazione razionale" di farmaci è uno degli approcci più utilizzati per ottenere nuove molecole capaci di inibire funzioni biologiche. Conoscendo la struttura molecolare di un possibile bersaglio (es. una proteina) è possibile, utilizzando sofisticati programmi bioinformatici, identificare molecole che interagiscano in modo specifico con il bersaglio stesso.

Obiettivi e metodi. Il progetto di ricerca si concentra su due proteine, LptA e LptC da noi scoperte, che sono componenti del macchinario Lpt. Le due proteine, che legano il lipopolisaccaride ed interagiscono tra di loro, rappresentano quindi ottimi bersagli farmacologici dal momento che sono presenti in molti ceppi batterici clinicamente rilevanti ma sono assenti nell'uomo.

Risultati preliminari. Abbiamo cominciato ad ottenere informazioni strutturali su LptA e LptC di *P. aeruginosa* grazie all'utilizzo di tecniche biochimiche, biofisiche e di genetica molecolare. Inoltre abbiamo messo a punto un saggio quantitativo per misurare l'interazione di queste proteine con il LPS.

Commenti e conclusioni. Questi risultati rappresentano il pre-requisito per progettare e disegnare piccole molecole in grado di inibire l'assemblaggio del complesso proteico Lpt ed il suo legame con il LPS.

27. Non-conventional strategies against *Pseudomonas aeruginosa* infection: interference with iron homeostasis and quorum sensing

Visca P¹, Leoni L²

¹Lab. Microbiologia clinica e Virologia, Dip. Biologia, Università "Roma Tre"; ²Lab. Microbiologia molecolare e Biotecnologie dei microrganismi, Dip. Biologia, Università "Roma 3" (FFC Project #14/2010, in progress)



Paolo Visca, primo a dx, con Livia Leoni, al centro, e il gruppo di ricerca

Background. A promising approach to suppress *P. aeruginosa* infection is the use of drugs which specifically inhibit the development of the chronic infection, rather than bacterial growth per se. Targeting of the pathogenic potential has the

advantage of reducing the bacterial adaptability to the host environment and the severity of the infection without creating, in theory, the selective pressure generally caused by conventional antibiotics. In *P. aeruginosa*, iron uptake and quorum sensing (QS) are critical for the establishment of the infection, thus representing ideal targets for the development of such drugs. Recent studies indicate gallium as a potent inhibitor of iron metabolism. This compound is already approved for medical use by the US Food and Drug Administration (FDA). The efflux pumps inhibitors (EPI) are used in clinical trials as antibiotic therapy adjuvant. Preliminary results suggested that EPI could have unpredictable side-effects on *P. aeruginosa* QS and pathogenesis.

Objectives. This project has two main objectives: 1) characterization of *P. aeruginosa* key factors involved in iron uptake and QS in the lung environment and their evaluation as drug targets; 2) assessment of the activity of gallium and EPI in the treatment of the chronic *P. aeruginosa* infection.

Preliminary results. With regard to iron uptake, a number of deletion mutants have been generated in a *P. aeruginosa* cystic fibrosis isolate, which will soon be investigated for their different ability to colonize and persist in the mouse lung. Preliminary tests have been performed to assess *in vitro* the activity of gallium whose possible use against *P. aeruginosa* infection will be evaluated *in vivo* during the second year of the project. Concerning the studies on QS, we have shown that the RsaL protein plays an important role in the establishment of the chronic lung infection in mice. This result indicates RsaL as a potential molecular target for the development of drugs able to inhibit the chronic infection. This issue will be further investigated in the second year of this research project. We have also shown that, *in vitro*, EPI can increase the release of a main QS signal molecule and stimulate *P. aeruginosa* processes that contribute to colonization and persistence in the lung.

Comments and conclusions. Our preliminary results raise serious concerns about the use of EPI in cystic fibrosis therapy and deserves further investigations.

Strategie non convenzionali per il trattamento dell'infezione da *Pseudomonas aeruginosa*: inibizione dell'omeostasi del ferro e del quorum sensing

Ragioni dello studio. L'infezione cronica ad opera del batterio *Pseudomonas aeruginosa* è la principale causa di perdita della funzionalità polmonare negli individui affetti da fibrosi cistica. Le terapie antibiotiche tradizionali dirette ad inibire la crescita batterica sono spesso inefficaci nell'eradicare l'infezione cronica polmonare da *P. aeruginosa*, soprattutto a causa dell'emergere di ceppi resistenti agli antibiotici e della formazione di biofilm. In *P. aeruginosa* i processi che controllano il metabolismo del ferro e la comunicazione tra batteri (quorum sensing) sono necessari per l'instaurarsi dell'infezione e per la produzione di biofilm, e pertanto rappresentano dei promettenti bersagli per lo sviluppo di nuovi farmaci.

Obiettivi. Lo scopo generale del presente progetto è stato quello di fornire un'indicazione chiara sulle potenzialità di farmaci anti-quorum sensing e anti-metabolismo del ferro per il trattamento dell'infezione polmonare da *P. aeruginosa*. Gli obiettivi specifici sono: 1) determinare il ruolo svolto dai diversi processi di trasporto del ferro e da regolatori chiave del quorum sensing *in vivo*, usando un modello animale di infezione cronica polmonare; 2) verificare l'efficacia di composti a base di gallio e degli inibitori delle pompe d'efflusso (EPI) per il trattamento dell'infezione polmonare da *P. aeruginosa*.

Risultati preliminari. Nel corso del primo anno, è stata ottenuta una collezione di ceppi mutanti di *P. aeruginosa* difettivi nei diversi sistemi di acquisizione del ferro. Questi mutanti verranno ora testati nel modello animale di infezione, al fine di determinare quali sistemi di acquisizione del ferro siano essenziali *in vivo* per l'instaurarsi dell'infezione e, quindi, quali di questi rappresentino possibili bersagli per nuovi farmaci. Per quanto riguarda gli studi riguardanti il quorum sensing, abbiamo dimostrato che il regolatore globale RsaL ha un ruolo positivo nell'infezione polmonare cronica nel topo.

Questa proteina potrebbe costituire un bersaglio per farmaci in grado di sopprimere o ritardare l'instaurarsi dell'infezione cronica. Tale possibilità verrà presa in esame nel corso del prossimo anno.

Commenti e conclusioni. I dati ottenuti sugli EPI indicano che questi composti stimolano il quorum sensing ed altri processi importanti per l'instaurarsi dell'infezione polmonare cronica. Questi risultati pongono seri dubbi sull'utilizzo degli EPI come adiuvanti nella terapia antibiotica nella fibrosi cistica e stimolano ad approfondire questo aspetto della ricerca.

28. Pathogenicity of *Staphylococcus aureus* and its role in the progression of *Pseudomonas aeruginosa* chronic lung infection

Cirillo DM¹, Bragonzi A², Kahl B³

¹EBPU-S, Raffaele Scientific Institute, Milano;

²Infections and CF, S. Raffaele Scientific Institute, Milano;

³UniversitätsKlinikum, Institute für Medizinische Mikrobiologie, Münster, Germany
(FFC Project#9/2010, in progress)



Daniela Maria Cirillo, prima a destra, con il suo gruppo di ricerca

Background. Despite the increase in prevalence of *S. aureus* (SA) and the serious potential morbidity from methicillin sensitive (MSSA) and methicillin-resistant SA (MRSA) in patients with CF, very little is known about its role in the progression of lung disease. It is unclear whether SA is an independent contributor to decline in lung function or increases susceptibility to *P. aeruginosa* (PA) superinfection and chronicity and the benefit to treat the first isolation of SA or its persistence in the airways of asymptomatic CF patients is still debated.

Objectives. We established a mouse model for SA chronic lung infection and we used this model to evaluate the virulence of early and late clinical SA strains isolated from CF patients. Preliminary results. All the strains tested were very efficient to induce chronic infections in mice, ranging from 71% to 100% and no significant difference between early and late isolates was evident. In vitro growth competition experiments showed that PA reference strain and early, but not late, clinical isolates were able to inhibit SA growth. We set up an *in vitro* dual species biofilm model: PA reference strain was able to significantly inhibit both biofilm and planktonic SA growth. We established a mouse model of co-infection by pre-infecting mice with SA and subsequently with PA. SA pre-infection reduced the mortality induced by PA infection and increased the capacity to establish chronic infection of PA strains. The inflammatory response *in vivo* seemed to be mostly ascribed to PA infection.

Conclusions. The preliminary results of the project up to date support an active role of SA infection in the progression of lung disease in CF patients. Evaluating the impact of the anti-SA treatment will further expand these findings.

***Staphylococcus aureus*: fattori patogenetici e ruolo nella progressione dell'infezione cronica polmonare in pazienti con fibrosi cistica**

Ragioni dello studio. *S. aureus* (SA) è un patogeno nosocomiale e comunitario, spesso resistente ai farmaci, che colonizza e/o infetta con alta prevalenza pazienti con fibrosi cistica. Non è chiaro se e tramite quali meccanismi SA contribuisca in modo indipendente al deterioramento della funzionalità polmonare o se favorisca l'instaurarsi dell'infezione cronica da *P. aeruginosa* (PA). Non è inoltre chiaro l'impatto clinico di un trattamento mirato anti-SA in pazienti FC colonizzati.

Obiettivi. i) caratterizzare i fattori di virulenza associati ad isolati di *S. aureus*, clinici e di laboratorio, ii) valutare le interazioni tra ceppi di SA e di PA in vitro ed in vivo, iii) stabilire l'impatto del trattamento antibiotico anti-SA e della superinfezione da PA nella progressione della malattia polmonare cronica.

Metodi. L'interazione tra le due specie viene studiata in vitro con saggi di inibizione reciproca della crescita libera ed in biofilm, ed in modelli di infezione cronica in vivo nel modello murino.

Risultati preliminari. Abbiamo messo a punto un modello murino di infezione polmonare cronica da SA e lo abbiamo utilizzato per valutare la virulenza di isolati clinici precoci e tardivi di SA da pazienti FC: tutti i ceppi hanno indotto infezione cronica nel topo. Esperimenti in vitro di coltura competitiva hanno evidenziato la capacità di ceppi di PA di riferimento e clinici precoci, ma non tardivi, di inibire la crescita di SA. Abbiamo allestito in vitro un modello di biofilm misto: il ceppo di PA di riferimento inibisce la crescita planctonica e in biofilm di SA. Infine abbiamo messo a punto un modello murino di co-infezione, pre-infettando con SA e infettandosi successivamente con PA: la pre-infezione con SA è associata a una riduzione della percentuale di mortalità indotta da PA e all'aumento della capacità dei ceppi di PA di stabilire infezione cronica; inoltre la risposta infiammatoria in vivo è risultata essere ascrivibile all'infezione da PA. In seguito verrà valutato l'impatto della terapia antistafilococcica nel modello murino.

Possibili ricadute per ricerca e clinica. Il progetto permetterà di capire il ruolo di SA nel deterioramento della funzionalità polmonare del paziente FC. Inoltre la comprensione del ruolo di SA nella progressione dell'infezione cronica polmonare da PA potrà essere utile a stabilire l'eventuale necessità di un trattamento (profilattico) e/o eradicante di SA e, di conseguenza, a migliorare le strategie terapeutiche in pazienti FC.

29. Calcium signal and PKC as targets of *Pseudomonas aeruginosa* infection

Pinton P

Dip. Medicina Sperimentale e Diagnostica, Università degli Studi di Ferrara
(FFC Project#12/2010, in progress)



Paolo Pinton, secondo da sinistra, e il suo gruppo di ricerca

Background. The major cause of morbidity and mortality of Cystic Fibrosis (CF) patients is chronic lung disease, which is associated with an excessive inflammatory response char-

acterized by the accumulation of large amounts of the polymorphonuclear leukocyte (PMN) and chemokine IL-8. The excessive neutrophilic inflammation is initially orchestrated by bronchial epithelial cells and amplified by chronic bacterial infection with *Pseudomonas aeruginosa* (PAO), leading to progressive tissue destruction. In a series of recent works appears to become central the role of Ca²⁺ and Protein Kinase C (PKC) in controlling activation of innate immune responses.

Objectives. The final result of this research is the identification of a "functional module" acting on Ca²⁺ and PKC signalling in the airway pro-inflammatory pathways, promoted by PAO infection. The identification of novel molecular route in the pro-inflammatory signalling is presently of paramount importance, opening at new possibilities of therapeutic and diagnostic approaches.

Methods. Mediating aequorin-based Ca²⁺ measurements and single cell imaging experiments with fluorescent recombinant PKC, we have monitored [Ca²⁺] changes in specific intracellular compartments during PAO infection, useful to PAO-dependent activation of PKC during pro-inflammatory response.

Preliminary results. Studies in bronchial epithelial cells exposed to PAO revealed that phospholipase C beta 3 (PLCB3), is implicated in extracellular nucleotide-dependent intracellular calcium (Ca²⁺) signalling, leading to activation of the protein kinase C alpha and beta. This regulation of intracellular calcium transients, plays a relevant role in amplifying the expression and release of IL-8 during PAO-dependent inflammatory response.

Comments & Conclusions. We conclude that in the CF airway tract chronically infected with *P. aeruginosa*, the Ca²⁺-dependent pathway induced by the release of nucleotides amplifies the innate defence signalling. The biological role of intracellular calcium homeostasis in bronchial epithelial cells in the CF lung disease remains again debated. Although the different considerations emerged, we are able to assert that the fine regulation of intracellular calcium is at base of PKC-activation. These kinases operate as PAO-dependent pro-inflammatory inducer in IL-8 transcription, cooperating with Nuclear Factor-kB.

Spin-off for research & clinical purposes. Our study identifies two new potential site for pharmacological therapy. PKC and intracellular calcium will be targets of pharmacological intervention to modulate the PAO-dependent pro-inflammatory response. In the future, we will now carry out a detailed analysis of the effect of the specific inhibitors of the PKC isozymes, and of calcium modulator on activation of innate immune response triggered by PAO.

Segnale Calcio e PKC come bersagli dell'infezione da *Pseudomonas aeruginosa*

Ragioni dello studio. La principale causa di morbosità e mortalità in pazienti affetti da fibrosi cistica è un danno cronico a livello dei polmoni, associato ad un'eccessiva infiammazione caratterizzata da un considerevole accumulo di leucociti polimorfonucleati e IL-8. L'infiammazione inizia a livello delle cellule dell'epitelio bronchiale promossa e amplificata in seguito ad un'infezione batterica cronica per mezzo del batterio *Pseudomonas aeruginosa* (PAO), con un progressivo danno tessutale. Studi recenti identificano un ruolo principale dello ione Calcio e delle Protein-chinas C (PKC) nel controllo dell'innesto di questa risposta immune innata.

Obiettivi. Il risultato finale di questa ricerca sarà l'identificazione di un "modulo funzionale" che agendo a livello del segnale Calcio e di PKC regolerà le vie di segnalazione pro-infiammatorie presenti sull'epitelio bronchiale, durante l'infezione da PAO. L'identificazione di nuovi vie molecolari nella trasduzione del segnale pro-infiammatorio è di fondamentale importanza e potrebbe aprire a nuovi approcci terapeutici e diagnostici.

Metodi. Tramite misure di calcio effettuate con l'utilizzo di sonde ricombinanti basate sulla sonda calcio-sensibile equorina e esperimenti di imaging mediante PKC ricombinanti e fluorescenti,

abbiamo identificato variazioni della concentrazione intracellulare di calcio durante l'infezione di PAO, fenomeno necessario per l'attivazione delle PKC (mediata da *Pseudomonas aeruginosa*) durante l'innesto della risposta pro-infiammatoria.

Risultati preliminari. Esperimenti effettuati in cellule di epitelio bronchiale esposte ad infezione di PAO mostrano che la fosfolipasi-C beta 3 (PLCB3) è coinvolta nella regolazione e modulazione del segnale calcio intracellulare, determinando l'attivazione di PKC alpha e beta. Questa regolazione dei livelli di calcio intracellulare, ricopre un ruolo fondamentale nella espressione e rilascio di IL-8, in seguito alla risposta infiammatoria indotta da PAO.

Commenti e conclusioni. Mediante tali osservazioni, abbiamo concluso che nel tratto respiratorio di pazienti affetti da Fibrosi Cistica ed infettati da PAO, avviene una forte induzione del meccanismo calcio-dipendente di segnalazione alla base delle difese innate. Il ruolo biologico del calcio intracellulare in cellule epiteli-

ali bronchiali in pazienti affetti da patologie polmonari indotte da Fibrosi Cistica resta tuttavia ancora dibattuto. Nonostante siano presenti diverse considerazioni, possiamo affermare che la regolazione del calcio intracellulare è alla base dell'attivazione delle PKC. Queste chinasi agiscono come induttori pro-infiammatori PAO-dipendenti attivanti la trascrizione della citochina IL-8, in cooperazione con il "Fattore Nucleare -kB".

Possibili ricadute per ricerca e clinica. I nostri studi identificano due potenziali siti di target per un nuovo approccio terapeutico. Le PKC e il calcio intracellulare potrebbero essere colpiti farmacologicamente in modo da modulare la risposta infiammatoria indotta dal batterio *Pseudomonas aeruginosa*. Successivamente, potremo fornire una analisi più dettagliata sull'effetto di inibitori specifici delle diverse isoforme di PKC e di agenti capaci di modulare i livelli di calcio intracellulare, riguardo la risposta immunitaria innata che avviene in seguito ad infezione da PAO.

FFC Core Facilities

Chairman: Gianni Mastella

30. Primary cell culture facility for human bronchial epithelial cells

Galietta L

Laboratorio di Genetica Molecolare, Istituto Giannina Gaslini, Genova



Luis Galietta,
responsabile del Servizio

The primary cultures of human airway epithelial cells represent a very important model to study the pathogenic mechanisms of lung disease in cystic fibrosis (CF) and to validate *in vitro* novel therapeutic strategies. There are several types of cell lines derived from the human bronchial or tracheal epithelium. These cells can be grown easily to perform various biochemical and functional studies. However, none of these cells has the exact characteristics of the native epithelium, such as the polarization (i.e. the development of an apical and a basolateral membrane), and the expression of CFTR, ENaC, and other proteins. Actually, the process of immortalization used to generate a cell line often results in the loss of expression of CFTR and other important proteins.

Therefore, CF investigators need to use primary cultures of airway epithelium as an important model to confirm the relevance of their studies. For example, the identification of new drugs to correct the basic defect (correctors, potentiators, activators of alternative channels), which is initially done on cell lines, needs to be confirmed in primary cultures. Also, gene therapy strategies need to be validated in polarized preparations of bronchial epithelial cells.

Despite their importance, primary cultures of airway epithelial cells are not easily accessible for many investigators because of difficult cell culture conditions and scarcity of human samples (nasal polyps or bronchi).

The primary cell culture facility supported by the Italian Foundation for Cystic Fibrosis has the goal to help the scientific community working on CF by isolating and distributing bronchial epithelial cells from CF patients and control individuals. The facility is based on the possibility to culture and amplify the initial number of cells obtained from each bronchus in order to generate a number of aliquots that may be frozen and made available for various types of studies.

Servizio di colture primarie di cellule epiteliali bronchiali umane

Le colture primarie di cellule epiteliali delle vie aeree rappresentano un modello molto importante per gli studi sul meccani-

smo patogenetico della malattia polmonare nella fibrosi cistica (FC) e per la valutazione *in vitro* di terapie sperimentali. Esistono già diversi tipi di linee cellulari derivate dall'epitelia bronchiale o tracheale umano. Queste cellule possono essere coltivate facilmente su vasta scala rendendo possibili diversi tipi di esperimenti biochimici e funzionali. Tuttavia nessuna di queste linee cellulari riproduce in maniera completa tutte le caratteristiche dell'epitelia nativo, quali la polarizzazione (cioè lo sviluppo di una membrana apicale e di una basolaterale) e l'espressione di CFTR, ENaC e di altre proteine. Infatti, il processo di immortalizzazione che viene utilizzato per generare una linea cellulare spesso determina la perdita di espressione di CFTR e di altre proteine importanti.

I ricercatori che studiano la FC avvertono quindi l'esigenza di sviluppare e utilizzare colture primarie di epitelia delle vie aeree quale modello essenziale per confermare la rilevanza dei propri studi. Ad esempio, lo sviluppo di farmaci sperimentali per la terapia del difetto di base (correttori, potenziatori, attivatori di canali ionici alternativi), in genere effettuato inizialmente su linee cellulari, richiede una conferma finale su cellule primarie. Anche interventi finalizzati alla terapia genica devono superare la prova importante di efficacia su colture primarie polarizzate, che sono particolarmente refrattarie rispetto alle linee cellulari di uso comune.

Nonostante la loro importanza, le colture primarie costituiscono un modello poco accessibile per molti ricercatori sia per la difficoltà di esecuzione delle colture sia per la scarsa disponibilità del materiale di partenza (polipi nasali o bronchi di pazienti FC e di soggetti di controllo).

Il servizio di colture primarie creato dalla FFC si propone di aiutare la comunità scientifica che lavora sulla FC attraverso l'isolamento e la distribuzione di cellule epiteliali bronchiali da bronchi di pazienti FC e da soggetti di controllo, ottenuti da espansi polmonari di pazienti sottoposti a trapianto polmonare. Il servizio si basa sulla possibilità di coltivare ed amplificare il numero iniziale di cellule ottenuto da ogni bronco in maniera da poter generare un numero ragionevole di aliquote che potranno essere congelate e rese disponibili per diversi tipi di studi.

31. CFaCore: Cystic Fibrosis animal Core Facility

Bragonzi A¹, De Fino I¹, Facchini M¹

¹Infections and Cystic Fibrosis Unit, FFC CFaCore Service, H.S. Scientific Institute, Milano



Alessandra Bragonzi
responsabile del Servizio

The Cystic Fibrosis Animal Core Facility (CFaCore) has been established to support investigations on CF pathogen-

esis and on candidate therapeutic molecules favoring the translation of basic research projects into pre-clinical applications. CFaCore provides researchers with mouse models and special expertise exceeding the capacity of any of the laboratory in the CF researcher institutions. CFaCore provides different levels of services to investigators, including CF mouse models by ensuring genetic quality and health, while guaranteeing that the mice are bred, maintained and used according to the official guidelines for the care and use of animals (IACUC) in biomedical research. The CFaCore has selected a colony of Cfr ko gut corrected C57Bl/6 Cfr^{tm1Unc-TgN(FABPCFTR)} mice among other CF models, according with the following criteria: availability of large number of animals with good health and availability of C57Bl/6 inbred mouse colony. The colony of CF mice has been set up and mice used for breeding and distribution. Additional services of the CFaCore include provision of specialized mice treatments, such as induction of disease states to model the human condition, substance administration, tissue collection and analysis. Despite some limitations, the murine models of acute and chronic lung infection provide valuable resources to mimic the initial and progressive bronchopulmonary infection typical of CF patients. These models are currently used to test novel therapies either targeted at reducing infection or inflammation. Thus, CFaCore assists researchers in the conduction of targeted research projects and provides guidance for experimental design and potential strategies. In particular, CFaCore reviews the IACUC protocol, develops experimental design using animals, treats (almost any route of administration) and monitors the mice (general clinical observations), sacrifices mice, harvests and analyzes biological samples. Additional service include processing of lung for histological analysis. In three years, CFaCore increased her success rate from 44% to 73% calculated as projects presented in response to the annual call/ projects approved. We expect to give a major contribution in providing the rationale and the proof-of-concept for the validation of novel therapies before entering in clinical trial.

CFaCore: servizio alla ricerca su modelli animali per la Fibrosi Cistica

Cystic Fibrosis animal Core Facility (CFaCore) è una nuova sede centralizzata dedicata all'utilizzo dei modelli animali per la FC. L'iniziativa ha come scopo finale quello di individuare e selezionare nei modelli animali le terapie più efficaci e promuovere i progetti più promettenti verso la sperimentazione clinica. CFaCore risponde ad un bisogno emergente tra gli investigatori italiani FC e mette a disposizione infrastrutture e competenze accreditate per l'utilizzo dei modelli animali. CFaCore prevede diversi livelli di servizi per i ricercatori, inclusi modelli animali FC che vengono allevati, gestiti ed utilizzati secondo le linee guida ufficiali per la cura e l'uso di animali nella ricerca biomedica. Servizi aggiuntivi includono la fornitura di trattamenti specializzati, come ad esempio l'induzione dell'infezione respiratoria per mimare la patologia umana, la somministrazione di terapie, la raccolta dei tessuti e l'analisi dei risultati. Nonostante alcune limitazioni, i modelli murini di infusione polmonare acuta e cronica forniscono risorse preziose per mimare l'infezione iniziale e progressiva polmonare tipica di pazienti con fibrosi cistica. Questi modelli sono attualmente utilizzati per testare nuove terapie mirate sia a ridurre l'infezione che l'infiammazione. Quindi, CFaCore assiste i ricercatori nell'utilizzo dei modelli animali guidandoli nella messa a punto di protocolli, nel monitoraggio e nella valutazione dei risultati. In tre anni, la CFaCore ha aumentato il suo indice di successo dal 44% al 73% calcolato come numero di progetti presentati in risposta al bando/ progetti approvati. Ci aspettiamo di dare un importante contributo nel validare nuove terapie nei modelli animali e favorire il loro passaggio alla sperimentazione clinica.

32. QuantiGENE: the FFC facility for the quantification of gene expression

Cabrini G¹, Nicolis E¹, Bezzetti V¹

¹Lab. Patologia Molecolare, Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata, Verona



Giulio Cabrini, responsabile del Servizio QuantiGENE e, nella foto di destra, Elena Nicolis e Valentino Bezzetti, collaboratori

QuantiGENE facility offers to the FFC research groups the opportunity of implementing and strengthening their experimental plan by performing the qualitative and quantitative analysis of gene expression at very low costs and in very short time. The potential applications of the technology offered by QuantiGENE are very wide and usually restricted to groups expert in molecular biology with adequate instrumentation. The principal advantages of the Service are based on three linked points: flexibility of operation on specific requests coming from the user, short time of development the quantification assay and/or in the analysis of the samples and a reduction of the costs compared to the commercial offers. The Service utilizes the Applied Biosystems ABI PRISM 7900HT Fast Real Time PCR System which allows to quantify from 1 to 384 genes in a sample in one operating session, lasting about half a working day. The offer is directed not only to studies in the field of inflammation, microbiology but also in all expression studies in vitro and in vivo. By macroarray approach, the Facility offers the quantification of approximately 100 murine genes involved in immunity. The experiment on mice in vivo is in fact an important step in research in cystic fibrosis and the positive feedbacks for CFaCore Facility show that certain groups are just working and investing accordingly. QuantiGENE is therefore proposed as a service on completion of testing in vivo, in order to deepen on the basis of molecular genetics and the effect of compound treatment.

QuantiGENE: il servizio di quantificazione dell'espressione genica offerto da FFC

Il Servizio QuantiGENE offre ai gruppi di ricerca FFC la possibilità di arricchire e rafforzare il proprio piano sperimentale effettuando l'analisi qualitativa e quantitativa della espressione genica, a costi estremamente contenuti e con tempi di risposta molto celeri. Le applicazioni potenziali della tecnologia offerta da QuantiGENE sono amplissime e usualmente limitate a gruppi esperti in biologia molecolare con adeguata strumentazione.

I vantaggi principali del Servizio si basano su tre punti interconnessi quali la flessibilità di intervento su specifici quesiti dell'utilizzatore, l'accorciamento dei tempi della messa a punto della quantificazione e/o della analisi dei campioni ed un contenimento dei costi rispetto alle comuni disponibilità commerciali. Il Servizio è dotato dello strumento Applied Biosystems ABI PRISM 7900HT Fast Real Time PCR System che permette di quantificare da 1 a 384 geni di un campione in una sola sessione operativa. L'offerta è rivolta a studi nel campo dell'infiammazione ma anche della microbiologia e in tutti gli studi di espressione condotti in vitro e in vivo. Mediante approccio macroarray il Servizio offre inoltre la quantificazione di circa 100 geni murini coinvolti nell'immunità, opportunità che ben si affianca alla CFaCore Facility. QuantiGENE si propone quindi come servizio di completamento sulla sperimentazione in vitro e in vivo, con lo scopo di approfondire su basi di genetica molecolare l'effetto di composti e trattamenti.

CFTR and ENAC Function / Dysfunction

Chairman: Antonio Cao • Introductory overview: Valeria Casavola

33. Interactome in Cystic Fibrosis: role of NHERF1 in actin cytoskeleton and tight Junction pathophysiology

Casavola V¹, Conese M²

¹Department of General and Environmental Physiology, University of Bari; ²Department of Biomedical Science, University of Foggia
(FFC Project #1/2009, concluded)



Valeria Casavola, seconda da destra, nel suo laboratorio con i collaboratori

Background. We previously demonstrated that the over-expression of the cellular protein NHERF1 in human CF airway cells homozygous for F508del mutation rescues F508del CFTR functional expression on the apical membrane. Moreover, NHERF1 modulates the actin cytoskeleton organization and stabilizes F508del CFTR on the apical membrane by the formation of the multiprotein complex NHERF1-ezrin-actin. During the two years of this project we have studied the cellular mechanisms underlying the formation of that multiprotein complex.

Methods and results. In particular we have studied the cellular events by which NHERF1 interacts and activates the small cellular protein ezrin. Ezrin exists in both an inactive, closed conformation and an open, active form that besides binding both F-actin and NHERF1, anchors PKA and localizes it to the proximity of CFTR. Ezrin activation results in the unmasking of its functional binding sites which occurs through conformational changes triggered by a series of events including the phosphorylation of the protein. By expression of ezrin mutants in CF airway cells, we showed that the phosphorylated form of ezrin "per se" is sufficient to rescue chloride efflux and the F-actin content in cells homozygous for F508del mutation while the inactive, unphosphorylated form of ezrin inhibits both the chloride secretion and F-actin organization in the "normal" airway cells. Moreover, using biochemical and physiological experimental approaches we found that it is the interaction of NHERF1 with ezrin that induces the phosphorylation and the activation of ezrin to drive the formation of the NHERF-ezrin-actin multiprotein complex which stabilizes CFTR in the membrane by delaying its internalization. In parallel experiments, we investigated if the multiprotein complex influences the barrier function of the respiratory epi-

thelium and observed that overexpression of either NHERF1 or wt CFTR induces both a re-organization of the cell-cell junctions in CF airway cells and reduces their permeability to small molecules. The same rescue of epithelial barrier tightness was observed in CF airway cells overexpressing the active phosphorylated form of ezrin suggesting, again, that the activation of ezrin is fundamental for the tightness of cell-cell junctions. Moreover, as the massive influx of neutrophil granulocytes into the airway is a hallmark of cystic fibrosis lung disease, we studied the neutrophil transmigration across the epithelial junctions. Importantly, we found that NHERF1 overexpression in CF airway epithelia reduced the transmigration rate to values found in "normal" airway cells confirming the important role of NHERF1 not only in rescuing chloride secretion but also in "re-organizing" the epithelial barrier function to inflammatory cells.

Conclusions and spin-off for research. Altogether these studies provide a more comprehensive understanding of the role of protein interactions with CFTR useful to better characterize possible novel therapeutics targets to correct the defect that is at the basis of CF and its resulting inflammatory pulmonary disease.

Ripristino della proteina CFTR mutata sulla membrana cellulare: nuovi bersagli terapeutici

Premesse. Nei polmoni di pazienti affetti da Fibrosi Cistica (FC) si osserva: 1) la mancanza della proteina CFTR sulla membrana apicale delle cellule respiratorie; 2) una presenza considerevole di polimorfonucleati neutrofili nel lume delle vie aeree. Entrambi i difetti sono responsabili delle conseguenze cliniche e patologiche a livello polmonare.

Particolare interesse, negli ultimi anni, è stato rivolto allo studio del ruolo modulatorio di proteine cellulari che, interagendo con CFTR, ne regolano l'attività e la stabilità sulla membrana. In cellule bronchiolari FC in coltura abbiamo dimostrato che l'aumentata sintesi della proteina NHERF1 ripristina la secrezione di cloro e aumenta la presenza sulla membrana della proteina F508del CFTR. In particolare abbiamo osservato che la proteina NHERF1 ripristina l'organizzazione citoscheletrica e determina la formazione di un complesso multiproteico che favorisce l'inserimento nella membrana apicale della proteina CFTR mutata.

Obiettivi. Lo scopo dello studio appena concluso è stato quello di studiare i meccanismi cellulari mediante i quali l'aumentata sintesi della proteina NHERF1 in cellule FC è in grado sia di indurre la formazione del complesso proteico, NHERF1-ezrin-actina, che ripristinare la funzionalità della F508del CFTR sulla membrana. Particolare attenzione è stata rivolta al meccanismo di attivazione della piccola proteina ezrin che è presente in due forme: una forma inattiva chiusa su se stessa che risiede nel citoplasma ed una attiva aperta che fa da ponte fra NHERF1 e l'actina. e risiede nella regione di membrana.

Metodi e principali risultati. La fosforilazione della proteina ezrin è l'evento chiave per la sua attivazione e per la costituzione del complesso multiproteico. Noi abbiamo osservato che inducendo in cellule bronchiolari in coltura FC la sintesi di ezrin mutata già fosforilata e quindi attiva si otteneva un ripristino della presenza funzionale della proteina F508del CFTR sulla membrana e una aumentata organizzazione dei filamenti di actina. Mediante l'uso di sperimentazioni biochimiche abbiamo dimostrato che è proprio NHERF1 che interagendo con ezrin ne determina la sua attivazione e fosforilazione e la conseguente formazione del complesso multiproteico. In parallelo abbiamo

analizzato il ruolo di NHERF1 e di ezrin nella formazione delle giunzioni cellula-cellula che costituiscono la principale barriera fra l'ambiente interno ed esterno. L'analisi morfologica in microscopia confocale, unitamente alle misure di permeabilità di piccole molecole e della trasmigrazione dei neutrofili attraverso i monostrati di cellule FC hanno evidenziato come l'aumento della sintesi di NHERF1 o di ezrin attiva fosforilata determinano una riorganizzazione delle giunzioni cellula-cellula e una significativa diminuzione della permeabilità e della trasmigrazione dei neutrofili.

Conclusioni. Nel complesso questi studi chiariscono alcuni aspetti non ancora noti dell'interazione della proteina CFTR con altre proteine cellulari e contribuiscono ad individuare nuovi possibili bersagli terapeutici che potrebbero correggere il difetto di base della FC e la malattia infiammatoria polmonare.

34. The search of HSP70/HSC70 complex inhibitors useful to correct the ΔF508-CFTR

Mazzei M¹, Fossa P¹, Turco C²

¹Dip. Scienze Farmaceutiche, Università di Genova; ²Dip. Scienze Farmaceutiche, Università di Salerno
(FFC Project#5/2010, in progress)



Mauro Mazzei, secondo da destra, con collaboratori

Background. The presence of DF508 mutation in CFTR is the major cause for morbidity and mortality in Cystic Fibrosis. In this case, patients do not have the CFTR in the plasma membrane as that protein remains entrapped in the endoplasmic reticulum (ER). At this level, DF508-CFTR cannot move towards the Golgi, but it is targeted to degradation by a system of chaperones, namely proteins devoted to the correct folding or degradation of proteins. Therefore, our goal is the finding of molecules (Correctors) favouring the proper folding and the maturation of DF508-CFTR to get the plasma membrane, where it maintains sufficient activity.

Objectives. The present project is directed to modulate the activity of those chaperones more involved in the degradation of CFTR. In this regard, the HSP70/HSC70 complex is a principal player in the processing of both WT- and DF508-CFTR. In particular, HSC70 is the first chaperone that binds WT- or DF508-CFTR and it was demonstrated that the downregulation of HSC70 may favour the moving of DF508-CFTR from the ER to the plasma membrane and may also increase the persistence of the mutant protein in the membrane.

Preliminary results. Since the target, in this first year of the project, is the downregulation of HSC70, our attention was addressed to a paper in which a quinolizidine alkaloid

derivative, namely Oxymatrine (or Matrine N-oxide), was used in lowering the levels of HSC70 with the aim of inhibiting Hepatitis B virus replication. In our approach to see if this strategy is appealing as a CF therapy, we have selected, instead of Oxymatrine, the Matrine since this alkaloid is the metabolic product of Oxymatrine and generally has the same action and toxicity as Oxymatrine. When Matrine was used in A549 cells transfected with the DF508-CFTR gene, it was possible to appreciate diminished levels of HSC70 and, by means of specific antibodies, an ameliorated trafficking of the mutant protein from the ER to the plasma membrane. Interestingly, downregulation of HSC70 resulted in increased levels of DF508-CFTR complexes with the co-chaperone BAG3, that furthermore appeared to co-localize with the mutant protein on the cell surface. The action mechanism of Matrine appears to be directed to the mRNA of HSC70 and, specifically, Matrine would bind to the 3'-untranslated regions of the messenger. In this case Matrine would act at an early step in the synthesis of HSC70.

Spin-off for research and clinical purposes. Hopefully, Matrine could be of support in future CF therapy especially providing grounds for the association with DF508-CFTR-binding correctors that, finding a more favourable environment, could be administered at lower and safer dosage.

Ricerca di inibitori di chaperoni del complesso HSP70/HSC70 utili per correggere la ΔF508-CFTR

Premesse. La presenza della mutazione DF508 nella CFTR è la principale causa di malattia in Fibrosi Cistica (FC). In questo caso i pazienti non presentano la CFTR sulla membrana plasmatica in quanto la proteina mutata, essendo incapace di assumere la corretta struttura, rimane intrappolata nel reticolo endoplasmatico ed è avviata alla demolizione. E' anche noto che se la DF508-CFTR riesce a raggiungere la membrana plasmatica risulta parzialmente funzionale e quindi un suo salvataggio è desiderabile per una terapia FC. I principali responsabili della scelta del destino delle proteine sia corrette che mutate sono i chaperoni, cioè proteine deputate o alla maturazione della proteina corretta (come avviene con la WT-CFTR) o al suo allontanamento se incorrecta (caso della DF508-CFTR). Dai dati della letteratura si desume che un ruolo importante nella decisione tra demolizione della DF508-CFTR e sua maturazione viene assunto dal sistema chaperonico HSP70/HSC70. In particolare una minore concentrazione di HSC70 è considerata favorevole al passaggio della DF508-CFTR verso la membrana.

Obiettivi. Quindi il nostro obiettivo per il primo anno di questo progetto è il ritrovamento di molecole che possano interferire con HSC70. Per questo la nostra attenzione si è rivolta ad un lavoro in cui l'alcaloide chinolizidinico Oximatrina (o Matrina N-ossido) veniva usato per diminuire i livelli di HSC70 con l'intento di inibire la replicazione del virus dell'epatite B.

Metodi e risultati preliminari. In questo approccio per vedere se questa strategia può essere di interesse per una terapia FC, abbiamo utilizzato la Matrina (che è un metabolita dell'Oximatrina); in sostanza non vi sono differenze di azione e tossicità tra la Matrina ed il suo N-ossido. Quando la Matrina è stata usata in cellule A549 trasfettate con il gene della DF508-CFTR è stato possibile vedere sia una diminuzione dei livelli di HSC70 sia, con specifici anticorpi, un notevole incremento della DF508-CFTR in membrana. Inoltre la diminuzione di HSC70 ha portato alla formazione, sulla superficie cellulare, di un complesso della DF508-CFTR con il co-chaperone BAG3. Per quanto riguarda il meccanismo d'azione si ritiene che la Matrina si leggi alle regioni non tradotte in 3' del messaggero di HSC70. Quindi la Matrina agisce ad uno stadio a monte della sintesi di HSC70.

Possibili ricadute cliniche. Proprio per questo meccanismo di azione la Matrina potrebbe essere di interesse nella terapia FC sia da sola ma probabilmente potrebbe favorire un miglior utilizzo di quei correttori che agiscono legandosi alla DF508-CFTR.

35. Structural features of the intracellular domains of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

Moran O, Galeno L, Marasini C
Istituto di Biofisica CNR, Genova
(FFC Project #7/2010, in progress)



Oscar Moran nel suo laboratorio con due collaboratrici

Background. Cystic fibrosis (CF) is caused by mutations of CFTR, a membrane protein involved on the chloride and bicarbonate transport in epithelia. The functional regulation of CFTR occurs in the intracellular domains, where also located the putative binding site of potentiators, drugs are successfully used in the therapy of CF caused by one class of mutations. Unfortunately, a better targeted development and drug optimization is limited by the insufficient knowledge of the details of the mechanism of CFTR activation and the way potentiators regulate it.

Objectives. In order to study the structure and the interactions between regions responsible of these mechanisms, by recombinant techniques, we have prepared the regulatory domain, that activates the CFTR when is phosphorylates as response of humoral signals, and the two nucleotide binding domains (NBD1 and NBD2), that determine the opening and closing of the chloride passage as a result of ATP binding and hydrolysis.

Project status. We are carrying out a series of measurements using spectroscopic and biochemical methods in order to analyse the conformational changes of each domain in the various states (phosphorylation or ATP binding), the interaction between the various domains and their modification by application of CFTR-potentiators. These studies are complemented with the results obtained from studies of X-ray scattering (SAXS) at the synchrotron and simulations of molecular dynamics in a super-computer.

Spin-off for research and clinical purposes. This study, which will be extended with experiments on proteins carrying mutations correlated to CF, will allow to better understand the physiology of the CFTR and its alteration in pathological conditions, and the molecular mechanism of the CFTR-potentiators, that it will allow to design better targeted drugs for the CF therapy.

Caratteristiche strutturali dei domini intracellulari della proteina responsabile della fibrosi cistica (CFTR)

Premesse. La fibrosi cistica (CF) è causata da mutazioni della CFTR, una proteina di membrana responsabile del trasporto di cloruro e bicarbonato negli epitelii. La regolazione funzionale della CFTR avviene nei domini intracellulari, dove si trova anche il

sito putativo di legami dei potenziatori, farmaci che si utilizzano con successo per la terapia della CF causata da una classe di mutazioni. Purtroppo, uno sviluppo più mirato all'ottimizzazione di farmaci è limitato dalla scarsa conoscenza dei dettagli del meccanismo di attivazione della CFTR e del modo in cui i potenziatori possano regolarlo.

Obiettivi e metodi. Per studiare la struttura e le interazioni tra le regioni responsabili di questi meccanismi, abbiamo preparato in modo ricombinante il dominio regolatore, che quando viene fosforilato a seguito di segnali umorali alla cellula è coinvolto con la attivazione della CFTR, e i due domini leganti nucleotidi (NBD1 e NBD2), che determinano la apertura e chiusura del passaggio di cloruro a seguito del legame di ATP e la sua idrolisi.

Stato del progetto. Stiamo portando avanti una serie di misure utilizzando tecniche spettroscopiche e biochimiche per analizzare i cambiamenti conformazionali di ciascuno dei domini nei loro diversi stati funzionali (fosforilazione o legame con l'ATP), l'interazione tra i diversi domini e la loro modifica dalla applicazione di potenziatori della CFTR. Questi studi sono confrontati con i risultati ottenuti da studi di dispersione di raggi-X (SAXS) al sincrotrone e simulazioni di dinamica molecolare in un super-calcolatore.

Possibili ricadute. Questo studio, esteso ad esperimenti su proteine portanti mutazioni correlate alla CF ci permetteranno capire meglio la fisiologia della CFTR e la sua alterazione in condizioni patologiche, così come il meccanismo molecolare dei potenziatori, che permetterà di pianificare uno sviluppo più mirato di farmaci indirizzati alla terapia della CF.

36. Decrease apical infection of CFTR by *Pseudomonas aeruginosa* infection: role of NHERF1 phosphorylation

Tamanini A¹, Reshkin S²

¹Lab. Patol. Molecolare, Lab. Analisi Cliniche ed Ematologiche, Azienda Osp. Integr. Verona; ²Dip. Fisiol. Generale ed Ambientale, Università di Bari
(FFC Project #8/2010, concluded)



Anna Tamanini, nella foto di sinistra al centro, e Stephan Reshkin, secondo da sinistra nella foto di destra, con alcuni collaboratori

Background. Lung disease in Cystic Fibrosis (CF) is characterized by chronic infection and inflammation that represents a key pathogenic event of respiratory failure. As an important part of this pathological process, *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) infections of the host airway cell have been shown to decrease apical expression of both wild-type (wt) and F508del CFTR through the inhibition of apical endocytic recycling, thus potentially impairing the efficacy of proposed potentiator/corrector therapies (Swiatecka-Urban A. et al. 2002, Guerra L. et al. 2005, Kwon SH. et al. 2007). Recently, the scaffolding protein, NHERF1, has been shown to have a role in the regulation of CFTR trafficking and apical membrane stability/function.

Objectives. In order to better understand the dynamics of

this process, we have investigated the effect of Pa on the protein NHERF1 and CFTR expression by Western Blot, *in vitro* in wt respiratory cells and *in vivo* in murine lung upon exposure of the cells and mice to Pa.

Methods and preliminary results. Pa induced a reduction of CFTR expression and increased both total NHERF1 expression and the relative expression of the higher molecular weight, phosphorylated form in both bronchial epithelial cells and in the lung of the mice. The results demonstrated that the exposure to Pa does indeed increase NHERF1 phosphorylation as it was very sensitive to Alkaline Phosphatase (AP). Our experiments have also shown that the increased expression of mature CFTR driven by the overexpression of NHERF1 does not render it insensitive to the negative effects of Pa infection. In parallel, *in vivo*, we observed that the infection induced a reduction of phosphorylation of Ezrin, corresponding to its activation, independently of the presence of NHERF1, suggesting the involvement of an alternative pathway interconnected to NHERF1 function. Lastly, histological lung sections of NHERF1 KO mice stained with Hematoxylin and Eosin displayed the presence of inflammatory cells even in absence of infection and a weakly up-modulated basal expression of inflammatory genes.

Spin-off for research. The presence of these abnormalities could open new experimental ways that need to be elucidated to understand if NHERF1 could be one of components of the signalling network involved in the expression of inflammatory genes in murine lung and if its absence, associated to the reduction of CFTR expression, could play a critical role in the pathogenesis of CF. The results of this "pilot project" indicate that the molecular identification of the pathological mechanisms responsible for these effects could identify novel targets to block this process and also block the Pa interference with the efficacy of drugs capable of increasing CFTR apical membrane expression.

Diminuita espressione di CFTR in cellule epiteliali respiratorie in seguito ad infezione da P. aeruginosa e ruolo della proteina NHERF1

Premesse. La fibrosi cistica è caratterizzata da un'esagerata infezione delle vie respiratorie che rappresenta un evento patogenetico chiave del progressivo declino della funzione respiratoria in questi pazienti. La ricostituzione del canale del cloro attraverso l'induzione del passaggio della proteina CFTR mutata dal reticolo endoplasmatico alla membrana apicale riporta ad una corretta clearance mucociliare e alla eliminazione di *P. aeruginosa* (Pa) dalle vie aeree. Numerosi studi dimostrano che l'infezione delle cellule epiteliali bronchiali induce la diminuzione dell'espressione apicale, sia della CFTR normale, che di quella mutata, portando così ad una riduzione dell'efficacia di composti potenziatori/correttori.

Obiettivi. In questo progetto, è stato studiato l'effetto di Pa sull'espressione di NHERF1 e CFTR *in vitro* e *in vivo*. CFTR e NHERF1 sono stati analizzati mediante Western Blot in cellule respiratorie e nel polmone murino in seguito ad infezione acuta delle cellule o dei topi con Pa.

Risultati preliminari. Il batterio induceva una riduzione della CFTR ed un aumento di espressione di NHERF1 e della sua forma fosforilata, associata alla sua inibizione, sia in cellule epiteliali bronchiali che nei polmoni di topo. Parallelamente, *in vivo*, sia in polmoni di topi normali che nei polmoni di topi non più in grado di esprimere NHERF1, si è osservato che l'infezione riduce la fosforilazione di Ezrin, inducendone la sua attivazione, in maniera indipendente dalla presenza di NHERF1, suggerendo il coinvolgimento di una via alternativa connessa alla funzione di NHERF1. In questo studio, in sezioni istologiche di polmone di topi non esprimenti NHERF1, colorate con Ematossilina ed Eosina, è stata osservata la presenza di cellule infiammatorie anche in assenza di infezione e una debole espressione basale up-modulata di geni coinvolti nell'infiammazione.

Commenti e conclusioni. Queste osservazioni necessitano di essere confermate con un numero maggiore di esperimenti sia *in vivo* che *in vitro* al fine di capire il ruolo di NHERF1 nella rete di segnali coinvolti nell'espressione di geni infiammatori e se la sua assenza associata alla ridotta espressione della CFTR possa svolgere un ruolo chiave nella patogenesi della fibrosi cistica.

Possibili ricadute. I risultati ottenuti durante lo svolgimento di questo progetto "pilota" indicano che la comprensione dei meccanismi molecolari alla base di questi effetti potrebbero portare alla identificazione di nuovi bersagli terapeutici per la cura della fibrosi cistica.

37. Molecular and functional study of the epithelial Na⁺ channel (ENaC) in CF and CF-like disease

Bombieri C¹, Seia M², Lucarelli M³, Ascenzioni F³, Conese M⁴,

¹Sez. Biologia e Genetica, Dip. Scienze della Vita e della Riproduzione, Università di Verona;

²Fondazione IRCCS Ca' Granda Osp. Maggiore Policlinico;

³Sez. Biochimica Clinica, Dip. Biotecnologie Cellulari ed Ematologia, Sapienza Univ. di Roma, Azienda Policlinico Umberto I;

⁴Dip. Scienze Biomediche, Lab. di Patologia Generale, Università di Foggia
(FFC Project #1/2010, concluded)



Chiara Bombieri, prima a sinistra, con due collaboratrici del suo laboratorio

Background. Recent evidences suggested that ENaC could be involved in CF: mutations in ENaC genes found in CF or CF-like patients, Na⁺ transport defect observed in CF patients, functional interaction between CFTR and ENaC. Moreover, experimental evidences suggest that DNA methylation would control transcription of ENaC genes.

Objectives. Analysis of genes encoding for ENaC subunits (SCNN1A, B, and G) at mutational level, including biological and functional analysis in CF and CF-like disease.

Methods. Identification of mutations in SCNN1A, SCNN1B and SCNN1G genes by DNA sequencing in CF patients with one unidentified CF mutation. Analysis of the gene expression patterns by reverse transcriptase PCR and real time PCR. Analysis of DNA methylation-dependent transcriptional control of ENaC in cell lines and nasal epithelial cells by HpaII / PCR also in presence of drug modulating gene expression and/or methylation.

Main results. Several rare mutations were found in SCNN1A, SCNN1B, and SCNN1G genes in a group of CF patients. Tagged sequences of ENaC subunits were cloned in mammalian expression vector to test activity of mutated ENaC genes by fluid absorption assay in FRT cell line system was obtained. Methylation analysis showed a strong correlation between expression and DNA methylation only for SCNN1A gene.

Comments & Conclusions. Our mutation analysis results are in agreement with previous studies reporting about a possible involvement of ENaC genes in CF. Further biological and functional studies could be useful to determine the functional role of the potentially damaging mutations found. Methylation pattern suggest for SCNN1A gene a methylation-dependent regulation that may allow this gene to regulate the other 2 ENaC genes. Further analysis on other target sites will be useful for a better comprehension of mechanism involved in methylation-dependent expression of SCNN1A and of DNA methylation role in the of SCNN1B and SCNN1G genes expression.

Spin-off for research & clinical purposes. The results of this study need further steps to assess the functional role of ENaC mutations, offering new insight that will help to clarify disease molecular mechanism. And can also help to clarify the mechanism(s) of ENaC gene transcriptional control and of their coordinated expression. They may be of interest for the comprehension of the mechanisms of CFTR – ENaC interaction and possibly for an optimization of therapeutic strategies for CF, involving ENaC inhibition.

Studio molecolare e funzionale del canale epiteliale del sodio (ENaC) in soggetti con FC e FC-atipica

Ragioni dello studio. Dati recenti suggeriscono che i geni codificanti per le subunità di ENaC possono essere coinvolti nella FC: mutazioni nei geni per ENaC sono state identificate in pazienti con FC o FC-atipiche e iper-espressione delle subunità ENaC sono state identificate nell'epitelio nasale in FC. Inoltre, dati sperimentali suggeriscono che la metilazione del DNA potrebbe controllare la trascrizione dei geni per ENaC.

Obiettivi. Identificazione e caratterizzazione biologico-funzionale di mutazioni nei geni codificanti per le 3 subunità di ENaC (SCNN1A, SCNN1B e SCNN1G) in pazienti con FC. Metodi – Analisi di mutazioni nei geni SCNN1A, B, G mediante sequenziamento, in pazienti con una mutazione FC identificata. Analisi dei pattern di espressione genica mediante RT-PCR e Real Time PCR. Analisi del controllo trascrizionale metilazione-dipendente di ENaC, in linee cellulari e cellule dell'epitelio nasale con HpaII-PCR, in presenza e non di sostanze che modulano metilazione e/o espressione genica.

Principali risultati. Sono state identificate varie mutazioni rare nei tre geni studiati. È stato prodotto un vettore contenente sequenze di ENaC per lo studio della variazione di attività delle sequenze mutate. L'analisi di metilazione mostra una forte correlazione tra espressione e metilazione del DNA solo per il gene SCNN1A.

Commenti e conclusioni. I nostri risultati sono in linea con precedenti studi che riportano un possibile coinvolgimento di ENaC in FC. Ulteriori analisi funzionali, tuttavia, sono necessarie per determinare il ruolo biologico delle mutazioni potenzialmente dannose che sono state identificate. Il pattern di metilazione suggerisce che SCNN1A abbia un ruolo nella regolazione degli altri 2 geni. Ulteriori studi sono però necessari per meglio comprendere i meccanismi coinvolti nella metilazione e regolazione dell'espressione dei geni SCNN1A, B, G.

Possibili ricadute per ricerca e clinica. I risultati dello studio necessitano di approfondimenti per determinare il ruolo delle mutazioni in ENaC, ma offrono nuovi spunti per chiarire i meccanismi molecolari della malattia. Contribuiscono inoltre a chiarire i meccanismi di controllo dell'espressione di ENaC e possono essere di interesse per meglio comprendere le interazioni CFTR-ENaC e per l'ottimizzazione delle strategie terapeutiche basate sull'inibizione di ENaC.

38. Strategies for the suppression of Na⁺ and fluid hyperabsorption in cystic fibrosis airway disease

Moran OZ, Melani R, Gianotti A, Caci E, Galietta LJV

Lab. di Genetica Molecolare, Istituto Giannina Gaslini, Genova (FFC Project #7/2009, concluded)



Olga Zegarra, seconda da sinistra, con le sue collaboratrici

Background. The most serious problem experienced by CF patients is the airway disease, characterised by increased viscosity of mucus with subsequent infection and colonization of the lungs. These conditions are all consequences of airway dehydration. Mutated CFTR caused reduction of chloride and water secretion and lead to prevalence of sodium and water absorption that resulted mostly from the activity of the epithelial sodium channel ENaC.

Objectives. The main objective of this project was to determine whether, and in which way, it is possible to increase the hydration of CF airways. We aimed to reduce ENaC subunit expression, increase the residual activity of CFTR on CF epithelia, determine how important the contribution of other proteins involved in fluid absorption is, and explore new means to transfer siRNA molecules into the polarised epithelium instead of transfecting the cells before epithelium formation.

Methods. We have used siRNA complementary to ENaC subunits, and to prostasin, a protease involved in ENaC activation. These siRNA are small molecules that enter the cell and cause a reduction in the expression of proteins. After siRNA transfection of CF and non-CF epithelia, we have measured ENaC function as short-circuit currents and the hydration level by using a fluorescent dye in a confocal microscope.

Main results. We have established that the contribution proteins other than ENaC to sodium absorption is lower than expected (<10%), thus less interesting as possible therapeutical targets. Our results demonstrate that combined application of siRNA against alpha and beta ENaC subunits, but not with PRSS8, leads to reduction of ENaC-mediated sodium transport and increases CF airways hydration. The hydration increase obtained in this way is similar to the increase obtained in non-CF epithelia after maximal CFTR stimulation.

Comments & Conclusions. ENaC activity reduction by means of a siRNA approach seems an efficient way to increase up to 7 days the hydration level of CF epithelium.

Spin-off for research & clinical purposes. We were unable to find an appropriate vector/condition to transduce with siRNAs the airway epithelium. Once this vector was found it will be possible to translate our results to a phase I clinical trial.

Strategie per la soppressione dell'iperassorbimento di Na⁺ e fluido nella malattia delle vie aeree in fibrosi cistica

Ragioni dello studio. Il problema maggiore dei pazienti colpiti da fibrosi cistica (FC) riguarda la compromissione delle vie aeree, dove un'aumentata viscosità del muco promuove le infezioni e la colonizzazione batterica del polmone. Questa condizione risulta da una idratazione insufficiente delle vie aeree come conseguenza della ridotta secrezione di cloruro attraverso la proteina mutata, che porta ad una prevalenza dell'assorbimento di sodio e acqua attraverso il canale ENaC.

Obiettivi. Il principale obiettivo di questo progetto è quello di stabilire se sia possibile, e in quale maniera, recuperare l'idratazione delle vie aeree di questi pazienti. Vorremmo agire sull'ENaC, sull'attività residua di CFTR in epitelii FC, e studiare quanto contribuiscono altre proteine all'assorbimento dell'acqua nell'epitelio. Vorremmo anche trovare le condizioni per poter trasferire i siRNA nell'epitelio già polarizzato e non durante il piastramento delle cellule che poi formeranno l'epitelio.

Metodi. Abbiamo usato RNA d'interferenza (siRNA) contro le

subunità del ENaC e contro la prostasina, enzima coinvolto nell'attivazione del canale. I siRNA sono piccole molecole che penetrano nella cellula portano ad una diminuzione nell'espressione delle proteine. Dopo trasfezione delle cellule non-FC e FC con i siRNA abbiamo misurato l'attività dell'ENaC come corrente di cortocircuito e l'idratazione dell'epitelio con coloranti fluorescenti.

Principali risultati. Abbiamo stabilito che il contributo di altre proteine all'assorbimento di fluido è minore di quanto si pensasse (<10%), quindi meno interessanti come bersagli terapeutici in FC. I nostri risultati dimostrano anche che l'azione combinata di dosi basse di siRNA contro le sub unità alfa e beta dell'ENaC, ma non con i siRNA contro la prostasina, porta ad una riduzione significativa dell'assorbimento di sodio e ad un'aumento dell'idratazione dell'epitelio FC. Questo aumento è simile a quello misurato in epitelii non-FC quando la CFTR viene attivata a massimi livelli.

Commenti e conclusioni. Ridurre l'attività dell'ENaC mediante l'utilizzo dei siRNA sembra essere un buon metodo per aumentare in maniera duratura (almeno 7 giorni) l'idratazione dell'epitelio FC.

Possibili ricadute per ricerca e clinica. Ancora non siamo riusciti a trovare il vettore appropriato per far sì che l'epitelio delle vie aeree internalizzi le molecole di siRNA. Una volta trovato si potrebbe passare ad una sperimentazione clinica di fase I.

Airway inflammation: new therapeutical perspectives

Chairman: Giorgio Berton • Introductory overview: Andrea Battistoni

39. Evaluation of the usefulness of therapeutic approaches aiming at increasing glutathione levels in the airways of Cystic Fibrosis patients to control lung infections and bacterial-induced damage

Battistoni A

Dip. Biol. Univ. Tor Vergata, Roma
(FFC Project #15/2010, in progress)



Andrea Battistoni, al centro, con il suo gruppo di ricerca

Background. A major defect characterizing Cystic Fibrosis (CF) is the marked decrease in reduced glutathione (GSH) concentration in the airway surface liquid (ASL) of patients. The roles of GSH in this compartment have not been characterized in detail, but it is likely that this antioxidant molecule plays an important anti-inflammatory role due to its ability to scavenge the reactive oxygen species which are continuously generated in the lungs. An elevated concentration of GSH in the ASL could be particularly important to control the damage induced by pyocyanin, an exotoxin released by *P. aeruginosa*, which generates free radicals and significantly contributes to the pathophysiological alterations typical of the CF lung.

Objectives. Our aim was to investigate the involvement of GSH in the response to bacterial infections and the potential usefulness of pharmacological treatments able to increase GSH in the lung to treat or prevent inflammation and infections in CF.

Methods. To reach our goals, we are 1) investigating the role of the GSH status on bacterial infections in cultured cells 2) analyzing the protective role of GSH against pyocyanin toxicity, 3) carrying out a preclinical investigation in CF mice on the effects of the oral administration of N-acetylcysteine.

Preliminary results. We have found that extracellular GSH can drastically reduce *B. cenocepacia* ability to adhere and invade epithelial respiratory cells. This effect is correlated to a GSH-dependent increase in the number of free thiols on the surface of epithelial cells, suggestive of a change in the oxidoreductive status of membrane proteins involved in *B. cenocepacia* recognition. Treatments with GSH led to

a consistent reduction of the expression of IL-8, TNF- α and IL-1 β in response to *B. cenocepacia* infection. Moreover, we have found that extracellular GSH prevents apoptosis and cell growth arrest due to pyocyanin.

Comments & Conclusions. Extracellular GSH can modulate the interaction between bacteria and epithelial respiratory cells and reduce cellular damage due to pyocyanin.

Spin-off for research & clinical purposes. Our findings suggest that therapies aimed at restoring normal levels of GSH in the ASL might be beneficial to control lung damage caused by infections and highlights the importance of developing models to test appropriate therapeutic approaches.

Valutazione dell'utilità di approcci terapeutici mirati ad aumentare i livelli di glutatione nelle vie aeree dei pazienti con Fibrosi Cistica per controllare le infezioni batteriche polmonari ed il danno indotto da batteri.

Ragioni dello studio. Uno dei difetti che caratterizzano i pazienti affetti da Fibrosi Cistica (FC) è una marcata riduzione del contenuto di glutatione ridotto (GSH) nei liquidi che rivestono le superfici delle vie aeree. Le funzioni del GSH in questo compartimento non sono ben caratterizzate, ma è probabile che esso svolga un importante ruolo antinfiammatorio grazie alla sua capacità di rimuovere le specie reattive dell'ossigeno che vengono generate in modo continuo nei polmoni. Un'elevata concentrazione di GSH nelle vie aeree potrebbe essere particolarmente importante per contrastare i danni indotti dalla pio cianina (PCN), un'esotossina rilasciata da *P. aeruginosa*, che genera radicali liberi e contribuisce alle alterazioni fisiopatologiche tipiche del polmone FC.

Obiettivi. Il nostro obiettivo era quello di studiare il coinvolgimento del GSH nella risposta alle infezioni batteriche e l'eventuale utilità di trattamenti farmacologici mirati ad aumentare i livelli di GSH nei polmoni dei pazienti FC.

Metodi. Per raggiungere il nostro obiettivo stiamo 1) studiando il ruolo del GSH nel controllare le infezioni batteriche in modelli cellulari, 2) analizzando il ruolo protettivo del GSH nei confronti della tossicità della PCN; 3) portando avanti uno studio preclinico su topi FC per valutare l'utilità della somministrazione orale di N-acetilcisteina.

Risultati preliminari. Abbiamo dimostrato che il GSH extracellulare riduce la capacità di *B. cenocepacia* di aderire e penetrare nelle cellule epiteliali di origine respiratoria. Questo effetto è associato ad un cambiamento nel numero dei sulfidrili liberi presenti sulla superficie delle cellule, che suggerisce che il GSH cambi lo stato ossidoreduttivo di proteine di membrana coinvolte nel riconoscimento del patogeno. Inoltre, trattamenti con GSH riducono significativamente l'espressione di citochine proinfiammatorie in risposta alle infezioni con *B. cenocepacia*. Infine, abbiamo osservato che il GSH extracellulare previene l'arresto della crescita e la morte cellulare causati da PCN.

Commenti e conclusioni. Il GSH extracellulare può modulare l'interazione tra batteri e cellule dell'epitelio respiratorio e ridurre il danno cellulare da PCN.

Possibili ricadute per ricerca e clinica. I nostri studi suggeriscono la possibile utilità di terapie mirate a ripristinare un normale livello di GSH nel polmone dei pazienti CF ed enfatizzano l'importanza di sviluppare modelli animali per sviluppare appropriati approcci terapeutici.

40. Modulation of sphingolipid metabolism as a strategy for the treatment of CF lung inflammation

Dechechci MC¹, Gambari R²

¹Lab. di Patologia Molecolare, Lab. Analisi Chimico-Cliniche ed Ematologiche, Università di Verona; ²Dipart. di Biochimica e Biologia Molecolare, Università di Ferrara
(FFC Project #16/2010, in progress)



Maria Cristina Dechechci (prima a dx) con il suo gruppo di ricerca

Background. To date, anti-inflammatory approaches developed against CF lung pathology present several limitations, so identification of novel molecular targets is a major priority. Sphingolipids (SLs) are important bioeffector molecules which are rising interest because of their role in many pulmonary disorders including CF. Results from different CF mouse models and patients, suggest that normalization of the SL ceramide could be useful to decrease infection and inflammation in CF airways. Miglustat, an inhibitor of the synthesis of GSLs, already used for treating type I Gaucher disease, produces an anti-inflammatory effect in bronchial epithelial cells (Dechechci 2008).

Objectives. Thanks to the FFC funding, we extended the analysis of the anti-inflammatory effect of miglustat, by investigating the anti-inflammatory properties *in vitro*; the therapeutic potential in controlling CF chronic airway inflammation; the possible anti-inflammatory action of either gene silencing or pharmacological inhibition (in collaboration with S. Cheng, Genzyme Corporation) of enzymes of SL metabolism, in order to provide pre-clinical evidence to support the use of miglustat for the treatment of CF lung inflammation.

Preliminary results. Through this study we validated the anti-inflammatory effect of miglustat in CF primary human airway cells grown at air-liquid interface and in murine models of lung inflammation (Dechechci, 2011). With respect to the attempt in understanding the molecular mechanism of action, our results indicate that non-lysosomal glucosylceramidase (GBA2) does not seem to be the target of the anti-inflammatory effect of miglustat since both inhibition of function by MZ-21 and silencing with siRNA do not reduce the inflammatory response to *P aeruginosa* in bronchial epithelial cells. On the other hand, the compound Genz-123346, exerts an inhibitory effect very similar to that previously observed with the structurally unrelated compounds, the imino sugars miglustat and NB-DGJ, suggesting glucosylceramide synthase (GlcCerT), one of the common molecular targets of these compounds, as putative biochemical pathway involved in the anti-inflammatory activity of miglustat.

Conclusions. These pre-clinical results further strengthen the efficacy of miglustat in controlling the immune response.

Spin-off for clinical purposes. In particular this study has real translational ramifications, considering that miglustat is an orally bioavailable FDA-approved and EMA-designated orphan drug, available for clinical trials.

La modulazione del metabolismo degli sfingolipidi come bersaglio terapeutico per la malattia polmonare in fibrosi cistica

Premesse. Le cure attualmente disponibili per l'infiammazione polmonare cronica dei pazienti FC sono poco efficaci e le limitazioni emerse dall'uso dei tradizionali anti-infiammatori, quali corticosteroidi e ibuprofene, spingono la ricerca verso nuovi farmaci in grado di ridurre i danni provocati da una risposta persistente ed esagerata, senza compromettere le difese. Studi effettuati in diversi modelli murini e pazienti FC suggeriscono che la normalizzazione dello sfingolipide (SL) ceramide potrebbe essere uno strumento utile per ridurre l'infiammazione polmonare in FC. Il miglustat, inibitore della sintesi dei glicosfingolipidi (GSLs), già usato per il trattamento della malattia di Gaucher e di altre sfingolipidosi, produce un effetto anti-infiammatorio in cellule epiteliali bronchiali (Dechechci 2008).

Obiettivi. Grazie ai finanziamenti da parte della FFC, abbiamo esteso l'analisi delle proprietà anti-infiammatorie del miglustat ed analizzato l'effetto della inibizione dell'espressione e dell'attività di alcuni enzimi del metabolismo dei SLs (in collaborazione con S. Cheng, Genzyme Corporation), allo scopo di produrre evidenze pre-cliniche per supportare l'utilizzo di questo farmaco per l'infiammazione FC.

Risultati preliminari. Il miglustat ha un effetto anti-infiammatorio in colture primarie ottenute da pazienti FC e in modelli murini di infiammazione polmonare (Dechechci, 2001). In relazione al possibile meccanismo d'azione, i nostri risultati indicano che la glucosil-ceramidasi non lisosomiale (GBA2), non sembra avere un ruolo sull'azione del miglustat, poiché né l'inibizione della sua funzione con il composto MZ-21, né dell'espressione con silenziamento genico riducono la risposta infiammatoria a *P. aeruginosa* in cellule epiteliali bronchiali. Al contrario, il composto Genz-123346, ha un effetto anti-infiammatorio paragonabile a quello precedentemente osservato con gli imino zuccheri miglustat e NB-DGJ, strutturalmente diversi da Genz-123346. Questo suggerisce che la glucosilceramide sintasi (GlcCerT), bersaglio molecolare comune di questi tre composti, potrebbe essere almeno una delle vie biochimiche coinvolte nell'effetto anti-infiammatorio del miglustat.

Conclusioni e possibili ricadute. I risultati ottenuti rafforzano l'efficacia del miglustat nel controllare la risposta immune. In particolare questo studio può avere reali ricadute cliniche per il trattamento dell'infiammazione polmonare nei pazienti FC, considerando che il miglustat è un farmaco orfano designato EMA ed approvato FDA, disponibile per studi clinici.

41. Molecular characterization of trimethylangelicin (TMA) and structurally-related compounds in CF lung disease: anti inflammatory effects and potentiation of the CFTR biological activity

Gambari R¹, Dall'Acqua F²

¹Dept. of Biochemistry and Molecular Biology, Univ. of Ferrara;
²Dept. of Pharmaceutical Sciences, Univ. of Padova
(FFC Project #17/2010, in progress)



Roberto Gambari con le collaboratrici del suo laboratorio

Background. Airway tract disease in cystic fibrosis (CF) patients is characterized by chronic infection with pathogens, such as *Pseudomonas aeruginosa*. Therapeutic approaches to control inflammation can result beneficial in reducing the progressive fibrosis of CF lungs. Potentiators/ correctors of CFTR functions are under study for therapeutic applications to CF.

Objectives. The major objective of the project is to characterize the biological activity of 4,6,4'-trimethylangelicin (TMA), and to synthesize novel structurally-related molecules with the aim of developing the best molecules with respect to their ability to reduce the expression of pro-inflammatory genes induced by *P. aeruginosa*. In addition, TMA and related compounds will be analysed as potentiators or correctors of CFTR biological activity. Moreover, the objectives of the project include testing of TMA and the best active compound(s) for their efficacy in mouse models for *P. aeruginosa* infection.

Methods. The project is based on the design and production of TMA and TMA analogues, including compounds with chemical modifications facilitating solubility and release to target cells.

Preliminary results. A. Using bioinformatic approaches to identify lead compounds, we have developed novel furocoumarins inhibiting NF- κ B dependent biological functions. B. We have generated photoproducts of bioactive furocoumarin derivatives to develop novel lead molecules. C. We have further characterized the TMA-mediated inhibition of IL-8 gene expression, and the potentiation of CFTR functions. D. We have demonstrated that TMA is a CFTR corrector. E. The results obtained after acute infection of C57Bl/6 mice with *P. aeruginosa* employing an oral treatment (gavage) with TMA or ibuprofen (used as control) demonstrated antiinflammatory effects of TMA in vivo. F. Novel antinflammatory compounds, during the research of molecules to be used in synergism with TMA, were found from extracts of bergamot (citropten and bergapten) and *Phyllanthus urinaria* (corilagin).

Comments & Conclusions. TMA is a triple acting compound, a corrector and a potentiator of the CFTR functions and an antiinflammatory compound inhibiting IL-8 expression.

Spin-off for research & clinical purposes. The reduction of neutrophil-dominated chronic inflammation in CF lungs is expected to ameliorate the quality and expectancy of life of the CF patients. Potentiation of CFTR will enhance the possibility to approach a cure for CF.

Caratterizzazione molecolare della trimetilan-gelicina (TMA) e di analoghi strutturali in fibrosi cistica: effetti anti-infiammatori e potenziatori dell'attività biologica della proteina CFTR.

Ragioni dello studio. La fibrosi cistica (FC) è caratterizzata da infezione cronica da parte di alcuni batteri patogeni, tra i quali *Pseudomonas aeruginosa*. Strategie terapeutiche mirate al controllo del processo infiammatorio possono risultare importanti e ridurre la progressiva fibosi nei polmoni FC. D'altra parte potenziatori/correttori della funzione CFTR sono in fase di studio per applicazioni terapeutiche in FC.

Obiettivi. L'obiettivo principale del progetto è la caratterizzazione dell'attività biologica della 4,6,4'-trimetilan-gelicina (TMA), e il disegno e la sintesi di nuovi analoghi strutturali, al fine di sviluppare molecole in grado di ridurre l'espressione di geni pro-infiammatori indotti da *P. aeruginosa*. Inoltre la TMA e i relativi analoghi saranno analizzati come potenziatori e correttori dell'attività biologica del canale CFTR. Infine, tra gli obiettivi del progetto va inserita l'analisi dell'attività anti-infiammatoria del TMA in modello murino.

Metodi. Il progetto è basato sul disegno e la sintesi di TMA e

analoghi strutturali, includendo molecole a maggiore solubilità e internalizzazione nelle cellule bersaglio.

Risultati preliminari. A. Utilizzando strategie bioinformatiche abbiamo sviluppato nuove furocoumarine in grado di inibire le funzioni biologiche sotto il controllo del fattore di trascrizione NF- κ B. B. Abbiamo ulteriormente caratterizzato l'inibizione dell'espressione di IL-8 TMA-mediata e il potenziamento della funzione del canale CFTR. C. Abbiamo dimostrato che la TMA è un correttore del canale CFTR. D. I risultati ottenuti dopo infezione di topi C57Bl/6 con *P. aeruginosa* e trattamento con TMA o ibuprofene (usato come controllo) hanno permesso di dimostrare un effetto antiinfiammatorio della TMA in vivo. F. Abbiamo identificato nuove molecole antiinfiammatorie da utilizzare in sinergismo con la TMA in estratti di bergamotto (citropten and bergapten) e di *Phyllanthus urinaria* (corilagin).

Commenti e conclusioni. TMA è un composto a tripla azione, correttore e potenziatore delle funzioni CFTR e molecola antiinfiammatoria in grado di ridurre l'espressione di IL-8.

Possibili ricadute per ricerca e clinica. È atteso che la riduzione dell'infiammazione cronica in polmoni FC possa comportare un miglioramento della qualità e dell'aspettativa di vita di pazienti FC.

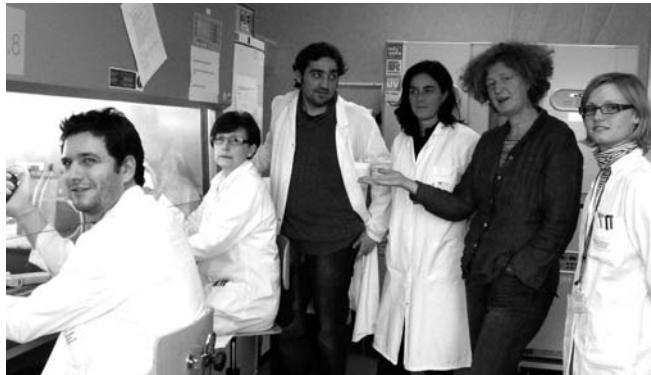
42. Infections in cystic fibrosis: role of the long pentraxin PTX3 in host resistance and as therapeutic agent

Garlanda C¹, Bragonzi A²

¹Fondazione Humanitas per la Ricerca, Rozzano, Milano;

²Divisione di Immunologia, Trapianti e Malattie infettive, Istituto San Raffaele, Milano

(FFC Project #18/2010, in progress)



Cecilia Garlanda, seconda da sinistra, con il suo gruppo di ricerca

Background. A major trust of this application is to explore the potential of the prototypic long pentraxin PTX3, discovered by the applicant group, in a therapeutic perspective. In particular, we will focus on infections by *Pseudomonas aeruginosa*, a bacterium which plays a key role in the pathology of patients with cystic fibrosis, the most frequent genetic disease causing premature death among Caucasian populations. PTX3 is a non-redundant component of innate immunity against selected pathogens, including *Pseudomonas aeruginosa*. In the years, the applicant defined the role of this molecule in immunological mechanisms and generated unique tools to investigate its function. Studies conducted in the previous research project funded by Fondazione FFC demonstrated the therapeutic potential of PTX3 in the context of experimental chronic lung infections by *P. aeruginosa*.

Objectives. Our aim was to pursue our preclinical studies on the therapeutic potential of PTX3 against *P. aeruginosa* and to extend the analysis to other pathogens infecting cystic fibrosis patients.

Methods. To these aims, we used *in vitro* assays for biochemical and cell biology studies, as well as animal models of chronic infections to address the therapeutic potential of PTX3 *in vivo*.

Preliminary results. The results obtained in the first year of activity allowed us to extend the knowledge on the interaction between the molecule under study and different strains of *P. aeruginosa* isolated from patients and better understand the biochemical mechanisms underlying the recognition of microbes relevant to cystic fibrosis. In addition, we were able to develop new experimental models necessary to study the therapeutic potential of the molecule. In particular, we characterized a model of chronic infection by *P. aeruginosa* in mice deficient in CFTR that mimics the clinical situation. In this model, we validated the therapeutic properties of PTX3.

Comments & Conclusions. Results obtained till now are promising for the therapeutic potential of this molecule, both for the antimicrobial role and anti-inflammatory effects.

Spin-off for research & clinical purposes. These studies could pave the way for future clinical studies on the therapeutic or prophylactic role of PTX3 in cystic fibrosis patients.

La pentrassina lunga PTX3 nella resistenza alle infezioni e candidato agente terapeutico nella fibrosi cistica

Ragioni dello studio. L'impegno principale di questo progetto è quello di valutare il potenziale della pentrassina lunga PTX3, molecola scoperta dal gruppo proponente, in una prospettiva terapeutica. L'attenzione è posta alle infezioni da *Pseudomonas aeruginosa*, un batterio che gioca un ruolo cruciale nella patologia polmonare dei pazienti con fibrosi cistica. PTX3 è un componente essenziale nei meccanismi di difesa immunologica nei confronti di alcuni microbi, inclusa *P. aeruginosa*. Studi di base condotti in questi anni, oltre a definire il ruolo fondamentale di PTX3 nei meccanismi immunologici, hanno generato strumenti molecolari unici per studiarne la funzione. Il lavoro svolto nel precedente progetto finanziato dalla Fondazione ci ha permesso di dimostrare il potenziale terapeutico di PTX3 nell'ambito delle infezioni polmonari croniche sperimentali da *P. aeruginosa*.

Obiettivi. Ci siamo proposti quindi di proseguire gli studi pre-clinici sul potenziale terapeutico di PTX3 verso *Pseudomonas aeruginosa* estendendo l'analisi ad altri micro-organismi rilevanti nella fibrosi cistica.

Metodi. A tali scopi, abbiamo utilizzato analisi *in vitro* di tipo biochimico, di biologia cellulare e modelli animali di infezione cronica per valutare il potenziale terapeutico di PTX3.

Risultati preliminari. I risultati ottenuti nel primo anno di attività ci hanno permesso di estendere le conoscenze sull'interazione tra la molecola in studio e diversi ceppi di *P. aeruginosa* isolati dai pazienti e di meglio comprendere i meccanismi biochimici del riconoscimento di microbi rilevanti per la fibrosi cistica. Inoltre, abbiamo potuto mettere a punto nuovi modelli sperimentali necessari per studiare le potenzialità terapeutiche della molecola. In particolare abbiamo caratterizzato un modello di infezione cronica da *P. aeruginosa* in topi deficienti di CFTR che mima la situazione clinica. In questo modello abbiamo validato le proprietà terapeutiche di PTX3.

Commenti e conclusioni. I risultati ottenuti fino ad ora sono promettenti sulla potenzialità terapeutica di questa molecola, sia per il suo ruolo nel controllo delle infezioni, sia per il suo potenziale anti-infiammatorio.

Possibili ricadute per ricerca e clinica. Questi studi potrebbero costituire la base per futuri studi clinici sull'utilità della somministrazione di PTX3 come agente profilattico e/o terapeutico nei pazienti con fibrosi cistica.

43. Metabolomic analysis by nuclear magnetic resonance spectroscopy as a new approach to understanding inflammation and monitoring of pharmacological therapy in children and young adults with cystic fibrosis

Montuschi P¹, Lucidi V², Motta A³

¹Ist. di Farmacologia, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Univ. Cattolica Sacro Cuore e Unità Operativa di Farmacologia, Policlinico Gemelli, Roma; ²Dip. di Pediatría, Unità Operativa Fibrosi Cistica, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma;

³Ist. di Chimica Biomolecolare, CNR, Pozzuoli

(FFC Project#19/2010, in progress)



Paolo Montuschi

Background. Assessment of lung inflammation is relevant for management of cystic fibrosis patients. Exhaled breath condensate (EBC) is a non-invasive method for sampling airway secretions. Metabolomics, the study of molecules generated by metabolic pathways, can be used for assessing oxidative stress non-invasively. 8-Isoprostanate, a reliable biomarker of oxidative stress, is elevated in EBC in cystic fibrosis patients. Azithromycin has antioxidant properties, but its effects on oxidative stress in cystic fibrosis patients are largely unknown.

Objectives. To study the potential antioxidant effects of azithromycin in patients with cystic fibrosis as reflected by 8-isoprostanate concentrations in EBC and oxidized metabolites detected by NMR spectroscopy.

Methods. A parallel group interventional study with vitamin E alone or in combination with azithromycin in stable cystic fibrosis patients has been undertaken. The study includes 4 visits: screening, baseline, post-treatment, after treatment withdrawal. Treatment phase is 8 weeks. Project duration is two years. The following interventions are being undertaken: clinical assessment; EBC sampling for metabolomics and 8-isoprostanate measurement; blood sampling for metabolomics, 8-isoprostanate and C reactive protein (CRP) measurement; spirometry; chest X ray.

Preliminary results. Fifty-four cystic fibrosis patients attended a screening visit for possible inclusion into the present study. Nineteen patients were excluded as they did not meet the inclusion criteria. Thirty-five patients have been enrolled so far. Twenty-eight patients are currently included in the study (13 in group A and 15 in group B). Seven patients were excluded from the study (4 patients due to cystic fibrosis exacerbation, 2 due to non-compliance, one due to consent withdrawal). Nineteen patients completed the study, 10 in group A and 9 in group B. 8-Isoprostanate has been measured in 38 serum samples. Samples are being assayed blindly.

Comments & Conclusions. Data from 10 patients included in group A and 9 patients included in group B do not show any within or between-group difference in lung function tests and serum CRP. The number of serum 8-isoprostane values at each visit is currently too small for statistical analysis. Metabolomics of EBC and serum, and measurement of 8-isoprostane in EBC have been planned.

Spin-off for research & clinical purposes. A new approach to understanding and monitoring of inflammation and new insights into antioxidant treatments.

Analisi metabolomica mediante spettrometria in risonanza magnetica nucleare: un nuovo approccio alla comprensione dell'infiammazione ed al monitoraggio della terapia farmacologica in bambini e giovani adulti con fibrosi cistica

Ragioni dello studio. Azitromicina ha proprietà antiossidanti, ma i suoi effetti sullo stress ossidativo in pazienti con fibrosi cistica sono in gran parte sconosciuti. Il condensato del respiro (EBC) è una metodica non invasiva per la raccolta delle secrezioni bronchiali. La metabolomica studia i metaboliti endogeni mediante la spettroscopia in risonanza magnetica nucleare (NMR) e può essere impiegata per valutare lo stress ossidativo. 8-isoprostano, un indicatore attendibile di stress ossidativo, è aumentato nell'EBC di pazienti con fibrosi cistica.

Obiettivi. Studiare i potenziali effetti antiossidanti di azitromicina in pazienti con fibrosi cistica sulla base delle concentrazioni di 8-isoprostano nell'EBC e di metaboliti ossidati rilevati mediante NMR.

Metodi. È stato intrapreso uno studio farmacologico comprendente due gruppi di pazienti, trattati con sola vitamina E o associata ad azitromicina. Sono previste 4 visite: screening, preterapia, post-terapia, dopo sospensione della terapia. La durata della terapia è di 8 settimane. La durata del progetto è 2 anni. Sarà raccolto EBC per analisi metabolomica e dosaggio di 8-isoprostano, prelievo ematico per metabolomica e misura di 8-isoprostano e proteina C reattiva (PCR), spirometria e radiografia del torace.

Risultati preliminari. Sono stati sottoposti a visita di screening per un possibile arruolamento nello studio 54 pazienti. Diciannove pazienti non rientravano nei criteri di inclusione, 35 pazienti sono entati nello studio. Tra questi, 28 sono attualmente nello studio, 19 hanno completato lo studio (10 nel gruppo A, 9 nel gruppo B), 9 stanno svolgendo lo studio, 7 sono usciti dallo studio (4 per riacutizzazione, 2 per non adesione alle procedure previste, 1 per ritiro del consenso). 8-Isoprostano è stato misurato in 38 campioni di siero. I dosaggi sono eseguiti senza sapere il tipo di terapia nel gruppo A e B.

Commenti e conclusioni. I dati disponibili non mostrano differenze all'interno o tra i gruppi per quanto riguarda prove di funzionalità respiratoria e PCR nel siero. Il numero dei valori delle concentrazioni di 8-isoprostano nel siero è attualmente troppo basso per consentire un'analisi statistica. Sono programmati analisi metabolomica del siero ed EBC e dosaggio di 8-isoprostano nell'EBC.

Possibili ricadute per ricerca e clinica. Un nuovo approccio alla comprensione e monitoraggio dell'infiammazione e nuove conoscenze sulla terapia antiossidante.

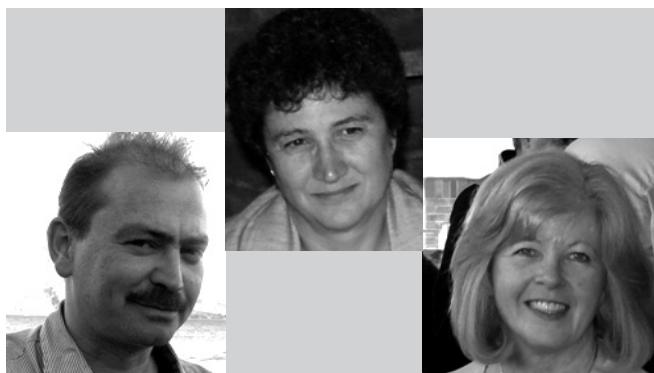
44. Identification of agents with multiple favourable activities as potential treatments for cystic fibrosis

Naggi A¹, Yates EA², Shute J³

¹Ist. di Ricerche Chimiche e Biochimiche "G. Ronzoni", Milano;

²School of Biological Science, Univ. Liverpool;

³Div. Pharmacol. Pharmacy and Biom. Science, Univ. Portsmouth (FFC Project#20/2010, in progress)



Annamaria Naggi, al centro, con Edwin A. Yates (sx) e Janis Shute (dx)

Background. Heparin has shown promise as a treatment for CF patients, in assisting airway clearance, and is thought to increase the activity of drugs based on DNase.

Objectives. The identification of polysaccharide derivatives with favourable activities in promoting DNase activity and reducing other factors relating to inflammation. A number of different activities will be studied and polysaccharides with favourable profiles will be selected.

Methods. A range of biochemical methods, measuring several activities, were applied to provide data that will allow selection of the polysaccharides, and these are currently on-going.

Preliminary results. Several polysaccharides with favourable activities have been identified. Interestingly, sputum from CF patients seems to contain an agent which allows heparin to activate DNase, while samples of DNA, DNase or heparin do not. We have discovered some modified polysaccharides that are able to inhibit elastase, a key activity relating to inflammation, even more effectively than heparin.

Comments & Conclusions. We have found evidence that materials in the sputum seem to be necessary, in addition to heparin, for the activation of the drug. This could explain how heparin promotes DNase activity. Experiments to identify the polysaccharides with the best overall activities are continuing.

Spin-off for research & clinical purposes. Understanding how heparin activates DNase will help contribute to the development of more efficient agents for sputum clearance in CF patients and have identified the need to conduct drug activity tests on sputum samples. The future isolation of this agent may provide an additional way of promoting DNase activity, hence, of improving airway clearance in CF patients.

Identificazione di potenziali agenti per il trattamento della fibrosi cistica aventi multiple attività favorevoli

Ragioni dello studio. È ormai noto che l'eparina possa essere utilizzata per il trattamento di pazienti affetti da FC, facilitando la liberazione delle vie respiratorie e si pensa che possa stimolare l'attività di farmaci basati sulla DNasi.

Obiettivi. L'identificazione di derivati polisaccaridici che possono stimolare l'attività della DNasi e ridurre l'azione di altri fat-

tori potenzialmente coinvolti nell'infiammazione.

Metodi. Diversi metodi biochimici, adatti a misurare l'interazione e/o l'attività con/di proteine coinvolte nei processi infiammatori, sono stati utilizzati per selezionare i possibili polisaccaridi interagenti. Tali misure sono tutt'ora in corso.

Risultati preliminari. Sono stati identificati alcuni polisaccaridi interagenti con la DNasi e con alcuni mediatori dell'infiammazione, in particolare abbiamo individuato alcuni polisaccaridi chimicamente modificati capaci di inibire l'elastasi, enzima chiave nei processi infiammatori, a livelli equivalenti o maggiori dell'eparina. È risultato evidente che, lo sputo dei pazienti affetti da FC possa contenere delle sostanze mediatiche dell'azione dell'eparina. Esperimenti atti ad identificare i polisaccaridi con il miglior insieme di attività sono tuttora in corso.

Commenti e conclusioni. Lo sputo dei pazienti affetti da FC sembra contenere delle sostanze che aiutano l'azione attivatrice dell'eparina e che sono invece assenti in preparazioni di solo DNA, DNasi o Eparina. Ciò potrebbe essere ulteriormente investigato e potrebbe portare ad una migliore comprensione dell'attività dell'enzima.

Possibili ricadute per ricerca e clinica. La comprensione del meccanismo di attivazione della DNasi da parte dell'eparina potrà aiutare la progettazione di farmaci più efficienti.

45. Th17 responses in Cystic fibrosis: paving the way for novel anti-inflammatory strategies and immunogenetic screening

Romani L

Dipartimento di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche/Microbiologia, Perugia
(FFC Project#21/2010, in progress)



Luigina Romani, prima a sinistra, con il suo gruppo di ricerca

Background. In cystic fibrosis (CF), progressive pulmonary diseases, including *Aspergillus* spp infections and complications, are the most dominant clinical features, characterized by chronic airway infection and inflammation. Although the pathogenic role of mutations in CFTR gene in the defective mucociliary clearance eventually leading to unresolved inflammation is largely undisputed, controversies exist on multiple aspects of this cascade. Recently, it has been shown that the T-cell derived products IL17 and IL17F are markedly elevated in bronchoalveolar lavage fluid or sputum of CF patients undergoing pulmonary exacerbation. Moreover, IL-23, a critical regu-

lator of Th17 cells, is also elevated in the sputum. Th17 cells are characterized as preferential producers of IL-17A, IL-17F, IL-21, and IL-22 and are in balance with the regulatory T cell (Treg) subset. Although Th17 cells and their effector cytokines mediate host defensive mechanisms to extracellular bacterial infections, they are also involved in the pathogenesis of many inflammatory and autoimmune diseases.

Objectives. The major objective of this project is to characterize the Th17/Treg imbalance in CF, identify the mediators leading to the uncontrolled inflammatory response and strategies to counteract and/or overcome them.

Preliminary results. Data in experimental models of CF indicate that an unchecked Th17 cell activity is associated with the chronicity of the pulmonary infection with the fungus *Aspergillus fumigatus*, a frequent colonizer of the respiratory tract in CF patients.

Comments and conclusions. Should a causal association between an ongoing Th17 cell responses and susceptibility to lung disease and complication by a respiratory pathogen proven to be true, this will pave the way for the development of novel anti-inflammatory strategies targeting the Th17/Treg balance, including a vaccination approach as well as a better screening of CF patients for risk of susceptibility to inflammatory/infectious diseases.

La risposta infiammatoria Th17 nella fibrosi cistica: nuove acquisizioni per la terapia dell'infiammazione e lo studio di polimorfismi genetici

Premesse. La Fibrosi Cistica (FC) è la malattia genetica ad esito fatale più diffusa tra la popolazione caucasica. Nella sua forma più grave, questa patologia colpisce pancreas, polmoni, fegato e intestino, provocando ostruzione dei dotti principali a causa della produzione di secrezioni molto viscose, tanto da essere conosciuta in passato come mucoviscidosi. Al momento, il problema a livello pancreatico è correggibile, mentre rimane ancora da risolvere il grave danno polmonare che si manifesta più o meno precocemente, ma che in ogni caso danneggia in modo progressivo e irreversibile il tessuto polmonare. Sebbene sia assodato il ruolo delle mutazioni del gene CFTR nel difetto di barriera antimicrobica muco-ciliare, non è ben chiaro se l'incapacità a difendersi dagli agenti patogeni prenda o sia conseguenza dello stato infiammatorio. Questo concetto è fondamentale per realizzare strategie terapeutiche che mirino al mantenimento dell'omeostasi immunologica. Recentemente, è stato dimostrato che i livelli citochinici di IL-17A e IL-17F prodotte dalle cellule T, sono elevati nel fluido bronco alveolare e nell'espettorato di pazienti con FC e sono associati ad una esagerata infiammazione polmonare. Inoltre, IL-23, regolatore necessario della funzione effettrice delle cellule Th17, risulta essere a sua volta elevato nell'espettorato degli stessi. Le cellule Th17 rappresentano una linea cellulare ben caratterizzata e distinta dalle precedenti, non solo perché tali cellule si differenziano in seguito a stimoli diversi, ma perché esprimono un pattern citochimico specifico, caratterizzato dalla produzione di IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22. Tali cellule sono e devono essere in equilibrio con il subset di cellule T regolatorie (Treg) che agiscono da freno immunologico sulle risposte infiammatorie tessutali.

Obiettivi. L'obiettivo primario di questo progetto è mettere in evidenza se uno squilibrio Th17/Treg esiste nella FC, il possibile ruolo patogenetico, l'identificazione di meccanismi molecolari e/o metabolici quali possibili bersagli di strategie anti-infiammatorie mirate nonché di screening immunogenetica nella CF.

Risultati preliminari. Non riportati.

POSTER SESSION

Only the projects 2011 are here reported. Those which are in progress are reported in the Plenary Sessions: see also the index

POSTER SESSION 1: INFLAMMATION

Chairman: **Maria Cristina Dehecchi**

46. Docosahexaenoic acid-derived anti-inflammatory mediators in exhaled breath condensate and sputum of adults with cystic fibrosis

Aiello M¹, Sala A², Clini C³, Pisi G⁴

¹Dip. Scienze cliniche, Università di Parma; ²Dip. Scienze Farmacologiche, Università di Milano; ³Dip. Oncologia, Ematologia e Malattie respiratorie, Università di Modena;

⁴Dip. Pediatria, Università di Parma
(FFC Project #17/2011, new)



Marina Aiello, terza da destra, con il direttore del laboratorio, prof. Marangio, e i collaboratori

Background. Cystic fibrosis (CF) is an autosomal recessive disorder, caused by genetic mutations in CF transmembrane conductance regulator (CFTR) protein. Chronic airway infection, inflammation and oxidative stress, which are mainly due to neutrophilic immune responses, are the characteristics of CF, resulting in pulmonary disease as the leading cause of morbidity and mortality in CF patients. Several reports have indicated the presence of specific fatty acid alterations in CF patients, most notably decreased levels of plasmatic and tissue-sal docosahexaenoic acid (DHA). Over the last ten years several classes of DHA-derived lipid mediators, such as resolvins and protectins have been identified as important factors in the resolution phase of the inflammatory reaction, raising considerable interest on the potential deficit of these lipid mediators in chronic inflammatory conditions.

Hypothesis and objectives. In the light of the decrease in DHA observed in CF subjects, we hypothesize that a markedly decreased synthesis of resolvins and protectins could contribute to the chronic pulmonary inflammation observed in CF subjects. The specific aim of the present study is to better understand the inflammation in CF through the quantitative evaluation of the anti-inflammatory and pro-resolution resolvins and protectins in the airways of CF subjects. In light of the decrease in DHA levels observed in CF subjects we hypothesize that a markedly decreased synthesis of resolvins and protectins could contribute to the severe

chronic pulmonary inflammation observed in CF subjects.

Methods and study design. Monitoring the presence of leukotriene B4 and isoprostanes as markers of neutrophilic activation and oxidative stress, respectively, as well as respiratory function parameters, the concentrations of exhaled NO and differential cells counts obtained from induced sputum samples, will give us important informations on the inflammatory status of the studied subjects airways, and together with the profile of DHA-derived anti-inflammatory mediators will provide the first integrated picture of pro-inflammatory and pro-resolution metabolites within the airways of CF subjects. The pulmonary inflammation observed in CF is characterized by a significant neutrophilic inflammatory infiltrate associated with increased oxidant stress; in the light of the fact that both these features are observed in healthy smokers as well as in COPD subjects, we will compare the results obtained from CF subjects to age-matched healthy smokers, a population where we expect to observe a normal production of resolution phase lipid mediators, and COPD stage 2-3 subjects (not age-matched), where a potential unbalance between pro- and anti-inflammatory mediators could also be observed. We expect to gather enough information to be able to define and compare the complex pro- and anti-inflammatory mediators profile in these three different populations.

We propose to study up to 20 CF subjects, 20 age-matched healthy smokers and 20 COPD Gold stage 2-3 patients (not age-matched). CF patients (age range 20 to 40 years) will be recruited at the Cystic Fibrosis Unit of Parma Hospital and the control group of healthy smokers and COPD patients will be recruited at the University Hospitals of Modena-Reggio Emilia and Parma. All patients with CF will be diagnosed by evidence of CFTR dysfunction (elevated sweat test) and/or identification of two pathological CFTR mutations (INNO-LiPA CFTR19®). The inclusion criteria will be the following: genotype ΔF508 homozygous, mild/moderate pulmonary disease (forced expiratory volume in 1sec., FEV1≥40% predicted value), and pancreatic insufficiency. All patients will be clinically stable and following standard CF therapy. Healthy smokers and COPD subjects will be examined at the time of enrolment, while CF patients will be examined both at enrolment and after 6 months. All subjects recruited will perform: nutritional status evaluation, spirometry, exhaled NO measurement, exhaled breath condensate (EBC), sputum induction (SI) and their blood sample will be drawn to evaluate their fatty acid profile. Samples will be kept at -80 until transferred to the Milano unit for analysis. The results of exhaled NO concentrations, total and differential cell counts in sputum samples, respiratory function parameters, fatty acid profile and pro- and anti-inflammatory mediators concentrations in EBC and sputum will be analyzed for potential correlations within each group of subjects. Comparisons for each parameter among the different groups will be carried out, and the statistically significant difference will be set at $P<0.05$.

Expected results. Through the focused lipidomic analysis of pro- and anti- inflammatory lipid mediators, we expect to be able to determine if decreased concentrations of DHA in CF

subjects are associated with a decrease in anti-inflammatory and pro-resolution mediators in the airways of CF subjects. Evaluating resolvins and protectins in DHA-supplemented subject we will also be able to find out if supplementation with this essential omega-3 fatty acid can affect the production of DHA-derived anti-inflammatory lipid mediators. Finally, the determination of the activity of 15-lipoxygenase in CF subjects will allow to confirm the presence of an eventual deficit in these subjects, paving the way to a possible therapeutic intervention aimed at restoring the concentrations of 15-LO derived anti-inflammatory lipid mediators within the airways of CF subjects.

Spin-off for research and clinical purposes. A better understanding of the metabolic changes that accompany inflammation could provide new insights into disease pathophysiology and potentially identify new biomarkers of disease severity. Simple and noninvasive biomarkers of this inflammation are urgently needed to monitor disease progression, identify exacerbations, and evaluate the efficacy of novel therapies.

Studio dei profili metabolici dell'espettorato e dell'esalato condensato in pazienti affetti da Fibrosi Cistica

Ragioni dello studio. La Fibrosi Cistica (FC), una patologia genetica autosomica recessiva, è caratterizzata da infezione cronica delle vie aeree, con associati abbondante infiammazione neutrofilica e stress ossidativo. Le complicanze polmonari sono la principale causa dei decessi nei soggetti affetti da FC. Numerosi studi hanno dimostrato nella FC una significativa riduzione dei livelli di acido docosaeaxenoico (DHA), che potrebbe pertanto svolgere un ruolo fondamentale nella sintomatologia e nella progressione della malattia. Tale deficit acquisisce un particolare significato alla luce del fatto che diversi metaboliti dell'acido docosaeaxenoico, quali le resolvine e le protectine, sono stati identificati come importanti fattori nella fase di risoluzione del processo infiammatorio. Esiste quindi un notevole interesse circa il ruolo di un potenziale deficit di tali mediatori lipidici in patologie infiammatorie croniche, come quella che interessa le vie aeree dei soggetti affetti da FC, e circa la loro attività a livello cellulare.

Obiettivi principali dello studio. Verificare se le diminuite concentrazioni di DHA, caratteristiche dei soggetti affetti da FC, possano causare una diminuzione nella sintesi di resolvine e protectine a livello delle vie aeree; analizzare i meccanismi molecolari e cellulari di sintesi e d'azione di questi mediatori (resolvine e protectine), utilizzando come confronto altre condizioni di infiammazione neutrofilica, quali la BPCO o lo stato di fumatore; verificare se la supplementazione con acidi grassi omega-3 sia in grado o meno di ripristinare i livelli fisiologici di DHA ed, eventualmente, la produzione di mediatori lipidici ad attività anti-infiammatoria e pro-risolutiva da esso derivati.

Metodi. Col presente studio ci proponiamo di determinare prodotti ad attività anti-infiammatoria derivati dal DHA presenti nell'esalato condensato (EBC) e nello sputo ottenuti da soggetti adulti affetti da FC, paragonandone i risultati con quelli osservati in fumatori sani e in pazienti BPCO (bronco pneumopatia cronica ostruttiva). Inoltre, tale analisi lipidica mirata verrà condotta anche in soggetti affetti da FC in trattamento dietetico con acidi grassi omega-3, per determinarne gli effetti sulla produzione di resolvine e protectine nelle vie aeree in seguito ad una supplementazione. Verrà infine determinata sia la attività dell'enzima 15-lipossigenasi (un enzima chiave nella sintesi di resolvine e protectine) nei soggetti affetti da FC in paragone a soggetti di controllo, che la modulazione funzionale dei neutrofili da parte di resolvine e protectine sintetiche.

Disegno dello studio. Questo studio multicentrico coinvolge 15 soggetti affetti da FC, reclutati presso il Centro per Fibrosi Cistica dell'Azienda Ospedaliera – Universitaria di Parma, 10 soggetti affetti da BPCO e 10 soggetti fumatori sani, reclutati dalle Cliniche Pneumologiche dell'Università degli Studi di Modena-Reggio Emilia e di Parma. Il protocollo dello studio prevede due fasi. La prima fase consiste nella valutazione in condizioni basali dello stato infiammatorio di 15 soggetti affetti da FC, 10 soggetti affetti da BPCO e 10 soggetti fumatori sani, determinando specifici prodotti ad attività anti-infiammatoria presenti nell'EBC e nello sputo. I risultati

ottenuti in soggetti adulti affetti da FC verranno paragonati a quelli osservati in soggetti fumatori sani ed a quelli osservati in pazienti BPCO. La seconda fase dello studio di tipo interventistico, prevede la valutazione dei medesimi prodotti ad attività anti-infiammatoria di 15 pazienti affetti da FC dopo due settimane di trattamento con antibioticoterapia e dopo dieci settimane di supplementazione di DHA nella dieta e dieci settimane senza supplementazione. La prima fase prevede una visita, mentre la seconda ne prevede tre. Per ogni visita saranno eseguiti la valutazione dello stato nutrizionale, spirometria con misura pleismografica dei volumi polmonari, valutazione della saturazione di ossigeno, misura dell'NO esalato, raccolta ed analisi dell'EBC, raccolta ed analisi dell'espettorato (se necessario, tramite tecniche di induzione), prelievo di un campione di sangue per quantificare i fosfolipidi nei globuli rossi.

Risultati attesi. Mediante l'analisi lipidica focalizzata di mediatori lipidici pro- ed anti infiammatori, i risultati di questo progetto di ricerca permetteranno di determinare se le diminuite concentrazioni di DHA in soggetti affetti da FC sono associate ad una diminuita sintesi di mediatori anti-infiammatori e pro-resolutivi a livello delle vie aeree, favorendo così la cronicizzazione dell'infezione. La determinazione di resolvine e protectine in soggetti in trattamento con DHA permetterà inoltre di determinare se la supplementazione con questo acido grasso essenziale è in grado di influenzare la produzione di mediatori lipidici anti-infiammatori derivati dal DHA, favorendo la risoluzione dell'infezione e migliorando la funzionalità respiratoria di questi pazienti. Infine, la determinazione della attività della 15-lipossigenasi nei soggetti affetti da CF permetterà di accettare la presenza di un eventuale deficit in questi soggetti ed aprire la strada ad un possibile intervento terapeutico mirato al ripristino dei mediatori anti-infiammatori e pro-resolutivi.

Possibili ricadute cliniche. Quindi, i risultati di questo progetto di ricerca potrebbero fornire informazioni di rilevanza clinica per la stratificazione e il monitoraggio dei pazienti sulla base dei loro profili metabolici. La conoscenza dettagliata di questi ultimi potrebbe contribuire ad acquisire importanti informazioni, che potrebbero portare allo sviluppo di specifiche terapie personalizzate sul profilo infiammatorio di ciascun paziente.

47. Inflammasome activation and IL-1 β mediated inflammation triggered by *Pseudomonas aeruginosa*: a rationale for novel therapeutic approaches in cystic fibrosis patients

Bernardini ML¹, Molinaro A², Garlanda C³, Abdelmounaim A⁴

¹Dip. Biologia e Biotecnologie, Università "La Sapienza", Roma; ²Dip. Chimica organica e biochimica, Università di Napoli; ³Fondazione Humanitas per la Ricerca, Milano;

⁴Lab. Batteriologia Molecolare, Facoltà di Medicina - Libera Università di Bruxelles
(FFC Project #18/2011, new)



Maria Lina Bernardini, al centro del suo gruppo di ricerca

Background. Recurrent and persistent airway infections with *Pseudomonas aeruginosa* (PA) are common in CF pa-

tients and account for severe inflammation and lung damages. Interaction of PA with lung tissue triggers the innate defense mechanisms leading to the production of pro-inflammatory cytokines e.g. TNF- α , IL-8 and IL-1 β . However, as the innate defense seems to be impaired, more the lung is stimulated by bacteria more the inflammation mounts, in the absence of a concomitant eradication of the infection. This is a vicious circle, often leading the patient to death due to lung functional decline. Given these premises and considering the complex scenario in which several cytokines participate to the inflammation, the characterization of the "master" cytokines against which targeting a proficient treatment seems to be a major goal in CF therapies. This project points to IL-1 β production as a master cytokine driving inflammation in lung of CF patients infected by PA.

Objectives. The primary objective is to identify possible therapeutic targets in the processes of IL-1 β synthesis and signaling. Various literature reports and preliminary results from participants to this project converge in the key role of IL-1 β in the establishment of PA infection in the airways of CF patients. The relevant aims are: the impact of potential IL-1 β -blocking-therapies in the development and chronicization of the infection with PA; the analysis of bacterial molecular complexes (e.g. flagellin, T3SS, pilin) and the purification of bacterial structures (lipopolysaccharide and peptidoglycan) known as activator of the expression and release of IL-1 β through different processes; the study of the IL-1 β mediated inflammation induced by bacterial molecular compounds as above, in relevant experimental models of CF infection in vitro and in vivo; the analysis of host relevant factors leading to IL-1 β signaling in CF models of infection; the evaluation of the presence of IL-1 β and molecules involved in IL-1 β synthesis and signaling in biological samples of CF patients.

Expected results. We plan to use the results coming from this study to identify novel therapeutic tools to lower the level of IL-1 β or to validate the usage of already existing pharmaceutical compounds aimed at containing the level of this cytokine in the context of CF.

I meccanismi di induzione dell'inflamasoma e del rilascio di IL-1 β stimolati da *Pseudomonas aeruginosa* forniscono le basi per strategie terapeutiche innovative nel trattamento dell'infiammazione nei malati di Fibrosi Cistica

Ragioni dello studio. Nei malati di Fibrosi Cistica (CF), i processi infettivi sostenuti da patogeni opportunisti, quali *Pseudomonas aeruginosa* (PA), aggravano uno stato infiammatorio probabilmente pre-esistente all'infezione e contribuiscono in maniera sostanziale al declino funzionale dei polmoni. È, dunque, di fondamentale importanza individuare quali siano quei fattori che possono agire da bersaglio nelle strategie terapeutiche finalizzate al contenimento dell'infiammazione. Nel corso di precedenti progetti abbiamo individuato un elemento chiave, la citochina pro-infiammatoria interleuchina 1 β (IL-1 β), nell'insorgenza e sviluppo delle infezioni da PA. Per tale motivo il progetto punta l'attenzione su IL-1 β come fattore fondamentale non solo nel predisporre nei polmoni dei malati di CF un ambiente idoneo per l'attaccamento dell'infezione da PA, ma anche come deleterio e predominante effetto dell'infezione da PA in questo tessuto.

Obiettivi. L'obiettivo è quello di verificare se l'inibizione della sintesi o dell'attività biologica di questa molecola possa contribuire al decremento dell'infiammazione e possa contrastare l'infezione di PA, creando un ambiente meno favorevole alla colonizzazione da parte di questo patogeno. In altre parole ci proponiamo di verificare cosa succeda quando questo circolo vizioso – bisogno di IL-1 β per l'infezione di PA e produzione di IL-1 β come effetto dell'infezione da PA- venga spezzato. Particolare attenzione sarà data alla verifica dell'impatto della mancanza di questa citochina nel contesto dei fattori che partecipano

all'infiammazione nei polmoni dei malati di CF.

Metodi. Le metodologie sperimentali si avvorranno dell'integrazione di gruppi di ricerca esperti in chimica, immunologia e microbiologia. Seguendo questa linea di ricerca, il principale "goal" del progetto è quello di caratterizzare le varie fasi nel percorso che porta alla produzione di IL-1 β al fine di individuare possibili bersagli terapeutici per abbassarne i livelli. Molecole per uso terapeutico anti-IL-1 β sono già commerciali ed analizzate in trials nell'ambito di quelle patologie dove il ruolo fondamentale di questa citochina è stato già accertato. L'uso di tali molecole in modelli sperimentali murini che mimano l'infezione di PA nelle vie aeree dei malati di CF viene contemplato nel progetto.

48. Phospholipase C beta (PLCB) as candidate therapeutic target in CF lung proinflammatory signaling

Cabrini G¹, Pinton P²

¹Dip. Patologia e Diagnostica, Università di Verona;

²Dip. Medicina Sperimentale e Diagnostica, Univ. di Ferrara (FFC Project #19/2011, new)



Giulio Cabrini con collaboratrici, nella foto a sinistra, e, nella foto di destra, Paolo Pinton, al centro

Background. It has been reported that reduced expression of IL-8 protein is protective in respect to the severity of progression of lung disease in CF patients. We previously found, from a phenotype-genotype investigation on 135 candidate genes encoding components of the pro-inflammatory signaling network, that PLC beta (PLCB) isoforms are in association with the progression of lung disease in CF patients and that the isoform PLCB3 is involved in increasing the expression of IL-8. In particular, we obtained confirmation that silencing PLCB3 reduces *P. aeruginosa*-dependent cytosolic calcium increase and transcription of IL-8 in bronchial epithelial cells, and that release of nucleotides is a key component of this proinflammatory mechanism.

Objectives and methods. The main objective of this project is to test the hypothesis that reduction of the activity of PLCB isoforms reduces the excessive release of IL-8, mitigating the inflammatory response without completely blunting its anti-infective role. This will be explored in bronchial epithelial cell models and in whole lungs of PLCB2/3-null mice. Three groups of small chemical compounds known to inhibit *P. aeruginosa*-dependent IL-8 transcription on PLCB activity will be tested for their potential inhibitory effect on PLCB enzyme activity, calcium signaling and IL-8 expression.

Spin-off for research and clinical purposes. Understanding the role of PLCB in CF lung inflammation will pave the way in finding novel anti-inflammatory molecules to mitigate excessive inflammation and tissue damage in CF lungs.

Fosfolipasi C beta come bersaglio terapeutico candidato del segnale proinfiammatorio nelle vie respiratorie della fibrosi cistica

Premesse. È stato riportato che una ridotta espressione di IL-8 proteina è protettivo rispetto alla gravità della progressione della malattia polmonare in pazienti con fibrosi cistica. Abbiamo precedentemente rilevato, da una indagine genotipo-fenotipo su 135 geni candidati della rete di segnali intracellulari pro-infiammatori, che isoforme di PLC beta (PLCB) sono in associazione con la progressione della malattia polmonare nei pazienti FC e che la isoforma PLCB3 è coinvolta nell'aumentare l'espressione di IL-8 in cellule epiteliali bronchiali dopo esposizione a *P. aeruginosa*.

Obiettivi e metodi. L'obiettivo principale di questo progetto è di verificare l'ipotesi che la riduzione dell'attività di isoforme PLCB riduce l'eccessivo rilascio di IL-8, attenuando l'eccessiva risposta infiammatoria in fibrosi cistica senza abolire completamente il suo fondamentale ruolo di difesa anti-infettiva. Il progetto utilizzerà modelli di cellule epiteliali bronchiali e polmoni di topi deficitari nella espressione di PLCB2/3, nonché tre gruppi di composti chimici noti per inibire la trascrizione di IL-8 dipendente da *P. aeruginosa*.

Possibili ricadute. La comprensione del ruolo di PLCB in infiammazione polmonare CF preparerà il terreno per trovare nuove molecole anti-infiammatorie per mitigare l'eccessiva infiammazione ed il danno tissutale nei polmoni dei pazienti affetti da fibrosi cistica.

to induce a serious damage to the lung tissue, characterized by mucus secretion and collagen deposition. Matrix metalloproteases could play a key role in this process by damaging several pulmonary structures, including elastin, fibronectin and collagen.

Objectives. The purposes of this study are: i) to establish the ability of early vs late *P. aeruginosa* strains to provoke host inflammation vs tissue damage and remodelling process (matrix metalloproteinases induction and extracellular matrix degradation) *in vitro* and mouse models and ii) to correlate airway remodelling with *P. aeruginosa* patho-adaptive traits in long term chronic persistence in CF patients.

Methods. Host response to *P. aeruginosa* sequential clonal strains isolated from CF patients will be evaluated *in vitro* and murine models by analysing cytokines, adhesion molecules, MMPs, active caspase1/3 and cell death. Bacterial count, leukocytes recruitment, cytokines and glycosaminoglycans measurement will be performed in BALF and lung of murine models of acute and chronic infection including CF. In addition, MMP-9 and matrix constituents, inflammatory cells and cytokines will be measured in induced sputum from CF patients. *P. aeruginosa* genotypic and phenotypic traits will be correlated with inflammatory markers and matrix degradation.

Expected results. We expect that the results of this project will define the role *P. aeruginosa* adaptation in the progression of CF lung disease. In addition, the knowledge obtained may clarify the potential value of inhibitors of matrix metalloproteases or other molecules involved in matrix breakdown as novel therapeutic targets in CF.

49. Host response to *Pseudomonas aeruginosa* adaptation during airway chronic infection

Cigana C¹, Colombo C²

¹Infection and Cystic Fibrosis Unit, Division of Immunology, Transplantation and Infectious Diseases, San Raffaele Scientific Institute, Milano; ²Centro Regionale FC, Fond. IRCCS "Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena", Milano
(FFC Project #20/2011, new)



Cristina Cigana, prima a sinistra, con i suoi collaboratori

Background. *P. aeruginosa* chronic infections cause persistent respiratory symptoms and decline of the lung functions in patients with CF. Despite aggressive and continuous antibiotics treatment, persistence is anyhow established after an acute infection stage. Therefore, the understanding of how this pathogen could establish a stable and deleterious relationship with the patients is a first issue in designing new effective therapies against CF. Preliminary results *in vitro* and in mouse models have shown that *P. aeruginosa* isolated at the onset of colonization is more pro-inflammatory and lethal, while strains isolated from the same patient after years of colonization are more prone to persist in the airways and

Risposta dell'ospite all'adattamento di *Pseudomonas aeruginosa* durante la colonizzazione cronica delle vie aeree

Ragioni dello studio. Le infezioni persistenti sono causate da batteri che utilizzano strategie per evitare il riconoscimento da parte del sistema immunitario dell'ospite e la conseguente risposta immunitaria. Nonostante gli innumerevoli studi sulle malattie infettive, non è chiaro se questa strategia è utilizzata anche da *P. aeruginosa* come meccanismo per la colonizzazione a lungo termine delle vie aeree dei pazienti con fibrosi cistica. Le infezioni croniche da *P. aeruginosa* provocano seri sintomi respiratori e il declino della funzionalità polmonare nei pazienti con fibrosi cistica. Nonostante cicli continui ed aggressivi di trattamenti antibiotici, nelle vie aeree del paziente fibroscistico si stabilisce inevitabilmente l'infezione cronica da *P. aeruginosa*. Pertanto, la comprensione di come questo patogeno possa stabilire un rapporto stabile e deleterio con i pazienti assume una notevole rilevanza nello studio di nuove terapie efficaci contro le infezioni. Risultati preliminari *in vitro* e in modelli murini di infezione acuta e cronica hanno dimostrato che all'inizio della colonizzazione *P. aeruginosa* stimola nell'ospite una risposta che risulta essere più pro-infiammatoria e virulenta, mentre dopo anni di colonizzazione i ceppi isolati dallo stesso paziente sono più inclini ad evadere il sistema immunitario ed indurre un grave danno al tessuto polmonare, caratterizzato da secrezione di muco e da deposizione di collagene. Le metalloproteasi della matrice potrebbero svolgere un ruolo chiave in questo processo, danneggiando diverse strutture polmonari, tra cui l'elastina, la fibronectina e il collagene.

Obiettivi. Lo scopo di questo studio è quello di verificare se, ed eventualmente, in che modo l'adattamento genetico sia una strategia adottata da *P. aeruginosa* per eludere il riconoscimento da parte del sistema immunitario e, al contempo, causare danno al polmone. La rilevanza clinica di questi risultati sarà valutata in pazienti fibroscistici attraverso analisi di campioni biologici. Marker di danno polmonare e, in particolar modo, di attività metalloproteasica saranno correlati alle caratteristiche fenotipiche e genotipiche di *P. aeruginosa* e allo stadio di infezione.

Possibili ricadute. Le conoscenze acquisite grazie a questo progetto potranno chiarire il potenziale di inhibitori delle metalloproteasi della matrice o di altre molecole coinvolte nella degradazione della matrice come nuovi bersagli terapeutici in fibrosi cistica.

50. Phosphodiesterases type-4 (PDE4) as a novel target to reduce neutrophilic lung inflammation in cystic fibrosis

Evangelista V¹, Romano M²

¹Lab. di Biologia e Farmacologia Vascolare, Consorzio Mario Negri Sud, Chieti; ²Lab. Medicina Molecolare, Ce.S.I., Università di Chieti-Pescara
(FFC Project #21/2011, new)



Virgilio Evangelista, primo a sinistra, con il gruppo di ricerca

Background. Excessive and persistent accumulation of neutrophils, associated with impaired bacterial clearance and tissue damage represent major pathogenetic mechanisms of CF lung disease. However, current therapies lack of specific approaches to tackle the two main steps of the neutrophilic inflammatory process, i.e., a) exaggerated recruitment and b) functional alterations of neutrophils migrated into the lungs. A large body of preliminary data, from our laboratory, demonstrates that selective blockade of PDE4 in normal human neutrophils intercepts signaling pathways that mediate neutrophil adhesiveness and reduces reduced neutrophil-recruitment on adherent platelets or endothelium under physiologic flow, *in vitro* and neutrophil accumulation at the site of vascular injury *in vivo*.

Hypothesis and Objectives. Thus, we propose to test the efficacy of PDE4 inhibitors in *in vitro* models relevant for CF and to initially validate this pharmacological approach in CF mouse models, *in vivo*: 1. To define the impact of pharmacological PDE4 blockade on biochemical, adhesive and functional responses of either normal mouse neutrophils and in neutrophils isolated from CFTR-null mice. 2. To validate the concept that PDE4 may be a potential target to reduce neutrophilic inflammation *in vivo* in CFTR-null mice.

Methods. The effect of selective PDE4 inhibitors will be investigated, *in vitro*, on: recruitment and transmigration of neutrophils across endothelial monolayers and bronchial epithelial barrier; NETs formation; Biosynthesis of lipoxins; Antibacterial response; Activation of biochemical pathways. The impact of PDE4 inhibitors will be examined also in CFTR-null mice after acute infection by *Pseudomonas aeruginosa* on: Neutrophil recruitment and lung inflammation; NETS formation in the airways; Lipoxin biosynthesis in the lung tissue; Antibacterial host defense.

Expected results. The identification of PDE4 as suitable targets to reduce neutrophilic inflammation CF lung will open new scenarios in CF pharmacology.

Spin-off for research & clinical purposes. Notably, roflumilast, a selective PDE4 inhibitor, has been recently approved in USA and EU for the treatment of severe chronic obstructive pulmonary disease. Therefore, if this class of drugs will give positive responses in preclinical models, clinical trials with CF patients could be rapidly arranged.

Le fosfodiesterasi di tipo-4 come nuovi bersagli terapeutici per ridurre l'infiammazione polmonare nella fibrosi cistica

Ragioni dello studio. La compromissione dell'apparato respiratorio è la causa più frequente di morte per i pazienti affetti da fibrosi cistica (FC). Il danno polmonare progredisce a causa di una persistente reazione infiammatoria mediata in particolare dai leucociti neutrofili. Le ragioni della persistente infiltrazione neutroflica vanno ricercate sia in una difettosa azione antibatterica intrinseca a queste cellule, legata al malfunzionamento del CFTR, sia al contesto microambientale delle vie respiratorie in cui la presenza di un muco alterato impedisce una risposta antibatterica efficiente. In questo contesto l'eccessivo richiamo di leucociti neutrofili determina, paradossalmente, un cronico danneggiamento delle vie respiratorie e del tessuto polmonare. Purtroppo le terapie correnti mancano di specifici approcci per contrastare da un lato l'eccessivo reclutamento e dall'altro l'alterata risposta funzionale dei neutrofili migrati nel polmone. Una grossa mole di ricerche dei laboratori proponenti hanno portato alla identificazione di alcuni segnali biochimici che sono fondamentali per l'attivazione di proteine di adesione necessarie per il reclutamento dei neutrofili, e alla scoperta che queste vie biochimiche possono essere "intercettate" tramite l'azione di meccanismi di feed-back negativi che vengono attivati, nei neutrofili, in seguito alla inibizione di fosfodiesterasi di tipo-4 (PDE4).

Ipotesi e obiettivi. Questo progetto si propone di verificare l'ipotesi che inibitori di PDE4 possano rappresentare un potenziale approccio farmacologico per ridurre l'infiltrazione neutroflica nella FC.

Metodi. Gli effetti di inibitori di PDE4 verranno analizzati in modelli sperimentali cellulari rilevanti per la FC *in vitro*. L'efficacia e gli eventuali effetti avversi di questi inibitori verranno valutati in modelli di infezione acuta da *Pseudomonas aeruginosa* in topi CFTR-deficienti.

Risultati attesi. Dimostrazione di efficacia di queste molecole in una sperimentazione preclinica in modelli sperimentali rilevanti per la FC.

Possibili ricadute per ricerca e clinica. Recentemente un inibitore orale, selettivo per PDE4, il roflumilast, è stato approvato negli USA e in Europa per il trattamento della broncopatia cronica ostruttiva polmonare. Se questa classe di farmaci si dovesse rivelare efficace in studi preclinici in modelli sperimentali, si potrebbe rapidamente passare alla sperimentazione clinica in pazienti con CF.

51. Targeting ceramide metabolism as a pharmacological strategy in cystic fibrosis

Ghidoni R¹, Caretti A¹, Signorelli P¹, Fabriàs G², Bragonzi A³

¹Lab Biochemistry and Mol Biology, Dept Medicine, San Paolo Hospital, University of Milan, Milano (Italy); ²Unit BioActive Molecules, Dept. de Química Biomèdica, IQAC, Barcelona (Spain); ³Infections and Cystic Fibrosis Unit, Div. Immunology, Transplantation and Infectious Diseases, San Raffaele Scientific Institute, Milano (Italy)
(FFC Project #22/2011, new)



Riccardo Ghidoni con due collaboratrici del progetto

Background. Ceramide is increased in the airway system of Cystic Fibrosis (CF) patients, possibly due to a decrease in its catabolism. Animal studies showed reduced lung inflammation and infection after pharmacological inhibition of ceramide accumulation.

Hypothesis and objectives. This proposal is aimed at reducing ceramide accumulation in epithelial cells and in mice CFTR defective by an innovative technique of nano-spheres delivery of either a known inhibitor of sphingolipid synthesis (myriocin) or a novel inhibitor of ceramide formation from its precursor dihydroceramide (XM462). Our hypothesis is that altered sphingolipid metabolism in CF, inducing increased ceramide content, may affect epithelial survival, response to inflammation and bacteria lung colonization. We will evaluate if inhibitors administration to CF mice is able to reduce ceramide and inflammatory response and to prevent acute bacteria infection in lungs.

Methods. We will treat CFTR defective IB3, and C38 control cell lines with the inhibitors, with or without TNF α and evaluate sphingolipids mass by LC-MS analysis and survival and apoptosis by FACS analysis after propidium iodide staining.

Once established the ability of fluorescent nano-spheres, injected intra-trachea, to reach the respiratory epithelium (by confocal microscopy) and to be well tolerated by the wild type animals, we will evaluate the effect of inhibitors loaded nano-spheres in CF mice on: i) ceramide intraepithelial accumulation and secretion in the surfactant (by LC-MS and immunostaining); ii) BAL content of inflammatory mediators, metalloproteases, elastases and growth factors (by ELISA and RT-PCR); iii) lung fibrosis, inflammatory infiltrate and NFkB activation (by immunostaining), inhibition of acute bacterial infection.

Expected results. Reducing de novo synthesis, or substitution of unsaturated with saturated sphingolipids will significantly decrease inflammatory response of respiratory epithelium and bacteria infection.

Spin-off for research & clinical purposes. Our study not only proposes new pharmacological tools for cystic fibrosis treatment but it is also a pioneer attempt to asses a non invasive method of drug delivery via lipid vesicles that, if effective, can be further delivered via aerosol therapy.

Modulazione del metabolismo del ceramide nella terapia della fibrosi cistica

Ragioni dello studio. È stato recentemente dimostrato che il ceramide si accumula nel sistema respiratorio dei pazienti affetti da Fibrosi Cistica (FC). Studi condotti su modelli animali di FC hanno evidenziato che l'inibizione farmacologica dell'accumulo di ceramide riduce l'infiammazione e l'infezione polmonare.

Ipotesi e obiettivi. Ci proponiamo di studiare, in modelli murini di FC, gli effetti di due potenziali farmaci: un noto inibitore del processo della formazione degli sfingolipidi (myriocin), da noi utilizzato con successo nella terapia di un'altra patologia cronica, la retinite pigmentosa, in modelli murini e di un nuovo inibitore (XM462), sintetizzato da un membro del nostro gruppo di collaborazione e testato da noi in altri modelli patologici (tumore). Inoltre ci proponiamo di utilizzare una nuova tecnica per la somministrazione di questi farmaci a base di innovative nanosfere lipidiche che veicolano e rilasciano i farmaci. La nostra ipotesi è che l'accumulo di ceramide influenzi la sopravvivenza dell'epitelio respiratorio, la risposta all'infiammazione e l'infezione batterica dei polmoni. Ci proponiamo di valutare se la somministrazione degli inibitori riduce l'accumulo di ceramide e la risposta infiammatoria correlata e previene le infezioni batteriche polmonari.

Metodi. Dopo aver iniettato intra-trachea nel modello murino affetto da FC le nanosfere lipidiche fluorescenti, si analizza la loro distribuzione a livello polmonare e la tollerabilità nell'animale. Quindi si valuta l'efficacia delle nanosfere veicolanti gli inibitori in termini di: i) accumulo e rimozione di ceramide nell'epitelio respiratorio; ii) contenuto di sostanze infiammatorie; iii) fibrosi del polmone, presenza di infiltrato infiammatorio e inibizione dell'infezione batterica acuta.

Risultati attesi. L'inibizione dell'accumulo di ceramide ridurrà in modo significativo la risposta infiammatoria e le infezioni batteriche a livello dell'epitelio respiratorio.

Possibili ricadute per ricerca e clinica. Il progetto si propone di contrastare le infezioni polmonari associate alla FC mediante la somministrazione di microscopiche vescicole lipidiche veicolanti i farmaci che, se efficaci nei modelli animali, potrebbero essere utilizzate nell'uomo per mezzo di aerosolterapia.

52. Polyethylenimine-engineered respirable particles delivering a decoy oligonucleotide to NF-Kb: a novel combination therapy for cystic fibrosis?

Quaglia F¹, Carnuccio R²

¹Dip.to di Chimica Farmaceutica e Tossicologica, Università di Napoli Federico II; ²Dip.to di Farmacologia Sperimentale, Università di Napoli Federico II
(FFC Project #23/2011, new)



Francesca Quaglia, al centro, con alla sua destra la partner Rosa Carnuccio e i due gruppi di ricerca

Background. Nuclear Factor- κ B (NF- κ B) plays a crucial role in orchestrating lung inflammatory response in cystic fibrosis (CF). A specific and promising approach to directly target DNA binding activity of NF- κ B relies on using decoy oligonucleotides. Nevertheless, the translation of this approach in humans runs into the need of specifically tailored inhalable formulations. With the support of FFC, we have developed particles (LPP) for the pulmonary delivery of a decoy oligodeoxynucleotide against NF- κ B (dec-ODN), which represent the first example of dry powder for oligonucleotide inhalation. After intratracheal administration to rats of dec-ODN loaded LPP, a prolonged inhibition of bronchoalveolar neutrophil infiltration as well as cytokine expression induced by LPS is observed.

Hypothesis and objectives. A multidrug approach is required for CF treatment aimed at controlling infection, chronic inflammation and iperproduction of a viscous mucus. In the light of its osmotic nature, proved antibacterial properties toward Gram (-) bacteria, and potential mucolytic effect, poly(ethyleneimine) (PEI) could represent an interesting candidate to provide additional properties to LPP. Thus, the goal of this study is the development of novel multifunctional respirable powders containing PEI for dec-ODN pulmonary delivery.

Methods. Biodegradable particles containing dec-ODN and PEI will be engineered for widespread deposition in the lung and slow *in situ* release of both molecules. Special attention will be paid to exploit specific PEI functionalities, i.e. effect on mucus viscosity and antimicrobial activity. Finally, we will study the effects of optimized dec-ODN/PEI LPP on NF- κ B-related gene expression in cultured cells and a model of rat lung inflammation.

Expected results. Respirable particles co-delivering dec-ODN and PEI are expected to display a prolonged antiinflammatory activity, accompanied by supporting mucolytic and antibacterial properties.

Spin-off for research & clinical purposes. In perspective, PEI-engineered respirable particles for dec-ODN may represent a valid therapeutic alternative in CF combined therapy and move nucleic acid inhalation from the laboratory bench to the clinic.

Particelle respirabili modificate con poli(etilenimina) per la veicolazione di un oligonucleotide decoy contro il fattore di trascrizione nucleare NF-**kB**: una nuova strategia per la terapia combinata della fibrosi cistica?

Ragioni dello studio. Il fattore di trascrizione NF-**kB** svolge un ruolo importante nel perpetuare la risposta infiammatoria delle vie aeree in pazienti affetti da fibrosi cistica (FC). Studi recenti indicano che piccoli frammenti di DNA, denominati oligonucleotidi decoy, in grado di bloccare NF-**kB**, possono limitare la progressione dell'infiammazione cronica polmonare. Per permettere a tali molecole di depositarsi a livello polmonare e di agire per tempi prolungati, nei nostri laboratori sono state sviluppate, con il supporto della FFC, polveri respirabili contenenti un oligonucleotide decoy contro NF-**kB** (dec-ODN). Tali sistemi microparticellari, biocompatibili e biodegradabili, rappresentano il primo esempio di pol-

veri secche per l'inalazione di oligonucleotidi e, testati in modelli animali, si sono mostrati in grado di distribuirsi omogeneamente nel polmone ed inibire in maniera prolungata la produzione di importanti mediatori dell'infiammazione.

Ipotesi e obiettivi. L'idea alla base di questo progetto è di sviluppare delle particelle respirabili contenenti dec-ODN potenziate nell'effetto grazie all'aggiunta di poli(etilenimina) (PEI), un eccipiente multifunzionale, il cui uso in FC si è rivelato particolarmente promettente per le sue proprietà osmotiche, la comprovata attività antibatterica verso i Gram (-) e la potenziale attività mucolitica.

Metodi. Il disegno sperimentale prevede, in una prima fase del progetto, lo sviluppo formulativo di nuove particelle respirabili contenenti dec-ODN e PEI. Particolare attenzione sarà dedicata agli effetti peculiari impartiti dalla PEI al sistema, quali attività mucolitica ed antibatterica.

In una seconda fase, sarà valutato il profilo di attività delle particelle contenenti dec-ODN e PEI sull'espressione di geni pro-infiammatori regolati da NF-**kB** in specifiche linee cellulari e su un modello animale di infiammazione polmonare.

Risultati attesi. Nuove particelle respirabili per il rilascio contemporaneo di dec-ODN e PEI che presentino, insieme alla principale attività antinfiammatoria, proprietà mucolitiche e antibatteriche.

Possibili ricadute per ricerca e clinica. In prospettiva, le particelle respirabili per il rilascio prolungato di dec-ODN possono rivelarsi un valido strumento di supporto alla terapia della FC. I risultati attesi potrebbero consentire un ulteriore passo in avanti della ricerca verso l'applicazione di acidi nucleici in campo clinico.

POSTER SESSION 2: CF MICROBIOLOGY

Chairman: Alessandra Bragonzi

53. Pulmonary delivery of inhaled peptidomimetic as novel antibiotics to control *Pseudomonas aeruginosa* infection in murine models

Bragonzi A¹, Bernardini F¹, Facchini M¹, Alcalà-Franco B¹,

Cigana C¹, Obrecht D²

¹Divisione di Immunologia, Trapianti e Malattie infettive, Infections and Cystic Fibrosis Unit, Istituto San Raffaele, Milano

²Polyphor Ltd, Switzerland
(FFC Project #10/2011, new)

Background. The discovery, development, and clinical exploitation of antibiotics with new mechanisms of action together with efficient drug pulmonary delivery systems is a top priority in the battle against untreatable chronic infections in CF patients. Despite growing concerns of clinicians and medical societies about the very limited number of novel drugs in the pipeline to fight multi-resistant *Pseudomonas* strains, only a low number of novel anti-*Pseudomonas* drugs are currently in late stage of pre-clinical or clinical development. POL7001 from Polyphor is a synthetic protein epitope mimetics that mimic protegrin-1, a lytic antimicrobial peptide shown to have potent antimicrobial activity against *Pseudomonas aeruginosa*. The eFlow device platform from PARI-Pharma has a significantly higher delivery efficiency than established jet, ultrasonic, or general purpose vibrating-mesh nebulizer systems used with current approved nebulized drug products.

Objectives and methods. In this project we aim to test *P. aeruginosa*-specific therapy by addressing a novel peptidomimetic antimicrobial in comparison to clinically approved antibiotics and improving the drug delivery by inhalation in

murine models. POL7001 will be tested in comparison with clinically approved antibiotics in established models of acute and chronic respiratory infection including CF mice. Lung pathology, inflammatory response and bacterial loads in the lung homogenate and broncho alveolar lavage (BAL) will be evaluated. In parallel, POL7001 pharmacokinetics in lung, BAL and plasma will be evaluated in order to optimise the compound administration by aerosol therapy under the perspective of preclinical development.

Expected results. We expect to develop novel pathogen-specific drug for the treatment of multi-drug resistant *P. aeruginosa* respiratory infections in patients with CF and new tools for management of *P. aeruginosa* infections.

Sviluppo pre-clinico di Peptidomimetici attraverso la via inalatoria per il controllo delle infezioni da *Pseudomonas aeruginosa* in modelli murini

Ragioni dello studio. Nonostante la crescente preoccupazione dei clinici rispetto ad un numero molto limitato di nuovi farmaci efficaci nel combattere ceppi multi-resistenti di *Pseudomonas*, solo un numero molto esiguo di nuovi agenti anti-*Pseudomonas* è attualmente in fase avanzata di sviluppo pre-clinico o clinico. Inoltre, per il trattamento delle infezioni polmonari croniche in pazienti con fibrosi cistica, un grande sforzo è concentrato nello sviluppo di diverse classi di antibiotici per terapia inalatoria. L'obiettivo a lungo termine di questo progetto è lo sviluppo pre-clinico di una nuova classe di anti-batterici (peptidomimetici) e la loro ottimizzazione per inalazione. POL7001, scoperto da Polyphor, è sintetizzato sul modello del peptide naturale Protegrina-1. Questo nuovo antibiotico ha una dimostrata attività antimicrobica contro ceppi sensibili e multi-resistenti di *P. aeruginosa*. In studi pre-clinici, utilizzando modelli animali di septicemia, POL7001 ha dimostrato una efficacia nel proteggere da una infezione letale da *P. aeruginosa* ed una maggiore efficacia rispetto agli effetti di un altro antibiotico, gentamicina.

Obiettivi e metodi. I risultati incoraggianti ottenuti fino ad oggi danno una motivazione ad estendere lo sviluppo pre-clinico di POL7001 in studi di infezione respiratoria. L'efficacia terapeutica di POL7001 per somministrazione inalatoria sarà valutata in modelli murini di infezione respiratoria acuta e cronica da *P. aeruginosa* e confrontato con antibiotici già approvati ed utilizzati nella pratica clinica. Per migliorare l'erogazione di nuovi antibiotici e l'efficacia del trattamento delle infezioni respiratorie useremo un dispositivo per terapia inalatoria (eFlow) fornito da PARI-Pharma. Questo dispositivo ha un rendimento significativamente superiore ai sistemi di nebulizzazione attualmente in commercio. Questo progetto propone una collaborazione tra ricerca accademica (San Raffaele), con competenze accreditate nella patogenicità di *P. aeruginosa* e modelli animali di infezione respiratoria, ed aziende innovative (Polyphor e PARI-Pharma) con vasta esperienza nella scoperta di nuovi farmaci, ottimizzazione e sviluppo pre-clinico.

Risultati attesi. L'aspettativa è quella di sviluppare nuovi antibiotici che possano avere una concreta applicazione nella pratica clinica per il trattamento delle infezioni causate da batteri multiresistenti agli antibiotici tradizionali quali *P. aeruginosa* in fibrosi cistica.

54. Design, synthesis, in vitro biological evaluation and anti-biofilm activity of new beta-lactam and linezolid-like compounds as potential antibacterial agents against *Staphylococcus aureus* infections in cystic fibrosis patients

Musumeci R¹, Cocuzza CE¹, Colombo C², Cariani L³, Garlaschi L³, Galletti P⁴, Tolomelli A⁴, Gentilucci L⁴, Giacomini D⁴

¹Dep. of Clinical Medicine and Prevention, University of Milano-Bicocca, ²Dep. of Pediatrics, CF Center, Fondazione IRCCS Cà Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Univ. of Milano; ³Central Lab CF Microbiology, Fondazione IRCCS Cà Granda Ospedale Maggiore Policlinico; ⁴Dep. of Chemistry "G. Ciamician" University of Bologna
(FFC Project#11/2011, new)



Clementina Cocuzza (seconda da dx) con le partner Daria Giacomi-ni (prima da dx) e Lisa Cariani (quarta da dx) e il gruppo di ricerca

Background. Pulmonary bacterial infections represent the main cause of morbidity in patients with cystic fibrosis (CF). *Staphylococcus aureus* is one of the major pathogens to colonize and infect the lungs of CF patients, causing recurrent and relapsing infections, particularly in children and adolescents. Moreover, recent data from USA and Europe have shown an increase in *S. aureus* infections in the CF population, with methicillin resistant strains (MRSA) being on the rise. These antibiotic-resistant strains are characterized by the presence of additional virulence factors, such as biofilm formation, and have been associated with a greater decline in lung function.

Hypothesis and objectives. The emergence of multidrug-resistant bacteria, such as MRSA, poses a special challenge in the treatment of infections in CF and new therapeutic agents are required.

The aim of this project was the design, synthesis and evaluation of the "in vitro" activity of new antistaphylococcal agents against recent well characterized antibiotic-resistant and virulent strains of *S. aureus* isolated from children with CF.

Methods. New anti-staphylococcal compounds, with beta-lactam or oxazolidinone-like structures, will be developed. The multidisciplinary approach of this project will involve the Unit of Milano characterising strains of *S. aureus* isolated from CF children with pulmonary lung infections; these will be used to screen libraries of compounds developed by the Bologna Unit during the first part of the project. Compounds will be optimized on the basis of the antibacterial activity assessed by Milano-Bicocca Unit; lead compounds and their chemical modifications will be also be further analysed. Finally electron microscopy and cytotoxicity studies will also be carried out to determine the possible mechanism of action of the most promising compounds.

Expected results. Preliminary results on the antibacterial activity of a series of new NSMe azetidinones against clinical *S. aureus* strains from CF patients have already given satisfactory results; new lead compounds are therefore expected to be developed during the course of this project active against antibiotic-resistant isolates.

Spin-off for research & clinical purposes. The development and optimization of new compounds active against antibiotic-resistant bacteria will bring about important advances in terms of reduction of morbidity and mortality in patients with serious infections caused by these pathogens.

Progettazione, sintesi, valutazione biologica in vitro e attività anti-biofilm di nuovi composti beta-lattamici e linezolid-simili come potenziali agenti antibatterici contro le infezioni da *Staphylococcus aureus* in pazienti affetti da fibrosi cistica.

Ragioni dello studio. Le infezioni batteriche polmonari rappresentano la principale causa di mortalità in pazienti con fibrosi cistica (FC). Lo *Staphylococcus aureus* è uno dei primi patogeni a colonizzare ed infettare i polmoni dei pazienti con FC, causando infezioni ricorrenti e recidivanti, in particolare nei bambini e negli adolescenti. Dati recenti dagli Stati Uniti e Europa hanno mostrato un aumento delle infezioni da *S. aureus* nella popolazione con FC, con un crescente aumento di ceppi meticillino-resistenti (MRSA); questi sono caratterizzati dalla presenza di fattori di virulenza aggiuntivi, come la formazione di biofilm, e sono stati associati ad una maggiore diminuzione della funzione polmonare.

Ipotesi e obiettivi. L'emergere di batteri multi-resistenti, come l'MRSA, rappresenta una importante sfida nel trattamento delle infezioni in FC rendendo necessaria lo sviluppo di nuovi agenti terapeutici. Scopo di questo progetto è la progettazione, sintesi e valutazione dell'attività antibatterica di nuovi agenti antistafilococcici.

Metodi. Verranno sviluppati nuovi composti, aventi strutture beta-lattamiche o oxazolidinoni-simili. L'approccio multidisciplinare di questo progetto comporterà che l'Unità di Milano caratterizzi ceppi di *S. aureus* isolati da pazienti pediatrici con FC affetti da infezioni polmonari; questi saranno successivamente utilizzati per lo screening delle librerie di composti sviluppate dall'Unità di Bologna durante la prima parte del progetto. I composti di riferimento saranno ottimizzati sulla base delle attività antibatteriche valutate dall'Unità di Milano-Bicocca. Infine studi di microscopia elettronica e di citotossicità saranno effettuati per determinare il possibile meccanismo d'azione dei composti più promettenti.

Risultati attesi. Ad oggi, risultati preliminari sull'attività antibatterica di una serie di nuovi NSMe-azetidinoni contro ceppi clinici di *S. aureus* isolati da pazienti con FC hanno dato risultati soddisfacenti; i risultati attesi dal proseguimento di questo studio sono pertanto lo sviluppo di nuovi composti attivi nei confronti di ceppi antibiotico-resistenti.

Possibili ricadute per ricerca e clinica. Lo sviluppo e ottimizzazione di nuove molecole attive nei confronti di batteri antibiotico-resistenti potrà portare nel futuro ad importanti ricadute in termini di riduzione nella morbidità e mortalità in pazienti con infezioni gravi associate a questi patogeni.

55. New drugs for *Burkholderia cepacia* from Antarctic bacteria

Fani R¹, Tutino ML², Rovero P³

¹ Lab. di Evoluzione Microbica e Molecolare, Dip. di Biologia Evoluzionistica, Università degli studi di Firenze; ² Dip. Chimica Organica e Biochimica, Università Federico II, Napoli; ³ Dip. Scienze Farmaceutiche, Università di Firenze (FFC Project#12/2011, new)



Renato Fani, primo a destra, e il suo gruppo di ricerca

Background. Lungs infection in Cystic Fibrosis (CF) patients are usually caused by Gram-negative organisms, including bacteria belonging to the *Burkholderia* genus. In particular, members of the *B. cepacia* complex (Bcc) possess high level of multidrug resistances and virulence determinants, making their eradication difficult.

Hypothesis and objectives. To overcome these difficulties, the aim of the project is the identification of new antibiotics. In this context unusual microorganisms isolated from extreme environments may represent an untapped sources for the discovery of new natural antibiotics to be exploited in the control of infections in CF patients. Bacteria inhabiting Antarctica have to face adverse environmental conditions. Hence, they adopt peculiar survival strategies to achieve a competitive advantage.

Methods and expected results. Specific assays for the detection of antibacterial activity from Antarctic bacteria revealed a specific action against Bcc species, and also that most of the bacteria tested were able to inhibit the growth of Bcc strains by producing one (or more) antimicrobial molecules that very likely are VOCs (volatile organic compounds). In this project, the active compounds will be isolated and structurally characterized by applying advanced analytical methodologies. Then, a multidisciplinary approach will allow us to identify the genes encoding the antimicrobial molecules biosynthetic pathway. Indeed, identification of all genes involved in VOCs production will be made both by SNPs detection after whole-genome sequencing of non-producing mutant Antarctic strains and by constructing a set of specific insertion/deletion mutants and complementing their lost function by recombinant gene expression.

A parallel study will be carried out in order to identify the molecular target(s) of the antimicrobial compounds produced by Antarctic bacteria. Bcc mutants resistant to the antimicrobial compounds will be isolated, phenotypically characterized, and then the entire genome sequence will be determined. The identification of genes involved in VOCs resistance will be carried out through SNPs detection and also gene products will be identified.

Spin-off for research and clinical purposes. In this way it will be possible to put the basis for the discovery and use of new effective antibiotics to be applied in the control of infections in CF patients.

Nuovi antibiotici prodotti da microrganismi antartici contro i batteri del *Burkholderia cepacia* complex

Ragioni dello studio. Le infezioni polmonari dei pazienti FC sono di solito causate da organismi Gram-negativi, alcuni dei quali appartengono al gruppo chiamato *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) che sono capaci di resistere a numerosi antibiotici, una proprietà che rende complicata la loro eradicazione dall'ospite.

Ipotesi e obiettivi. Per aggirare questo ostacolo, il progetto è rivolto alla scoperta di nuove sostanze antibiotiche. In questo contesto, microrganismi "inusuali", come quelli che vivono in ambienti estremi (es. Antartide) possono rappresentare una fonte straordinaria di nuovi antibiotici. Infatti, i batteri che hanno colonizzato l'ambiente antartico, caratterizzato da condizioni ambientali molto avverse, adottano particolari strategie per sopravvivere in un ambiente così "ostile". Queste strategie si basano spesso sulla produzione di molecole antibiotiche particolari e non ancora identificate. L'obiettivo di questo progetto è pertanto l'isolamento e la caratterizzazione (strutturale e funzionale) di nuovi antibiotici prodotti da batteri isolati in Antartide per combattere e sconfiggere le infezioni dovute ai batteri appartenenti al Bcc.

Metodi e risultati attesi. In precedenza sono stati allestiti saggi specifici per il rilevamento di attività antibiotica prodotta da batteri antartici contro patogeni appartenenti al Bcc che infettano pazienti FC, con ottimi risultati. È stato infatti dimostrato che i batteri antartici producono antibiotici molto potenti capaci di inibire la crescita del Bcc. È stato anche dimostrato che i composti con azione antimicrobica sono gassosi e vengono definiti VOC (Compensi Organici Volatili). L'identificazione, l'isolamento e la caratterizzazione degli "antibiotici antartici" sarà possibile grazie ad un approccio multidisciplinare integrato che prevederà la stretta collaborazione tra i diversi gruppi partecipanti al progetto e l'utilizzo di metodiche avanzate nel campo della genomica, della bioinformatica, della genetica, della microbiologia e della farmacologia, quali ad esempio il sequenziamento massivo e la spettrometria di massa. L'uso combinato di queste metodologie permetterà non solamente di identificare le vie metaboliche dei batteri antartici responsabili della sintesi di tali composti, ma anche di isolare e determinare la struttura dei nuovi antibiotici.

Possibili ricadute per ricerca e clinica. In questo modo saranno poste le basi per nuove terapie antibiotiche contro le infezioni da batteri appartenenti al Bcc.

56. Identification and characterization of novel drugs suppressing *Pseudomonas aeruginosa* virulence in chronic infection

Leoni L¹, Imperi F²

¹Lab. Microbiologia molecolare e Biotecnologie dei microrganismi, Dip. Biologia, Università "Roma 3"; ²Dip. Biologia e Biotecnologie, Univ. "La Sapienza", Roma (FFC Project#13/2011, new)



Livia Leoni, prima a destra, con il partner Francesco Imperi, alla sua destra, e il gruppo di ricerca

Background. Eradication of chronic *P. aeruginosa* lung infection in cystic fibrosis (CF) patients is currently impossible. Moreover, frequent antibiotic courses in chronically infected individuals, besides exerting selective pressure for antibiotic resistance, often results in cumulative toxicity. An innovative approach to combat bacterial infections is to use drugs able to specifically inhibit the bacterial capability to establish the infection rather than bacterial growth. Targeting the bacterial pathogenic potential has the advantage of reducing the bacterial adaptability to the host environment and the severity of the infection, ultimately providing the host immune system with a better chance of clearing the infection.

Hypothesis and objectives. A promising strategy for the development of novel drugs is searching for new side activities in old drugs. According to this approach, only a limited number of highly diverse drugs, which use in humans has already been approved, are screened. This strategy is expected to reduce the time and cost associated with standard drug discovery processes. Quorum sensing (QS) and pyoverdine signaling (PS) play a key role in *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity. Thus, we selected these systems as targets for the identification of new anti-virulence drugs.

Methods. In a previous FFC project (FFC#8/2008) we developed two high-throughput screening systems for the identification of QS and PS inhibitory compounds. These systems were validated by screening a library of 1120 established drug molecules. We found four drugs with relevant activity against QS or PS. In this new project, the effect of these compounds on *P. aeruginosa* pathogenicity and biofilm formation will be determined both in vitro and in a murine model of chronic lung infection.

Expected results. The final output of the project will hopefully be the identification of molecules which are able to inhibit *P. aeruginosa* virulence phenotypes in vitro, and which are effective in preventing and/or treating *P. aeruginosa* lung infection in a mouse model.

Spin-off for research & clinical purposes. Since the screened compounds are already approved for clinical use and have very low toxicity to humans, the anti-virulence drugs identified and characterized in this project could hopefully be taken into consideration for clinical studies. Alternatively, they could be used as starting point for drug optimization programs.

Identificazione e caratterizzazione di nuovi farmaci contro l'infezione cronica da *Pseudomonas aeruginosa*

Ragioni dello studio. Le terapie antibiotiche tradizionali sono generalmente inefficaci nell'eradicare l'infezione cronica polmonare da *Pseudomonas aeruginosa*, soprattutto a causa dell'insorgenza di ceppi resistenti agli antibiotici e della formazione di biofilm. Una strategia alternativa per il trattamento delle infezioni da *P. aeruginosa* potrebbe essere l'utilizzo di farmaci in grado di inibire la capacità del batterio di instaurare l'infezione e formare il biofilm. L'uso di questi farmaci "anti-virulenza", da soli o in combinazione con gli antibiotici, darebbe al sistema immunitario migliori possibilità di risolvere spontaneamente l'infezione.

Ipotesi e obiettivi. È ben noto che i farmaci già in commercio, oltre alla loro attività principale, possono possedere attività secondarie, spesso inesplorate. In nostro obiettivo è quello di identificare un'attività secondaria "anti-*Pseudomonas*" in farmaci già approvati per l'uso nell'uomo. Questo consentirebbe di ridurre notevolmente i lunghi anni di studio ed i forti investimenti necessari allo sviluppo di un farmaco ex novo. Il "quorum sensing" (QS) ed il "pyoverdine signalling" (PS) sono due processi necessari a *P. aeruginosa* per instaurare l'infezione e produrre il biofilm. Pertanto, rappresentano bersagli ideali per lo sviluppo di farmaci "anti-virulenza".

Metodi. In un precedente progetto (FFC#8/2008) il nostro gruppo ha messo a punto dei sistemi per l'identificazione di inibitori del QS e del PS. Questi sistemi sono stati utilizzati per cercare composti "anti-virulenza" in una collezione di 1120 farmaci con

diverse proprietà farmacologiche e chimiche. Tale analisi ha portato all'identificazione di quattro farmaci in grado di inibire il QS o il PS. Nel presente progetto l'azione "anti-*Pseudomonas*" di questi farmaci verrà indagata nel dettaglio, sia in vitro che in un modello murino d'infezione polmonare cronica.

Risultati attesi. Il risultato atteso del presente progetto è l'identificazione di uno o più farmaci in grado di inibire l'espressione dei fattori di virulenza e la formazione di biofilm in *P. aeruginosa*, che si dimostrino inoltre efficaci nel prevenire e/o eradicare l'infezione polmonare da *P. aeruginosa* in un modello animale.

Possibili ricadute per ricerca e clinica. Dato che i composti da noi identificati sono farmaci già approvati per uso clinico, è plausibile che questi farmaci "anti-virulenza" potranno essere considerati per un trasferimento alla fase clinica di studio in tempi brevi.

57. Development of new host-defence like peptides and lipopeptides against lung pathogens: in vitro and in vivo studies

Mangoni ML¹, Shai Y²

¹Dip. Scienze Biochimiche, Univ. "La Sapienza", Roma;

²Dep. of Biological Chemistry, The Weizmann Institute of Science, Israel

(FFC Project#14/2011, new)



Foto sopra, Maria Luisa Mangoni, prima a destra, con collaboratori del progetto. Foto sotto, Yechiel Shai, a sinistra, e collaboratrici

Background. Lung infections by the multi-drug resistant bacterial pathogen *Pseudomonas aeruginosa* are the major life-threats in patients with cystic fibrosis (CF). Naturally occurring small molecules, named antimicrobial peptides (AMPs), are promising candidates for the development of novel therapeutics and represent the reason of our study.

Hypothesis and objectives. Our goal is to find new effective and economically feasible antimicrobial agents to prevent and treat lung infections by *P. aeruginosa*. A few short AMPs isolated from frog skin (13-21 amino-acids) or de-novo designed lipopeptides (only 3-4 amino acids linked to a fatty acid chain) have shown anti-*Pseudomonas* activity in vitro. Interestingly, some of them destroy the membrane of bacterial cells and preserve activity in serum as well as in a high-salt environment. In addition, some AMPs can neutralize the toxic effect of the bacterial cell wall component lipopolysaccharide (LPS or endotoxin-

in). Septic shock caused by elevated levels of pro-inflammatory molecules (i.e. cytokines) released from LPS-activated immune cells is not a major problem in CF. Nevertheless, the development of an antimicrobial compound with both a direct killing activity and an anti-LPS effect is particularly advantageous to reduce deterioration of lung function.

Methods. We will use a multidisciplinary approach combining biochemical and microbiological techniques and animal models to achieve three major aims: i) Identify novel peptides/lipopeptides active on both the planktonic and the sessile forms of *Pseudomonas*, either when used alone or in combination with conventional antibiotics; ii) Study the peptides' ability to detoxify *P. aeruginosa* LPS, by monitoring the inhibition of LPS-induced production of cytokines from immune cells; iii) Study the peptides' antimicrobial efficacy in murine models of acute and chronic *P. aeruginosa* lung infections.

Expected results. We expect to select a low-cost AMP with a high therapeutic index *in vivo*, and with further attractive features (e.g. ability to overcome resistance mechanisms, LPS-neutralizing activity) to be developed as a new weapon against *Pseudomonas* lung infections.

Spin-off for research & clinical purposes. The proposed studies will allow to enlarge our knowledge on the structure/function relationship of AMPs and to select/optimize the design of new peptide-based drugs to be used in clinical medicine, alone or in combination with traditional antibiotics, against the major cause of infection in CF.

Sviluppo di nuovi peptidi e lipopeptidi attivi nel trattamento di patogeni polmonari: studi in vitro ed in vivo

Ragioni dello studio. Infezioni polmonari causate dal batterio multi-farmaco resistente *Pseudomonas aeruginosa* sono una delle maggiori minacce di vita in pazienti con fibrosi cistica (FC). Piccole molecole naturali definite peptidi antimicrobici (AMP) rappresentano promettenti candidati per lo sviluppo di nuovi agenti terapeutici e sono la ragione del nostro studio.

Ipotesi e obiettivi. Il nostro scopo è quello di sviluppare composti antimicrobici a basso costo ed efficaci nel trattamento di infezioni polmonari indotte da questo microrganismo. Alcuni AMP di piccole dimensioni (13-21 aminoacidi) isolati dalla pelle di rana e lipopeptidi di sintesi chimica (contenenti 3-4 aminoacidi legati ad una catena di acido grasso) sono attivi in vitro contro *P. aeruginosa*. Alcuni di questi distruggono la membrana di cellule batteriche e mostrano un'attività antimicrobica anche in presenza di siero o ad elevata concentrazione salina. Inoltre, alcuni AMP neutralizzano l'effetto tossico del lipopolisaccaride (LPS o endotossina), quale componente della parete di cellule batteriche. Sebbene lo shock endotossico non rappresenti un grave problema in pazienti con FC, la scoperta di un composto con duplice attività, battericida ed anti-LPS, è sicuramente di grande vantaggio per ridurre il deterioramento delle funzioni polmonari.

Metodi. Un approccio multidisciplinare coinvolgente tecniche biochimiche, microbiologiche e l'impiego di modelli animali servirà a raggiungere tre principali obiettivi: i) identificare molecole peptidiche attive sia sulla forma planctonica che sessile di *Pseudomonas* quando usate singolarmente o in combinazione con antibiotici convenzionali; ii) studiare la loro abilità a detoxificare LPS da *Pseudomonas* inibendo il rilascio di molecole pro-infiammatorie da cellule immunitarie attivate da LPS; iii) studiare l'efficacia antimicrobica dei peptidi in modelli di topo con infezione respiratoria acuta e cronica da *P. aeruginosa*.

Risultati attesi. Ci aspettiamo di trovare un peptide con un alto indice terapeutico, incapace di generare microorganismi resistenti e con un'azione anti-LPS, per lo sviluppo di un nuovo antibiotico contro le infezioni polmonari da *Pseudomonas*.

Possibili ricadute per ricerca e clinica. Il progetto proposto permetterà di allargare le nostre conoscenze sulle relazioni struttura/funzione degli AMP e di selezionare/ottimizzare la progettazione di nuovi farmaci a base peptidica da impiegare nella pratica clinica contro il principale tipo di infezione nella FC.

58. Development, production and characterization of antibacterial peptides (CAMPs) active on the sessile form of the opportunistic human pathogens *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cenocepacia*

Pizzo E¹, Varcamonti M²

¹Dip. Biologia Strutturale e Funzionale, Università "Federico II", Napoli; ²Dip. Biologia Strutturale e Funzionale, Università di Napoli "Federico" (FFC Project#15/2011, new)



Elidoro Pizzo, primo a sinistra, con il gruppo di ricerca

Background. In the lungs of Cystic Fibrosis patients, the impact of a bacterial biofilm is dramatic because of the propensity of these bacteria to persist in the tissue and to acquire resistance to most of the antibiotic used. Therefore, bacterial infection are the primarily cause of death. Indeed new antibiotics are needed to combat specifically biofilm forming pathogens, but progress in developing them has been slow so far. At this regard, Cationic Antimicrobial Peptides/Proteins (CAMPs) are a valuable attractive: they are relatively small peptides with broad spectrum of antimicrobial activity and they are active on both non dividing and actively dividing cells. These peptides are secreted by several multicellular eukaryotes including plants, vertebrates and invertebrates and are a key component of the innate immune system being a first line of defense against microbial invasion.

Objectives. The project has two targets: firstly, the screening of CAMPs, and CAMPs mixtures toward hypermutable, mucoid and poly-drug resistant *P. aeruginosa* CF isolates. Secondly, the most promising products will be chemically modified with the purpose to increase their bactericidal activity.

Methods. Through bioinformatics and computational strategies new potential human CAMPs will be identified. These CAMPs, their mixtures and/or their chemical derivatives will be produced through recombinant DNA technology and opportune chemical manipulations. These products, after isolation, will be tested both on planktonic and sessile (or biofilm) form of CF pathogens, *Pseudomonas* and *Burkholderia*. Parallel to this work, those CAMPs or derivatives with relevant bactericidal activity will be assayed on normal human cell lines to value toxic effects.

Expected results. During the course of this project, we expect to develop a panel of CAMPs very active on CF clinical isolates of *P. aeruginosa*. The toxicity of this "first generation" CAMP(s) will be improved through their irreversible denaturation by means of chemical modifications of some key amino acids, as cysteines. The most promising compounds and/or formulations will be tested *in vivo*.

Spin-off for research clinical purposes. These peptide-

based "bactericidal drugs" could find application in the treatment of pathogenic multi-drug resistant biofilm forming bacteria which are becoming more and more frequently a serious threat for human health in general and for CF patients.

Sviluppo, produzione e caratterizzazione di peptidi antibatterici (CAMPs) attivi su patogeni umani opportunisti *Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia cenocepacia*

Ragioni dello studio. Nei polmoni dei pazienti affetti da Fibrosi Cistica (FC), l'impatto di un biofilm batterico è drammatico a causa della propensione dei batteri a persistere nel tessuto e ad acquisire resistenza agli antibiotici utilizzati. È per questo motivo che le infezioni batteriche sono la prima causa di morte in pazienti FC. Nuovi antibiotici sono pertanto necessari per combattere in maniera specifica i patogeni che formano biofilm, anche se attualmente i progressi nel loro sviluppo sono ancora scarsi. I peptidi cationici antibatterici (CAMPs) rappresentano alternative particolarmente interessanti. Queste molecole, aventi ridotte dimensioni, possiedono un ampio spettro di attività antimicrobica, sono attive sia su cellule in divisione che su cellule sessili e sono secrete da numerosi organismi eucarioti incluse piante, vertebrati e invertebrati. I peptidi antimicrobici sono determinanti nel sistema immunitario innato, essendo la prima linea di difesa contro le invasioni microbiche.

Ipotesi e obiettivi. Il progetto si propone di raggiungere due obiettivi: in primo luogo l'identificazione di CAMPs, o miscele di CAMPs, attivi nei confronti di ceppi mucoidi e ipermutanti di *P.aeruginosa* isolati da pazienti affetti da FC. In secondo luogo, i prodotti più promettenti saranno chimicamente modificati allo scopo di migliorarne l'attività battericida.

Metodi. Nuovi potenziali CAMPs umani saranno identificati attraverso strategie bioinformatiche e computazionali. I CAMPs identificati, le loro miscele e/o i loro derivati chimici saranno prodotti attraverso la tecnologia del DNA ricombinante e opportune manipolazioni chimiche. Tali prodotti saranno poi testati sia su cellule planctoniche sia su cellule sessili (o biofilm), da *Pseudomonas* e *Burkholderia*, isolate dai pazienti FC. In parallelo, i CAMPs o i loro derivati che risulteranno molto attivi, saranno testati su cellule umane normali per valutarne eventuali effetti tossici.

Risultati attesi. Nel corso del progetto genereremo un archivio di CAMPs attivi su isolati clinici da pazienti affetti da FC. La tossicità di questi CAMPs sarà poi migliorata attraverso modifiche chimiche. I composti più promettenti e/o le loro formulazioni saranno infine testati in vivo.

Possibili ricadute per ricerca e clinica. Questi farmaci di derivazione peptidica potrebbero trovare applicazione nel trattamento di biofilm formati da batteri multi-resistenti, i quali rappresentano in generale un serio pericolo per la salute dei pazienti affetti da FC.

59. *Achromobacter xylosoxidans* an emerging pathogen in cystic fibrosis patients: from molecular characterization to development of innovative therapeutic strategies based on the antibacterial activities of *Bdellovibrio* predator bacteria

Quattrucci S¹, Trancassini M², Schippa S³, Nicoletti M⁴

¹Dip. Pediatria e Neuropsichiatria Inf., Univ. "La Sapienza", Policl. Umberto I, Centro fibrosi cistica, Roma; ²Dip. Salute Pubblica e Malattie Infettive, Università "La Sapienza" Roma;

³Dip. Salute pubblica e Malattie Infettive, Univ. La Sapienza, Roma; ⁴Dip. Scienze Biomediche, Univ. "G. D'Annunzio", Chieti (FFC Project#16/2011, new)



Serena Quattrucci, a sinistra con il camice, e il suo gruppo di ricerca

Background. In Cystic fibrosis (CF) chronic microbial colonization biofilms and recurrent infections have to be considered as trigger of lung inflammation. Handling this infections it's a serious problem, principally due to the antibiotic resistance of the involved bacterial strains. *Bdellovibrio* microbes are able to prey and kill Gram negative bacteria also in mature biofilms, consequently this species could be candidate for alternative therapeutic applications, along with its bacteriolytic enzymes.

Hypothesis and objectives. Artificial manipulation of lung communities could be a more effective treatment of chronic infections. The bacterial predator *Bdellovibrio* spp. is able to attack different Gram-negative bacteria and their pre-formed biofilms, making these bacteria, or their lytic products interesting as potential therapeutic candidates. The project aim is to evaluate the therapeutic potential of *Bdellovibrio*, or its products, in managing these infections.

Methods. *A. xylosoxidans*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* and *S. maltophilia* strains have been isolated from respiratory samples of patients attending the Cystic Fibrosis Centre of the Pediatric Department of Policlinico Umberto I of Rome. The project will be carried out by using standard methods of cell biology and bacteriology, and molecular methods. In order to give insights into the predatory spectrum of *Bdellovibrio* we will evaluate *Bdellovibrio* antibacterial activity, or of its proteolytic enzymes, against: the different bacterial species isolated from CF patients, and *A. xylosoxidans* biofilm.

Expected results. Antibiotic resistance is a serious problem among CF patients. Our study is aimed at bypass such phenomenon by evaluating the usefulness of *Bdellovibrio* as an alternative new therapeutic strategy for the handling of pulmonary infections in CF patients.

Spin-off for research & clinical purposes. In conclusion, once achieved expected results proposed in this study, a research spin-off could be proposed, in order to evaluate the clinical impact of the predatory ability of *Bdellovibrio*. The ability of bacteria to adhere to host tissues and to form biofilm in vivo are considered important prerequisites for colonization and for the establishment of infection in CF patients. Studies devoted to find out original and suitable ways useful to interfere on colonization steps will be important in order to set up new therapeutic strategies.

Achromobacter xylosoxidans* patogeno emergente in pazienti affetti da Fibrosi Cistica: dalla caratterizzazione molecolare allo sviluppo di strategie terapeutiche basate sull'attività del batterio predatore *Bdellovibrio

Ragioni dello studio. Nella Fibrosi Cistica (FC) la colonizzazione microbica e le infezioni ricorrenti scatenano l'infiam-

mazione dei tessuti respiratori. La formazione di biofilm causa notevoli problemi terapeutici ed è considerata una evenienza comune nelle infezioni polmonari dei pazienti con FC. Il trattamento delle infezioni polmonari in questi pazienti rappresenta un serio problema a causa della resistenza agli antibiotici e studi volti a terapie alternative sono di grande interesse. Il genere *Bdellovibrio* comprende batteri che predano e uccidono i Gram-negativi e hanno la capacità di ridurre il biofilm batterici. Essi potrebbero quindi costituire un interessante approccio per il trattamento delle infezioni in pazienti FC.

Ipotesi e obiettivi. La manipolazione artificiale delle comunità microbiche potrebbe rappresentare un più vantaggioso trattamento delle infezioni croniche. Lo scopo del presente studio è valutare il possibile utilizzo del batterio predatore *Bdellovibrio* o di suoi enzimi batteriolitici, come agenti terapeutici alternativi nella FC.

Metodi. I ceppi di isolamento clinic utilizzati nello studio sono: *A. xylosoxidans*, *P.aeruginosa*, *S. aureus* and *S. maltophilia*, tutti isolati da campioni del tratto respiratorio di pazienti con FC selezionati nel Centro di Fibrosi Cistica del Dipartimento di Pediatria del Policlinico Umberto I di Roma. Verrà valutata l'attività antibatterica ed anti-biofilm di *Bdellovibrio* e dei suoi enzimi batteriolitici su colture pure delle diverse specie batteriche isolate, su modelli di infezione cellulare con *A. xylosoxidans*.

Risultati attesi. l'antibiotico resistenza è un problema che rende difficile il trattamento delle infezioni polmonari in pazienti con FC. La valutazione preliminare della possibilità di sviluppare nuove terapie basate sull'impiego di *Bdellovibrio* sono quindi di notevole rilevanza.

Possibili ricadute per la ricerca clinica. In conclusione, ottenuti i primi risultati del presente studio, potrebbe essere proposto un ulteriore sviluppo al fine di valutare l'impatto clinico dell'abilità predatoria della specie *Bdellovibrio*. Studi volti ad interferire con importanti prerequisiti utili per lo stabilirsi dell'infezione, come colonizzazione dei tessuti polmonari e la capacità di formare biofilm, sono di grande interesse al fine di mettere a punto nuove strategie terapeutiche alternative agli antibiotici.

60. Preclinical development of the antimicrobial peptide M33. Efficacy against *P. aeruginosa* lung infections and pharmacokinetic studies in animals

Pini A

Dipartimento di Biotecnologie, Università di Siena
(FFC Project#24/2011, new)



Alessandro Pini, secondo da sinistra, con il suo gruppo di ricerca

Background. The project FFC#24/2011 is the extension of a project previously financed by Italian Foundation for Cystic Fibrosis in 2009. The present project is aimed to the animal experimentation of a novel antimicrobial peptide, termed M33, which was discovered by proposers some years ago and then optimized for antimicrobial activity, toxicity and production

processes with the aim to develop a new drug for lung infections.

Hypothesis and objectives. M33 peptide is active against many Gram-negative bacteria including *Pseudomonas aeruginosa*, a microbe importantly involved in Cystic Fibrosis. The present project is aimed to test M33 in the aerosol treatment of *Pseudomonas* lung infections induced in animals. The aerosol treatment allows the drug to reach immediately the centre of infection and this should let a rapid and strong reduction of bacterial load.

Methods. Animal models of lung infections will be used borrowing existing protocols already experimented by the proposers. New protocols for lung infections will be possibly set up for this purpose. A special machine for drug nebulization will be optimized from a prototype constructed by the proposers and used for animal treatment after bacterial challenge.

Expected results. This is a single year project. During this period we expect to obtain the first results about the bacterial load reduction from lungs of animals treated with M33 administered via aerosol. Results from these experiments will provide crucial information about real possibilities to develop a new antibacterial drug.

Spin-off for research & clinical purposes. Peptide M33 as a new antibacterial agent is protected by three international patents filed by the proposers in the last years. Project FFC#24/2011 is part of a larger program where peptide M33 is evaluated in preclinical tests which include also pharmacokinetic, bio-distribution and toxicity studies. Results from the whole program of development will allow to understand if M33 peptide will enter in clinical phases in the next years.

Sviluppo preclinico del peptide antimicrobico M33. Efficacia contro le infezioni polmonari da *Pseudomonas aeruginosa*

Ragioni dello studio. Il progetto FFC#24/2011 è la continuazione di un progetto finanziato dalla Fondazione Fibrosi Cistica nel 2009. Questo progetto è finalizzato alla sperimentazione preclinica di una nuova molecola antimicrobica (peptide M33). Questa molecola è stata isolata nel laboratorio proponente alcuni anni fa, ed è stata ottimizzata in termini di attività antimicrobica, tossicità e sistemi di produzione con l'obiettivo di sviluppare un nuovo farmaco da usare nelle infezioni polmonari.

Ipotesi e obiettivi. Il peptide M33 è efficace contro molte specie batteriche Gram-negative con una elevata attività nei confronti di *Pseudomonas aeruginosa*, uno degli agenti batterici maggiormente coinvolti nelle infezioni polmonari di pazienti di Fibrosi Cistica. Il progetto FFC#24/2011 è finalizzato a sperimentare il peptide M33 in modelli animali di infezione polmonare da *Pseudomonas* attraverso somministrazioni aerosoliche che permettono al farmaco un immediato raggiungimento del focolaio di infezione.

Metodi. Per la sperimentazione dell'efficacia del peptide M33 somministrato per via aerosol sarà costruito ed ottimizzato un appropriato strumento di nebulizzazione che permetterà ad animali da esperimento di respirare la molecola in esame dopo infezione avvenuta secondo protocolli standard già sperimentati dal gruppo proponente, e/o secondo nuovi protocolli attualmente in fase di ottimizzazione.

Risultati attesi. Il progetto FFC#24/2011 è stato finanziato per un singolo anno. Durante questo periodo ci aspettiamo di mettere a punto il sistema di nebulizzazione e di utilizzarlo per i primi esperimenti di trattamento delle infezioni polmonari. La diminuzione della carica batterica nei polmoni degli animali infettati fornirà cruciali informazioni sulle reali potenzialità del peptide M33 come nuovo farmaco antibatterico.

Possibili ricadute per ricerca clinica. Il peptide M33 è protetto da 3 brevetti internazionali depositati dai ricercatori coinvolti in questo progetto che hanno l'obiettivo di portare questa molecola verso la sperimentazione clinica nel tempo più breve possibile. Il progetto FFC#24/2011 è parte di un programma di sperimentazione più ampio, quasi interamente al di fuori del finanziamento della Fondazione Fibrosi Cistica, che comprende la completa caratterizzazione farmacocinetica e tossicologica negli animali. I risultati ottenuti dall'intero programma di sviluppo permetteranno di capire se il peptide M33 inizierà la sperimentazione clinica nei prossimi anni.

POSTER SESSION 3: THERAPIES OF THE BASIC DEFECT

Chairman: Alberto Luini

61. Properties of trimethylangelicin in F508del CFTR rescue

Casavola V

Department of General and Environmental Physiology,
University of Bari
(FFC Project #1/2011, new)

Background. The most frequent mutation of the CFTR protein, F508del, produces a mis-folded protein that is associated with a defective chloride secretion, a depletion of airway surface liquid, bacterial infection, inflammation and impairment of lung function. Therefore, it is extremely important to identify small molecule compounds, which could, even partially, both rescue the biosynthetic defect of F508del-CFTR and restore the chloride secretion. We recently demonstrated that a psoralen-related compound 4,6,4'-trimethylangelicin (TMA), strongly inhibits the expression of the IL-8 gene in bronchial epithelial cells in which the inflammatory response has been challenged by infection with *Pseudomonas aeruginosa*. Moreover, a short treatment (15 min) with TMA is able to potentiate the chloride secretion through CFTR present on the membrane. More recently, in the course of preliminary experiments, performed in a secondary cell line of airway cells homozygous for the F508 deletion, we observed that long-term TMA preincubation (24 hrs) rescues both the trafficking of the mutated F508del CFTR on the cellular membrane and chloride secretion.

Hypothesis and objectives. In the course of the present project by a series of experiments finalized to analyze both the presence of the F508del CFTR on the cell surface and the rescue of chloride secretion, we will compare the effect of long acting TMA as a corrector in both secondary and primary human bronchial epithelial cells derived from FC subjects. In particular, the experiments conducted in primary human bronchial epithelial cells will provide insights into the real efficacy of this compound as a corrector since these cells are closer to the physiopathology of the bronchiolar cells of FC patients. Lastly, to analyze if the TMA-induced rescue of CFTR functions could be directly or indirectly correlated with the inflammation, we will perform the analysis of a panel of genes involved in the inflammatory response. Therefore, this project will clarify if TMA is able not only to correct the traffic defect of F508 del CFTR but also to relieve the inflammatory response.

Proprietà di Trimetilangelicina nel recupero di DF508-CFTR

Premesse e ragioni dello studio. La più frequente mutazione della proteina CFTR, F508del, dà luogo ad una proteina che, incapace di raggiungere la membrana cellulare, non è in grado di secertere cloro con conseguente disidratazione delle vie aeree, colonizzazione di batteri e infiammazione cronica. Risulta pertanto di grande utilità terapeutica la correzione, anche se parziale, del difetto del traffico della proteina mutata CFTR in modo da ripristinare, la secrezione di cloro nei pazienti affetti da Fibrosi Cistica (FC). Recentemente abbiamo dimostrato che la trimetilangelicina (TMA), un derivato dello psoralene, ha una spiccata attività anti-infiammatoria in quanto riduce l'espressione di interleuchina-8 (IL-8), la chemochina maggiormente responsabile del reclutamento di neutrofili nelle vie aeree infettate da *Pseudomonas aeruginosa*. Inoltre, un breve trattamento con TMA (15min.) è in grado di potenziare l'efflusso di cloro della proteina CFTR presente sulla membrana. Interessantemente, in preliminari esperimenti,

abbiamo osservato che una prolungata preincubazione (24 ore) con concentrazioni nanomolari di TMA è in grado di ripristinare la secrezione di cloro in una linea di cellule bronchiolari FC.

Ipotesi e obiettivi. Nel corso del presente progetto ci proponiamo di determinare se il composto TMA possa agire da "correttore" non solo in cellule bronchiolari stabilizzate ma anche in colture primarie derivanti da pazienti FC omozigoti per la mutazione F508del. Mediante analisi biochimiche e morfologiche condotte in epitelio di cellule bronchiolari analizzeremo sia l'efflusso di cloro che la presenza della proteina F508 del CFTR sulla membrana cellulare. In particolare gli esperimenti condotti in colture primarie ci daranno informazioni importanti sulla reale capacità di correggere il difetto della proteina F508del in quanto tale modello cellulare rispecchia la fisiopatologia delle cellule bronchiolari dei pazienti. Infine, allo scopo di evidenziare se la correzione indotta dal TMA della proteina CFTR mutata possa influenzare direttamente o indirettamente i processi infiammatori in cellule primarie, verrà effettuata l'analisi delle proteine e dei principali geni coinvolti nella risposta infiammatoria. Questi esperimenti chiariranno se il TMA è in grado di correggere anche solo parzialmente il difetto di traffico della proteina e alleviare l'eccessiva risposta infiammatoria.

62. PTC124 derivatives as a novel approach to improve the readthrough of premature stop codons in the CFTR gene

Di Leonardo A, Lentini L, Melfi R, Pibiri I

Department of Science and Molecular and Biomolecular Technologies (STEMBIO), University of Palermo, Italy
(FFC Project #2/2011, new)



Aldo Di Leonardo con le collaboratrici del suo laboratorio

Background. The presence of Premature Stop Codons (PTCs) in mRNA results in protein truncation that is responsible for inherited (genetic) diseases. Approximately 10% (worldwide) of patients affected by cystic fibrosis (CF) have nonsense mutations (UAA, UAG or UGA) in the CF trans-membrane regulator (CFTR) gene. CFTR mutations in the two genes (alleles) of a patient can be different, with one mutation being delta-F508 and the other a nonsense mutation. Pharmacological approaches aimed to rescue protein function have been proposed to directly overcome nonsense mutations. PTC124 (Ataluren), a small molecule that mimics the activity of aminoglycosides, has been suggested to allow PTCs readthrough (Welch EM et al. Nature. 2007 May 3;447[7140]:87-91.). However, despite the results obtained from "in vitro" and "in vivo" experiments

as well the advanced clinical trials done with Ataluren, some caveats exist. In fact Ataluren has a lower activity against UAA and UAG than UGA nonsense mutations and also there is no general consensus about its mechanism of action.

Hypothesis and objectives. We think that is very important to develop drugs capable of promoting better PTCs read-through found in CF patients. Our project is aimed to design and synthesize new small molecules possessing wider activity towards PTCs than Ataluren. To this end Ataluren derivatives with the geometrical requirements to match the hydrogen bonding of the PTCs present in the mRNA will be synthesized.

Methods. To evaluate these small molecules we will use human cultured cells engineerized with plasmids harboring PTCs in the H2BGFP, FLuc and RLuc reporter genes (Auld DS et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Mar 3;106(9):3585-90). Ability of the new molecules to promote PTCs read-through will be assessed by detecting fluorescence of the H2BGFP reporter gene by microscopy and by luminometer, and at molecular level by immunoblotting and Real time RT-PCR. Validation will consist in assessing CFTR status showed by IB3-1 epithelial cells after treatment with the newly synthesized small molecules.

Expected results. We expect to obtain newly synthesized compounds displaying, in preclinical settings, better bioavailability and better activity than Ataluren to restore expression of the full-length proteins.

Spin-off for research and clinica purposes. The project deals with innovative research and its results could open up new avenues for the understanding of the mechanism of action of these small molecules as well for the development of new drugs for PTCs caused pathology.

Sintesi di derivati del PTC124 con capacità di 'readthrough' di codoni di stop prematuri presenti nel gene CFTR e aumentata biodisponibilità

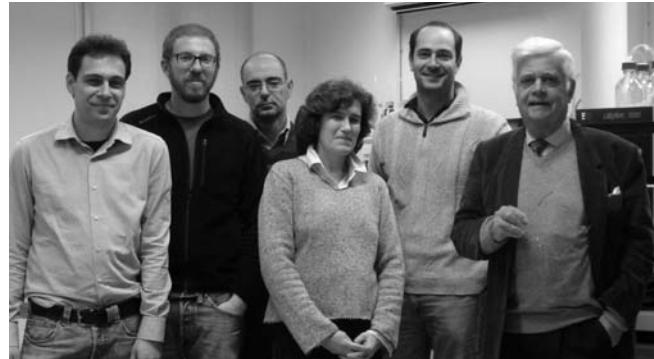
Ragioni dello studio. Particolari alterazioni geniche, che avvengono sulla molecola di DNA, chiamate mutazioni 'nonsense' sono la causa dell'interruzione della traduzione del messaggio genetico. Queste mutazioni generano segnali (codoni di stop: UGA, UAG, UAA) in punti non corretti del messaggio che causano la sintesi di una proteina tronca e con conseguente perdita della funzione. Mutazioni nonsense nel gene CFTR sono un difetto genetico frequente in pazienti affetti da Fibrosi Cistica (10%). Sono in fase di studio alcuni farmaci in grado di sopprimere la mutazione nonsense, impedire il blocco della traduzione e riavviare il meccanismo di sintesi della proteina. Uno di questi il PTC124 (Welch et al. Nature. 2007 May 3;447:87-91) è in fase di avanzata sperimentazione clinica. Alcuni recenti lavori scientifici però hanno mostrato che esistono delle controversie sulla funzione del PTC124 (Ataluren) infatti, nonostante i risultati ottenuti con esperimenti sia "in vitro" che "in vivo", così come i 'trials' clinici avanzati effettuati con questa molecola, non esiste ancora un consenso generale sul comportamento dell'Ataluren. Alcuni aspetti del meccanismo di funzionamento dell'Ataluren non sono ancora completamente conosciuti e altri, in base alle conoscenze acquisite, appaiono migliorabili. Inoltre tale molecola sembrerebbe essere più specifica per il codone prematuro di stop UGA e molto meno per gli altri due (UAG, o UAA). Pertanto è necessario approfondire ulteriormente le conoscenze sul funzionamento dell'Ataluren in modo da sintetizzare nuove molecole affini che siano in grado di permettere la lettura degli altri codoni di stop.

Obiettivi e metodi. Il progetto di ricerca sarà focalizzato sulla sintesi e progettazione di nuove molecole derivate dall'Ataluren con migliori performance e selettività complementare nei confronti di altri codoni di stop prematuri. Queste nuove molecole saranno saggiate su cellule in cui sono state introdotte artificialmente mutazioni nonsense che causano la formazione di codoni di stop prematuri (UGA, UAG, UAA). L'effetto di queste molecole sarà confrontato con quello prodotto dall'Ataluren. Le molecole più promettenti, individuate dagli esperimenti suindicati, saranno utilizzate per valutare la loro capacità di ripristinare livelli di proteina CFTR completa in cellule epiteliali derivate da malati FC che hanno mutazioni nonsense nel gene CFTR.

63. Subverted signalling by protein kinase CK2 in ΔF508 CFTR expressing cells. Functional aspects and prospects in therapy

Pinna LA, Venerando A, Pagano MA, Cozza G, Arrigoni G, Sarno S

Department of Biological Chemistry – University of Padova (FFC Project #3/2011, new)



Lorenzo Pinna, primo da destra, con i suoi collaboratori

Background. In the course of previous investigation supported by FFC we disclosed functional links between CFTR (whose genetic alterations underlie Cystic Fibrosis) and the highly pleiotropic protein kinase CK2, by showing that: i) the NBD1 domain of CFTR is readily phosphorylated by CK2 in vitro at Ser-422, which is located in its "regulatory insert"; ii) peptides reproducing the CFTR 500-518 segment with the F508 deletion which is the commonest cause of CF alter the activity and targeting of CK2. Consistent with the latter observation phosphorylation of CK2 targets in lysates of BHK cells expressing deltaF508 CFTR is subverted with respect to lysates from cells expressing wild type CFTR.

Hypothesis and objectives. These data led us to hypothesize that CK2 could both mediate some of the consequences of the basic defect causative of CF and play a role in the process leading to premature degradation of deltaF508 CFTR. Manipulation of CK2 could therefore provide a new tool for treating CF.

Methods. Recombinant CFTR, either full size or its individual domains, expressed together with CK2 and/or incubated in vitro with CK2 will be analyzed by mass spectrometry in order to identify all phospho-sites generated by CK2. Phospho-specific antibodies against these individual sites will be raised in order to validate their phosphorylation in living cells. Advantage will be taken of cells expressing CFTR either wild type or deltaF508 and bearing mutations at residues affected by CK2, to compare the maturation and degradation patterns of CFTR under conditions where targeting by CK2 is altered.

Expected results. We expect to be able to show that additional CFTR residues, besides Ser-422, are phosphorylated by CK2, that such events take place in living cells and have functional consequences on the maturation, stability and degradation of wild type and/or deltaF CFTR.. We are also confident to be able to compile a repertoire of CK2 targets, including several chaperones, whose phosphorylation is altered in deltaF CFTR expressing cells.

Spin-off for research and clinica purposes. Once confirmed a cause-effect link between CK2 activity and CFTR functionality, several reagents/strategies already available to manipulate CK2, including CK2 inhibitors in clinical trials for different purposes, will be examined as potential tools for treating CF.

Alterato signalling da parte di protein chinasi

CK2 in cellule che esprimono CFTR con la delezione di F508. Aspetti funzionali e prospettive terapeutiche

Premesse e ragioni dello studio. Nel corso di precedenti studi finanziati da FFC abbiamo evidenziato rapporti funzionali tra la proteina "regolatrice transmembrana della Fibrosi Cistica" (CFTR) ed un importante enzima regolatore denominato CK2, dimostrando che: i) il dominio NBD1 di CFTR viene modificato mediante fosforilazione da parte di CK2 in un punto (S422) che si trova nel cosiddetto "inserto regolatore"; ii) frammenti di CFTR che riproducono il segmento 500-518 con la mancanza dell'aminoacido F508 (che è la causa più frequente di fibrosi cistica) modifica l'attività e la specificità di CK2. Di conseguenza abbiamo anche osservato che nei lisati di cellule che esprimono CFTR con questa delezione (delf) la fosforilazione di alcune proteine è alterata rispetto a quella di cellule con CFTR normale.

Ipotesi e obiettivi. Questi dati ci hanno indotto ad ipotizzare che CK2 possa mediare alcune delle conseguenze del difetto che causa FC e avere un ruolo nel processo che porta CFTR delf a prematura degradazione. Pertanto intervenire su CK2 potrebbe essere utile nel trattamento della FC.

Metodi. CFTR intero o suoi frammenti funzionali espressi insieme a CK2 verranno analizzati mediante spettrometria di massa per identificare tutti i punti in cui CK2 inserisce fosfato. Anticorpi specifici contro questi siti fosforilati verranno prodotti ed usati per confermare la loro esistenza in vivo. Si useranno cellule che esprimono CFTR come tale o con mutazioni nei siti fosforilati da CK2 per confrontare i pattern di maturazione e di degradazione di CFTR in condizioni in cui l'attività di CK2 viene alterata.

Risultati attesi. Ci aspettiamo di riuscire a dimostrare che oltre ad S422 altri punti di CFTR sono modificati da CK2, che tali eventi hanno luogo anche in vivo e che influenzano la maturazione, la stabilità e la degradazione di CFTR. Confidiamo anche di compilare un repertorio di bersagli di CK2 la cui fosforilazione è modificata da CFTR con la delezione di F508.

Possibili ricadute. Se riusciamo a confermare un nesso di causa-effetto tra l'attività di CK2 e la funzionalità di CFTR, numerosi reagenti e strategie già disponibili per manipolare CK2, compresi inibitori in fase clinica per scopi differenti, diverranno potenzialmente utili per contribuire a correggere il difetto di base.

ride canne activated by the cAMP-dependent Protein Kinase A (PKA). Growing evidence indicates that even if a sizeable fraction of F508delCFTR has been rescued to the apical membrane, it still exhibits regulatory defects, suggesting that a defect in its ability to respond to cAMP/PKA regulation. The efficacy of this CFTR regulation may be dependent on the degree of PKA stimulation and/or spatial relationship with the components of this signal transduction pathway. However, compartmentalization of PKA and the contribution of PKA anchored to the sub-plasma membrane compartment in rescuing functional control of the mutant CFTR are still unknown.

Objectives and methods. The main objectives of this project are: to investigate how the cAMP/PKA signaling pathway is organized and regulated within normal and CF epithelial airway cells by monitoring both the role of the cytoskeleton organization using depolymerizing agents and the implication of phosphodiesterases (PDEs) in shaping intracellular cAMP gradients using selective and non-selective inhibitors, in secondary and primary airway cells. The cAMP/PKA spatio-temporal dynamics in regulating CFTR activity, together with the role of the actin cytoskeleton and/or PDEs will be first determined in human polarized normal (16HBE14o- (HBE)), and CF (CFBE41o- (CFBE)) airway cell lines. Then we will validate the findings in primary human cell cultures from both normal subjects and F508delCFTR patients. FRET reporters of cAMP levels and for PKA activity will be used together with antibodies against activated PKA to determine the dynamics of the cAMP/PKA response. CFTR activity will be determined spectrofluorimetrically and its trafficking by biotinylation. The role of the actin cytoskeleton in these processes will be determined by using depolymerizing agents and the implication of phosphodiesterases (PDEs) in shaping intracellular cAMP gradients using selective and non-selective inhibitors.

Expected results and spin-off for research and clinical purposes. The knowledge acquired in this project will permit us to understand the basic mechanisms underlying the defective cAMP/PKA stimulation of F508delCFTR even when its apical expression has been increased by trafficking and/or membrane stability-based therapy and should help in designing novel therapeutics for the treatment of cystic fibrosis.

64. Role of spatial cAMP/PKA compartmentalization and activity in regulating CFTR function

Reshkin S

*Department of General and Environmental Physiology,
University of Bari
(FFC Project #4/2011, new)*



Stephan Reshkin, in piedi a sinistra, con il suo gruppo di ricerca

Background. Cystic Fibrosis (CF) is a pathology caused by mutations of a membrane protein, CFTR, that is a chlo-

Ruolo della compartmentizzazione e dell'attività del sistema AMPc/PKA nella regolazione dell'espressione funzionale di CFTR

Premesse. La fibrosi cistica (FC) è una patologia causata da mutazioni a carico di una proteina di membrana, CFTR, che è un canale al cloro attivato da una protein chinasi AMPc dipendente (PKA). Tali mutazioni inducono la perdita o disfunzione della proteina con conseguente alterazione nella secrezione di cloro. In particolare, una delle mutazioni più frequenti, indicata come F508del, determina un mancato inserimento della proteina sulla membrana apicale. L'evidenza che questo CFTR mutato conservi almeno parzialmente la propria funzione, ha suggerito nuove strategie terapeutiche per il ripristino della piena funzionalità della proteina, alcune delle quali mirate al suo reinserimento sulla membrana mediante molecole trasportatrici dette correttori. In molti casi, tuttavia, nonostante il reinserimento sulla membrana, rimane una certa refrattarietà del canale a rispondere agli stimoli di attivazione e questo è probabilmente dovuto ad una scarsa disponibilità del sistema AMPc/PKA nelle vicinanze della proteina CFTR. In precedenti studi abbiamo evidenziato come in cellule bronchiali provenienti da soggetti affetti da FC, l'AMPc è maggiormente concentrato a livello citoplasmatico mentre in cellule provenienti da soggetti sani l'AMPc è più concentrato a livello della membrana ove è disponibile per attivare CFTR. Che la diversa organizzazione citoscheletrica potesse essere responsabile della diversa compartmentizzazione dell'AMPc nei due tipi cellulari è risultato evidente dal fatto che agenti farmacologici che disorganizzano il citoscheletro rendono le cellule normali simili alle cellule FC per quanto riguarda la compartmentizzazione dell'AMPc.

Ipotesi e obiettivi. Pertanto in questo studio analizzeremo se

l'organizzazione citoscheletrica, possa rappresentare una barriera fisica alla diffusione dell'AMPc e del suo effettore PKA promuovendo la formazione di micro-compartmenti in prossimità del CFTR.

Metodi e risultati attesi. Lo studio verrà condotto non solo in cellule bronchiolari stabilizzate ma anche in colture primarie derivate da pazienti FC omozigoti per la mutazione F508del. In particolare gli esperimenti condotti in colture primarie forniranno

informazioni importanti sull'effettiva organizzazione citoscheletrica e compartimentazione dell'AMPc/PKA, in quanto tale modello cellulare rispecchia la fisiopatologia delle cellule bronchiolari dei pazienti.

Possibili ricadute. La comprensione dei meccanismi coinvolti nella regolazione dell'attività del CFTR mediata da PKA rappresenta un passo chiave per lo sviluppo di nuove terapie farmacologiche.

POSTER SESSION 4: GENETIC AND CLINICAL RESEARCH

Chairman: Carlo Castellani

65. European Cystic Fibrosis Modifier Gene Study

Corvol H¹, Cabrini G², Elborn S³, Mehta A⁴, Mc Kone E⁵, Macek M⁶, Cuppens H⁷

¹Pediatric CF Center of Trousseau Hospital - Inserm U938/UPMC; ²Lab. Patologia Molecolare, AOUI Verona; ³School of Medicine, Dentistry and Biomedical Sciences, Centre for Infection and Immunity, Queen's University Belfast; ⁴Division of Medical Science, University of Dundee; ⁵Dep. Of Respiratory Medicine, National Referral Centre for CF, St. Vincent's University Hospital, Ireland; ⁶Dep. of Biology and Medical Genetic, Second Faculty of Medicine, Charles University Prague, University Hospital Motol; ⁷Centre for Human Genetics, Katholieke Universiteit Leuven, Belgium, (European CF Modifier Genes Consortium)

(FFC Project #5/2011, new)



Harriet Corvol, ottava da sinistra, con il gruppo di ricerca di Parigi

Background. Although cystic fibrosis (CF) is recognized as a single gene disorder, considerable clinical diversity exists among patients with the same CFTR mutations, especially regarding the lung disease severity. In France, a national study on CF modifier genes has been underway since 2006 and more than 3000 French CF patients already participated. Similar independent initiatives have been conducted in several European countries (Italy, United Kingdom, Ireland, Belgium and Czech Republic). However, the population size of each separate study limited significantly the impact of the results obtained so far.

Hypothesis and objectives. Reassembling these independent studies into a large European Consortium appears essential. Our aim is to amalgamate French and EU-wide clinical and DNA data to go beyond current approaches pioneered in North America using a new approach that has not previously been applied in large CF populations, namely, haplotype and single gene approaches studies in combination.

Methods. Together, French, British, Irish, Italian, Belgian and Czech CF experts are forming a European consortium to

sequence the genomes of participants within their study populations (each numbering over a hundred participants). The final results will be pooled. The scientific program consists of several stages: 1) recruitment of the CF patients from all the CF participating centers in Europe (approximately 9000 to 10000 patients); 2) establishment of a collection of well defined clinical data on a longitudinal basis; 3) storage of DNA at the Genethon DNA and cell bank (Evry); 4) phenotype analyses allowing extreme disease phenotype determination; 5) genetic analyses at the Centre National de Génotypage (Evry); 6) further genotype/phenotype association analyses, 7) replication in independent CF cohorts.

Expected results. The expected results will be the identification of genetic variants involved in CF disease severity. The information derived from the study might also find hitherto unknown proteins and pathways involved in the disease, and as such identify new targets for the development of new therapies.

Spin-off for research & clinical purposes. The study should contribute to the identification of genetic factors other than the CFTR mutations that could impact on the severity of CF. Identification of these modifier genes is a great challenge that should offer not only a way to distinguish those patients at risk of developing a more severe disease and to adapt a care accordingly, but also to better understand the physiopathological mechanisms of CF and enable the development of new drugs.

Studio Europeo sui geni modificatori in fibrosi cistica

Introduzione. Anche se la fibrosi cistica è riconosciuta come una malattia da singolo gene, si osserva una notevole diversità clinica tra pazienti pur con la stessa mutazione del gene CFTR, in particolare per quanto riguarda la gravità ed il decorso della patologia polmonare. In Francia è stato intrapreso sin dal 2006 uno studio nazionale a questo riguardo, al quale hanno già partecipato più di 3000 pazienti affetti da fibrosi cistica. Simili iniziative indipendenti sono state condotte in altri Paesi europei, (Italia, Gran Bretagna, Irlanda, Belgio e Repubblica Ceca). Purtroppo, le dimensioni delle popolazioni in ciascun studio separato hanno limitato significativamente l'impatto dei risultati ottenuti sinora.

Ipotesi ed obiettivi. Rilanciare questi studi separati in unificandoli in un largo Consorzio Europeo appare fondamentale. Il nostro scopo è di raccogliere ed omogeneizzare i dati clinici ed i campioni di DNA di un largo campione nonché di utilizzare nuovi approcci di studio genetici.

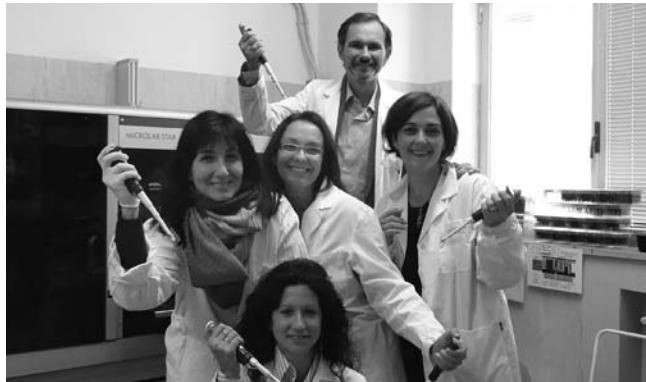
Metodi. Assieme, gli esperti delle nazioni partecipanti formano un Consorzio Europeo allo scopo di sequenziare il genoma dei pazienti fibroscistici partecipanti. I risultati finali verranno omogeneizzati in un unico pool. Il programma consiste di diversi stadi successivi: 1) reclutamento dei pazienti fibroscistici da tutti i Centri FC partecipanti in Europa (circa 9000 - 10000 pazienti); 2) creazione e consolidamento di un database con dati clinici ben stabiliti su base longitudinale; 3) banking del DNA presso la facility Genethon (Evry); 4) analisi dei fenotipi con determinazione degli estremi; 5) genotipizzazione al Centro Nazionale di Genotipizzazione di Genethon (Evry); 6) ulteriori analisi di associazione genotipo/fenotipo; 7) studi di replicazione in coorti indipendenti di pazienti fibroscistici.

Risultati attesi. Riguardano l'identificazione di varianti genetiche implicate nella gravità della malattia. L'informazione derivata dallo studio potrà identificare il coinvolgimento di vie metaboliche inattese, quindi possibili nuovi bersagli di cura per la fibrosi cistica.

66. CFTR mRNA analysis as a key step to understand the role of CFTR gene mutations in cystic fibrosis disease expression

Duga S

Dip. Biologia e Genetica per le Scienze Mediche, Univ. Milano (FFC Project #6/2011, new)



Stefano Duga e il suo gruppo di ricerca

Background. Despite an extensive genetic screening of the coding regions of the CFTR gene, 1-10% (depending on the population) of cystic fibrosis (CF) patients lack a definite molecular diagnosis. This is even truer for atypical CF and other related diseases. A significant portion of these patients might have mutations in noncoding regions of the CFTR gene affecting pre-mRNA splicing and/or in other genes.

Hypothesis and objectives. The advent of next-generation sequencing (NGS) technologies, combined with advancements in targeted genomic region enrichment and in multiplexing techniques, are making increasingly affordable a sequencing-based approach to the identification of genetic variants in extended genomic regions.

This approach will be exploited to perform a full-gene sequencing of CFTR in CF (and CF-like) patients with no definite genetic diagnosis. The SCNN1A, SCNN1B, and SCNN1G genes, coding for the subunits of the ENaC receptor, will also be fully sequenced. ENaC mutations cause a CF-like syndrome and variations in these genes were recently hypothesized to contribute to the pathophysiology of CF-like disease.

Methods. Patients with the following characteristics will be selected for targeted NGS of CFTR, SCNN1A, SCNN1B, and SCNN1G genes: 1. no mutation (or just one mutated allele) identified after conventional screening; 2. no alteration in copy-number analysis; 3. no CFTR mRNA abnormalities, or with mRNA quantitative reduction but no aberrant RT-PCR products; 4. both parents available. Target-enrichment of DNA samples and NGS will be performed through an external service provider. Sequence data will be aligned to the reference human genomic regions. Data from DbSNP, HapMap, and the 1000 genome project will be used to discriminate between known and novel variants.

Expected results. We expect to find mutations in the non-coding portions of CFTR, neglected by conventional mutational screenings. The distribution of the mutations in cases and controls, their position within the gene, the degree of functional relevance as assessed by *in-silico* analyses as well

as the segregation within the families will be used to prioritize genetic variations for further functional validation.

Spin-off for research & clinical purposes. The project is expected to give clues on the technical and economical feasibility of such a large scale sequencing project and also on the advantage of using NGS for the complete screening of the coding region vs. the full gene sequencing of CFTR.

Studio del ruolo di mutazioni nel gene CFTR nel modulare l'espressione fenotipica della fibrosi cistica mediante analisi dell'mRNA

Ragioni dello studio. La fibrosi cistica (FC) è causata da mutazioni nel gene CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) codificante per un trasportatore di membrana del cloro. La malattia è trasmessa con modalità autosomica recessiva, quindi, per sviluppare la FC, è necessario che entrambe le copie del gene CFTR siano mutate. Malgrado siano disponibili test sofisticati per identificare le mutazioni responsabili di FC mediante analisi del DNA, in – l'1-10% dei pazienti (in funzione delle diverse popolazioni) non è possibile ottenere una diagnosi molecolare completa. Alcune delle mutazioni che causano FC, infatti, sono presenti in regioni del gene che non sono normalmente analizzate, in quanto sarebbe troppo lungo e costoso con le tecnologie attualmente impiegate.

Ipotesi e obiettivi. La recente introduzione di nuove tecnologie di sequenziamento del DNA, chiamate "ultra massive", consente di analizzare la sequenza di tutto il gene CFTR (non solo degli esoni) con costi e tempi molto inferiori. Ciò rende possibile identificare nuove mutazioni, che spesso interferiscono con il normale processo di splicing, ovvero con quel processo maturativo che porta alla rimozione degli introni dalle molecole di pre-mRNA. Questo progetto di ricerca si prefigge di analizzare l'intero gene CFTR (che si estende per 189.000 basi di DNA) mediante sequenziamento ultra massivo in un gruppo selezionato di pazienti nei quali non è stato possibile identificare le mutazioni responsabili della malattia. Contemporaneamente verranno ricercate mutazioni in altri 3 geni (SCNN1A, SCNN1B, e SCNN1G, codificanti le subunità del canale epiteliale per il sodio chiamato ENaC), recentemente implicati in forme atipiche di FC.

Metodi. Le regioni del genoma corrispondenti al gene CFTR e ai geni SCNN1A, SCNN1B, e SCNN1G saranno "catturate" e analizzate mediante sequenziamento ultra-massivo. La possibilità di "etichettare" il DNA di ogni individuo mediante l'aggiunta di sequenze che funzionano da veri e propri codici a barre consentirà di analizzare contemporaneamente il DNA di molti pazienti.

Risultati attesi. Ci attendiamo di identificare nuove mutazioni nelle regioni non codificantili del gene CFTR (e potenzialmente anche nei geni codificantili per il canale ENaC) che potrebbero essere responsabili di FC e di forme atipiche di FC.

Possibili ricadute per ricerca e clinica. La conoscenza dei difetti genetici nei pazienti affetti da FC è di fondamentale importanza non solo per la prevenzione di questa malattia ma anche per sviluppare nuovi approcci terapeutici basati sulla correzione dei difetti a livello dell'mRNA. Inoltre questo progetto servirà per valutare la fattibilità e la convenienza economica di affrontare la diagnosi molecolare di FC mediante analisi con sequenziamento ultramassivo.

67. New strategies for clinical application of noninvasive prenatal diagnosis of cystic fibrosis based on the analysis of fetal mutated alleles in maternal plasma

Ferrari M¹, Cretich M²

¹Lab. Biologia Clinica Molecolare e Citogenetica, Università Vita-Salute HSR, Milano; ²Ist. di Chimica del Riconoscimento Molecolare, CNR, Milano
(FFC Project #7/2011, new)



Maurizio Ferrari e il suo gruppo di ricerca

Background. The possibility to retrieve fetal DNA from maternal plasma has made available a new source of fetal genetic material for noninvasive analysis of numerous fetal pathological conditions. Nevertheless, due to the scarcity of fetal DNA in maternal plasma and the difficulty in detecting fetal mutated alleles noninvasive prenatal diagnosis (NIPD) has not yet attained a widespread clinical application. Different approaches have been developed so far to enrich fetal minority sequences based on either the use of costly and sophisticated techniques or cumbersome protocols.

Hypothesis and objectives. Our goal is to develop, optimize and validate simple and accurate tests for NIPD which combine high sensitivity, speed and ease of use to be performed without the need of sophisticated and costly equipments.

Methods. The project is focus on the set up of methodologies for the identification of fetal paternally inherited mutations/polymorphisms in maternal plasma DNA during the first trimester of pregnancy. Two main research lines are been investigated: the development of simple mutant enrichment amplification protocols based on CO-amplification at Lower Denaturation temperature-PCR (COLD-PCR) combined with Sanger sequencing and highly sensitive microarray substrates which could allow the detection of fetal minority sequences without any enrichment strategy. We are developing assays for the 7 more frequent CF mutations (F508del, N1303K, G542X, 2183AA>G, 1717-1G>A, W1282X, R1162X) and for 3 common polymorphisms (rs213950, rs214164 and rs1800136) in the Italian population.

Expected results. The identification of minority mutated alleles is one of the major challenges in future molecular medicine due to its important implications in early diagnosis and clinical management. We plan to optimize assays which could be easily transferable to clinical setting for early NIPD.

Spin-off for research & clinical purposes. The analysis of fetal DNA in maternal plasma is a key point to develop highly versatile noninvasive diagnostic approaches which do not constitute a risk for the mother and the fetus. The project is aimed at filling the present gap between research and routine noninvasive analysis of fetal mutations in the clinical laboratory providing accurate and reproducible results at a cost compatible with large scale application. The implementation of NIPD is desirable to improve the quality and management of antenatal care and to facilitate parental reproductive choice.

Nuove strategie per applicazioni cliniche alla diagnosi prenatale non invasiva di fibrosi cistica: analisi di alleli fetali mutati nel plasma materno

Ragioni dello studio. Attualmente la diagnostica prenatale richiede il prelievo di cellule fetalni mediante metodiche invasive, (amniocentesi e villocentesi). Queste tecniche comportano un rischio (0.5-1%) di provocare un aborto inoltre, per motivi

ostetrici, devono essere effettuate in epoche gestazionali precise. La scoperta del DNA fetale nel plasma materno identificabile a partire dalla quinta settimana di gestazione ha dato nuovo impulso allo sviluppo di procedure alternative di diagnosi prenatale che non costituiscano un rischio per la madre e per il feto. Inoltre, l'analisi su plasma materno può essere effettuata su minime quantità di sangue, sottolineando ulteriormente la non invasività di tale approccio. Il DNA fetale nel plasma materno, oltre ad essere in concentrazione molto scarsa, si trova in presenza di un grande eccesso (>95%) di DNA di origine materna. Questo complica notevolmente l'identificazione delle mutazioni fetalni, dato che la maggior parte delle malattie genetiche è causata da difetti a carico di una singola base.

Ipotesi e obiettivi. Ci proponiamo di sviluppare due strategie dotate di elevata sensibilità e accuratezza, facilmente accessibili e a basso costo per la diagnosi prenatale di fibrosi cistica nel primo trimestre di gravidanza.

Metodi. Applicheremo la reazione di COLD-PCR (CO-amplification at Lower Denaturation temperature-PCR) un metodo sviluppato per arricchire sequenze minoritarie.

Il DNA fetale arricchito sarà analizzato mediante metodiche di facile accesso (sequenziamento). Questo protocollo è stato recentemente applicato dal nostro gruppo sul DNA fetale nel plasma materno per l'identificazione di due mutazioni che causano beta-talassemia. Svilupperemo inoltre dei saggi con un sistema microarray che dai nostri studi preliminari dovrebbe consentire l'identificazione diretta di sequenze fetalni mutate evitando qualsiasi procedura di arricchimento.

Risultati attesi. Il progetto rappresenta un intervento originale che risponde a bisogni mai soddisfatti: non esistono strategie consolidate dotate di accuratezza elevata e di facile applicazione per l'analisi diretta non invasiva del genotipo fetale in coppie a rischio per fibrosi cistica.

Possibili ricadute per ricerca e clinica. I sistemi innovativi da noi proposti potrebbero rappresentare un modello di riferimento e costituire la base per lo sviluppo di ulteriori saggi facilmente trasferibili nelle cliniche ginecologiche e nei laboratori specializzati del sistema sanitario nazionale.

68. A field study in an area of extensive carrier screening for cystic fibrosis

Castellani C¹, Picci L²

¹Centro Regionale FC, Az. Ospedaliera Universitaria, Verona,

²Clinica Pediatrica, Azienda Ospedaliera, Padova
(FFC Project #8/2011, new)



Carlo Castellani, a sinistra, e il collaboratore Elia Casati

Background. In the latest years the offer of Cystic Fibrosis (CF) carrier tests to individuals and couples at no increased risk of having affected children (carrier screening) has been constantly growing. CF carrier screening is widely practiced in a sub-area of north-eastern Italy (Eastern Veneto), although not in a structured and formal setting. Recent European guidelines indicate optimal practices for CF carrier screening.

Hypothesis and objectives. The project is designed to continue the monitoring of carrier screening with respect to CF incidence in Northeastern Italy; the goal is to verify if the previously detected correlation between the diffusion of the practice of carrier screening and the CF birth rate contraction is confirmed. The project also foresees the analysis of the reproductive choices of CF carriers couples and this will allow to define better if and how the choices of these couples affect the numerosity of CF births. Finally, and importantly, the project is expected to have a positive effect on the carrier screening practice in the area under study, by homogenizing carrier screening custom.

Methods. These objectives should be achieved through the following major actions:

- creation of a dedicated website, and an interactive computer programme
- web-based information for health professionals offering the carrier test
- development of a network of laboratories and possibly of health care providers adopting European good practice standards
- centralization of genetic counselling for carrier couples
- monitoring of laboratories results
- follow-up of carrier couples' attitudes and behaviours

Expected results. The main expected results are the following:

- further information on the correlation between CF incidence and CF carrier screening
- positive effect on the carrier screening practice in the area under study, by homogenizing carrier screening custom
- facilitation of a shift of the carrier test offer from the prenatal to the preconceptional period
- increased awareness of CF and genetics in the population.
- the use of interactive computer assisted delivery of information for pre-test information
- a reassessment of spectrum and prevalence of the disease mutations in the screened population

Spin-off for clinical purposes. Relevant information for the implementation of CF carrier screening

Analisi dello screening del portatore di fibrosi cistica su un ampio territorio

Ragioni dello studio. Negli ultimi anni l'offerta dei test del portatore di fibrosi cistica (FC) a singoli e coppie senza alcun rischio aumentato di avere figli affetti (screening del portatore) è cresciuta in modo costante. Lo screening del portatore FC è largamente praticato in una sub-area del nord-est d'Italia (Veneto Orientale), anche se non ancora in un setting strutturato e formale. Recenti linee guida Europee indicano le pratiche ottimali per lo screening del portatore FC.

Ipotesi e obiettivi. Il progetto è stato concepito per continuare il monitoraggio dello screening del portatore in relazione all'incidenza della FC nell'Italia Nord-orientale; l'obiettivo è quello di verificare se viene confermata la correlazione tra la diffusione della pratica dello screening del portatore FC e la diminuzione dell'incidenza di neonati malati di FC. Il progetto prevede anche l'analisi delle scelte riproduttive delle coppie portatrici della FC e questo permetterà di definire meglio se e come le scelte di queste coppie influenzano la numerosità delle nascite di neonati malati di FC.

Infine, il progetto dovrebbe avere un effetto positivo sulla pratica dello screening del portatore nell'area oggetto di studio, rendendo più omogenea la pratica dello screening del portatore.

Metodi. Questi obiettivi dovrebbero essere raggiunti attraverso le seguenti principali azioni: la creazione di un sito web dedicato e di un programma informatico interattivo; la fornitura di informazioni web-based per i professionisti sanitari che offrono il test del portatore; lo sviluppo di un network di laboratori e se possibile di professionisti sanitari che adottino standard europei di buone pratiche; la centralizzazione della consulenza genetica per le coppie di portatori in centri specialistici; il monitoraggio dei risultati di laboratorio; il follow-up delle attitudini e dei comportamenti delle coppie portatrici.

Risultati attesi. I principali risultati attesi sono i seguenti: ulteriori informazioni sulla correlazione tra incidenza FC e screening

FC; un effetto positivo sulla pratica dello screening del portatore nell'area oggetto di studio grazie all'omogenizzazione della pratica dello screening del portatore; facilitazione del passaggio dell'offerta del test del portatore dal periodo prenatale (durante la gravidanza) a quello preconcezionale (prima della gravidanza); maggiore consapevolezza della fibrosi cistica nella popolazione; uno strumento informatico interattivo per fornire informazioni pre-test; una rivalutazione dello spettro e della prevalenza delle mutazioni delle malattia nella popolazione sottoposta allo screening.

Possibili ricadute. Informazioni rilevanti per l'attuazione di un sistema di screening del portatore FC.

69. Cystic fibrosis: to screen or not to screen? Involving citizens' jury in decision on carrier screening

Mosconi P¹, Colombo C¹, Villani W¹, Satolli R², Castellani C³

¹Laboratory for medical research and consumer involvement,

Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, Milano;

²Roberto Satolli, Zadig Agenzia Editoria Scientifica, Milano;

³Carlo Castellani, Cystic Fibrosis Centre, Verona

(FFC Project #9/2011, new)



Paola Mosconi

Background. In the latest years the molecular biology techniques improvements have made carrier detection available for several genetic conditions, including cystic fibrosis (CF). A recent observational study provides evidence on the impact of two different policies: in the eastern part of north-eastern of Italy CF carrier screening has been offered and performed extensively; in the western part the carrier screening was not actively offered.

Hypothesis and objectives. The choice of an active offering of the carrier screening at a population level should not be done by the local health authorities only without any consultation of the citizen's preferences. There is the necessity to consider all the possible consequences at the social level.

A possible way could be a method of citizens' jury, a method of deliberative democracy to directly involve the citizens in health decisions. It is based on the idea that many issues are best decided by a group of lay people who have no vested interests and who apply their common sense and experience, having been presented with the best possible evidence.

Methods. The project is managed by an Executive Committee (EC), and superintended by a multidisciplinary Scientific Committee (SC), and a lay people jury is involved after an ad hoc training. The members of the Jury are involved in a meeting assisted by a non-medical expert and a facilitator. EC and SC are in charge to produce an ad hoc informative material, on the basis of different aspects considered. Experts and witnesses to be questioned during the a meeting of the Jury are also identified. An ad hoc section of <http://www.partecipasalute.it> is dedicated to this project.

Expected results. The project, the documents discussed, the final report will be available for public, clinicians and researchers through the publication in different ways, as articles submitted at international and national journal, websites, and media.

Spin-off for research & clinical purposes. The relevance of this project is related to the impact of the issue discussed and to the novelty of the method adopted. In particular:

- specific for FC patients, physicians and researchers in the field of FC, and policy maker who will have access to a shared final report on FC carrier screening;
- generic, i.e. the development of a feasible and reproducible method to involve citizen in health decisions that can be easily exported to other clinical situations.

Lo screening del portatore sano per la fibrosi cistica: la voce dei cittadini. Una esperienza pilota

Ragioni dello studio. Lo screening del portatore prevede un esame genetico per individuare tra gli adulti in età riproduttiva i portatori sani, cioè i cosiddetti eterozigoti che hanno una sola copia del gene mutato e quindi non sono malati, ma possono trasmettere la malattia a un figlio se anche l'altro genitore è portatore di una mutazione simile. Nella parte occidentale del Veneto ed in Trentino Alto-Adige questo test è stato offerto a coloro che avevano già un caso di fibrosi cistica in famiglia. L'Università di Padova ha invece avviato una campagna di offerta attiva del test. Nella parte orientale della regione si sono eseguite decine di migliaia di test, individuando migliaia di portatori e decine di coppie in cui entrambi sono eterozigoti e il numero di nuovi nati con la fibrosi cistica è sceso quasi ad annullarsi, mentre questa diminuzione è stata più bassa nella parte occidentale del Veneto e in Trentino-

Alto Adige dove il test è offerto solo alle famiglie a rischio.

Ipotesi e obiettivi. Si apre per la fibrosi cistica un importante dibattito sulle scelte individuali e collettive. La scelta di una offerta attiva di screening del portatore a livello di popolazione non dovrebbe infatti essere fatta da autorità sanitarie locali senza una consultazione delle preferenze del cittadino, vi è infatti la necessità di considerare tutte le possibili conseguenze.

Metodi. Si propone il metodo "La giuria dei cittadini" per coinvolgere i cittadini nel processo decisionale attraverso un percorso basato su informazioni e coinvolgimento di esperti e associazioni di pazienti. I cittadini - senza esperienza di fibrosi cistica e senza interessi di parte - arriveranno a scrivere un documento di indirizzo per rispondere proprio alla domanda "Dovrebbe il sistema sanitario offrire a tutte le coppie lo screening del portatore?".

Risultati attesi. Il progetto, i documenti, il rapporto finale saranno disponibili per pubblico, medici, ricercatori e decisi in sanità attraverso la pubblicazione in riviste internazionali e nazionali e siti web.

Possibili ricadute per ricerca e clinica. La rilevanza del progetto è nell'impatto del tema trattato e nella novità del metodo. In particolare:

- specifico per pazienti, medici, ricercatori e policy maker nel campo della fibrosi cistica che avranno accesso a un rapporto condiviso finale;
- generica, lo sviluppo di un metodo fattibile e riproducibile per coinvolgere i cittadini nelle decisioni sanitarie esportabile in altre situazioni cliniche.

Publications and congress communications from the studies funded by Italian CF Research Foundation 2002-2011

Pubblicazioni e comunicazioni congressuali dagli studi finanziati dalla Fondazione FFC dal 2002 al 2011

1. CFTR PATHOPHYSIOLOGY AND THERAPY OF THE BASIC DEFECT

Fisiopatologia CFTR e terapie del difetto di base

■ FFC Project#1/2002 "Mini-chromosomes: a new approach for cystic fibrosis gene therapy"

Fiorentina Ascenzi (Dipart. Biologia cellulare e dello sviluppo – Univ. La Sapienza Roma), Massimo Conese (Ist. per il Trattamento sperimentale della FC - Osp. San Raffaele – Milano), Olga Zegarra (Lab. Gen. Molec. – Ist. Gaslini – Genova)

Publications

- Auriche C. et al. "Functional human CFTR produced by a stable minichromosome" EMBO Reports 2002; vol. 3, no. 9, pp. 862-868

■ FFC Project#2/2002 "Evaluation of efficiency efficacy and safety of CFTR-gene delivery mediated by lentivirus vectors in model systems of cystic fibrosis airway epithelium"

Massimo Conese (Ist. per il Trattamento Sperimentale della FC - Osp. San Raffaele – Milano)

Publications

- Copreni E. et al. "Lentivirus-mediated gene transfer to the respiratory epithelium: a promising approach to gene therapy of cystic fibrosis" Gene Therapy (2004) 11, S67-S75.
- Carrabino S. et al. "Serum albumin enhances polyethylenimine-mediated gene delivery to human respiratory epithelial cells" The Journal of Gene Medicine 2005; 7: 1555-1564

Abstracts

- Copreni E. et al. "Pseudomonas aeruginosa infection of airway epithelium in a human fetal respiratory xenograft model in view of lentiviral gene therapy of CF lung disease" Journal of Cystic Fibrosis 2 (2003) S19-S23 – 26th Congress European Cystic Fibrosis Society, Belfast 4-7 June 2003.
- Copreni E. et al. "Biosafety of a third generation lentiviral vector for gene transfer to the airway epithelium" NACFC, 2005
- Copreni E. et al. "Gene transfer to the airway epithelium mediated by a third generation HIV-1 based vector: efficiency and role of heparin sulphate" American Society of Gene Therapy, 8th Annual Meeting June 1-5 2005.
- Copreni E. et al. "Study of clearance and internalization of pseudomonas Aeruginosa in a human fetal respiratory xenograft model" Pediatric Pulmonology Suppl. 25, 2003. 17th Annual North American Cystic Fibrosis Conference – Anaheim, 16 – 19 October 2003
- Copreni E. et al. "Lentivirus-mediated gene transfer to the respiratory epithelium in vitro and in vivo in the absence of preconditioning of the airways" 2nd European Conference & Practical Course, February 1-14th, 2004 – Bellaterra, Spain
- Copreni E. et al. "Gene transfer to the airway epithelium by HIV-based vectors" ECFS Conference, Tomar, Portugal 30 April – 3 May 2004;
- Copreni E. et al. "Optimisation of gene transfer to the respiratory epithelium in vitro and in vivo by a last generation lentiviral vector" 3rd European Conference & Practical Course 14 – 26 June 2004, Genopole-Evry, France;
- Copreni E. et al. "Gene transfer to the airway epithelium mediated by last generation lentiviral vectors does not require preconditioning of the epithelial tight junctions" Pediatric Pulmonology Suppl. 27 – The 18th Annual North American CF Conference; America's Center, St. Louis, Missouri, Oct. 14-17 2004
- Copreni E. et al. "Trasferimento genico in modelli in vitro e pre-clinici di epitelio respiratorio mediante vettori virali e non virali" I incontro dei ricercatori di base della fibrosi cistica, Roma 1-2 luglio 2004
- Copreni E. et al. "Trasferimento genico mediato da un vettore lentivirale in modelli di epitelio respiratorio in vitro e in vivo: efficienza e ruolo dell'eparsolfato" X Congresso Nazionale di Fibrosi Cistica – Palermo, 27 – 30 ottobre 2004.
- Copreni E. et al. "Valutazione dell'efficienza, efficacia e sicurezza di vettori lentivirali nel trasferimento del gene CFTR in sistemi modello di epitelio respiratorio con fibrosi cistica" I Convention d'Autunno dei Ricercatori Italiani per la fibrosi cistica – 14-15 novembre 2003, Verona

- Copreni E. et al. "Efficiency, efficacy and safety of Lentivirus vectors in CFTR gene transfer in model systems of airway epithelia with cystic fibrosis" II Convention d'Autunno dei Ricercatori Italiani per la fibrosi cistica – 19-20 novembre 2004, Verona

■ FFC Project#1/2003 "CFTR regulation by protein-protein interactions"

Valeria Casavola (Dipart. Fisiologia Gen. ed Amb. - Univ. Bari), Manuela Zaccolo (Ist. Veneto Med. Molecolare, Padova)

Publications

- Abrahamsen H. et al. "TCR – and CD28 Mediated Recruitment of Phosphodiesterase 4 to Lipid Rafts Potentiates T Cell Receptor Signaling" J Immunol. 2004 Oct 15;173(8):4847-58
- Zaccolo M. et al "Use of Chimeric Fluorescent Proteins and Fluorescence Resonance Energy Transfer to Monitor Cellular Responses" Circulation Research 2004;94:866-873
- Mongillo M. et al. "Fluorescence Resonance Energy Transfer-Based Analysis of cAMP Dynamics in Live Neonatal Rat Cardiac Myocytes Reveals Distinct Functions of Compartmentalized Phosphodiesterases" Circulation Research 2004; 95:67-75;
- Guerra L. et al. "Stimulation of Xenopus P2Y1 receptor activates CFTR in A6 cells" Eur J. Physiol. (2004) 449: 66-75;
- Cardone R. A. et al. "Protein kinase A gating of a pseudopodially-located rhoA/ROCK/p38/NHE1 signal module regulates invasion in breast cancer cell lines" Molecular Biology of the Cell Vol. 16, 3117-3127, July 2005;

Abstracts

- Fanelli T. et al. "CFTR regulation of ion transporters by protein – protein interactions" Gordon Conference Le Diablerets 3-8 ottobre 2004
- Guerra L. et al. "Ruolo dei domini PDZ di entrambe le isoforme di NHERF nella regolazione del CFTR" X Congresso Nazionale di Fibrosi Cistica della Società Italiana di Pediatria Palermo, 27-30 ottobre 2004;
- Favia M. et al. "CFTR regulation of ion transporters by protein – protein interactions" The American Society fro Cell Biology, 44th Annual Meeting – Washington 4-8 December 2004
- Riccardi S. M. et al. "Role of NHERF1 in rescuing of F508del-CFTR activity". 2005 – European CF Conference - Evora, Portugal 14-17 April 2005

■ FFC Project#2/2003 "Activators of the CFTR ionic transport: identification and molecular modelling of the binding sites"

Oscar Moran, (Ist. Biofisica – CNR – Genova), Olga Zegarra, (Lab. Gen. Molec. - Ist. Gaslini – Genova), Vincenzo Martorana, (Ist. Biofisica – CNR – Palermo)

Publications

- Galietta L. et al. "Identification of CFTR activators and inhibitors: chance or design?" Current opinion in Pharmacology, vol. 4 issue 5, October 2004, 497-503
- Moran O. et al. "Binding site of activators of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in the nucleotide binding domains" CMLS Cellular and Molecular Life Sciences 62 (2005) 446-460
- Moran O. et al. "A quantitative description of the activation and inhibition of CFTR by potentiatotors: Genistein" FEBS Letters 579 (2005) 3979-3983

Abstracts

- Moran O. et al. "Molecular model of the nucleotide binding domains of the CFTR: cystic fibrosis correlated mutations" Paediatric Pulmonology, The 17th Annual North American CF Conference, Anaheim, California 16-19 October 2003;
- Moran O. et al. "Searching for the CFTR- Openers binding site" 2004 – ECFS Conference New Frontiers in Basic Science of Cystic Fibrosis 30 April – 3 May 2004 Tomar Portugal;
- Moran O. et al. "Identification of the CFTR – openers binding site" S.I.B.P.A. 2004 XVII Congresso Nazionale della Società di Biofisica Pura ed Applicata Pisa 23-25 settembre 2004;
- Zegarra O. et al. "Identification of New Drugs for the Modulation of Chloride Transport in CF. Advance in the HTS Programme" 2004 – ECFS Conference New Frontiers in Basic Science of Cystic Fibrosis 30 April – 3 May 2004 Tomar Portugal;

■ FFC Project#3/2003 "Screening of drugs approved for human use to identify novel pharmacological tools for Cystic Fibrosis"

Luis JVL Galietta (Lab. Gen. Molec. - Ist. Gaslini - Genova), Mauro Mazzei (Dipart. Scienze Farmaceutiche - Univ. Genova), Massimo Conese (Ist. per il Trattamento Speriment. della FC - Osp. San Raffaele - Milano)

Publications

- Pedemonte N. et al. "Anti-hypertensive 1,4 dihydropyridines as correctors of the CFTR channel gating defect caused by cystic fibrosis mutations" Molecular Pharmacology, Vol. 68, No. 6 (2005) pp. 1736-1746
- Pedemonte N. et al. "Small-molecule correctors of defective ΔF508-CFTR cellular processing identified by high-throughput screening" The Journal of Clinical Investigation, Vol. 115, No. 9, Sept. 2005, pp. 2564-2571

Abstracts

- Pedemonte N. et al. "Screening of a chemical library containing approved drugs and natural compounds to identify small molecules for the functional correction of CFTR mutants" 2004 North American Cystic Fibrosis Conference
- Pedemonte N. et al. "Dual activity of aminoarylthiazoles on trafficking and gating defects caused by CF mutations" Pediatric pulmonology, Suppl. 31, 2008. 22nd Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Orlando, Florida, 22-25 October 2008, p. 311

■ FFC Project#11/2003 "Pathogenesis and treatment of Cystic Fibrosis-related liver disease"

Mario Strazzabosco (Dipart. Med. Spec. e dei trapianti, U.O. Gastroenterologia, Osp. Riuniti – BG)

Publications

- Spirli C. et al. "Glibenclamide Stimulates Fluid Secretion in Rodent Cholangiocytes through a CFTR-Independent Mechanism" Gastroenterology 2005; 129: 220-33
- Strazzabosco M. et al. "Pathophysiology of Cholangiopathies" J. Clin Gastroenterology. Vol. 39, suppl. 2, April, 2005;
- Fiorotto R. et al. "Ursodeoxycholic Acid Stimulates Cholangiocyte Fluid Secretion in Mice via CFTR-Dependent ATP Secretion" Gastroenterology (2007); 133: 1603-1613

Abstracts

- Fiorotto R. et al. "Ursodeoxycholic acid stimulates fluid secretion in mice bile ducts trough a CFTR and PKCα/PKCε-dependent mechanism" Hepatology Vol. 40, No. 4, Suppl. 1, 2004

■ FFC Project#13/2003 "Biochemical and physiopathological aspects of plasma membrane of human bronchial epithelial cells expressing DF508 mutation before and after supplementation of methylated folic acid and B12 vitamin"

Lisa Bambara (Medicina Interna B, Policlinico, Univ. di Verona)

Publications

- Scambi C. et al. "Can 5-methyltetrahydrofolate modify the phospholipids fatty acid pattern in cystic fibrosis paediatric patients?" Journal of Cystic Fibrosis 2006 ; 5: 197-199

■ FFC Project#2/2004 "Chemoreceptor mechanism in CFTR expressing cells: molecular bases and role in control of secretion"

Francesco Osculati (Dipart. Scienze Morfologico Biomediche – Università di Verona)

Publications

- Merigo F. et al. "Secretory cells of the airway express molecules of the chemoreceptive cascade" Cell Tissue Res. 2007 327:231-247

■ FFC Project#3/2004 "Natural and synthetic amino acids as chemical chaperones to promote CFTR folding"

B. M. Rotoli (Plesso Biotec. Integrato - Sez. Pat. Gen. e Clinica - Univ. Parma)

Abstracts

- Rotoli B. M. et al. "Effects of taurine and other amino acids on the phenotype of ΔF508-CFTR cells" Experimental Biology 2006, April 1-5 – San Francisco, California;

■ FFC Project# 4/2004 "Role of adenovirus receptors in the activation of mitogen activated protein kinase pathways and nuclear factor – kB in human airways epithelial cells"

Anna Tamanini (Lab. Patologia Molecol. – Centro Fibrosi Cistica – Verona)

Publications

- Tamanini A. et al. "Interaction of Adenovirus type 5 fiber with the Coxsackie Adenovirus receptor activates inflammatory response in human respiratory cells" Journal of Virology, 2006 Nov. Vol 80, No 22 p. 11241-11254;

Abstracts

- Tamanini A. et al. "Adenovirus Vector Receptor Interactions and Early Pro-Inflammatory Signalling" 2005 – European Cystic Fibrosis Conference – New Frontiers in Basic Science of Cystic Fibrosis – Evi-

ra, Portugal 14 – 17 April 2005;

- Tamanini A. et al. "Biosafety studies in CF gene transfer: role of vector-receptor interactions in pro-inflammatory signalling" Journal of Cystic Fibrosis 4 (2005) S26-S33; 28th European C.F. Conference, Hersonissos, Crete, Greece; 22-25 June 2005.

■ FFC Project#1/2005 "Role of the scaffolding protein NHERF in the PKA-mediated regulation of CFTR sorting and activity"

Valeria Casavola (Dipart. Fisiologia Gen. ed Amb. - Univ. Bari)

Publications

- Guerra L. et al. "Na+/H⁺ Exchanger regulatory factor isoform 1 over expression modulates cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) expression and activity in human airway 16HBE14o – cells and rescues ΔF508 CFTR functional expression in Cystic Fibrosis cells" The Journal of Biological Chemistry vol. 280, No. 49, pp. 40925-40933, December 9, 2005.
- Favia M. et al. "NHE3 inhibits PKA-dependent functional expression of CFTR by NHERF2 PDZ interactions" Biochemical and Biophysical Research Communications 2006 Aug 25;347(2):452-9.
- Pantano S. et al. "Molecular basis of the allosteric mechanism of cAMP in the regulatory PKA subunit" FEBS Letters 579 (2005) 2679-2685;
- Fanelli T. et al. "Beta-estradiol rescues Delta-F508 CFTR functional expression in human cystic fibrosis airway CFBE 41 o-cells through the up-regulation of NHERF1". Biol Cell 2008 Jan 9

Abstracts

- Fanelli T. et al. "β-estradiol rescues ΔF508-CFTR functional expression in CFBE41o-cells via NHERF1 up-regulation" Workshop Transporters 2006, Parma 6-9 September 2006.
- Guerra L et al. "Rescue of deltaF508 CFTR in CFBE41O-cells is dependent on actin cytoskeleton interaction with ezrin and NHERF1" European CF Conference, Belek, Turkey, 13-16 June 2007; J. of Cystic Fibrosis June 2007, vol. 6, suppl. 1:S7
- Riccardi S.M. et al. "Rescue of deltaF508 CFTR in CFBE41O-cells is dependent on actin cytoskeleton interaction with ezrin and NHERF1" 58th National Congress of the Italian Physiological Society, Lecce 19-21 Sept. 2007; Acta Physiologica, vol. 191, suppl. 657

■ FFC Project#2/2005 "Macrolides and ion transport across CFTR"

Emanuele Giordano (Ist. Naz. Ricerca Cardiovascolare (INRC) - Dipart. Biochimica)

Abstracts

- Furini S. et al. "Macrolides antibiotics and ion transport across plasma membrane" XIII Congresso Nazionale della Società Italiana di Ricerche Cardiovascolari, Imola 21-23 settembre 2006

■ FFC Project#4/2005 "Novel generation lentiviral vectors: evaluation of inflammatory potential in human respiratory cells"

Giulio Cabrini (Lab. Patologia Molecol. – Centro FC - OCM Verona)

Abstracts

- Copreni E. et al. " Novel generation lentiviral vectors: evaluation of inflammatory potential in human respiratory epithelial cells" North American CF Conference 2006. Denver co, USA
- Bezzzeri V. et al. " Selective modulation of P. aeruginosa-dependent induction of interleukin-8 by transcription factor decoy oligonucleotides in CF bronchial epithelial cells" The 20th North American CF Conference, Denver, Colorado, Nov. 2-5 2006
- Lampronti I. et al. " Medicinal plant extracts inhibit the induction of pro-inflammatory genes in bronchial epithelial cells" The 21st Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Anaheim Convention Center, Anaheim, California, October 3-6 2007
- Bezzzeri V. et al. " Modulation of expression of genes involved in leukocyte chemotaxis by interfering with nuclear transcription factors" The 21st Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Anaheim Convention Center, Anaheim, California, October 3-6 2007

■ FFC Project#5/2005 "CFTR gene correction in human embryonic stem cells mediated by Small Fragment Homologous Replacement (SFHR)"

Federica Sanguinolo (Dipart. Biopatologia e Diagnostica per imm. - Univ. Tor Vergata RM), Massimo De Felici (Dipart. Salute pubblica e Biologia cellulare - Univ. Tor Vergata RM), Lorenzo Guerra (Dipart. Fisiologia Gen. ed Amb. - Univ. Bari), Marco Lucarelli (Dipart. Bioteecn. Cell. ed ematologia - Univ. La Sapienza Roma)

Publications

- Sanguinolo F. et al. "CFTR gene targeting in mouse embryonic stem cells mediated by small fragment homologous replacement (SFHR)" FBS, 2008, 13:2989-99

Abstracts

- Filareto A. et al. "DNA methylation enhances repair efficiency of small fragment homologous replacement (SFHR) gene targeting" 13th Italian Cystic Fibrosis Conference, Milan, 30 Nov. – 2 Dec. 2007, J. Cyst Fibrosis 2008; 7, suppl. 3: S15

■ FFC Project#1/2006 "Novel methods of intracellular delivery of ΔF508-CFTR correctors"

Marco Colombari (Dipart. Patologia - Sez. Immunologia – Università di Verona), Giulio Cabrini (Lab. Patologia Molecol. – Centro FC - OCM Verona), Franco Dosio (Dipart. Scienze e Tecnologia del Farmaico - Univ. Torino)

Publications

- Norez C. et al. "Chemical conjugation of ΔF508-CFTR corrector deoxyspergualin to transporter human serum albumin enhances its ability to rescue Cl⁻channel functions" Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2008 Aug, vol. 295, pp. L336-L347.

Abstracts

- Norez C. et al. "Chemical conjugation of ΔF508-CFTR corrector deoxyspergualin to transporter human serum albumin enhances its ability to rescue Cl⁻channel functions" Pediatric pulmonology, Suppl. 31, 2008. 22nd Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Orlando, Florida, 22-25 October 2008, p. 313.

■ FFC Project#2/2006 "Homing of bone marrow-derived stem cells to the respiratory epithelium in a cystic fibrosis mouse model: Role of bioenergetic metabolism"

Massimo Conese (Ist. per il Trattamento speriment. della FC - Osp. San Raffaele – Milano), Nazareno Capitanio (Dipart. Scienze Biomediche - Univ. Foglia), Valeria Casavola (Dipart. Fisiologia Gen. ed Ambientale - Univ. Bari)

Abstracts

- Conese M. et al. "Homing to the lung, mitochondrial content and CFTR expression in hematopoietic stem cells" 13th Italian Cystic Fibrosis Conference, Milan, 30 Nov. – 2 Dec. 2007, J. Cyst Fibrosis 2008; 7, suppl. 3: S16

■ FFC Project#3/2006 "Identification, optimization, and validation of potentiators and correctors for the pharmacotherapy of cystic fibrosis"

Luis JV Galietta (Lab. Gen. Molec. - Ist. Gaslini – Genova), Mauro Mazzei (Dipart. Scienze Farmaceutiche - Univ. Genova), Oscar Moran, (Istituto di Biofisica CNR – Genova)

Publications

- Pedemonte N. et al. "Structure-Activity relationship of 1,4-Dihydropyridines as potentiators of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel" Molecular Pharmacology, Vol. 72, N. 1, pp. 197-207
- Caputo A. et al. "TMEM16A, A Membrane Protein Associated with Calcium-Dependent Chloride Channel Activity" Science Express, DOI: 10.1126/science.1163518, 4 Sept. 2008.
- Caputo A. et al. "Mutation-specific potency and efficacy of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel potentiators" J Pharmacol Exp Ther (2009) 330: 783-91.
- Catani F. et al. "Synthesis of 4-thiophen-2'-yl-1,4-dihydropyridines as potentiators of the CFTR chloride channel" Bioorg Med Chem (2009) 17: 7894-903
- Ferrera L. et al. "Regulation of TMEM16A chloride channel properties by alternative splicing" J Biol Chem (2009) 284: 33360-33368

■ FFC Project#4/2006, FFC#2/2008 "Functional and structural basis of the molecular mechanism of CFTR potentiators: towards therapeutic feasible molecules"

Oscar Moran, (Istituto di Biofisica CNR – Genova), Olga Zegarra, Nazareno Dimasi (Lab. Gen. Molec. - Ist. Gaslini – Genova)

Publications

- Zegarra Moran O. et al. "Functional analysis of mutations in the putative binding site for CFTR potentiators: interaction between activation and inhibition" The Journal of Biological Chemistry Vol. 282, No. 12 pp. 9098-9104, 2007
- Ferrera L. et al. "Characterization of a 7,8-Benzoflavone Doublet Effect on CFTR Cl⁻ Channel Activity" J. Membrane Biol. (2007) DOI 10.1007/s00232-007-9066-4
- Moran O. et al. "On the measurement of the functional properties of the CFTR" Journal of Cystic Fibrosis, 7 (2008) 483-494
- Moran O. "Model of the cAMP activation of chloride transport by CFTR channel and the mechanism of potentiators" J. Theor. Biol. (2010) 262:73-79.
- Bisignano P. et al. "Molecular dynamics analysis of the wild type and ΔF508 mutant structures of the human CFTR-nucleotide binding domain 1" Biochimie (2010) 92:51-57.
- Melani R. et al. "Analysis of ion transport in the airway epithelium using RNA interference" Current Opinion in Molecular Therapeutics, 11 (3): 282-291, 2009
- Melani R et al. "Modulation of Cystic Fibrosis transmembrane conductance regulator activity and genistein binding by cytosolic pH" J of Biol Chem (2010) Vol 285, 53:41591-6
- Galeno L. et al. "Small-angle X-ray scattering study of the ATP modulation of the structural features of the nucleotide binding domains of the CFTR in solution" Eur Biophys J, 2011 Jul;40(7):811-24

Abstracts

- Bisignano P. "Dinamica molecolare della CFTR: stabilità strutturale e termodinamica del primo dominio legante il nucleotide (NBD1)" Università degli Studi di Genova, Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali, Corso di laurea specialistica in Biologia Cellulare e Molecolare, Tesi di laurea, a.a. 2008/2009.

- Galfre E. et al. "Biophysical characterisation of the interaction of recombinant nucleotide binding domains of the CFTR and potentiators" XIX Congresso Nazionale SIBPA, Roma, 17-20 settembre 2008

- Ferrera L. et al. "Modulation of CFTR activity by interactions between the UCCF-029 potentiator and ATP analogues" The 22nd Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Orlando, Florida, October 23-25, 2008

- Melani R. et al. "Interaction between CFTR and Genistein at different values of intracellular pH" 2009 ECFS Basic Science Conference, New Frontiers in Basic Science of Cystic Fibrosis, April 15-19, Tavira, Portugal

- Martorana V. et al. "A molecular dynamics study of the CFTR nucleotide binding domains interaction" European Biophysics Journal, 7th EBSA European Biophysics Congress, Genova, July 11-15, 2009

- Moran O., moderators "Pharmacology – how do correctors and potentiators work?" Special group discussion – IV, European CF Society, Tavira, Portugal, April 15-19, 2009

- Moran O. et al., Identification of the binding site of CFTR potentiators. Presented at the 51st Annual Meeting of the Biophysical Society (Baltimore, U.S.A.). 3-7 March, 2007.

- Galfre E. et al., Biophysical characterisation of the interaction of recombinant nucleotide binding domains of the CFTR and potentiators, XIX Congresso Nazionale della Società Italiana di Biofisica Pura ed Applicata (Roma, Italy) 2008

- Zegarra-Moran O. et al. "Pharmacologic activation of chloride transport in CF mutants" ECFS Conference. New Frontiers in Basic Science of Cystic Fibrosis (Regua, Douro, Portugal), 9-13 April, 2008.

- Moran O. et al., Pharmacology- how do correctors and potentiators work? New frontiers in basic science of cystic fibrosis. European Cystic Fibrosis Society Conference New Frontiers in Basic Science of Cystic Fibrosis (Tavira, Portugal), 15-19 April, 2009.

- Bisignano P. et al., Molecular dynamics of CFTR: Structural stability and thermodynamics of the first nucleotide binding domain (NBD1). BITS 2009 - Sixth Annual Meeting of the Italian Bioinformatics Society (Genova, Italy). 2009.

- Zegarra-Moran O. et al., Binding of potentiators to CFTR involves electrostatic interactions. Pediatr. Pulm. S33:234. 24th Annual North American Cystic Fibrosis Conference (Baltimore, U.S.A.). 21-23 October, 2010.

- Zegarra-Moran O., "CFTR potentiators: effects of pH and mutations". 33rd European Cystic Fibrosis Conference (Valencia, Spain). 16-19 June 2010.

- Galeno L. et al., Structural features of the nucleotide binding domains of the CFTR in solution. XX Congresso Nazionale della Società Italiana di Biofisica Pura ed Applicata 2008 (Arcidosso, Italy)

- Melani R. et al., CFTR Activity and Potentiators Binding Are Modulated By Cytosolic pH. ECFS Conference New Frontiers in Basic Science of Cystic Fibrosis.(Tirrenia, Italy). 30 March-2 April, 2011.

■ FFC Project#2/2007 "Cellular and molecular mechanisms of the actin cytoskeleton involvement in the NHERF1-dependent rescue of del-ΔF508 CFTR in human airway cells"

Valeria Casavola (Dipart. Fisiologia Gen. ed Ambientale - Univ. Bari), Massimo Conese (Ist. per il Trattamento speriment. della FC - Osp. San Raffaele – Milano)

Publications

- Fanelli T. et al. "β-estradiol rescues ΔF508CFTR functional expression in human cystic fibrosis airway CFBE41o-cells through the up-regulation of NHERF1" Biol Cell. –2008 Jul;100(7):399-412

- Favia M et al. "Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor 1 overexpression-dependent increase of cytoskeleton organization is fundamental in the rescue of F508del cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in human airway CFBE41o- Cells" Molec Biol of the Cell (2010), Vol. 21: 73-86

Abstracts

- Favia M. et al "Ezrin phosphorylation and activation of RHOA play a role in the rescue of ΔF508 un CFBE41O-cells by NHERF1" XIII Congresso italiano della Fibrosi cistica, III Congresso nazionale SIFC, Milano, 30 novembre – 2 dicembre 2007

- Favia M. et al. "Ezrin phosphorylation and activation of RhoA play a role in the NHERF1 overexpression-dependent rescue of F508del CFTR in human airway CFBE41o- cells" IV Congresso Nazionale della Società Italiana Fibrosi Cistica, Torino, 27-29 novembre 2008

- Monterisi S. et al. "Ezrin and cAMP/PKA have different compartmentalization in CFBE41o- and 16HBE14o- cells" 31st European Cystic Fibrosis Conference, Prague 11-14 June 2008

- Favia M. et al. "Rescue of F508del-CFTR in CFBE41o- cells is dependent on actin cytoskeleton interaction with Ezrin and NHERF1"

ECFS Basic Science Conference, Regua, Douro, Portugal, 9-13 April 2008

■ FFC Project#3/2007 "Pharmacological chaperones as correctors of DF508-CFTR"

Mauro Mazzei (Dipart. Scienze Farmaceutiche - Univ. Genova), Melloni E. (Dip. Medicina Sper., Genova), Moro S. (Dip. Scienze Farmaceutiche Padova), Luis JV Galieta (Lab. Gen. Molec. - Ist. Gaslini – Genova)

Publications

- Cateni F. et al. "Synthesis of 4-thiophen-2'-yl-1,4-dihdropyridines as potentiators of the CFTR chloride channel" *Bioorganic & Medicinal Chem.* 17 (2009) 7894-7903

■ FFC Project#4/2007 "Assessing the implication of protein kinase CK2 in cystic fibrosis pathogenesis"

Lorenzo A. Pinna (Dipart. Chimica Biologica – Università di Padova)

Publications

- Pagano M. et al. "Modulation of protein kinase CK2 activity by fragments of CFTR encompassing F508 may reflect functional links with cystic fibrosis pathogenesis" *Biochemistry* 2008, 47, 7925-7936

- Pagano M. et al. "CFTR fragments with the F508 deletion exert a dual allosteric control over the master kinase CK2" *Biochem. J.* In press.

- Pagano M. et al. "La sorprendente diffusione del gene della fibrosi cistica: indizi per una nuova ipotesi" Atti dell'Istituto Veneto di Scienze, Lettere ed Arti, Tomo CLXVII (2008-2009) – Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali, Padova

- Pagano M. et al. "Cystic fibrosis trans membrane regulator fragments with the Phe508 deletion exert a dual allostericcontrol over the master kinase CK2" *Biochem. J.* (2010) 426, 19-29

■ FFC Project#1/2009 "Role of the scaffolding protein NHERF in the PKA-mediated regulation of CFTR sorting and activity"

Valeria Casavola (Dipart. Fisiologia Gen. ed Amb. - Univ. Bari)

Publications

- Favia M et al "Na₊/H₊ Exchanger Regulatory Factor 1 Overexpression-dependent Increase of Cytoskeleton Organization Is Fundamental in the Rescue of F508del Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator in Human Airway CFBE41o- Cells", *Molecular Biology of the Cell* January 1, 2010, Vol. 21, 73–86

Abstracts

- Mancini MC. et al. "Phosphorylation of ezrin on threonine t567 plays a crucial role in the rescue of f508del cftr functional expression" Congresso SIFC Rimini, 18-21 novembre 2010

- Monterisi S. et al., "CFTR regulation in human airway epithelial cells requires integrity of the actin cytoskeleton and compartmentalized cAMP and PKA activity" 8th ECFS Basic Science Conference, Tirrenia, Italy 30 March - 2 April 2011

■ FFC Project#2/2009 "Development of small molecules to correct the defective chloride transport in cystic fibrosis"

Luis JV Galieta (Lab. Gen. Molec. - Ist. Gaslini - Genova), Enrico Millo (Dip. Medicina Sperimentale – Lab. Biochimica – Univ. di Genova), Mauro Mazzei (Dipart. Scienze Farmaceutiche - Univ. Genova)

Publications

- Ferrera L et al "Regulation of TMEM16A chloride channel properties by alternative Splicing" *J Biol Chem* 284:33360-33368, 2009
- Pedemonte N et al "Influence of cell background on pharmacological rescue of mutant CFTR" *Am J Physiol Cell Physiol* (2010) 298:C866-74

- Budries R. et al. "Cystic fibrosis: a new target for 4-Imidazo[2,1-b]thiazole-1, 4-dihdropyridines" *J Med Chem.* 2011 Jun 9;54(11):3885-94

- Pedemonte N. et al. "Dual activity of aminoarylthiazoles on the trafficking and gating defects of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) chloride channel caused by cystic fibrosis mutations" *J Biol Chem.* 2011 Apr 29;286(17):15215-26
- Ferrera L. et al. "A minimal isoform of the TMEM16A protein associated with chloride channel activity" *Biochim Biophys Acta* 1808 (2011) 2214-2223

- Sondo E. et al. "Rescue of the mutant CFTR chloride channel by pharmacological correctors and low temperature analyzed by gene expression profiling" *Am J Physiol Cell Physiol.* 2011 Jul 13, Epub ahead of print

■ FFC Project#3/2009 "Dissection by RNAi-mediated silencing of molecular mechanisms leading to f508del-cftr misprocessing"

Nicoletta Pedemonte (Lab. Gen. Molec. - Ist. Gaslini – Genova)

Publications

- Pedemonte N. et al. "Influence of cell background on pharmacological rescue of mutant CFTR" *Am J Physiol Cell Physiol* (2010) 298:C866-74

- Pedemonte N. et al. "Dual activity of aminoarylthiazoles on the trafficking and gating defects of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) chloride channel caused by cystic fibrosis mutations" *J Biol Chem.* 2011 Apr 29;286(17):15215-26

Abstracts

- Pedemonte N et al "Dissection by rnai-mediated silencing of molecular mechanisms involved in DF508del-CFTR misprocessing" North America Cystic Fibrosis Conference, Baltimore, October 2010

■ FFC Project#4/2009 "Signaling potential of the DF508 CFTR mutation: a new paradigm to explain nonchannelopathy related aspects of cystic fibrosis"

Lorenzo A. Pinna (Dipart. Chimica Biologica – Università di Padova)

Publications

- Ruzzene M et al "Assessment of CK2 Constitutive Activity in Cancer Cells" *Methods in Enzymology* 2010; 484:495-514

-Salvi M "Variable contribution of protein kinases to the generation of the human phosphoproteome: a global weblogo analysis" *BioMol Concepts* 2010 Aug; 1(2): 185–195.

-Salvi M et al "Motif analysis of phosphosites discloses a potential prominent role of the Golgi casein kinase (GCK) in the generation of human plasma phospho-proteome" *J Proteome Res.* 2010 Jun; 9(6): 3335-3338.

-Ruzzene M et al "Addiction to protein kinase CK2: a common denominator of diverse cancer cells?" *Biochim Biophys Acta* 2010 Mar; 1804(3): 499-504.

-Pagano MA et al "Cystic fibrosis transmembrane regulator fragments with the Phe508 deletion exert a dual allosteric control over the master kinase CK2" *Biochem J.* 2010 Jan; 426(1):19-29.

Abstracts

-Pagano MA et al "CK2 as a novel player in the modulation of phosphorylation-dependent events in cystic fibrosis" 6th International Conference on Protein Kinase CK2, Cologne (Germany), September 7-10, 2010.

■ FFC Project#7/2009 "Strategies for the suppression of Na⁺ and fluid hyperabsorption in cystic fibrosis airway disease"

Olga Zegarra-Moran (Laboratorio di Genetica Molecolare - Istituto "Giannina Gaslini" - Genova)

Publications

- Melani R. et al., "Analysis of ion transport in the airway epithelium using RNA interference" *Curr Opin Mol Ther*, 11:282-291, 2009.

- Auriche C. et al., "CFTR expression and activity from the human CFTR locus in BAC vectors, with regulatory regions, isolated by a single-step procedure" *Gene Therapy*, 17:1341-1354, 2010.

- Becq F. et al., "Pharmacological therapy for cystic fibrosis: from bench to bedside" *J Cyst Fibros.* 10:S129-45, 2011.

- Melani R. et al., "Airway surface fluid expansion by activating CFTR or silencing ENaC" In preparation.

Abstracts

- Gianotti A. et al. "Innovative strategies for the Suppression of Fluid Hyperabsorption and the Recovery of airways hydration in cystic fibrosis" 2011 ECFC Basic Science Conference 30 March – 2 April 2011, Tirrenia, Pisa, Italy

- Zegarra-Moran O., "Identification of components of innate defense in the airway surface fluid" ECFS Conference. New Frontiers in Basic Science of Cystic Fibrosis (2009, Tavira, Portugal).

- Zegarra-Moran O., "Binding of potentiatotrs to CFTR is pH sensitive 33rd European Cystic Fibrosis Conference" (2010, Valencia, Spain).

- Zegarra-Moran O., "Epithelial sodium channel inhibition in primary human bronchial epithelia by transfected siRNA" Ion Channel Research Network Meeting (2011, Cambridge, UK).

- Melani R. et al., "CFTR Activity and Potentiatotrs Binding Are Modulated By Cytosolic pH" New Frontiers in Basic Science of Cystic Fibrosis .2011 (Tirrenia, Italy).

■ FFC Project#18/2009 "Mapping IL-8 gene transcription machinery in bronchial epithelial cells"

Giulio Cabrini (Lab. Patologia Molecol. – Centro FC - OCM Verona)

Publications

- Bezzzerri V. et al. "Phospholipase C-3 is a key modulator of IL-8 expression in cystic fibrosis bronchial epithelial cells" *J Immunol.* 2011 Apr 15;186(8):4946-58

- Bezzzerri V. et al. "Mapping transcriptional machinery of IL-8 gene in human bronchial epithelial cells" *Journal of Immunology*, October 26, 2011, doi:10.4049/jimmunol.1100821

Abstracts

- Gambari R. et al. "Pharmacological modulation of chemotactic signaling in respiratory models" 2010 ECFS Conference – April 7-10, Carcavelos (Portugal)

- Bezzzerri V et al "Genetic regulatory network of Interleukin-8" 3rd European CF Young Investigator Meeting, Lille, France, 2009

- Cabrini G., "Modulazione farmacologica della infiammazione polmonare cronica", 1° Conferenza Aziendale sulla Ricerca, La pa-

tologia polmonare, Azienda Ospedaliera Universitaria di Verona, Verona, 2010

- Bezzetti V. et al., "Role of PLCB3 in pro-inflammatory signaling in bronchial epithelial cells", 25th North American Cystic Fibrosis Conference, Anaheim, CA, USA

■ FFC Project#6/2010 "Novel biomarkers for evaluation of efficacy of new therapies in cystic fibrosis"

Paola Melotti (Centro Regionale Fibrosi Cistica, OCM Verona), Claudio Sorio (Dip. Patologia, Sez. Patologia Generale, Università di Verona)

Publications

- Sorio C. et al. "Defective CFTR expression and function are detectable in blood monocytes: development of a new blood test for cystic fibrosis" PLoS One, 2011; 6(7): e22212. Published online 2011 July 21.

Abstracts

- Sorio C. et al., "Defective CFTR expression and function are detectable in blood monocytes: development of a new blood test for cystic fibrosis" 2011 ECFC Basic Science Conference 30 March – 2 April 2011, Tirrenia, Pisa, Italy
- Rizzo R. et al., "Ruolo della molecola HLA-G come marcatore dello stato infiammatorio nella CF", VII Meeting Nazionale SIFC, Latina, 14-15 Aprile 2011

■ FFC Project#7/2010 "Structural features of the intracellular domains of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator" Oscar Moran (Istituto di Biofisica CNR, Genova)

Publications

- Galeno L. et al. "Small-angle X-ray scattering study of the ATP modulation of the structural features of the nucleotide binding domains of the CFTR in solution" Eur Biophys J, 2011 Jul;40(7):811-24

Abstracts

- Galeno L. et al. "Structural Features of the Nucleotide Binding Domains of the Cftr in Solution" XX Congresso Nazionale SIBPA 11-14 settembre 2010, Arcidoso
- Galeno L. et al. "Structural Features of the Nucleotide Binding Domains of the Cftr in Solution" ECFS 30 March- 2 April 2011, Tirrenia (Pi)
- Moran O. "Model of the cAMP Activation of Chloride Transport by CFTR Channel and the Mechanism of Potentiators" ECFS 30 March- 2 April 2011, Tirrenia (Pi)
- Moran O., "ATP-Dependent Conformational Changes of the NBD" The 34th European CF conference, Symposium CFTR Structure, Function and Therapy 8-11 June 2011, Hamburg
- Galeno L., "Structural Features of the Nucleotide Binding Domains of the CFTR in Solution" At XV school of Pure and applied Biophysics, Venezia, 24-28 January 2011.
- Moran O., "SAXS study of the ATP-modulation of the structural features of the nucleotide binding domains of the CFTR in solution" At Area della Ricerca di Palermo, CNR, Palermo 11 May 2011

■ FFC Project#8/2010 "Decrease apical infection of CFTR by Pseudomonas aeruginosa infection: role of NHERF1 phosphorylation"

Anna Tamanini (Laboratorio Patologia Molecolare, Laboratorio Analisi Cliniche ed Ematologiche, OCM Verona), Stephan Reskin (Dip. Fisiologia Generale ed Ambientale, Università di Bari)

Abstracts

- Tamanini A. et al. "Decreased apical expression of CFTR by Pseudomonas Aeruginosa infection in respiratory cells: role of NHERF1 phosphorylation" 2011 ECFC Basic Science Conference 30 March – 2 April 2011, Tirrenia, Pisa, Italy

2. GENETICS Genetica

■ FFC Project#4/2003 "Identification of CF modifier genes by family studies and microarray analysis"

Giuseppe Novelli (Dipart. Biopatologia e Diagnostica per imm. - Univ. Tor Vergata RM), Pierfranco Pignatti (Ist. Biol. Genetica – Dip. Materno Infantile - Univ. Verona), Francesco Salvatore (Dipart. Bioch. e Biotec. Mediche – Univ. Federico II – Napoli)

Publications

- Groman J. D. et al. "Variation in a Repeat Sequence Determines Whether a Common Variant of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene is Pathogenic or Benign" Am. J. Hum. Genet. 74:176-179, 2004
- Sangiuliano F. et al. "Toward the pharmacogenomics of Cystic Fibrosis – an update" Future Medicine – Pharmacogenomics, 2004 Oct., 5 (7), pp. 861-878
- Salvatore D. et al. "Isolated elevated sweat chloride concentrations in the presence of the rare mutation S1455X: an extremely mild form of CFTR dysfunction" Am J Med Genet A. 2005 Mar 1;133A(2):207-8

- Castaldo G. et al. "Phenotypic discordance in three siblings affected by atypical cystic fibrosis with the F508del/D614G genotype" J Cyst Fibros. 2006 Aug;5(3):193-5

- Gambardella S. et al. "Gene expression profile study in CFTR mutated bronchial cell lines" Clin Exp Med (2006) 6:157-165

Abstracts

- Gambardella S. et al. "CAP70 as a possible modifier gene of Cystic fibrosis phenotype" 54th Annual Meeting Toronto, Canada October 26 – 30 2004
- Gambardella S. et al. "Different CFTR genotypes induce dissimilar expression patterns in CF putative modifier genes" European Human Genetics Conference 2005, Prague 7-10 May 2005;
- Gambardella S. et al. "Different CFTR genotypes induce dissimilar expression patterns in CF putative modifier genes" 28th European CF Conference, Crete, Greece 22-25 June 2005;
- Gambardella S. et al. "Diversi genotipi CFTR causano un diverso adattamento dell'espressione genica in linee cellulari FC" VIII Congresso Nazionale S.I.G.U. – Domus de Maria (CA) 28-30 settembre 2005;
- Groman J. D. et al. "Length of a variable TG repeat predicts whether the IVS8-5T mutation in the CFTR gene is pathogenic or benign" VI Congresso Nazionale S.I.G.U. – Verona 24-27 settembre 2003;
- Belpinati F. et al. "Geni modificatori in fibrosi cistica" V Congresso Nazionale S.I.G.U. – 5° Congresso Nazionale S.I.G.U. Verona 24-27 settembre 2002;
- Belpinati F. et al. "Geni modificatori del fenotipo polmonare in Fibrosi Cistica" 6° Congresso Nazionale S.I.G.U. Verona 24-27 settembre 2003;
- Gambardella S. et al. "CAP70: nuovo gene modificatore del fenotipo nella Fibrosi Cistica?" 7° Congresso Nazionale S.I.G.U. 2004

■ FFC Project#5/2003 "Molecular pathology of CFTR pre-mRNA splicing. Diagnostic and therapeutic aspects"

Franco Pagani (ICGBE – Trieste)

Publications

- Buratti E. et al. "Nuclear factor TDP-43 Ninds to the Polymorphic TG Repeats in CFTR Intron 8 and Causes Skipping of Exon: A Functional Link with Disease Penetrance" Am. J. Hum. Genet. 74:1322-1325, 2004
- Amaral M. D. et al. "Quantitative methods for the analysis of CFTR transcripts/splicing variants" Journal of Cystic Fibrosis 3 (2004) 17-23;
- Zuccato E. et al. "An Intronic Polypyrimidine-rich Element Downstream of the Donor Site Modulates Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Exon 9 Alternative Splicing" The Journal of Biological Chemistry – Vol 279, No. 17, Issue of April 23, pp. 16980-16988, 2004
- Pagani F. et al. "Synonymy mutations in CFTR exon 12 affect splicing and are not neutral in evolution" Proc Natl Acad Sci USA 2005, 102 (18), 6368-72.

■ FFC Project# 6/2003 "Assessing the possible utilization of CFTR-M470V genotyping for CF risk determination"

Pierfranco Pignatti (Ist. Biol. Genetica – Dip. Materno Infantile - Univ. Verona), Carlo Castellani (Centro FC – Ospedale Civile Maggiore - Verona), Guido Modiano (Dipart. Biologia "E. Calef" Università di Roma -Tor Vergata)

Publications

- Pompei F. et al. "Haplotype block structure study of the CFTR gene. Most variants are associated with the M470 allele in several European populations" European Journal of Human Genetics 2006 Jan;14(1):85-93.
- Ciminelli B.M. et al. "Highly preferential association of NonF508del Cf mutations with the M470 allele" Journal of Cystic Fibrosis 6 (2007) 15 – 22.

Abstracts

- Pignatti P. F. et al "Assessing the possible utilization of CFTR-M470V genotyping for CF risk determination" Congresso ASHG 26 – 30 ottobre 2004;
- Pompei F. et al. "Determinazione del possibile utilizzo del polimorfismo CFTR-M470V per la determinazione del rischio di Fibrosi Cistica" Congresso SIGU 13 – 16 ottobre 2004;

■ FFC Project#5/2004 "Screening of CFTR gene rearrangements in Italian CF patients"

Giuseppe Castaldo (CEINGE - Biotec. Avanzate s.c.a.r.l. - Univ. Federico II Napoli), Carlo Castellani (Centro FC – Ospedale Civile Maggiore – Verona), Cristina Bombieri (Ist. Biol. Genetica – Dip. Materno Infantile - Univ. Verona), Federica Sangiuliano (Dipart. Biopatologia e Diagnostica per Immagini - Univ. Tor Vergata Roma)

Publications

- Bombieri C. et al. "Frequency of large CFTR gene rearrangements in Italian CF patients" European Journal of Human Genetics (2005) 13, 687-689;

- Salvatore D. et al. "Cystic fibrosis presenting as metabolic alkalosis in a boy with the rare D579G mutation" *Journal of Cystic Fibrosis* 3 (2004) 135-136

- Tomaiuolo R. et al. "Epidemiology and a novel procedure for large scale analysis of CFTR rearrangements in classic and atypical CF patients: a multicentric Italian study" *J Cyst Fibrosis* 7 (2008) 347-351

Abstracts

- Bombieri C. et al. "Ricerca di riarrangiamenti del gene CFTR in pazienti italiani con Fibrosi Cistica" 7° Congresso Nazionale S.I.G.U. 13-15 ottobre 2004, Pisa;

- Bombieri C. et al. "Screening of CFTR gene rearrangements in Italian CF patients" Poster: Molecular Basis of Mendelian Disorder – The American Society of Human Genetics, 54th Annual Meeting, Toronto, Canada, October 26-30, 2004;

- Tomaiuolo R. et al. "Screening di macrodelezioni del gene CFTR in pazienti CF originari del sud Italia" 37° Congresso Nazionale S.I.BIOC (Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica), 11-14 ottobre 2005, Roma;

- Tomaiuolo R. et al. "Screening di varianti geniche di geni modulatori in pazienti con fibrosi cistica con fenotipo epatico" Poster - 37° Congresso Nazionale Società It. Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Roma 11-14 Ott. 2005

- Cardillo G. et al. "Varianti geniche di SLC26A3 in pazienti con fibrosi cistica con mutazioni non note nel gene-malattia" Poster - 37° Congresso Nazionale Società It. Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Roma 11-14 Ott. 2005

- Tomaiuolo R. et al. "Screening of large rearrangements in the CFTR gene in cystic fibrosis patients from Southern Italy" 15th International Conference on Laboratory Medicine and 12h European Conference of Clinical Molecular Biology, 11-12 novembre 2005, Napoli;

- Tomaiuolo R. et al. "Screening di macrodelezioni del gene CFTR in pazienti CF" IX Congresso Nazionale S.I.G.U. – Lido di Venezia – 8-10 novembre 2006

- Raia V. et al. "La mutazione D1152H si associa a forme non classiche di CF" XII Congresso italiano della Fibrosi Cistica, Firenze, 23-25 novembre 2006

■ FFC Project#7/2004 "The Cystic Fibrosis mutation spectra in Italy: regional distribution and the European framework"

Alberto Piazza (Dipart. Genetica e Biochimica - Univ. Torino)

Abstracts

- Riccardino F. et al. "Geografia (e storia) delle mutazioni della Fibrosi Cistica: l'Italia in un contesto europeo" 8° Congresso Nazionale S.I.G.U. – Cagliari 28 – 30 Settembre 2005.

- Viviani L. et al. "Cystic Fibrosis mutations spectra in Italy: a regional distribution" *Journal of Cystic Fibrosis* 4 (2005) S3-S10

■ FFC Project# 8/2004 "CF: characterization of the unknown mutations in Italian patients and assessment of their pathogenic role"

Maria Cristina Rosatelli, (Dipart. Scienze Biom. e Biotecn. Lab. Genetica Molecolare - Univ. Cagliari), Franca Dagna Bricarelli (Lab. Genetica Umana - Osp. Galliera Genova), Alberto Bonizzato (Centro FC – Ospedale Civile Maggiore – Verona), Manuela Seia (Lab. Genetica Molecolare ICP – Milano), Antonio Amoroso (Scuola di Genetica Medica - Univ. Trieste)

Publications

- Faa V. et al. "A new insertion / deletion of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene account for 3.4% of cystic fibrosis mutations in Sardinia: implications for population screening" *J. Mol Diagn.* 2006 Sep; 8(4):499-503

■ FFC Project#9/2004 "Selection and functional characterization of CFTR intronic sequence variations potentially causing atypical forms of CF: modulation of CFTR alternative splicing?"

Roberto Strom (Dipart. Biotecnologie Cellulari ed Ematologia - Univ. La Sapienza Roma), Serena Quattrucci (Centro FC Regione Lazio, Dipart. Pediatria - Univ. La Sapienza Roma), Fernando Mazzilli (Dipart. Fisiopatologia Medica - Univ. La Sapienza Roma)

Publications

- Lucarelli M. et al. " A 96- well formatted method for exon and exon/intron boundary full sequencing of the CFTR gene" *Anal. Biochem.* 2006 Jun 15; 353(2): 226-35

- Narzi L. et al. "Does cystic fibrosis neonatal screening detect atypical CF forms? Extended genetic characterization and 4-year clinical follow-up" *Clin Genet.* 2007; 39-46

■ FFC Project#14/2005 "New approaches for noninvasive prenatal diagnosis of cystic fibrosis by fetal DNA analysis in maternal plasma"

Laura Cremonesi (Unità di Genomica per diagnosi di patologie umane - Fond. Centro San Raffaele del Monte Tabor, Milano), Gabriella Restagno (S.S. di Diagnostica Molecolare e Test genetici integrati - Dip. Patologia Clinica dell' A.O.O.I.R.M. – S. Anna, Torino), Manuela Seia (Istituti Clinici di Perfez. - Lab. Genetica Molecolare, Milano),

Carlo Castellani (Centro Reg. Fibrosi Cistica – Osp. Civile Maggiore, Verona)

Publications

- Bruno F. et al. "High- sensitive microarrays substrates specifically designed to improve sensitivity for the identification of fetal paternally inherited sequences in maternal plasma" *Clin Chem Lab Med* 2009, 47:818-823

- Mari C. et al. "Application of pyrosequencing to the identification of sequence variations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene." *Clin Chem Lab Med* 2009; 47:1051-4

■ FFC Project#15/2005 "Splicing Affecting Genomic Variants in CFTR: Diagnostic and Therapeutic Aspects"

Franco Pagani (ICGEB, Trieste)

Publications

- Youhna M. A. et al. " TDP43 depletion rescues aberrant CFTR exon 9 skipping" *FEBS Letters* 580 (2006) 1339-1344.

- Raponi M. et al. "Reduced splicing efficiency induced by synonymous substitutions may generate a substrate for natural selection of new splicing isoforms: the case of CFTR exon 12" *Nucleic Acids Research*, 2007, Vol. 35, No. 2, pp. 606-613

■ FFC Project#24/2006 "Characterization of the unknown mutations in Italian patients and assessment of their pathogenic role: a prerequisite for prevention of Cystic Fibrosis by carrier screening and prenatal diagnosis"

Maria Cristina Rosatelli, (Dipart. Scienze Biom. e Biotecn. Lab. Genetica Molecolare - Univ. Cagliari), M. Baffico (Ospedali Galliera, Laboratorio di Genetica, Genova), Carlo Castellani (Centro FC – Ospedale Civile Maggiore - Verona), Manuela Seia (Lab. Genetica Molecolare ICP – Milano)

Publications

- Faa V. et al. "A Synonymous Mutation in the CFTR Gene Causes an Aberrant Splicing in an Italian Affected by a Mild Form of Cystic Fibrosis" *J Mol Diagn.* 2010 May;12(3):380-3. Epub 2010 Feb 26

■ FFC Project#19/2007 "Molecular analysis of genes encoding CFTR interactors of SLC26 family in CF patients"

Giuseppe Castaldo (CEINGE - Biotec. Avanzate s.c.a.r.l. - Univ. Federico II Napoli)

Publications

- Elce A. et al. "Three novel CFTR polymorphic repeats improve segregation analysis for cystic fibrosis" *Clin Chem.* 2009 Jul;55(7):1372-9

Abstracts

- Elce A. et al. "Direct sequencing of CSTs in Cystic Fibrosis patients bearing indefinite genotype" 13th Italian Cystic Fibrosis Conference, Milan, 30 Nov. – 2 Dec. 2007, *J. Cyst Fibrosis* 2008; 7, suppl. 3: pp. S12

- Tomaiuolo R. et al. "Molecular analysis of genes encoding CFTR interactors of SLC26 family in CF patients: preliminary results" 13th Italian Cystic Fibrosis Conference, Milan, 30 Nov. – 2 Dec. 2007, *J. Cyst Fibrosis* 2008; 7, suppl. 3: pp. S12-S13

- Elce A. et al. "L'analisi di tre nuovi marcatori polimorfici del gene CFTR rende più efficiente l'analisi molecolare indiretta della fibrosi cistica" XI Congresso nazionale SIGU, 23-25 novembre 2008, Genova

- Elce A. et al. "La caratterizzazione di tre nuovi polimorfismi nel gene CFTR permette il potenziamento dell'analisi di linkare nella fibrosi cistica" XIV Congresso italiano della fibrosi cistica – IV Congresso SIFC, Torino 27-29 novembre 2008

■ FFC Project#20/2007 "Evaluation of disease causing mutations in CFTR co-transcriptional splicing units: diagnostic and therapeutic aspects"

Franco Pagani (ICGEB – Trieste)

Publications

- Baralle M. et al. "Influence of Friedrich Ataxia GAA noncoding repeat expansion on Pre-mRNA processing" *Am J Hum Genet* 83, 77-88, July 2008

- Goina E. et al. "Binding of DAZAP1 and hnRNPA1/A2 to an exonic splicing silencer in a natural BRCA1 exon 18 mutant" *Mol Cell Biol*, 28, June 2008, 3850-3860.

- Pinotti M. et al. "U1-snRNA-mediated rescue of mRNA processing in severe factor VII deficiency" *Blood*, 111, 5, 2681-4.

■ FFC Project#3/2008 "Genetic factors influencing pulmonary disease in Cystic Fibrosis (CF) patients"

Paolo Gasparini (Dip. Scienze dello Sviluppo e Riproduttive - Università di Trieste), Giulio Cabrini (Lab. Patologia Molecolare - Azienda Ospedaliero - Universitaria - Verona)

Publications

- Crovella S. et al. "A polymorphism in the 5' UTR of the DEFB1 gene is associated with the lung phenotype in F208del homozygous

Italian cystic fibrosis patients" Clin Chem Lab Med 2011;49(1):49-54

■ FFC Project#4/2008 "Search of novel regulatory elements in the promoter region of CFTR gene"

Pietro Pucci (CEINGE - Biotec. Avanzate s.c.a.r.l. - Univ. Federico II Napoli)

Abstracts

- Cozzolino F. et al. "Identification of novel CFTR promoter regulatory elements" Italian Proteomics Association, 4th Annual National Conference, Milano, June 22-25, 2009.
- Lo Presti A. et al. "Ricerca di mutazioni nel promotore del gene CFTR in soggetti affetti da Fibrosi Cistica" XII Congresso Nazionale di Genetica Umana: - SIGU - Torino, 8th -11th November 2009
- Iannone C et al "Identification of novel CFTR expression regulatory elements" ITPA 2010 - Florence, 9 th -12 th June 2010
- Giordano S. et al. "Il ruolo del promotore del gene CFTR: da elemento regolatore a possibile protagonista della patogenesi della malattia" 42° Congresso Nazionale SIBioC. Riassunti Poster Biochimica Clinica, 2010, vol. 34, n. 5, pag 419, n°061 - Rome, 5th – 8th October 2010

■ FFC Project# 5/2008 "Feasibility of a screening program for the pre-conceptional identification of Cystic Fibrosis carriers in Sardinian population"

Maria Cristina Rosatelli, (Dipart. Scienze Biom. e Biotecn. Lab. Genetica Molecolare - Univ. Cagliari)

Publications

- Faa V. et al. "A Synonymous Mutation in the CFTR Gene Causes Aberrant Splicing in an Italian Patient Affected by a Mild Form of Cystic Fibrosis" J. Mol Diagn. 2010 May; 12(3):380-383
- Coiana A. et al. "Preconceptional identification of cystic fibrosis carriers in the Sardinian population: a pilot screening program", J Cyst Fibros. 2011 May;10(3):207-11

■ FFC Project# 9/2009 "Molecular pathology of the pre-mRNA splicing machinery in cystic fibrosis: mechanistic aspects and therapeutic approaches"

Franco Pagani (International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, ICGB, Trieste)

Publications

- Goina E. et al. "Approaches to study CFTR pre-mRNA splicing defects" in Amaral MD & Kunzelmann K (Ed.), Cystic Fibrosis, Methods in Molecular Biology, 2010, 741 (2): 155-159.
- Alanis E. F. et al. "An exon-specific U1 small nuclear RNA (snRNA) strategy to correct splicing defects" (in preparation)
- Alanis E. F. et al. "An exon-specific U1 small nuclear RNA (snRNA) strategy to correct splicing defects" in preparation

Abstracts

- Alanis E. F. et al. "Shift U1 snRNAs Targeted to an Intronic Splicing Silencer correct aberrant CFTR exon 12 skipping" 8th European Cystic Fibrosis Society Basic Science Conference, Tirrenia, Italy, Mar.-Apr. 2011
- Alanis E. F. et al. "Shift U1 snRNAs targeting to ISS in splicing correction" 2nd International EURASNET Conference on Alternative Splicing, Granada, Spain, Feb.-Mar. 2011
- Alanis E. F. et al. "Defective Donor Splice Sites: Molecular analysis and therapeutic approaches" EURASNET Focus Meeting on RNA Mis-Splicing, Cambridge, UK, Churchill College, Univ. Of Cambridge, Jul. 2010

3. MICROBIOLOGY Microbiologia

■ FFC Project#4/2002 "Taxonomy and virulence markers of *B. cepacia* strains associated with respiratory infections in patients with cystic fibrosis"

Roberta Fontana (Lab. Microbiol e Virologia, Ospedale Civile Maggiore – Verona)

Publications

- Golini G. et al. "Molecular epidemiology and antibiotic susceptibility of Burkholderia cepacia-complex isolates from an Italian cystic fibrosis centre." Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2006 Mar;25(3):175-80.

Abstracts

- G. Golini et al. " Distribution of Burkholderia Cepacia complex isolates from patients with cystic fibrosis" 12th ECCMID, Milan, 24-27 April 2002. Clinical Microbiology and Infection 2002; 8 Supp. 1:114
- G. Golini et al. "Distribution of Burkholderia Cepacia complex isolates from patients with cystic fibrosis" 25th European Congress CF Society, Genoa; 20-23 June 2002. Journal of CF 2002; 1 Supp. 1: 127.
- G. Golini et al. " Burkholderia Cepacia infection and clinical course in cystic fibrosis" 26th European Congress CF Society, Belfast;

4-7 June 2003. Journal of CF 2003; 2 Supp. 1:34.

- G. Golini et al. "In vitro of levofloxacin and ciprofloxacin on clinical isolates obtained from patients with cystic fibrosis" 11th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases – Istanbul, Turkey – 1-4 April 2001

■ FFC Project#8/2003 "Gene regulation and adaptive mutation of *Pseudomonas aeruginosa* in a chronic lung infection model for Cystic Fibrosis"

Alessandra Bragonzi (Istituto per il trattamento sperimentale della fibrosi cistica, Osp. S. Raffaele, Milano), Gerd Döring (Institute for Gen. and Environ. Hygien - Univ. Tuebingen – Germany)

Publications

- Bragonzi A. et al. "Sequence diversity of the mucABD locus in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis" Microbiology (2006), 152, 3261-3269
- Bragonzi A. et al. " Nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* expresses alginate in the lungs of patients with cystic fibrosis and in a mouse model" J. Infect Dis. 2005; 192(3): 410-419

Abstracts

- Montanari S. et al. "Evaluation of the biological cost of *Pseudomonas aeruginosa* hypermutation in a murine model of chronic pulmonary infection" Paediatric Pulmonology, Suppl. 28: 289, 2005. (19th North American Cystic Fibrosis Conference, Baltimore, USA)
- Paroni M. et al. "Pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* clonal strains isolated from CF patients in a murine model of chronic pulmonary infection" 20th Annual North American CF Conference; Denver – Colorado, 2-5 Nov. 2006
- Montanari S. et al. "Cost versus benefit of *Pseudomonas Aeruginosa* hypermutation in the absence or presence of antibiotic treatment" 20th Annual North American CF Conference; Denver – Colorado, 2-5 Nov. 2006
- Montanari S. et al. "Evaluation of the biological cost of hypermutation in *Pseudomonas aeruginosa* from patients with cystic fibrosis" 2nd FEMS Congress of European Microbiologists, Madrid, July 4-8, 2006

■ FFC Project#9/2003 "Development of a rapid diagnostic test to discriminate *B. cepacia* complex species and genomovars in routine clinical analysis involving CF patients"

Renato Fani (Dipart. Biologia Animale e Genetica - Univ. Firenze), Giovanni Taccetti (Dipart. Pediatria – Centro Fibrosi Cistica - Ospedale Meyer - Firenze), Graziana Manno (Dipart. Pediatria - Osp. G. Gaslini - Genova), Silvia Tabacchioni (Dipart. Biotec. Prot. della Salute e degli Ecosistemi - Sez. Gen. e Genomica veg. - ENEA - CRE – CASACCIA -UTS – Roma)

Publications

- Tabacchioni S. et al. "Use of the gyrB gene to discriminate among species of the Burkholderia cepacia complex" FEMS Microbiol. Lett (2008) 1-8
- Papaleo M.C. et al. " Structural, evolutionary and genetic analysis of the histidine biosynthetic "core" in the genus Burkholderia" Gene 448 (2009) 16-28
- Perrin E. et al. "Exploring the HME and HAE1 efflux systems in the genus Burkholderia" BMC Evol Biology (2010), 10:164
- Ferri L. et al. "Application of multiplex single nucleotide primer extension (mSNuPE) to the identification of bacteria: The Burkholderia cepacia complex case" J. of Microbiol. Methods (2010) In press

Abstracts

- Cocchi P. et al. "Identification of Burkholderia cepacia complex species by SNuPE analysis of recA and gyrB genes" 28th European CF Conference, Crete, Greece 22-25 June 2005;

■ FFC Project#10/2003 "The quorum sensing of the emerging fibro-cystic pathogen *B. cepacia*"

Vittorio Venturi (ICGB Trieste)

Publications

- Venturi V. et al. "Quorum sensing in *B. cepacia* complex" Research in Microbiology 155 (2004) 238-244
- Bertani I. et al. "Regulation of the N-Acyl Homoserine Lactone-Dependent Quorum-Sensing in Rhizosphere *Pseudomonas putida* WCS358 and Cross-Talk with the Stationary-Phase RpoS Sigma Factor and the Global Regulator GacA" Applied and Environmental Microbiology, Sept. 2004, p. 5496-5502

Abstracts

- Bertani I. et al. "Negative regulation of N-acyl homoserine lactone quorum sensing in *Pseudomonas putida*" Pseudomonas 2005, 10th International Congress, Marsiglia, 27-31 Aug. 2005

■ FFC Project#10/2004 "Genome-wide identification of target genes for the design of non-conventional antibiotics against CF related pathogens"

Giovanni Bertoni (Dipart. Scienze Biomolecolari e Biotecnologie - Univ. Milano)

Abstracts

- Vidal Aroca F. et al. "Functional genomics of the opportunistic pathogen *Pseudomonas Aeruginosa* by interfering antisense RNA" 25° Congresso Nazionale della SIMGBM, Orvieto 8- 10 giugno 2006;
- Vidal Aroca F. et al. "Functional genomics of the opportunistic pathogen *Pseudomonas Aeruginosa* by interfering antisense RNA" Summer School – International Univ. Bremen, 28 luglio – 4 agosto 2006;
- Milani A. et al. "Functional genomics of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* by interfering antisense RNA" 1st European CF Young Investigator Meeting, Lille, Aug. 29-31, 2007

■ FFC Project#11/2004 "Evaluation of the pathogenicity of environmental and clinical isolates of *Burkholderia cepacia* complex alone and in the presence of *Ps aeruginosa*"

Annamaria Bevvino (Dipart. Biotecnologie Agroindustr. e protezione della salute - ENEA - Casaccia - Roma), Fiorentina Ascenzioni (Dipart. Biologia cellulare e dello sviluppo - Univ. La Sapienza Roma), Alessandra Bragonzi (Ist. per il Trattamento speriment. della FC - Osp. San Raffaele - Milano)

Publications

- Chiarini L. et al. "Burkholderia Cepacia complex species: health hazards and biotechnological potential" Trends in Microbiology Vol. 14 No. 6 June 2006; 277-286
- Pirone L. et al. "Burkholderia cenocepacia strains isolated from cystic fibrosis patients are apparently more invasive and more virulent than rhizosphere strains" Environmental Microbiology (2008) Oct;10(10):2773-84

Abstracts

- Pirone L. et al. "In vitro and in vivo pathogenicity of Burkholderia cenocepacia strains of clinical and environmental origin" 28th European CF Conference, Crete, Greece 22 – 25 June 2005;
- Pirone L. et al. "Clinical and environmental Burkholderia cenocepacia strains: evaluation of pathogenicity by in vitro and in vivo models" International Burkholderia Cepacia Working Group meeting April 20 – 23, 2006, Gent, Belgium
- Pirone L. et al. "Clinical and environmental Burkholderia cenocepacia strains: evaluation of pathogenicity by in vitro and in vivo models" 19th Annual North American CF Conference, Baltimore; October 20 – 23 2005

■ FFC Project#12/2004 "Antimicrobial resistance in *Burkholderia cepacia* complex from CF patients: identification, characterization and role of efflux transporters in intrinsic and acquired drug resistance"

Giovanna Riccardi (Dipart. Genetica e Microbiologia - Univ. Pavia), Graziana Manno (Dipart. Pediatria - Osp. G. Gaslini - Genova)

Publications

- Guglielme P. et al. "Efflux pump genes of the resistance-nodulation division family in Burkholderia cenocepacia genome" BMC Microbiol. 2006 Jul 20; 6:66

■ FFC Project#6/2005, #12/2006, #11/2007 "Community-acquired MRSA and hospital- acquired MRSA in cystic fibrosis patients: a multi-centre study regarding antibiotic susceptibility, epidemiology, natural history and clinical relevance"

Silvia Campana (Dipart. Pediatria – Centro Fibrosi Cistica - Ospedale Meyer – Firenze)

Publications

- Campana S. et al. "Emergence of an epidemic clone of community-associated methicillin-resistant Panton-Valentine leukocidin negative *Staphylococcus aureus* in Cystic Fibrosis patients populations" – Journal of Clinical Microbiology, Sept. 2007; vol. 45, No 9:3146-47
- Taccetti G. et al. "Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Cystic Fibrosis", European Infectious Diseases, 2008, vol. 2, issue 2.
- Taccetti G. et al. "Staphylococcus aureus meticillino-resistente comunitario e nosocomiale in fibrosi cistica: uno studio di epidemiologia molecolare" Medico e Bambino (2010)

Abstracts

- Piluso A. et al. "A national overview of MRSA epidemiology: emergence of an epidemic clone" NACFC 2006.
- Cocchi P. et al. "Epidemiology of Community acquired MRSA and hospital acquired MRSA in cystic fibrosis patients: a national overview" North American CF Conference, Anaheim, California, Oct. 3-6, 2007
- Cocchi P. et al. "Emergence of an epidemic clone of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) Panton-Valentine leukocidin (PVL) negative in Cystic Fibrosis patients" 30th European CF Conference, Belek, turkey, 13-16 June 2007
- Cocchi P. et al. "Epidemiologia italiana di staphylococcus aureus meticillino-resistente: risultati di uno studio multicentrico" XII Congresso Italiano Fibrosi Cistica, Firenze, 23-25 Nov. 2006
- Taccetti G. et al. "Methicillin-resistant *S. Aureus* (MRSA) in cystic fibrosis patients: prevalence and clinical findings" Pediatric pulmuno-

logy, Suppl. 31, 2008. 22nd Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Orlando, Florida, 22-25 October 2008, p. 343.

- Cocchi P. et al. "MLST analysis of an epidemic clone of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) panton-valentine leukocidin (PVL) negative in cystic fibrosis patients" Pediatric pulmunology, Suppl. 31, 2008. 22nd Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Orlando, Florida, 22-25 October 2008, p. 348

- Campana S. et al. "Community-Aquired MRSA cause earlier infection than Hospital Acquired MRSA in patients with cystic fibrosis" 32nd European Cystic Fibrosis Conference, 10-13 giugno 2009, Brest, France.

- Cocchi P. et al. "Characterization of SCCmec types involved in persistent MRSA infections in cystic fibrosis patients" 32nd European Cystic Fibrosis Conference, 10-13 giugno 2009, Brest, France.

- Campana S. et al. "Infection with community-and hospital-acquired MRSA: influence on pulmonary function in CF patients" 23rd Annual North American Cystic Fibrosis Congress, Minneapolis, Minnesota, 15-17 October 2009.

- Cocchi P. "SCCMCE types involved in persistent MRSA infections in CF patients: a longitudinal study" 23rd Annual North American Cystic Fibrosis Congress, Minneapolis, Minnesota, 15-17 October 2009.

■ FFC Project#7/2005 "Stenotrophomonas maltophilia, an emergent pathogen associated to cystic fibrosis: identification and molecular characterization of virulence determinants as potential targets for new therapeutical strategies"

Bianca Colonna (Dipart. Biologia Cellulare e dello Sviluppo - Lab. Microbiologia Molecolare - Univ. La Sapienza – Roma), Maurizio Sanguineti (Ist. Microbiologia - Univ. Sacro Cuore – Roma), Mauro Nicoletti (Dipart. Scienze Sanità Pubbli. - Sez. Microbiologia - Univ. La Sapienza – Roma), Mariassunta Casalino (Dipart. Microbiologia – Univ. Roma 3), Ersilia Fiscarelli (Dipart. Medicina Pediatrica - Osped. Pediatrico "Bambin Gesù" – Roma)

Publications

- Di Bonaventura G. et al. "Molecular characterization of virulence determinants of *Stenotrophomonas maltophilia* strains isolated from patients affected by cystic fibrosis". Internat J Immunopath Pharmacol 2007;Vol. 20:529-37
- E. Roscetto et al. "PCR-based rapid genotyping of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates" BMC Microbiol 2008 Nov 24;8:202.

Abstracts

- De Carolis E. et al. "Analisi proteomica di *Stenotrophomonas Maltophilia*" Congresso Società Italiana di Microbiologia (SIM), Genova 15-18 ottobre 2006.

- Del Chierico F. et al. "Caratterizzazione genetica e molecolare dei geni codificanti il flagello in ceppi di *Stenotrophomonas Maltophilia* isolati da pazienti con fibrosi cistica (FC)" Congresso Società Italiana di Microbiologia (SIM), Genova 15-18 ottobre 2006.

- Di Bonaventura G. et al. "Effetto di concentrazioni sub-inibenti di Moxifloxacin su *Stenotrophomonas Maltophilia* isolati da fibrosi cistica" Congresso Società Italiana di Microbiologia (SIM), Genova 15-18 ottobre 2006.

■ FFC Project#8/2005 "Genetic fingerprinting of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Italian cystic fibrosis patients: comparison with isolates from the environment and other clinical origins in Europe"

Graziana Manno (Dipart. Pediatria - Osp. "G. Gaslini" - Genova), Roberto Biassoni (Lab. Medicina Molecolare – Ist. Gaslini – Genova), Eugenio Agenore Debbia (DISCAT - Sez. Microbiologia "C.A. Romanzi" – Genova), Angela Sangiuliano (ARPAL - Dipart. Prove. di Genova)

Abstracts

- Morelli P. et al. "Pseudomonas aeruginosa in CF patients: acquisition sources, means of transmission and hypermutable phenotype occurrence" 1st European CF Young Investigator Meeting, Lille – France; 29-31 Aug. 2007

- Manno G. et al. "Occurrence of *P.aeruginosa* (PA) with hypermutable phenotype (HMP) in Italian CF patients" 30th European CF Conference, Belek (Turkey), 6-9 June 2007

- Manno G. et al. "Genetic fingerprinting of *Pseudomonas aeruginosa* from Italian CF patients: comparison with isolates from environment and other clinical origins in Europe" 30th European CF Conference. Belek (Turkey), 6-9 June 2007

■ FFC Project#9/2005 "Studies of the Quorum Sensing Systems of *Pseudomonas* and *Burkholderia*"

Vittorio Venturi (ICGEB Trieste)

Publications

- Rampioni G. et al. "The Quorum sensing negative regulator RsaL of *Pseudomonas Aeruginosa* binds to the lasI Promoter" Journal of Bacteriology (2006), vol. 188, No. 2, pp. 815-819.
- Solis R. et al. "Involvement of quorum sensing and RpoS in rice

seedling blight caused by Burkholderia plantarii" FEMS Microbiol Lett 259 (2006) 106-112

- Bertani I. et al. "The Pseudomonas putida Lon protease is involved in N-acyl homoserine lactone quorum sensing regulation" BMC Microbiol 2007 Jul 26; 7:71

- Devescovi G. et al. "Involvement of a Quorum-Sensing-Regulated Lipase Secreted by a Clinical Isolate of Burkholderia glumae in Severe Disease Symptoms in Rice" Applied and Environmental Microbiology, (2007); 73 (15): 4950-8

- Licciardello G. et al. "Pseudomonas corrugata contains a conserved N-acyl homoserine lactone quorum sensing system; its role in tomato pathogenicity and tobacco hypersensitivity response" FEMS Microbiol Ecol. (2007); 61 (2): 222-34

- Rampioni G. et al. "The Pseudomonas quorum sensing regulator RsaL belongs to the tetrahelical superclass of H-T-H proteins" Journal of Bacteriology, 2007, Vol. 189, No. 5, pp. 1922-1930

- Massa C. et al. "Isolation, heterologous and characterization of an endo-polygalacturonase produced by the phytopathogen Burkholderia cepacia". Protein Expression and Purification 2007; 54(2): 300-308

- Steindler L. et al. "Detection of quorum sensing N-acyl homoserine lactone signal molecules by bacterial biosensors" FEMS Microbiol Lett. 266 (2007)

■ FFC Project#6/2006 "Genome-wide identification of target genes for the design of non-conventional antibiotics against cystic fibrosis-related pathogens"

Giovanni Bertoni (Dipart. Scienze Biomolecolari e Biotecnologie - Univ. Milano), Alessandra Bragonzi (Istituto per il trattamento sperimentale della fibrosi cistica, Osp. S. Raffaele, Milano)

Abstracts

- Milani A., et al. "Functional genomics of the opportunistic pathogen Pseudomonas aeruginosa by interfering antisense RNA" 1st European CF Young Investigator Meeting, Lille, August 29-31 2007

■ FFC Project#7/2006 "Influence of Pseudomonas aeruginosa and CF host on Burkholderia cenocepacia pathogenicity"

Annamaria Bevvino (Dipart. Biotecnologie Agroindustr. e protezione della salute - ENEA - Casaccia - Roma), Fiorentina Ascenzioni (Dipart. Biologia cellulare e dello sviluppo - Univ. La Sapienza Roma), Alessandra Bragonzi (Ist. per il Trattamento speriment. della FC - Osp. San Raffaele - Milano)

Publications

- Pirone L. et al. "Burkholderia cenocepacia strains isolated from cystic fibrosis patients are apparently more invasive and more virulent than rhizosphere strains" Environmental Microbiology (2008) Oct;10(10):2773-84

Abstracts

- Pirone L. et al. "Influence of Pseudomonas aeruginosa on the growth rate and internalization of Burkholderia cenocepacia" 9° Convegno Nazionale FISV, Riva del Garda (TN), 26- 29 Sett. 2007

- Bevvino A. et al. "Influence of Pseudomonas aeruginosa on the growth rate and internalization of Burkholderia cenocepacia" 13th Italian Cystic Fibrosis Conference, Milan, 30 Nov. - 2 Dec. 2007, J. Cyst Fibrosis 2008; 7, suppl. 3: S16

- Paroni M. et al. "Pathogenicity of environmental Burkholderia cenocepacia strains" Poster + Oral communication: 10° Convegno FISV - Federazione italiana scienze della vita, Riva del Garda (Trento), 24-27 settembre 2009

- Pirone L. et al. "Dual-species biofilm formation and cell invasion of Pseudomonas aeruginosa and Burkholderia cenocepacia" 10° Convegno FISV - Federazione italiana scienze della vita, Riva del Garda (Trento), 24-27 settembre 2009

■ FFC Project#8/2006 "A genome-wide approach to the identification of novel targets for immuno-antibacterials in Pseudomonas aeruginosa"

Alessandra Bragonzi (Istituto per il trattamento sperimentale della fibrosi cistica, Osp. S. Raffaele, Milano) Giovanni Bertoni (Dipart. Scienze Biomolecolari e Biotecnologie - Univ. Milano), Maria Scarcelli (Centro Ricerche Chiron - Unità Bioinformatica - Siena)

Abstracts

- Bragonzi A. et al. " Pseudomonas aeruginosa pathogenicity within clonal strains from patients with cystic fibrosis" 13th Italian Cystic Fibrosis Conference, Milan, 30 Nov. - 2 Dec. 2007, J. Cyst Fibrosis 2008; 7, suppl. 3: S17

- Leone M. et al. "Chemical and biological characterization of lipopolysaccharide and peptidoglycan of Pseudomonas aeruginosa isolated from a patient at different stages of cystic fibrosis" Pediatric pulmonology, Suppl. 31, 2008. 22nd Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Orlando, Florida, 22-25 October 2008, p. 265.

- Bragonzi A. et al. "Genetic adaptation of Pseudomonas aeruginosa for the commitment to chronic lung infection" Pediatric pulmonology, Suppl. 31, 2008. 22nd Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Orlando, Florida, 22-25 October 2008, p. 342

■ FFC Project#9/2006 "Counteracting Pseudomonas aeruginosa biofilm formation by inhibition of novel targets: regulation of the levels of the di-cyclic-GMP signal molecule"

Paolo Landini (Università di Milano Dip.to Scienze Biomolecolari e Biotecnologie), Anna Bernardi (Università di Milano, Dip. chimica Organica ed Industriale), Pierfausto Seneci (Università di Milano, Dip. Chimica Organica e Industriale)

Publications

Antoniani D. et al. "Monitoring of diguanylate cyclase activity and of cyclic-di-GMP biosynthesis by whole-cell assays suitable for high-throughput screening of biofilm inhibitors" Appl Microbiol Biotechnol, August 2009, DOI 10.1007/s00253-009-2199-x, ahead of print.

• FFC Project#10/2006 "The role of RND drug efflux transporters in the intrinsic antibiotic resistance of Burkholderia cenocepacia"

Giovanna Riccardi (Università di Pavia Dip.to Genetica e Microbiologia), Miguel Valvano (Dept. of Microbiology and Immunology, University of Ontario, Canada)

Publications

- Buroni S. et al. "Assessment of three Resistance-Nodulation-Cell Division drug efflux transporters of Burkholderia cenocepacia in intrinsic antibiotic resistance" BMC Microbiology 2009, 9:200, http://www.biomedcentral.com/1471-2180/9/200 Abstracts

- Buroni S. et al. "The role of RND drug efflux transporters in intrinsic antibiotic resistance of Burkholderia cenocepacia" 28th National Meeting Società Italiana di Microbiologia generale e Biotecnologie micrbiiche, Spoleto, June 11-13, 2009

■ FFC Project#11/2006 "A structure-function investigation of exopolysaccharides and lipopolysaccharides produced by clinical strains of the Burkholderia cepacia complex and of their interaction with antimicrobial peptides of the host innate immune system"

Roberto Rizzo (Dipart. Biochimica, Biofisica e Chimica Macrocellulare - Univ. Trieste), Antonio Molinaro (Dipart. Chimica Organica e Biochimica - Univ. Napoli), Enrico Tonin (Dipart. Scienze Biomediche - Univ. Trieste)

Publications

- Herasimenka Y. et al. "Exopolysaccharides produced by Inquilinus limosus, a new pathogen of cystic fibrosis patients: novel structures with usual components" Carbohydrate Res. (2007); 342, 2404:2415

- De Soya A. et al. "Chemical and biological features of Burkholderia cepacia complex lipopolysaccharides" Innate Immunity (2008); 14(3); 127-144

- Herasimenka Y. et al. "Macromolecular properties of cepacian in water and dimethylsulphoxide" Carbohydr. Res. 343 (2008) 81-89

- Ieranò T. et al. "The structure and pro-inflammatory activity of the lipopolysaccharide from Burkholderia multivorans and the differences between clonal strains colonizing pre- and post-transplanted lungs" Glycobiology, 2008, 18: 871-881

- Cescutti P. "Bacterial capsular polysaccharides and exopolysaccharides" in "Microbial Glycobiology Structures, Relevance and Application" Eds. Moran A. P., Brennan P. J., Holst O., and von Itzstein M., Elsevier, 2009, 93-108

- Foschiatti M. et al. "Inhibition of cathelicidin activity by bacterial exopolysaccharides" Molecular Microbiology 72, 2009, 1137-1146

- Ieranò T. et al. "Structural and conformational behavior of the two lipopolysaccharide O-antigens produced by the cystic fibrosis pathogen Burkholderia multivorans" Chemistry European Journal, 2009, 15:7156:7166

Abstracts

- Furlanis L. et al. "Determinazione dell'unità ripetitiva del cepaciano traslocata nello spazio periplasmatico da una flippasi codificata dal gene bceQ" 37° Congresso Nazionale di Microbiologia, Torino11 - 14 Ottobre 2009

- Rizzo R. et al. "Aggregation properties of cepacian. A model for biofilm formation" 15th European Carbohydrate Symposium - Vienna Luglio 19 - 24, 2009

- Cescutti P. et al. "Identification of the gene involved in the transfer of cepacian repeating unit to the periplasmic space. Determination of the biological repeating unit of cepacian" 15th European Carbohydrate Symposium - Vienna Luglio 19 - 24, 2009

- Rizzo R. et al. "Aggregation properties of cepacian. A model for biofilm formation" 13th Annual Meeting of the International Burkholderia cepacia working group, 2009, April 23-26 University of Toronto - Canada

- Cescutti P. "Determination of the biological repeating unit of cepacian translocated to the periplasmic space by a flippase coded by the bceq gene" 13th Annual Meeting of the International Burkholderia cepacia working group, 2009, April 23-26 University of Toronto - Canada

- Molinaro A. "Analysis of endotoxin from B. cepacia" XI Convegno-Scuola sulla Chimica dei Carboidrati, Pontignano (Siena, Italy), June 22-26, 2008

- Silipo A. "Structure and pro-inflammatory activity of endotoxin from the Burkholderia cepacia complex" International Burkholderia Cepacia Working Group, Ca' Tron di Roncade (TV - Italy) April 14-17, 2008
- T. Ierano, "Analysis of endotoxins from *B. cepacia* complex" European CF Young Investigator Meeting, Lille (France), August 27 – 29, 2008
- T. Ierano' "Analysis of endotoxins from *B. cepacia* complex" Summer Course Glycosciences-10th European Training Course on Carbohydrates – Wageningen (The Netherlands), June 9-12, 2008
- Rizzo R. et al. "Structure and Functions of Exopolysaccharides Produced by *Inquilinus limosus*: A Pathogen of Cystic Fibrosis Patients" International carbohydrate symposium, Oslo (Norway), 27 July – 1 August 2008
- Furlanis L. et al. "L'esopolisaccaride batterico come fattore di patogenicità nelle infezioni respiratorie da *Burkholderia cepacia*" 36° Congresso Società italiana di Microbiologia, Roma (Italy) 12-15 ottobre 2008
- Cescutti P. et al. "Structure-function relationships in cepacian biofilm formation" 14th European Carbohydrate Symposium, Lubeck 3-7 September 2007
- Cescutti P. et al. "Structure-function relationships in cepacian biofilm formation" XVIII convegno dell'Associazione Italiana di Scienza e Tecnologia delle Macromolecole, Catania 16-20 September 2007
- Cescutti P. et al. "Exopolysaccharides as bacterial defence tools: the case of *Burkholderia cepacia* Complex" XIV European Meeting on Carbohydrates, Lubeck, September 3-7, 2007

■ FFC Project#14/2006 **"Longitudinal study of *Pseudomonas aeruginosa* resistance: selection and evolution of resistance mechanisms in relation to antibiotic treatment in cystic fibrosis patients"**

Anna Silvia Neri (Dipart. Pediatria - Centro FC - Ospedale Meyer – Firenze), Gianmaria Rossolini (Dipart. Biologia Molecolare – Policlinico "Le Scotte" - Siena)

Abstracts

- Campana S. et al. "Pseudomonas aeruginosa e metallo beta-lattamasi in pazienti affetti da fibrosi cistica: prevalenza e persistenza nel tempo" XII Congresso Italiano della Fibrosi Cistica, Firenze 23-25 Nov. 2006
- Campana S. et al. "Persistence of metallo -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients" 30th European CF Conference, Belek, Turkey; 13-16 June 2007
- Pollini S. et al. "Pseudomonas aeruginosa e metallo- lattamas in pazienti con fibrosi cistica: prevalenza e persistenza" XXXVI Congresso Nazionale – Associazione Microbiologi Clinici Italiani, Rimini; 2-5 Ottobre 2007.
- Mugnaioli C. et al. "Meccanismi di resistenza acquisita in *Pseudomonas Aeruginosa* da pazienti con fibrosi cistica cronicamente colonizzati" XXXVII AMCLI, 2008, Stresa (VB), 5-8 Ottobre; NACFC, 2008, Orlando (Florida, USA), 23-25 October
- Mugnaioli C. et al. "Evolution of acquired resistance mechanism in *Pseudomonas Aeruginosa* isolated from chronically-infected cystic fibrosis patients" XXXVII AMCLI, 2008, Stresa (VB), 5-8 Ottobre; NACFC, 2008, Orlando (Florida, USA), 23-25 October

- FFC Project#6/2007 "Dissecting a surface target candidate for the rational design of novel antibacterial drugs against *Pseudomonas aeruginosa*"

Francesco Bonomi (Dipartimento di Scienze Molecolari Agroalimentari, Università degli Studi di Milano), Giovanni Bertoni(Dipartimento di Scienze Biomolecolari e Biotecnologie, Università di Milano)

Abstracts

- Milani A. et al. "Analysis of a novel membrane protein in the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*" Poster ed abstract: 28th National Meeting Società Italiana di Microbiologia generale e Biotecnologie micobiche, Spoleto, June 11-13, 2009.
- Milani A. et al. "Analysis of a novel membrane protein in the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*" Poster: 10° Convegno FISV – Federazione italiana scienze della vita, Riva del Garda (Trento), 24-27 settembre 2009.
- Iametti S. et al. "A fluorescence-based assay for bacterial transglutaminase activity" Poster: VII European Symposium of the Protein Society, Zurich (Switzerland), June 14-18, 2009.

■ FFC Project#7/2007 **"*Stenotrophomonas maltophilia*, a multidrug resistant emergent pathogen associated to cystic fibrosis: a post genomic approach to identify new immunological and therapeutic targets"**

Bianca Colonna (Dipart. Biologia Cellulare e dello Sviluppo - Lab. Microbiologia Molecolare - Univ. La Sapienza – Roma), Maurizio Sanguinetti (Ist. Microbiologia - Univ. Sacro Cuore – Roma), Mauro Nicoletti (Dipart. Scienze Sanità Pubbl. - Sez. Microbiologia - Univ. La Sapienza – Roma), Mariassunta Casalino (Dipart. Microbiologia – Univ. Roma 3)

Publications

- Di Bonaventura G. et al. "Molecular characterization of virulence determinants of *Stenotrophomonas maltophilia* strains isolated from patients affected by cystic fibrosis" Int. J. Immunopathol. Pharmacol., 2007, Vol. 20, n. 3, pp. 529-537.
- Rossetto E. et al. "PCR-based rapid genotyping of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates", BMC Microbiol, 2008, 8:202 doi:10.1186/1471-2180-8-202
- Rocco F. et al. "Stenotrophomonas maltophilia isolated from patients affected by cystic fibrosis: genotyping analysis and molecular characterisation of virulence determinants" Int. J. Med. Microbiol., 2009, Jun 30 (Ahead of print)
- Rocco F. et al. "Stenotrophomonas maltophilia genomes: a start-up comparison" Int. J. of Med Microbiol 299 (2009) 535-546
- Pomilio A. et al. "Adhesion to and biofilm formation on IB3-1 bronchial cells by *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from cystic fibrosis patients" BMC Microbiology 2010, 10:102
- Di Bonaventura G. et al. "Role of Excessive Inflammatory Response to *Stenotrophomonas maltophilia* Lung Infection in DBA/2 Mice and Implications for Cystic Fibrosis" Infection and Immunity June 2010, Vol. 78, (6):2466-76
- Nicoletti M. et al. "Stenotrophomonas maltophilia strains from cystic fibrosis patients: genomic variability an molecular characterization of some virulence determinants" Int J of Med Microbiol 301 (2011):34-43
- De Carolis E. et al. "Analysis of heat-induced changes in protein expression of *Stenotrophomonas maltophilia* K279a reveals a role for GroEL in the host-temperature adaption" Int J Med Microbiol. 2011 Apr;301(4):273-81

Abstracts

- Bonaventura G. et al. "Effetto di concentrazioni subinibenti di moxifloxacinica su *Stenotrophomonas maltophilia* isolati da fibrosi cistica" 34° Congresso nazionale della Società Italiana di Microbiologia, Genova 15-18 ottobre 2006.
- Prosseda G. et al. "Virulence factors of *Stenotrophomonas maltophilia*, an emergent pathogen associated to cystic fibrosis" 9° Convegno Nazionale FISV, Riva del Garda (TN), 26- 29 Sett. 2007
- Casalino M. et al. "Molecular characterization of *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from cystic fibrosis patients" 9° Convegno Nazionale FISV, Riva del Garda (TN), 26- 29 Sett. 2007
- Di Bonaventura G. et al. "Interazione in vitro tra *Stenotrophomonas maltophilia* e cellule epiteliali bronchiali IB3-1: implicazioni in fibrosi cistica" 35° Congresso nazionale della Società Italiana di Microbiologia, Catania 30 settembre – 3 ottobre 2007
- Ficarelli E. et al. "Stenotrophomonas maltophilia isolated from patients affected by cystic fibrosis: genotyping analysis and molecular characterisation of virulence determinants" 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Barcelona, 19-22 April 2008
- Di Bonaventura G. et al. "Adhesion to and biofilm formation on IB3-1 bronchial cells by *Stenotrophomonas maltophilia*: implications in cystic fibrosis" 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Barcelona, 19-22 April 2008
- Ficarelli E. et al. "Caratterizzazione molecolare di ceppi di *Stenotrophomonas maltophilia* isolati da pazienti con fibrosi cistica" 36° Congresso nazionale della Società Italiana di Microbiologia, Roma 12-15 ottobre 2008.
- Di Bonaventura G. et al. "Caratterizzazione fenotipica e genotipica della formazione di biofilm da parte di *Stenotrophomonas maltophilia* isolati da pazienti con fibrosi cistica" 36° Congresso nazionale della Società Italiana di Microbiologia, Roma 12-15 ottobre 2008.
- Di Bonaventura G. et al. "Patogenesi microbica in fibrosi cistica: clearance di *Stenotrophomonas maltophilia* ed infiammazione in un modello murino di infezione polmonare" 36° Congresso nazionale della Società Italiana di Microbiologia, Roma 12-15 ottobre 2008.
- Michelacci V. et al. "Identification of genes expressed at the host temperature in *S. maltophilia*, an emergent pathogen in CF patients" 7th Louis Pasteur Conference on Infectious Disease, 11-13 Novembre 2008, Paris, France.
- Cipresso R. et al. "Epidemiology of health care-associated *Stenotrophomonas maltophilia* infections in CF and ICU patients: role of biofilm formation. Clinical Microbiology and Infection" 2009; 15(s4):S401. Proceedings of the 19th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID), Helsinki, Finland.
- Iacobino A. et al. "Analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* virulence factors" SIMGBM 11-13 giugno 2009, Spoleto.
- Barchitta M. et al. "Ruolo epidemiologico del biofilm in isolati di *Stenotrophomonas maltophilia* da pazienti con fibrosi cistica e da pazienti ricoverati in unità di terapia intensiva" XI° Conferenza Nazionale di Sanità Pubblica, Napoli 2009
- Iacobino A. et al. "Virulence factors of *Stenotrophomonas maltophilia*: an opportunistic pathogen" FISV2009 11th Annual Congress Riva del Garda, 23-25 Sept.2009.
- Ciavardelli D. et al. "Alterazione dei livelli tessutali di ioni metallici

in un modello murino di infezione polmonare da *Stenotrophomonas maltophilia*" XXXVII Congresso Nazionale della Società Italiana di Microbiologia, Torino 11-14 Ottobre 2009.

- Picciani C et al. "Analisi proteomica del biofilm formato da un ceppo di *Stenotrophomonas maltophilia* isolato da fibrosi cistica" XXXVII Congresso Nazionale della Società Italiana di Microbiologia, Torino 11-14 Ottobre 2009.

- Nicoletti M. et al. "Analisi genotipica e caratterizzazione molecolare di determinanti di virulenza espressi da ceppi di *Stenotrophomonas maltophilia* isolati da pazienti affetti da fibrosi cistica" XXXVII Congresso Nazionale della Società Italiana di Microbiologia, Torino 11-14 Ottobre 2009.

- De Carolis E. et al. "Caratterizzazione e analisi molecolare dell'espressione dell'operone groESL di *Stenotrophomonas maltophilia*" XXXVII Congresso Nazionale della Società Italiana di Microbiologia, Torino 11-14 Ottobre 2009.

■ FFC Project#9/2007 "Burkholderia cepacia complex: closing down on the major virulence factors"

Vittorio Venturi (ICGB Trieste)

Publications

- Rampioni G. et al. "RsaL provides quorum sensing homeostasis and functions as a global regulator of gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*" *Molec. Microbiol.* (2007) 66 (6), 1557-1565

- Licciardello G. et al. "Pseudomonas corrugata contains a conserved N-acyl homoserine lactone quorum sensing system; its role in tomato pathogenicity and tobacco hypersensitivity response" *FEMS Microbiol Ecol* 61 (2007) 222-234.

- Steindler L. et al. "The presence, type and role of N-acyl homoserine lactone quorum sensing in fluorescent *Pseudomonas* originally isolated from rice rhizospheres are unpredictable" *FEMS Microbiol. Lett.* 288 (2008) 102-111.

- Steindler L. et al. "LasI/R and RhlI/R Quorum Sensing in a strain of *Pseudomonas aeruginosa* beneficial to plants" *Appl. Environ. Microbiol.*, August 2009, p. 5131-5140.

- Netoeta S. et al. "A simple model for the early events of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*: modeling bacterial swarming as the movement of an "activation zone" *Biology direct* 2009, 4:6, <http://www.biology-direct.com/content/4/1/6>

■ FFC Project#8/2007 "The structure and immunological activity of lipopolysaccharide and peptidoglycan of *Ps aeruginosa* before and after the onset of chronic infection"

Antonio Molinari (Dip. di Chimica Organica e Bioch. - Univ. di Napoli Federico II, Complesso Universitario Monte Santangelo, Napoli), Maria Lina Bernardini (Dip. Biol. Cell. - Univ. La Sapienza, Roma)

Publications

- Cigana C. et al. "Pseudomonas aeruginosa Exploits Lipid A and Muropeptides Modification as a Strategy to Lower Innate Immunity during Cystic Fibrosis Lung Infection" *PLoS ONE*, December 2009, Vol. 4, Issue 12, e8439

■ FFC Project#10/2007 "Iron uptake and quorum sensing in Pseudomonas aeruginosa virulence"

Paolo Visca (Dip. Biologia – Lab. Microbiologia Clinica e Virologia – Univ. Roma 3), Livia Leoni (Dip. Biologia – Lab. Microbiologia Molecolare e Biotecnologie dei Microorganismi – Univ. Roma 3)

Publications

- Gaines J. M. et al. "Regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* *toxA*, *regA* and *ptxR* genes by the iron-starvation sigma factor *PvdS* under reduced levels of oxygen" *Microbiology* (2007) Vol 153: 4219-33

- Tiburzi F. et al. "Intracellular levels and activity of *PvdS*, the major iron starvation sigma factor of *Pseudomonas aeruginosa*" *Mol. Microbiol.* (2008) Vol. 67: 213-227

- Rampioni G. et al. "RsaL provides quorum sensing homeostasis and functions as a global regulator of gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*" *Mol. Microbiol.* (2007) Vol. 66: 1557-1565

- Imperi F. et al. "Membrane-association determinants of the -amino acid monooxygenase *PvdA*, a pyoverdine biosynthetic enzyme from *Pseudomonas aeruginosa*" *Microbiology*, 2008 Sept., 154(Pt 9):2804-13

- Tiburzi F. et al. "Is the host heme incorporated in microbial heme-proteins?" *IUBMB Life*, 61(1):80-83 January 2009

- Imperi F. et al. "Analysis of the periplasmic proteome of *Pseudomonas aeruginosa*, a metabolically versatile opportunistic pathogen" *Proteomics* 2009, 9, 1901-1915

- Imperi F. et al. "Transcriptional control of the *pvdS* iron starvation sigma factor gene by the masterregulator of sulphur metabolism *CysB* in *Pseudomonas aeruginosa*" *Environ. Microbiol.* (2010) Vol. 12(6): 1630-1642

- Imperi F. et al. "Molecular basis of pyoverdine siderophore recycling in *Pseudomonas aeruginosa*" *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Dec 1;106(48):20440-5

Abstracts

- Rampioni G. et al. "RsaL is a global regulator controlling quorum sensing homeostasis and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*" *ASM Conference Pseudomonas 2007*, Seattle, Washington, 26-30 August 2007, pp. 15-16.

- Rampioni G. et al. "RsaL, a quorum sensing homeostatic effector controlling virulence and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*" 9° Convegno Nazionale FISV, Riva del Garda (TN), 26-29 Sett. 2007

- Rampioni G. et al. "RsaL is a global regulator controlling quorum sensing homeostasis and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*" *ASM Conference Cell-Cell Communication in Bacteria*, Austin, Texas, 7-10 October 2007, p. 41

- Tiburzi F. et al "A new regulator involved in the control of pyoverdine synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: the role of the LysR-type transcriptional regulator *CysB*" 28th National Meeting Società Italiana di Microbiologia generale e Biotecnologie microbiche, Spoleto, June 11-13, 2009.

■ FFC Project#6/2008 "Design of non-conventional antibiotics against cystic fibrosis-related pathogens"

Giovanni Bertoni (Dipartimento di Scienze Biomolecolari e Biotecnologie, Università degli Studi di Milano), Stefano Maiorana (Dip. Chimica Organica e Industriale, Università degli Studi di Milano)

Degree thesis

Luca Sorrentino "Disegno ed utilizzo di oligomeri antiseno nel batterio patogeno opportunista *Pseudomonas aeruginosa*" Università degli Studi di Milano – A.A. 2009-2010

■ FFC Project#7/2008 "Burkholderia cenocepacia pathogenicity: synergistic interactions with *Pseudomonas aeruginosa* and adaptation to CF host"

Annamaria Bevivino (ENEA C.R. Casaccia - Biotecn. Agroindustriale e Protezione della Salute), Fiorentina Ascensioni (Dip. Biologia Celulare e dello Sviluppo - Univ. La Sapienza)

Abstracts

- Pirrone L. et al. "Interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cenocepacia* strains in biofilm and in a mouse model of chronic infection" *Eurobiofilms*, Rome, 2-5 September 2009

- Paroni M. et al. "Interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cenocepacia* strains in biofilm and in a mouse model of chronic infection" Poster + oral communication: XV Congresso Italiano della Fibrosi Cistica – V Congresso SIFC, 1-4 ottobre 2009, Soverato, Squillace, (CZ)

- Paroni M. et al. "Pseudomonas aeruginosa and Burkholderia cenocepacia polymicrobial interactions in biofilm and murine model of chronic infection" XXVIII Convegno nazionale SIMGBM, Società Italiana di Microbiologia generale e Biotecnologie microbiche, Spoleto, 11/13 Giugno 2009

- Paroni M. et al. "Pseudomonas aeruginosa and Burkholderia cenocepacia polymicrobial interactions in biofilm and murine model of chronic infection" 23rd Annual North American Cystic Fibrosis Congress, Minneapolis, Minnesota, 15-17 October 2009.

- Farulla I et al "Clinical and environmental *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cenocepacia* strains: dual-species interactions in biofilm and in a mouse model of chronic infection" Environmental Microbiology Meeting (BMMA) 2010, 21-22 May, Bertinoro (FC), Italy

- Paroni M et al "Pseudomonas aeruginosa and Burkholderia cenocepacia polymicrobial interactions in biofilm and in a murine model of chronic infection" *Pseudomonas* 2010, *Pseudomonas* in the Test Tube and in the Environment, 28-29 January 2010, Milan, Italy

■ FFC Project#8/2008 "Development and validation of a novel screening system for the identification of *Pseudomonas aeruginosa* virulence inhibitor"

Livia Leoni (Lab. Microbiologia molecolare e Biotecnologie dei microrganismi, Dip. Biologia, Università "Roma 3"), Paolo Visca (Lab. Microbiologia clinica e Virologia, Dip. Biologia, Università "Roma Tre")

Publications

- Rampioni G. et al. "Contribution of the *RsaL* global regulator to *Pseudomonas aeruginosa* virulence and biofilm formation" *FEMS Microbiol Lett* 301 (2009): 210-217

- Imperi F et al "Molecular basis of pyoverdine siderophore recycling in *Pseudomonas aeruginosa*" *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009. 48:20440-5.

- Imperi F et al "Transcriptional control of the *pvdS* iron starvation sigma factor gene by the master regulator of sulfur metabolism *CysB* in *Pseudomonas aeruginosa*" *Environ Microbiol.* 2010. 6:1630-42.

- Massai F. et al "A multitask biosensor for micro-volumetric detection of N-3-oxo-dodecanoyl-homoserin lactone quorum sensing signal" Biosensors and Bioelectronics. 2010. Submitted.

Abstracts

- Rampioni G. et al. "Role of the RsaL quorum sensing regulator in *Pseudomonas aeruginosa* pathogenic potential" 28th National Meeting Società Italiana di Microbiologia generale e Biotecnologie micròiche, Spoleto, June 11-13, 2009
- Rampioni G. et al. "Role of the RsaL quorum sensing regulator in *Pseudomonas aeruginosa* pathogenic potential" Pseudomonas XII Conference, August 3-17 2009, Hannover, Germany
- Rampioni G. et al. "The RsaL quorum sensing regulator controls surface motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*" Eurobiofilms, Rome, 2-5 September 2009
- Longo F. et al. "Picking up *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing regulators" 28th National Meeting Società Italiana di Microbiologia generale e Biotecnologie micròiche, Spoleto, June 11-13, 2009
- Massai F. et al. "Development and validation of screening systems for the identification of *Pseudomonas aeruginosa* virulence inhibitors" 28th National Meeting Società Italiana di Microbiologia generale e Biotecnologie micròiche, Spoleto, June 11-13, 2009

■ FFC Project#10/2008 "Essential proteins of *Pseudomonas aeruginosa* other membrane biogenesis as novel targets for new anti-microbial drugs design and synthesis"

Alessandra Polissi (Dipartimento Biotecnologie e Bioscienze - Università Bicocca Milano), Gianni Dehò (Dipartimento Scienze Biomolecolari e Biotecnologie - Università di Milano), Cristina De Castro (Dipartimento di Chimica e Biochimica Organica - Università di Napoli "Federico II"), Martino Bolognesi (Dipartimento Scienze Biomolecolari e Biotecnologie - Università di Milano), Laura Cipolla (Dipartimento Biotecnologie e Bioscienze - Università Bicocca Milano), Luca De Gioia (Dipartimento Biotecnologie e Bioscienze - Università Bicocca Milano)

Publications

- Sommaruga S. et al. "Structure prediction and functional analysis of KdsD, an enzyme involved in lipopolysaccharide biosynthesis" Biochemical and Biophysical Research Communication, 388 (2009) 222-227
- Airoldi C. et al "Targeting Bacterial Membranes: Identification of *Pseudomonas aeruginosa* d-Arabinose-5P Isomerase and NMR Characterisation of its Substrate Recognition and Binding Properties" ChemBioChem DOI: 10.1002/cbic.201000754

Abstracts

- Airoldi C. et al. "D-arabinose-5-phosphate isomerase: NMR characterisation of natural substrates recognition and binding requirements" Biotech.org - Chimica Organica e Biotecnologie: Sfide e Opportunità, May 20-23, 2009, Forte dei marmi (Lucca)
- Sommaruga S. et al. "3D structure by homology modeling of the *Escherichia coli* KdsD, an enzyme involved in lipopolysaccharide biosynthesis" FISV 2008 10th Annual Congress (Riva del Garda - TN, 24-27 Settembre 2008)
- Airoldi C. et al. "NMR as tool for the characterization of carbohydrate processing enzymes: the example of *E. coli* arabinose 5-phosphate isomerase (API)" XI Convegno-Scuola sulla Chimica dei Carboidrati, 22-26 Settembre 2008, Pontignano (Siena)
- Sommaruga S. et al. "Structural and biochemical characterization of KdsD, an enzyme involved in lipopolysaccharide biosynthesis" XXVIII Convegno nazionale SIMGBM, Società Italiana di Microbiologia generale e Biotecnologie micròiche, Spoleto, 11/13 Giugno 2009
- Sperandeo P. et al. "Biogenesis of lipopolysaccharide, an immunomodulatory molecule of the outer membrane of Gram-negative bacteria" XXVIII Convegno nazionale SIMGBM, Società Italiana di Microbiologia generale e Biotecnologie micròiche, Spoleto, 11/13 Giugno 2009
- Polissi A. "Biogenesis of outer membrane of Gram-negative bacteria: new genes implicated in Lipopolysaccharide transport to the cell surface" Meeting on: Cellular Lipid Transport Processes and their Role in Human Disease, October 22-26, 2008 Canmore (Alberta, Canada)

■ FFC Project#11/2009 "Community-acquired MRSA and hospital-acquired MRSA in cystic fibrosis patients: a multicentre study regarding antibiotic susceptibility, epidemiology, natural history and clinical relevance"

Silvia Campana (Dipart. Pediatria – Centro Fibrosi Cistica - Ospedale Meyer – Firenze)

Abstracts

- Cocchi P et al "Molecular characterization of MRSA involved in persistent lung infections in cystic fibrosis patients: emergence of epidemic clones" XXXIII ECFS Conference, Valencia, Spain 2010
- Cocchi P et al "Diffusion of MRSA strains in the Italian CF popula-

tion: a multicenter study" XXIV NACFC Conference Baltimore 2010

■ FFC Project#12/2009 "Novel strategies for respiratory infection therapy in CF. Use of natural and designed antibacterial peptides"

Renato Gennaro (Dipart. Scienze della Vita, Università di Trieste), Giovanni Di Bonaventura (Dip. Scienze Biomediche – Univ. "G. D'Annunzio" Pescara), Ersilia Fiscarelli (Osp. Pediatrico "Bambini Gesù", Roma)

Abstracts

- Di Bonaventura G. et al. "Attività antibatterica ed anti-biofilm di bmap-27 e bmap-28 verso ceppi multiresistenti isolati da pazienti affetti da fibrosi cistica" VI Congresso Nazionale della Società Italiana per lo studio della Fibrosi Cistica; Rimini, 18-21 novembre 2010
- Di Bonaventura G. et al. "In vitro bactericidal and anti-biofilm activity of bovine myeloid antimicrobial peptides against multidrug-resistant bacteria from patients with cystic fibrosis" poster at 21 st ECCMID – 27 th ICC, Milan, Italy 7-10 May 2011
- Pomilio A. et al., "Attività antibatterica ed anti-biofilm del peptide P19(9/B) verso isolati multi resistenti da pazienti affetti da fibrosi cistica" XXXIX Congresso Nazionale della Società Italiana di Microbiologia, Riccione, 3-6 ottobre 2011

■ FFC Project#13/2009 "Prevention of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation by inhibition of cyclic-di-GMP (c-di-GMP) metabolism"

Paolo Landini (Dipartimento Scienze Biomolecolari e Biotecnologia - Università degli Studi di Milano), Pierfausto Seneci (Dipartimento Chimica organica e industriale - Università degli Studi di Milano), Anna Bernardi (Dipartimento Chimica organica e industriale - Università degli Studi di Milano), Francesca Cutruzzola (Dipart. Scienze Biochimiche - Università "La Sapienza" Roma)

Publications

- Antoniani D. et al. "Discovery of novel inhibitors of bacterial biofilm formation targeting enzymes involved in the metabolism of the second messenger cyclicdi-GMP" 2010, Special Abstracts / Journal of Biotechnology 150S-S101 (Published Meeting Abstract).
- Stelitano V. et al. "Structure and function of representative HD-GYP proteins controlling biofilm formation" Manuscript in preparation

Abstracts

- Antoniani D. et al. "Inhibition of metabolism of the signal molecule cyclic-di-GMP affects biofilm formation in *Escherichia coli*", Cortona, Procarioti 2010, 14-15 April 2010, Cortona (AR) (oral presentation)
- Antoniani D. et al. "Discovery of novel inhibitors of bacterial biofilm formation targeting enzymes involved in the metabolism of the second messenger cyclicdi-GMP" 14th International Biotechnology Symposium and Exhibition, 14-18 September 2010, Rimini (oral presentation)
- Stelitano V. et al. "Characterization of proteins from *Pseudomonas aeruginosa* involved in c-di-GMP turnover" 36th FEBS Congress "Biochemistry for Tomorrow's Medicine" Torino, 25-30 June 2011 (oral presentation)
- Stelitano V. et al. "In vitro characterization of the two HD-GYP phosphodiesterases from *Pseudomonas aeruginosa* involved in c-di-GMP-dependent biofilm formation" EMBO Meeting 2011, Vienna (Austria) 10-13 September 2011 (poster presentation)
- Stelitano V. et al. "In vitro characterization of the two HD-GYP phosphodiesterases from *Pseudomonas aeruginosa* involved in c-di-GMP-dependent biofilm formation" 29° SIMGBM meeting 20-23 September 2011, Pisa (poster presentation)
- Rinaldo S. et al. "Inhibition of bacterial biofilms: new molecular strategies targeting diguanylate cyclase" 29° SIMGBM meeting 20-23 September 2011, Pisa (poster presentation)

■ FFC Project#14/2009 "In vivo characterization of a novel branched antimicrobial peptide specific for Gram-negative bacteria. Efficacy in *P. aeruginosa* lung infection and pharmacological profile"

Alessandro Pini (Dipart. di Biologia Molecolare, Sezione di Chimica Biologica, Università di Siena)

Publications

- Pini A. et al. "A novel tetrabranched antimicrobial peptide that neutralizes bacterial lipopolysaccharide and prevents septic shock in vivo" The FASEB J. 2010 24:1015-22
- Pini A et al. "Efficacy and toxicity of the antimicrobial peptide M33 produced with different counter-ions" Amino Acids, 2011 Oct 8. [Epub ahead of print]

Abstracts

- Pini A. et al. "A novel tetrabranched antimicrobial peptide that neutralizes bacterial lipopolysaccharide and prevents septic shock in vivo" Gordon Research Conference on Chemistry and Biology of Peptides February 28-March 5 2010, Ventura, CA, USA
- Pini A. et al. "A novel tetrabranched antimicrobial peptide that neutralizes bacterial lipopolysaccharide and prevents septic shock in vivo" 12th Naples Workshop on bioactive peptides-2nd Italy-Korea Symposium on antimicrobial peptides. 4-7 June 2010, Naples, Italy

- Pini A. et al. "A novel tetrabranched antimicrobial peptide that neutralizes bacterial lipopolysaccharide and prevents septic shock in vivo" 31st European Peptide Symposium, 5-7 September 2010, Copenhagen, DK

■ FFC Project#15/2009 **"The role of RND transporters in Burkholderia cenocepacia life by microarray analysis"**

Giovanna Riccardi (Dipart. Genetica e microbiologia – Università degli Studi di Pavia)

Publications

- Perrin E. et al. "Exploring the HME and HAE1 efflux systems in the genus Burkholderia" BMC Evolutionary Biol (2010), 10:164
- Coenye T. et al., "Molecular mechanisms of chlorhexidine tolerance in Burkholderia cenocepacia biofilms" Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 55: 1912-1919
- Bazzini S. et al. "Deciphering the role of RND efflux transporters in Burkholderia cenocepacia" PLoS One. 2011 Apr 19;6(4):e18902
- Pasca M. et al. "Evaluation of fluoroquinolone resistance mechanisms in Pseudomonas aeruginosa MDR clinical isolates" Microbial Drug Resistance, 2011 Jul 28. [Epub ahead of print]

Abstracts

- Perrin E. et al., "Exploring the HME and HAE1 efflux systems in the genus Burkholderia" Cortona, Procarioti 2010, Cortona (AR), 14-15 Aprile 2010
- Perrin E. et al., "Evolution of the HME and HAE1 efflux systems in the genus Burkholderia" Convegno SIBE, Milano, 2-4 Settembre 2010
- Fani R. et al., "Genomic, transcriptomic, and phenomic analysis of Burkholderia cepacia mutants impaired in HAE efflux pumps" 2nd Florence Conference on Phenotype MicroArray Analysis of Microorganisms, Firenze, 13-15 Settembre 2010
- Pasca MR. et al., "Pompe di efflusso e farmacoresistenza di stitipi di Pseudomonas aeruginosa isolati presso la fondazione IRCCS S. Matteo di Pavia" XXXIX Congresso Nazionale AMCLI, Rimini, 20-22 Ottobre 2010
- Bazzini S. et al., "Deciphering the role of RND efflux transporters in Burkholderia cenocepacia" Convegno Congiunto DGM-CNR, Pavia, 22-23 Febbraio 2011
- Buroni S. et al., "The role of RND efflux transporters in Burkholderia cenocepacia life" International Burkholderia cepacia Working Group-15th Annual Meeting, Praga (Repubblica Ceca), 13-16 Aprile 2011.
- Bazzini S. et al., "Deciphering the role of RND efflux transporters in Burkholderia cenocepacia" I discepoli di Adriano Buzzatini-Traverso: la Genetica Molecolare tra Università e CNR, Pavia, 24 Maggio 2011.
- Buroni S. et al., "Deciphering the role of RND efflux transporters in Burkholderia cenocepacia" FEMS 2011, 4th Congress of European Microbiologists, Geneva (Switzerland), 26-30 Giugno 2011.
- Bazzini S. et al., "New insight into Burkholderia cenocepacia RND efflux systems" SIMGBM 29th Annual Meeting, Pisa, 21-23 Settembre 2011.
- Perrin E. et al., "In silico analysis of RND superfamily in the Burkholderia genus" SIMGBM 29th Annual Meeting, Pisa, 21-23 Settembre 2011.
- Papaleo M.C. et al., "Analyzing the role of RND efflux transporters in Burkholderia cenocepacia: a proteomic analysis" SIMGBM 29th Annual Meeting, Pisa, 21-23 Settembre 2011.

■ FFC Project#16/2009 **"In vitro and in vivo studies of novel antimicrobials targeting bacterial cytoskeleton and cell surface virulence markers in the treatment of Burkholderia cepacia complex infection"**

Alba Silipo (Dipartimento di Chimica Organica e Biochimica - Università degli Studi "Federico II" - Napoli), Anthony De Soyza (Dipartimento di Medicina Respiratoria, Freeman Hospital - Gruppo di Immunobiologia Applicata e Trapianti, Istituto di Medicina cellulare - The Medical School University of Newcastle)

Publications

- Nicholson A. et al. "In vitro activity of S-(3,4-dichlorobenzyl)isothiourea hydrochloride and novel structurally related compounds against multi-drug resistant bacteria including Pseudomonas aeruginosa and Burkholderia cepacia complex" 2010, Int. Journal of Antimicrobial Agents: In press

Abstracts

- Carnell S. et al., "The bacterial cytoskeleton-A new antimicrobial target in cystic fibrosis pathogens?" In: Thorax: British Thoracic Society Winter Meeting. 2010, Westminster, UK: BMJ Group
- Carnell S. et al., "The bacterial cytoskeleton – a new antimicrobial target in cystic fibrosis pathogens?" International Burkholderia cepacia Working Group Annual Meeting, Prague, April 2011
- Carnell S. et al. "The bacterial cytoskeleton-complexities with a new antimicrobial target in cystic fibrosis pathogens"- British Association for Lung Research conference, Newcastle-upon-Tyne, July 2011

■ FFC Project#10/2010 **"Exploring thermostable quorum quenching lactonases to counteract bacterial infections in cystic fibrosis"**

Giuseppe Manco (Istituto di Biochimica delle Proteine CNR, Napoli); Davide Andrenacci (Istituto di Genetica e Biofisica CNR, Napoli)
Abstracts

- Porzio E. et al., "Exploring thermostable quorum quenching lactonases as a tool to interfere with Pseudomonas aeruginosa infections in cystic fibrosis" Cell Biology and Pharmacology of Mendelian Disorders, 7-11 October 2011, Vico Equense, Italy

■ FFC Project #14/2010 **"Non-conventional strategies against Pseudomonas aeruginosa infection: interference with iron homeostasis and quorum sensing"**

Paolo Visca (Dipart. Biologia, Università Roma Tre, Roma); Livia Leonini (Dipart. Biologia, Università Roma Tre, Roma)

Publications

- Bazzini S. et al., "Deciphering the role of RND efflux transporters in Burkholderia cenocepacia" 2011. PLoS One. 6:e18902.
- Venturi V. et al., "The virtue of temperance: built-in negative regulators of quorum sensing in Pseudomonas" Mol. Microbiol., 2011, submitted
- Rampioni G. et al., "Functional characterization of the quorum sensing regulator RsaL in the plant-beneficial strain Pseudomonas putida WCS358" Applied Environmental Microbiology, 2011, submitted

Abstracts

- Buroni S. et al., "The role of RND efflux transporters in Burkholderia cenocepacia life" International Burkholderia cepacia working group - 15th annual meeting. Praga, 13-16 Aprile 2011
- Longo F. et al., "Picking up novel Pseudomonas aeruginosa quorum sensing regulators" FEMS 2011- 4th Congress of European Microbiologists. Geneva, 26-30 giugno 2011
- Buroni S. et al., "Deciphering the role of RND efflux transporters in Burkholderia cenocepacia. FEMS 2011- 4th Congress of European Microbiologists. Geneva, 26-30 giugno 2011
- Imperi F. et al. "A new biosensor provides fast and cost-effective identification of Pseudomonas aeruginosa virulence inhibitors" FEMS 2011- 4th Congress of European Microbiologists. Geneva, 26-30 giugno 2011
- Bazzini S. et al. "New insight into Burkholderia cenocepacia RND efflux systems" SIMGBM 2011- 29th Congress of Italian Microbiologists. Pisa, 21-23 settembre 2011
- Longo F. et al. "Picking up novel Pseudomonas aeruginosa quorum sensing regulators" SIMGBM 2011- 29th Congress of Italian Microbiologists. Pisa, 21-23 settembre 2011
- Ramachandran Pillai C. et al., "Non conventional strategies against Pseudomonas aeruginosa: evaluation of efflux pumps inhibitors as anti-virulence drugs" SIMGBM 2011- 29th Congress of Italian Microbiologists. Pisa, 21-23 settembre 2011

4. INFLAMMATION Infiammazione

■ Progetti FFC#3/2002, FFC#10/2005 e FFC#17/2006 **"Roles of azithromycin other than bactericidal: relevance for therapy of cystic fibrosis"**

Paola Melotti (Lab. Patologia Molecolare - Centro FC – Ospedale Civile Maggiore – Verona)

Publications

- Cigana C. et al. "Azithromycin selectively reduces tumour necrosis factor alpha levels in Cystic Fibrosis airway epithelial cells" Antimicrobial agents and chemotherapy, Mar. 2007, vol. 51, No. 3, p. 975-981
- Cigana C. et al. "Anti-inflammatory effects of azithromycin in cystic fibrosis airway epithelial cells" Elsevier, Biochemical and Biophysical Research Communications 350 (2006) 977-982
- Nicolis E. et al. "The GCC repeat length in the 5'UTR of MRP1 gene is polymorphic: a functional characterization of its relevance for cystic fibrosis" BMC Med Genet. 2006 Feb 7;7:7.
- Cigana C. et al. "Effects of Azithromycin on the Expression of ATP Binding Cassette Transporters in Epithelial Cells from the Airways of Cystic Fibrosis Patients" J. of Chemotherapy (2007) 19; 643:649
- Bergamini G. et al. "Effects of Azithromycin (AZM) on Glutathione-S-Transferases (GST)s in cystic fibrosis airways cells" Am J Respir Cell Mol Biol, 2009 Aug;41(2):199-206

Abstracts

- Cigana C. et al. "Azithromycin reduces tumour necrosis factor alpha expression in CF airway epithelial cells" The 20th Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Denver, Colorado, Nov. 2-5, 2006
- Bergamini G. et al. "Azithromycin (AZM) decreases Glutathione-S-Transferase (GST)-T1 expression and activity in CF airway epithelial cells" 30th European Cystic Fibrosis Conference, Belek, Turkey, 13-16 June 2007

- Cigana C. et al. "Possible mechanisms of action of azithromycin in cystic fibrosis" 15th ERS Annual Congress. Copenhagen, Denmark – September 17-21 2005.
- Cigana C. et al. "Anti-inflammatory effects of azithromycin in cystic fibrosis airway epithelial cells" 16th European Congress of Immunology. Paris, 6-9 September 2006.
- Cigana C. et al. "Reduction of tumour necrosis factor alpha (TNF) expression by azithromycin (AZM) in CF airway epithelial cells" Journal of Cystic Fibrosis, 29th European Cystic Fibrosis Conference. Copenhagen, 15-18 June 2006.
- Nicolis E. et al. "Analisi della ripetizione GCC nel promotore del gene Multidrug Resistance-Associated Protein 1 (MRP1) in pazienti con Fibrosi Cistica (FC) 6° Congresso Nazionale S.I.G.U. Società Italiana di Genetica Umana – Verona 24 – 27 settembre 2003;
- Cigana C. et al. "Differential expression of the multidrug resistance-associated protein 1 in isogenic CF and non-CF human bronchial epithelial cells" Journal of Cystic Fibrosis 3 (2004) S4-S9 27th European CF Conference. Birmingham, UK 12 – 17 June 2004
- Pasetto M. et al. "Inhibitory effects of azithromycin on interleukin 8 expression by CF airway epithelial cells" Journal of Cystic Fibrosis 3 (2004) S20-S25 27th European CF Conference. Birmingham, UK 12 – 17 June 2004
- Pasetto M. et al. "Inhibitory effects of azithromycin on interleukin 8 production by Cystic Fibrosis airway epithelial cells" Paediatric Pulmonology – The 18th annual North American CF Conference – America's Center, St. Louis, Missouri, October 14-17, 2004;
- Cigana C. et al. "ATP binding cassette proteins: differential expression in isogenic cystic fibrosis and non-cystic fibrosis human bronchial epithelial cell lines" 7° Congresso Nazionale S.I.G.U. – Pisa 13 – 15 Ottobre 2004;
- Nicolis E. et al. "Is the GCC repeat polymorphic length in the Multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1) gene relevant for regulating transcriptional activity constitutively and in response to azithromycin (AZM)?" 28th European CF Conference - Crete. Greece: 22-25 June 2005;
- Cigana C. et al. "Azithromycin (AZM) inhibits Nuclear Factor-kB (NF-kB) activity and expression of interleukin 8 (IL8) in CF airway epithelial cells" Journal of Cystic Fibrosis 4 (2005) S26-S33; 28th European CF Conference - Crete. Greece: 22-25 June 2005;
- Cigana C. et al. "Effects of macrolides on interleukin 8 expression in cystic fibrosis airway epithelial cells" 4th National Conference SIICA; Brescia – June 8-11 2005;
- Cigana C. et al. "Regulation of pro-inflammatory transcription factors by azithromycin in Cystic Fibrosis airway epithelial cells" 2005 North American Cystic Fibrosis Conference – Baltimore, Maryland October 20-23 2005;
- Nicolis E. et al. "Meccanismi non antibiotici dell'Azitromicina: rilevanza per la terapia della fibrosi cistica" X Congresso Nazionale di Fibrosi Cistica – Palermo, 27-30 ottobre 2004
- Cigana C. et al. "Possible mechanisms of action of Azithromycin in cystic fibrosis" ERSNET, 2005
- Melotti P. "Detection of bacterial secretion variations among *Pseudomonas aeruginosa* strains by multidimensional protein identification technology" Rediscovering Biomarkers, San Diego, July 23-24 2007
- Bergamini G. et al. "Azithromycin (AZM) decreases Glutathione-S-Transferase (GST)-T1 and M1 (GSTM1) expression and activity in CF airway epithelial cells" North American Cystic Fibrosis Conference, Anaheim, California, 3-6 Oct. 2007
- Cigana C. et al. "Relevance of oxygen limitation on *Pseudomonas aeruginosa* strains: effects on released proteins expression" North American Cystic Fibrosis Conference, Anaheim, California, 3-6 Oct. 2007
- Cigana C. et al. "Mudpit analysis of *Pseudomonas aeruginosa* secretome: consequences of oxygen limitation in clinical and laboratory strains" 13th Italian Cystic Fibrosis Conference, Milan, 30 Nov. – 2 Dec. 2007, J. Cyst Fibrosis 2008; 7, suppl. 3: S16
- Cigana C. et al. "Proteins released from *Pseudomonas aeruginosa* (PA) referent and clinical strains under microaerobiosis and their effects on cystic fibrosis airways" 31st European CF Conference, Prague, June 11-14, 2008

■ FFC Project# 7/2003 "Proteomics of the airway surface liquid: implications for cystic fibrosis"

Olga Zegarra Moran (Lab. Gen. Molec. - Ist. Gaslini – Genova), Giovanni Candiano (Lab. Nefrologia - Ist. "G. Gaslini" – Genova), Luca Bini (Dipart. Biologia Molecolare - Univ. Siena)

Publications

- Candiano G. et al. "Gelsolin secretion in interleukin 4 treated bronchial epithelia and in asthmatic airways" Am J Respir Crit Care Med. 2005; Vol 172 pp 1-7
- Candiano G. et al. "Proteomic analysis of the airway surface liquid: modulation by proinflammatory cytokines" Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2007 Jan;292(1):L185-98

Abstracts

- Zegarra-Moran O. et al., Proteomic analysis of the periciliary fluid in cultured human bronchial epithelial cells. Pediatr. Pulm. S25:182. Presented at the 17th Annual North American Cystic Fibrosis Conference. 2003 (Anaheim, U.S.A.)
- Zegarra-Moran O. et al., Increased gelsolin secretion in interleukin-4 treated bronchial epithelial cells and in asthmatic patient airways. Pediatr. Pulm. S27:146. 18th Annual North American Cystic Fibrosis Conference. 2004 (St. Louis, U.S.A.)
- Zegarra-Moran O., "Identification of components of innate defense in the airway surface fluid". ECFS Conference New Frontiers in Basic Science of Cystic Fibrosis (Tavira, Portugal), 15-19 April, 2009.

■ FFC Project# 14/2004 "Interaction in vitro between CF pathogens and epithelial cells expressing the CF transmembrane conductance regulator (CFTR)"

Maria Cristina Dechechchi (Lab. Patologia Molecolare - Centro FC – Ospedale Civile Maggiore – Verona)

Abstracts

- Dechechchi M. C. et al. "Uso di correttori del difetto di maturazione di CFTR come strategia per controllare la risposta infiammatoria all'infezione da *P. aeruginosa* in cellule epiteliali respiratorie" XII Congresso Italiano della Fibrosi Cistica, Montepaone (CZ), 29-31 maggio 2006
- Dechechchi M.C. et al. "Defective CFTR enhances PAO1-stimulated inflammatory response in epithelial cells" 2005 ECFS Conference – New frontiers in Basic Science of Cystic Fibrosis – 14 – 17 April, Portugal;
- Dechechchi M.C. et al. "Increased *Pseudomonas aeruginosa* induced inflammatory response in epithelial cells expressing mutated CFTR" Journal of Cystic Fibrosis 4 (2005) S17-S25; 28th European CF Conference, Heronissos, Crete, Greece; 22-25 June 2005
- Dechechchi M.C. et al. "The inflammatory response of CF airway cells to *Pseudomonas Aeruginosa* is reduced by benzo(c)quinolizinium compound MPB-07" Congresso NAFC 2006;

■ FFC Project# 15/2004 "Novel diagnostic and therapeutic approaches for CF"

Roberto Gambari (Dipart. di Biochimica e Biologia Molecolare - Università di Ferrara)

Publications

- Bezzzeri V. et al. "Transcription factor oligodeoxynucleotides to NF-kB Inhibit Transcription of IL-8 in Bronchial Cells" Am J Respir Cell Mol Biol. 2008 Jul;39(1):86-96
- Borgatti M. et al. "Induction of IL-6 gene expression in a CF bronchial epithelial cell line by *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on transcription factors belonging to the Sp1 superfamily" BBRC 357 (2007) pp. 977-983.
- Piccagli L. et al. "Doking of molecules identified in bioactive medicinal plants extract into the p50 NF-kappaB transcription factor: correlation with inhibition of NF-kappaB/DNA interactions and inhibitory effects on IL-8 gene expression" BMC Structural Biology, 2008 Sep 3:8:38

Abstracts

- Bezzzeri V. et al. "Selective modulation of *P. Aeruginosa* dependent induction of interleukin-8 by transcription factor decoy oligonucleotides in CF bronchial epithelial cells" XX North American CF Conference, Denver 2-4 Nov. 2006

■ FFC Project# 16/2004 "Nasal polyps of Cystic Fibrosis patients as an ex vivo model to study inflammation and its modulation via the inhibition of the p-38 MAP-kinase pathway: implications for therapy"

Valeria Raia (Dipart. Pediatria - Univ. Federico II Napoli), Giuseppe Castaldo (CEINGE - Biotec. Avanzate s.c.a.r.l. - Univ. Federico II Napoli)

Publications

- Raia V. et al. "Inhibition of p38 mitogen activated protein kinase controls airway inflammation in cystic fibrosis" Torax 2005; 60: 773-780;

■ FFC Project# 11/2005 "Chronic oxidative lung injury during cystic fibrosis – protective roles of gamma-glutamyltransferase and ascorbic acid"

Alfonso Pompella (Dipart. Patologia Sperimentale, Biotec. Mediche, Infettivologia ed Epidemiologia - Univ. Pisa)

Publications

- Corti A. et al. "Vitamin C supply to bronchial epithelial cells linked to glutathione availability in elf – A role for secreted γ -glutamyltransferase?" Journal of Cystic Fibrosis, 7 (2008) pp. 174-178.

■ FFC Project# 15/2006 "Contribution of alterations in metal and glutathione homeostasis to the bacterial infections typical of Cystic Fibrosis and examination of the possible protective role of lactoferrin and antioxidants"

Andrea Battistoni (Dipart. Biologia - Univ. Tor Vergata – Roma)

Publications

- Berlotti F. et al. "Bovine lactoferrin inhibits the efficiency of invasion of respiratory A549 cells of different iron-regulated morphological forms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cenocepacia*" *Int J Immunopathol Pharmacol.*, 2008 Jan-Mar;21(1):51-9

■ FFC Project# 16/2006 "Effect of correctors of defective CFTR on the *Pseudomonas aeruginosa*-dependent inflammatory response in respiratory epithelial cells"

Maria Cristina Dechechchi (Lab. Patologia Molecolare - Centro FC – Ospedale Civile Maggiore – Verona), Frederic Becq (Inst. De Physiologie et Biologie Cellulaires - Poitiers (France), Roberto Gambari (Dipart. di Biochimica e Biologia Molecolare - Università di Ferrara)

Publications

- Dechechchi M. C. et al. " MPB-07 reduces the inflammatory response to *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic fibrosis bronchial cells" *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* May 2007, Vol. 36 PP. 615-624,
- Dechechchi M. C. et al. "Anti-inflammatory effect of miglustat in bronchial epithelial cells" *Journal of Cystic Fibrosis*, 7 (2008) pp. 555-565.

Abstracts

- Dechechchi M. C. et al. "Miglustat and DGJ reduce the inflammatory response to *Pseudomonas aeruginosa*, TNF-alpha and IL-1beta in bronchial epithelial cells" NACFC, 2007, Anaheim, California
- Dechechchi M. C. et al. "Correctors of F508del CFTR reduce the inflammatory response to *Pseudomonas aeruginosa* in CF respiratory epithelial cells" ECFS Conference 2007, Tavira, Algarve (Portugal), April 25-29
- Dechechchi M. C. et al. "Miglustat, an inhibitor of the synthesis of glycosphingolipids, has an anti-inflammatory effect in vitro and in vivo" Pediatric pulmonology, Suppl. 31, 2008. 22nd Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Orlando, Florida, 22-25 October 2008, pp. 257-258.
- Dechechchi M. C. et al. "Uso di correttori del difetto di maturazione di CFTR come strategia per controllare la risposta inflamatoria all'infezione da *P. aeruginosa* in cellule epiteliali respiratorie" XII Congresso Italiano della Fibrosi Cistica, 2006, Firenze, November 23-25.
- Dechechchi M. C. et al. "Anti-inflammatory effect of miglustat in bronchial cells" 13th Italian Cystic Fibrosis Conference, Milan, 30 Nov. – 2 Dec. 2007, *J. Cyst Fibrosis* 2008; 7, suppl. 3: p. S18
- Nicolis E. et al. "Inhibition of pro-inflammatory genes in CF bronchial epithelial cells by medicinal plant extracts" 13th Italian Cystic Fibrosis Conference, Milan, 30 Nov. – 2 Dec. 2007, *J. Cyst Fibrosis* 2008; 7, suppl. 3: p. S18
- Dechechchi M. C. et al. "Anti-inflammatory effect in vitro and in vivo of miglustat, an inhibitor of the synthesis of glycosphingolipids" XIV Congresso italiano della fibrosi cistica – IV Congresso nazionale Sifc, Torino, 27-29 novembre 2008

■ FFC Project#5/2007 "Novel particulate systems for the delivery of an oligonucleotide decoy to Nuclear Factor-kB: a potential strategy for treating cystic fibrosis"

Fabiana Quaglia (Dipart. Chimica Tossicologica e Farmaceutica - Univ. Federico II Napoli), Rosa Carnuccio (Dip.to di Farmacologia Sperimentale, Università di Napoli Federico II)

Abstracts

- Giovino C. et al. "Large Porous Particle for lung delivery of hydrophilic macromolecules: preliminary technological studies" 49° Simposio AFI, Rimini 10-12 giugno 2009
- Giovino C. "Veicolazione polmonare di un oligonucleotide decoy contro NF-Kb per il trattamento della fibrosi cistica: progettazione e sviluppo di Large Porous Particles a base di PLGA" 8° Scuola avanzata per Dottorandi di ricerca del settore farmaceutico tecnologico applicativo, Recent advances in vesicle drug carriers, Università della Calabria, Arcavacata di Rende, 22-27 settembre 2008
- Giovino C. et al. "Design and development of microsphere-loaded drug eluting stents for the controlled release of the antirestenosis agents" AAPA Italian University Network, Fisciano, March 6-7, 2009
- De Stefano D. et al. "ODN decoy to NF-KB released from resipirable PLGA large porous particles: a potential for treating cystic fibrosis?" 34° National Congress of the Italian Pharmacology Society, Rimini, October 14-17, 2009
- Govino C. et al. "A new approach for cystic fibrosis treatment: large porous particles for local and prolonged delivery of an oligonucleotide decoy to Nuclear Factor-kB in the lung" AAPS Annual Meeting and Exposition, Los Angeles, California, November 8-12, 2009

■ FFC Project# 13/2007 "A gene-targeted anti-inflammatory approach based on the Transcription Factor "decoy" strategy"

Giulio Cabrini (Lab. Patologia Molecolare - Centro FC – Ospedale Civile Maggiore – Verona), Roberto Gambari (Dipart. di Biochimica e Biologia Molecolare - Università di Ferrara)

Publications

- Bezzetti V. et al. "Transcription Factor Oligodeoxynucleotides to NF-kB Inhibit Transcription of IL-8 in Bronchial Cells" *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2008 Jul;39(1):86-96
- Nicolis E. et al. "Pyrogallol, an active compound from the medicinal plant *Embla officinalis*, regulates expression of pro-inflammatory genes in bronchial epithelial cells" *Int Immunopharmacol.* 2008 Dec 10;8(12):1672-80
- Piccagli L. et al. "Doking of molecules identified in bioactive medicinal plants extract into the p50 NF-kappaB transcription factor: correlation with inhibition of NF-kappaB/DNA interactions and inhibitory effects on IL-8 gene expression" *BMC Structural Biology*, 2008 Sep 3;8:38
- Gambari R. et al. "Decoy oligodeoxyribonucleotides and peptide nucleic acids-DNA chimeras targeting nuclear facto kappa-B: inhibition of IL-8 gene expression in Cystic Fibrosis cells infected with *Pseudomonas aeruginosa*" *Biochem. Pharmacol.* (2010), doi: 10.1016/j.bcp.2010.06.047
- Cabrini G. et al. "Targeting transcription factor activity as a strategy to inhibit pro-inflammatory genes involved in Cystic Fibrosis: decoy oligonucleotides and low-molecular weight compounds" *Current Medicinal Chemistry*, 2010, 17(35):4392-404

Abstracts

- Bezzetti V. et al. "Transcription factor (TF) decoy strategy to silence expression of pro-inflammatory genes in cystic fibrosis (CF) bronchial epithelial cell line" 2nd European CF Young Investigator Meeting, 2008, Lille, France
- Cabrini G. et al. "Decoy" molecules for nuclear transcription factors and regulation of expression of proinflammatory genes" 13th Italian Cystic Fibrosis Conference, Milan, 30 Nov. – 2 Dec. 2007, *J. Cyst Fibrosis* 2008; 7, suppl. 3: pp. S18.
- Nicolis E. et al. "Isolation of active anti-inflammatory compounds from medicinal plant extracts" Pediatric pulmonology, Suppl. 31, 2008. 22nd Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Orlando, Florida, 22-25 October 2008, p. 259.
- Tamanini A. et al. "Effect of furocoumarin derivatives on *P. aeruginosa*-dependent pro-inflammatory response in bronchial epithelial cells" Pediatric pulmonology, Suppl. 31, 2008. 22nd Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Orlando, Florida, 22-25 October 2008, pp. 260-261.
- Nicolis E. et al. "Does anti-inflammatory treatment have any effect on PAO1 dependent induction of the antimicrobial genes?" Pediatric pulmonology, Suppl. 31, 2008. 22nd Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Orlando, Florida, 22-25 October 2008, pp. 261-262.
- Piccagli L. et al. "Anti-inflammatory molecules obtained from virtual screening of a furocoumarin database against NF-kB" 23rd Annual North American Cystic Fibrosis Congress, Minneapolis, Minnesota, 15-17 October 2009.
- Nicolis E. et al. "Nigella arvensis extract inhibits the induction of IL-8 gene in bronchial epithelial cells" 23rd Annual North American Cystic Fibrosis Congress, Minneapolis, Minnesota, 15-17 October 2009.
- Tamanini A. et al. "Combined effects of furocoumarin compounds as anti-inflammatory and CFTR potentiatior in CALU-3 epithelial cells" 23rd Annual North American Cystic Fibrosis Congress, Minneapolis, Minnesota, 15-17 October 2009.

■ FFC Project #14/2007 "Influence of CFTR mutations in bactericidal activity of human macrophages"

Paola Del Porto (Dipart. di Biologia Cellulare e dello Sviluppo – Università "La Sapienza", Roma), Fiorentina Ascenzioni (Dipart. di Biologia Cellulare e dello Sviluppo – Università "La Sapienza", Roma), Serena Quattrucci (Centro Regionale FC – Policlinico "Umberto I", Roma)

Abstracts

- Soccia V. et al. "Influence of CFTR mutations on bactericidal activity of human macrophages" 32nd European Cystic Fibrosis Conference, Brest, France 10 - 13 June 2009 (awarded as best poster in "Inflammation")
- Soccia V. et al. "Espressione del CFTR ed attività battericida dei macrofagi umani" XV Congresso Italiano della Fibrosi Cistica, V Congresso Nazionale SIFC, 1-4 Ottobre 2009 Soverato, Italia (Premio Annalisa Marzotto)

■ FFC Project #15/2007 "Mechanisms of inflammation resolution in cystic fibrosis"

Mario Romano (Dip. Scienze Biomediche - CeSI – Univ. "G. D'Annunzio" di Chieti)

Publications

- Mattoscio D. et al. "Cystic Fibrosis Transmembrane conductance regulator (CFTR) expression in human platelets: impacts on mediators and mechanisms of the inflammatory response" *The Faseb J.*, 2010 June, doi: 10.1096/fj.10-159921

- Pieroni L et al "Proteomics investigation of human platelets in healthy donors and cystic fibrosis patients by shotgun nUPLC-MSE and 2DE: a comparative study" Mol BioSystems 12 Nov 2010 doi:10.1039/C0MB00135J

■ FFC Project# 11/2008 "Effect of glutathione and lactoferrin on redox regulation, metal homeostasis and inflammatory responses of Cystic Fibrosis bronchial cells upon infection with Burkholderia cenocepacia"

Andrea Battistoni (Dipart. Biologia - Univ. Tor Vergata – Roma)
Publications

- Valenti P et al "Lactoferrin decreases inflammatory response in cystic fibrosis bronchial cells invaded by iron modulated biofilm of Burkholderia cenocepacia strains" Submitted to Microbes and Infections (Manuscript Number: MICINF-D-10-00030).

Abstracts

- Berluttì F. et al "Lactoferrin modulates gene expression of cystic fibrosis bronchial cells invaded by iron and zinc modulated biofilm of Burkholderia cenocepacia clinical isolates" IXth International Lactoferrin Conference, Beijing, China, October 18-22, 2009.

Ammendolia M.G et al "Bovine lactoferrin interacts with cable pili of Burkholderia cenocepacia" IXth International Lactoferrin Conference, Beijing, China, October 18-22, 2009.

■ FFC Project#12/2008 "Anti-inflammatory effect of miglustat: sphingolipid ceramide metabolism as a therapeutic target for CF lung disease"

Maria Cristina Dechechchi (Lab. di Patologia Molecolare, Lab. Analisi Chimico-Cliniche ed Ematologiche, Università di Verona), Roberto Gambari (Dipart. di Biochimica e Biologia Molecolare, Università di Ferrara)

Publications

- Dechechchi MC. et al. "Anti-inflammatory effect of miglustat in bronchial epithelial cells" J Cyst Fibros. 2008 Nov;7(6):555-65
- Dechechchi MC. et al. "Modulators of Sphingolipid metabolism reduce lung inflammation" Am J Respir Cell Mol Biol. 2011 Jun 9

Abstracts

- Dechechchi M.C. et al. "Anti-inflammatory effect of miglustat: sphingolipid metabolism as a therapeutic target for CF lung inflammation" 23rd Annual North American Cystic Fibrosis Congress, Minneapolis, Minnesota, 15-17 October 2009

- Dechechchi M.C. et al. "Lack of efficacy of dexamethasone in reducing the inflammatory response to *P. aeruginosa* in a cell line derived from bronchial epithelium of a CF patient" 23rd Annual North American Cystic Fibrosis Congress, Minneapolis, Minnesota, 15-17 October 2009

- Dechechchi M.C. et al. "Modulation of sphingolipids metabolism reduces the neutrophil chemotaxis in human and murine respiratory models in vivo and in vitro" 2010 ECFS Basic Science Conference "New frontiers in Basic Science in Cystic Fibrosis" 7-10 April 2010, Carcavelos, Portugal

- Dechechchi M.C. et al "Down modulation of neutrophil chemotactic signalling by targeting the metabolism of sphingolipids" Pediatr. Pulmonol. 2010 24th Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Baltimore, MD, U.S.A., 2010

- Dechechchi MC et al "Modulation of sphingolipids metabolism reduces the neutrophil chemotaxis in human and murine respiratory models in vitro and in vivo" 1a Conferenza Aziendale sulla Ricerca: La patologia Polmonare - Verona, 25 maggio 2010

■ FFC Project#13/2008 "Pre-clinical evaluation of new vitamin E-based anti-inflammatory agents in CF"

Francesco Galli (Dipart. Med. Interna - Sez. Bioch. Appl. e Scienze Nutrizionali - Univ. Perugia), Luigi Iuliano (Dipart. Med. Interna e vascolare - Univ. La Sapienza Roma), Claudia Bettina Schock (Queen's University Belfast, Respiratory Medicine Research Group), Giandomenico Goracci (Dipart. Med. Interna - Sez. Biochimica - Univ. Perugia)

Publications

- Iuliano L. et al. "Association of cholesterol oxidation and abnormalities in fatty acid metabolism in cystic fibrosis" Am J Clin Nutr, July, 2009 Sep;90(3):477-84
- Galli F. et al. "La supplementazione umana con vitamina E" Progress in Nutrition, Vol. 12, N. 3, 00-00, 2010
- Mazzini F. et al. "Anticancer Activity of Vitamin E-Derived Compounds in Murine C6 Glioma Cells" Chem. Med. Chem, 2010, 5, 540-543.

■ FFC Project#14/2008 "Infections in cystic fibrosis: role of the long pentraxin PTX3 in host resistance and as therapeutic agent"

Cecilia Garlanda (Fondazione Humanitas per la Ricerca, Rozzano, Milano), Alessandra Bragonzi (Divisione di Immunologia, Trapianti e Malattie infettive – Istituto San Raffaele, Milano)

Publications

- Bragonzi A. et al. "Pseudomonas aeruginosa microevolution during cystic fibrosis lung infection establishes clones with adapted virulence"

ce" Am J Respir Crit Care Med, 2009 Jul 15; 180 (2): 138-45

- Moalli F. et al. "Role of Complement and Fc R in the protective activity of the long pentraxin PTX3 against *Aspergillus fumigatus*" Blood, 2010 Dec 9;116(24):5170-80

- Moalli F. et al. "Therapeutic potential of the humoral pattern recognition receptor PTX3 in chronic lung infection by *Pseudomonas aeruginosa*" (manuscript in preparation)

- Bottazzi B. et al. "The long pentraxin PTX3 as a prototypic humoral pattern recognition receptor: interplay with cellular innate immunity" Immunol Rev. 2009 Jan; 227 (1):9-18

- Bottazzi B. et al "An integrated view of humoral innate immunity: pentraxins as a paradigm" Annu Rev Immunol 2010 Mar; 28:157-83

Abstracts

- Moalli F. et al. "Role of the long pentraxin PTX3 in chronic lung infection by *Pseudomonas aeruginosa*", Bari 2010

- Moalli F et al "The opsonic activity of the long pentraxin PTX3 for *Aspergillus fumigatus* conidia is complement-dependent and mediated by Fc γ R-dependent CR3 integrin activation"

- Moalli F et al "Therapeutic potential of the humoral pattern recognition receptor PTX3 in chronic lung infection by *Pseudomonas aeruginosa*" Innocom

- Moalli F et al "Therapeutic potential of the humoral pattern recognition receptor PTX3 in chronic lung infection by *Pseudomonas aeruginosa*" Roma

- Moalli F et al "Potenziale terapeutico della pentrassina lunga PTX3 nelle infezioni croniche indotte da *Pseudomonas aeruginosa*" Firenze

- Moalli F et al "Role of the long pentraxin PTX3 in chronic lung infection by *Pseudomonas aeruginosa*" Capo Caccia 2010

- Moalli F et al "Role of complement and Fc γ R in the protective activity of the long pentraxin PTX3 against *Aspergillus fumigatus*" Rome, 4-6 February 2010

- Paroni M et al "Therapeutic potential of the humoral pattern recognition protein PTX3 in a murine model of *Pseudomonas aeruginosa* chronic infection" The 22nd Annual NACFC, Orlando October 23-25 2008

■ FFC Project#15/2008 "Effects of azithromycin (AZM) on Pseudomonas-induced chronic lung inflammation in cystic fibrosis"

Teresinha Leal (Department of Clinical Chemistry, Université Catholique de Louvain, St. Luc University Hospital) Pierluigi Mauri (Ist. Tecnologie Biomediche CNR, Segrate Milano), Claudio Sorio (Dipart. Patologia, Patologia Generale, Università di Verona)

Publications

- Sorio C. et al. "The role of macrophages and their scavenger receptors in cystic fibrosis", 2009 J Leucok Biol. Sep;86 (3) 465-8.

- Bergamini G. et al. "Pseudomonas aeruginosa released proteins: effects on cystic fibrosis airways and consequences of oxygen limitation in clinical and laboratory strains" (2010) Submitted

Abstracts

- Cigana C. et al. "Proteins released from *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) referent and clinical strains under microaerobiosis and their effects on cystic fibrosis airways" 31st European Cystic Fibrosis Conference, 11-14 June 2008, Prague, Czech Republic, J Cystic Fibrosis, vol. 7 (2), June 2008.

- Cigana C et al. "MudPIT analysis of *Pseudomonas aeruginosa* secretome: consequences of oxygen limitation in clinical and laboratory strains" 31st European Cystic Fibrosis Conference, 11-14 June 2008, Prague, Czech Republic, J Cystic Fibrosis, vol. 7 (3), June 2008 pp. S16

- Bergamini G. et al. "Proteomic analysis of proteins released from *Pseudomonas aeruginosa* clinical and laboratory strains: effect of azithromycin" 23rd Annual North American Cystic Fibrosis Congress, Minneapolis, Minnesota, 15-17 October 2009

- Bergamini et al. "Proteomic analysis of proteins released from *Pseudomonas aeruginosa* clinical and laboratory strains: effects of azithromycin" New Frontiers in Basic Science of Cystic Fibrosis. Tavira (Portugal), April 15-19 (2009) Journal of Cystic Fibrosis, (2009) Vol 9, Supplement 1, p. S40

- Bergamini G et al. "Proteomic analysis of proteins released from *Pseudomonas aeruginosa* clinical and laboratory strains: effects of azithromycin." Pediatric Pulmonology, (2009) Vol 44, Supplement 32, p 242.

■ FFC Project#5/2009 "Functional evaluation of CFTR in blood leukocytes in human subjects as a new tool for diagnostic and clinical research applications"

Claudio Sorio (Dipart. Patologia, Patologia Generale, Università di Verona), Paola Melotti (Lab. Patologia Molecolare - Centro FC – Ospedale Civile Maggiore – Verona), Mario Rosario Buffelli (Dipartimento di Scienze Neurologiche e della Visione- Sez. Fisiologia, Policlinico Verona)

Publications

- Melotti P. et al. "Evaluation of Cystic Fibrosis Conductance Tran-

smembrane Regulator (CFTR) expression and activity in human monocytes and possible clinical application" Submitted for publication
- Sorio C. et al. "Defective CFTR expression and function are detectable in blood monocytes: development of a new blood test for cystic fibrosis" PLoS One, 2011; 6(7): e22212. Published online 2011 July 21.

Abstracts

- Sorio C. et al. "Defective CFTR expression and function are detectable in blood monocytes: development of a new blood test for cystic fibrosis" Young Investigators Meeting, Lille (France) August 2010
- Sorio C. et al. "Analysis of CFTR function in human monocytes" European Respiratory Society Annual Congress held in Barcelona (Spain) in September 2010, abstract # 251869
- Sorio C. et al. "Functional evaluation of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) in human monocytes" J Cystic Fibrosis vol. 8, suppl. 2, June 2009: S22, abstract # 86.
- Sorio C. et al. "Measurement of CFTR expression and function in human leukocytes: new assays for the management of Cystic Fibrosis" Pediatric Pulmonology suppl. 33, 2010: 287, abstract # 192
- Sorio C. et al. "Defective CFTR expression and function are detectable in human monocytes: a potential new blood test for cystic fibrosis" FEBS Workshop on "Cell Biology and Pharmacology of Mendelian Disorders", Vico Equense, Napoli, Italy, 7-11 October 2011

■ FFC Project#19/2009 "Role of CFTR-Connexin interaction on PGE2 signaling and inflammation: implication for cystic fibrosis"

Marc Chanson (Dip. Pediatria – Università di Ginevra), Maria Cristina Dechechchi (Lab. di Patologia Molecolare, Lab. Analisi Chimico-Cliniche ed Ematologiche, Azienda Ospedaliero Universitaria di Verona)

Publications

- Scheckenbach KE L. et al. "PGE2 Regulation of CFTR activity and air surface liquid volume requires Gap Junctional Communication" doi: 10.1165/rcms.2009-0361OC
- Losa D. et al., "Connexins as therapeutic targets in lung disease" Expert Opin Ther Targets 2011;15:989-1002. Review

Abstracts

- Losa D. et al., "Gap Junctions Contribute To Airway Surface Liquid Homeostasis in Human Airway Epithelial Cells" April 07-10 2010 Carcavelos, Portugal. ECFS Basic Science Conference, oral presentation by Losa Davide (Novartis Young Fellows Travel Award)
- Chanson M. et al., "PGE2 Regulation of CFTR Activity and Airway Surface Liquid Volume Requires Gap Junctional Communication" August 08-13 2010 Saxtons River, Vermont, USA. FASEB Summer Research Conferences "The Lung Epithelium in Health and Disease", poster presentation
- Losa D. et al., "Pseudomonas aeruginosa Increase Gap Junction Channels In Calu-3 Cells By A TLR5-Dependent Mechanism" March 30 to April 2 2011 Tirrenia-Pisa, Italy. ECFS Basic Science Conference, poster presentation
- Losa D. et al., "Cx43 participates in the airway epithelium defense against Pseudomonas aeruginosa infection by a TLR5-dependent mechanism" August 6-11 2011 Ghent, Belgium. International Gap Junction Conference, oral presentation
- Losa D. et al., "Cx43 participates in the airway epithelium defense against Pseudomonas aeruginosa infection by a TLR5-dependent mechanism" September 6 2011 Bern, Switzerland. Annual Meeting of the Swiss Physiological Society, oral presentation by Losa Davide ("Asher-Hess Prize – Young Investigator Award" for the best oral presentation).

■ FFC Project# 21/2009 "Mechanisms of bactericidal activity of human macrophages and influence of CFTR mutations"

Paola Del Porto (Dipartimento di Biologia cellulare e dello Sviluppo - Università degli Studi "La Sapienza" - Roma); Fiorentina Ascenzioni (Dipartimento di Biologia cellulare e dello Sviluppo - Università degli Studi "La Sapienza" - Roma); Serena Quattrucci (Centro Fibrosi Cistica, Dip. Pediatria - Università di Roma "La Sapienza")

Publications

- Del Porto P. et al., Dysfunctional CFTR Alters the Bactericidal Activity of Human Macrophages against Pseudomonas aeruginosa, PLoS One.6(5):e19970.

Abstracts

- Cifani N. et al., Bactericidal activity of human CF macrophages against Pseudomonas aeruginosa. 34th European Cystic Fibrosis Conference; 8-11 June 2011; Hamburg Germany

■ FFC Project# 22/2009 "Origin of lung fluid gamma-glutamyltransferase and its effects in modulation of antioxidant balance, inflammation and CF respiratory dysfunction"

Alfonso Pompella (Dipart. Patologia Sperimentale, Biotec. Mediche, Infettivologia ed Epidemiologia - Univ. Pisa)

Publications

- Bergamini G et al "Effects of azithromycin (AZM) on glutathione-s-

transferases (GST)s in cystic fibrosis airway cells" Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 41: 199-206, 2009

- Bramanti E et al "Exogenous vs. endogenous -glutamyltransferase activity: implications for the specific determination of S-nitroso-glutathione in biological samples" Arch. Biochem. Biophys. 487: 146-52, 2009.

- Bramanti E et al "The determination of S-nitrosothiols in biological samples – procedures, problems and precautions" Life Sci. 2010 (in press)

■ FFC Project# 11/2010 "Development of new therapeutic approaches against microbial infection in cystic fibrosis patients: biochemical analysis of cell wall fragments"

Antonio Molinaro (Dip. Chimica Organica e Biochimica, Università di Napoli), Maria Lina Bernardini (Dip. Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Università La Sapienza, Roma), Gerd Döring (Institute of Medical Microbiology and Hygiene, University of Tübingen)

Publications

- Ieranò T. et al. "Molecular Modeling Study of the Carbohydrate region of the Endotoxin from Burkholderia cenocepacia ET-12", Eur. J. Org. Chem. 2011, 5114-5122
- Louet S. A. et al. "Transcriptional responses of Burkholderia cenocepacia to polymyxin B in isogenic strains with diverse polymyxin B resistance phenotypes", BMC Genomics 2011, 12:472
- De Castro C. et al. "Bacterial Lipopolysaccharides in plant and mammalian innate immunity" Prot. Pept. Lett., in press

■ FFC Project#12/2010 "Calcium signal and PKC as targets of Pseudomonas aeruginosa infection"

Paolo Pinton (Dip. Medicina Sperimentale e Diagnostica, Univ. Ferrara)

Publications

- Patergnani S. et al. "Calcium signaling around Mitochondria Associated Membranes (MAMs)" Cell Commun Signal 2011, 9:19
- Giorgi C. et al. "Mitochondria associated membranes (MAMs) as critical hubs for apoptosis" Communicative&Integrative Biology 4:3, 334-335; May-June 2011
- Giorgi C. et al. "Mitochondrial calcium homeostasis as potential target for mitochondrial medicine" Mitochondrion 2011 Jul 21. [Epub ahead of print]
- Bononi A. et al. "Protein Kinases and phosphatase in the Control of cell fate" Enzyme Research 2011;2011:329098. Epub 2011 Sep 4.
- Suski J. et al. "p66Shc aging protein in control of fibroblasts cell fate" Int. J. Mol. Sci. 2011;12(8):5373-89. Epub 2011 Aug 22.
- Giorgi C. et al. "Translocation of signaling proteins to the plasma membrane revealed by a new bioluminescent procedure" BMC Cell Biology 2011, 12:27
- Suski J. et al. "Mitochondrial tolerance to drugs and toxic agents in ageing and disease" Current Drug Targets, 2011, 12, 827-849
- Pinton P. et al. "The role of PML in the control of apoptotic cell fate: a new key player at ER-mitochondria sites" Cell Death and Differentiation (2011) 18, 1450-1456

■ FFC Project#16/2010 "Modulation of sphingolipid metabolism as a strategy for the treatment of CF lung inflammation"

Maria Cristina Dechechchi (Lab Patologia Molecolare, Lab Analisi chimico Cliniche ed Ematologiche, Az Osp Univ, Verona); Roberto Gambari (Dip. Biochimica e Biologia Molecolare – Univ Ferrara)

Publications

- Dechechchi MC. et al., "Modulators of Sphingolipid Metabolism Reduce Lung Inflammation" Am J Respir Cell Mol Biol, In press
- Dechechchi MC. et al., "Pharmacological modulators of sphingolipid metabolism for the treatment of cystic fibrosis lung inflammation" In: Cystic Fibrosis. ISBN 979-953-307-059-8, edited by: Dr. Dinesh D. Sriramulu, Germany. In press

Abstracts

- Dechechchi MC. et al. "Inhibitors of glucosylceramide synthase (GluCerT) reduce the transcription of IL-8 induced by P. aeruginosa in CF bronchial cells" ECFC Basci Science Conference Tirrenia - Pisa, Italy 30 March - 2 April 2011
- Dechechchi MC et al., "Down modulation of neutrophil chemotactic signalling by targeting the metabolism of sphingolipids" Pediatr. Pulmonol.2010 24th Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Baltimore, MD, U.S.A., 2010
- Dechechchi MC et al. "Down modulation of neutrophil chemotactic signalling by targeting the metabolism of sphingolipids" Pediatr. Pulmonol.2010 24th Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Baltimore, MD, U.S.A., 2010
- Dechechchi MC et al., "Inhibitors of glucosylceramide synthase (GluCerT) reduce the transcription of IL-8 induced by P.aeruginosa in CF bronchial cells" New Frontiers in Basic Science of Cystic Fibrosis, Tirrenia (Pisa), 30 March-2 April 2011
- Tebon M. et al. Miglustat reduces lung inflammation in vitro and in vivo", 5th European CF Young Investigator Meeting, Lille, France, 23 – 26 August 2011

- Dechechci MC et al., "Anti-inflammatory effect of miglustat: sphingolipid metabolism as a therapeutic target for cystic fibrosis lung inflammation" FEBS Workshop: Cell Biology and Pharmacology of Mendelian Disorders, Vico Equense (Naples), 7-11 october 2011.
- Dechechci MC. et al., "Down modulation of neutrophil chemotactic signalling by targeting the metabolism of sphingolipids" Pediatr. Pulmonol.2010, 24th Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Baltimore, MD, U.S.A., 2010 (poster)
- Dechechci MC. et al., "Inhibitors of glucosylceramide synthase (GluCert) reduce the transcription of IL-8 induced by P.aeruginosa in CF bronchial cells" New Frontiers in Basic Science of Cystic Fibrosis, Tirrenia (Pisa), 30 March-2 April 2011
- Tebon M. et al., "Miglustat reduces lung inflammation in vitro and in vivo" 5th European CF Young Investigator Meeting, Lille, France, 23 – 26 August 2011
- Dechechci MC. et al., "Anti-inflammatory effect of miglustat: sphingolipid metabolism as a therapeutic target for cystic fibrosis lung inflammation" FEBS Workshop: Cell Biology and Pharmacology of Mendelian Disorders, Vico Equense (Naples), 7-11 october 2011.

■ FFC Project# 17/2010 **"Molecular characterization of trimethylangelicin (TMA) and structurally-related compounds in CF lung disease: anti inflammatory effects and potentiation of the CFTR biological activity"**

Publications

- Borgatti M. et al. "Development of a novel furocumarin derivative inhibiting NF- B dependent biological functions: design, synthesis and biological effects" Eur J Med Chem 2011, Oct;46(10):4870-7
- Borgatti M. et al. "Bergamot (*Citrus bergamia Riso*) fruit extract and identified components alter expression of interleukin 8 gene in cystic fibrosis bronchial epithelial cells lines" BMC Biochem, 2011 Apr 15; 12:15
- Mazzitelli S. et al. "Encapsulation of eukaryotic cells alginate microparticles: cell signaling by TNF-alpha through capsular structure of cystic fibrosis cells" J Cell Commun Signal, 2011 Jun;5(2):157-65 Epub 2010 Nov 25
- Tamanini A. et al. "Trimethylangelicin Reduces IL-8 Transcription and Potentiates CFTR Function" Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2011 Mar;300(3):L380-90
- Hau D. K. et al. "In vivo anti-tumoral activity of corilagin on Hep3B hepatocellular carcinoma" Phytomedicine, 2010 Dec 15;18(1):11-5
- Piccagli L. et al. "Virtual screening against nuclear factor B (NF-B) of a focus library: identification of bioactive furocoumarin derivatives inhibiting NF- B dependent biological functions involved in cystic fibrosis" Bioorg Med Chem, 2010 Dec 1;18(23):8341-9
- Borgatti M. et al. "Induction by TNF- of IL-6 and IL-8 in cystic fibrosis bronchial IB3-1 epithelial cells encapsulated in alginate microbeads" J Biomed Biotechnol, 2010; 2010. pii:907964. Epub 2010 Sep 8
- Gambari G. "Recent patents on the therapy based on the transcription factor decoy approach" Expert Opinion on Therapeutic Patents, in press

■ FFC Project# 18/2010 **"Infections in cystic fibrosis: role of the long pentraxin PTX3 in host resistance and as therapeutic agent"**

Cecilia Garlanda (Fondazione Humanitas per la Ricerca, Milano); Alessandra Bragonzi (Infections and Cystic Fibrosis Unit, Division of Immunology, Transplantation and Infectious Disease, H. S. Raffaele, Milano)

Publications

- Moalli F. et al. "The therapeutic potential of the humoral pattern recognition molecule PTX3 in chronic lung infection caused by *Pseudomonas aeruginosa*", J Immunol, 2011 May 1;186(9):5425-34
- Chiarini M. et al. "PTX3 genetic variations affect the risk of *Pseudomonas aeruginosa* airway colonization in cystic fibrosis patients" Genes Immun. 2010 Dec;11(8):665-70.
- Inforzato A. et al., "The long pentraxin PTX3 at the crossroads between innate immunity and tissue remodeling" Tissue Antigens. 2011 Apr;77(4):271-82.
- Moalli F et al., "Pathogen recognition by the long pentraxin PTX3" J Biomed Biotechnol, 2011;2011:830421. Epub 2011 Jun 2.
- Moalli F. et al. "Role of complement and FC receptors in the protective activity of the long pentraxin PTX3 against *Aspergillus fumigatus*" Blood, 2011 116:5170-5180

Abstracts

- Garlanda C. et al., "Role of Complement and Fc Receptors in the protective activity of the long pentraxin PTX3 against *Aspergillus fumigatus* and *Pseudomonas aeruginosa*" Innate Immunity: Mechanisms Linking with Adaptive Immunity. June 7 - 12, 2010. Trinity College Dublin, Ireland
- Garlanda C., "Infections in cystic fibrosis: role of the long pentraxin PTX3 in host resistance and as therapeutic agent", VIII Italian Convention of Researchers in Cystic Fibrosis, Verona, Italy, Decem-

ber 2-4, 2010

- Gardanda C., "Role of the long pentraxin PTX3 in chronic lung infection by *Pseudomonas aeruginosa*" SIICA 7th National Conference", Bari, Italy, May 26-29, 2010
- Garlanda C., "The therapeutic potential of the humoral pattern molecule PTX3 in chronic lung infection caused by *Pseudomonas aeruginosa*" 5th ENII EFI/EJI Summer School in advanced immunology", Capo Caccia, Sardinia, Italy, May 9-16, 2010
- Moalli F. et al. "Role of Complement and Fc Receptors in the protective activity of the long pentraxin PTX3 against *Aspergillus fumigatus*" Innate Immunity: Mechanisms Linking with Adaptive Immunity, Trinity College Dublin, Dublin, Ireland, June 7-12, 2010
- Paroni M. et al. "Therapeutic potential of the long pentraxin PTX3 in a murine model of *Pseudomonas aeruginosa* chronic lung infection" 24th Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Baltimore, USA, October 21-23, 2010
- Moalli F. et al. "Role of Complement and Fc Receptors in the protective activity of the long pentraxin PTX3 against *Aspergillus fumigatus* and *Pseudomonas aeruginosa*", Toll2011 Meeting, Decoding Innate Immunity, Riva del Garda, Italy, May 4-7, 2011
- Garlanda C. et al., "Role of Complement and Fc Receptors in the protective activity of the long pentraxin PTX3 against *Aspergillus fumigatus* and *Pseudomonas aeruginosa*", Toll2011 Meeting, Decoding Innate Immunity, Riva del Garda, Italy, May 4-7, 2011

■ FFC Project# 21/2010 **"Th17 responses in Cystic fibrosis: paving the way for novel anti-inflammatory strategies and immunogenetic screening"**

Luigina Romani (Dip. Medicina Sperimentale e Scienze Biomediche, Università di Perugia)

Publications

- Sorci G. et al. "The danger signal S100B integrates pathogens- and danger-sensing pathways to restrain inflammation" PLoS Pathog. 2011 Mar;7(3):e1001315
- Romani L. "Immunity to fungal infections" Nat Rev Immunol. 2011 Apr;11(4):275-88
- Zelante T. et al. "IL-22 in antifungal immunity" Eur J Immunol. 2011 Feb;41(2):270-5

5. CLINICAL RESEARCH

Ricerca clinica

■ FFC Project 2005 **"Infection Control"**

Roberto Buzzetti (Componente del Comitato di Consulenza Scientifica della Fondazione per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica)

Publications

- Buzzetti R. et al. "Controllo e prevenzione delle infezioni respiratorie nel paziente affetto da fibrosi cistica" Edit. Fondazione per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica. Verona, 2005
- Festini F. et al. "Isolation measures for prevention of infection with respiratory pathogens in cystic fibrosis: a systematic review" Journal of Hospital Infection (2006) 64, 1-6

■ FFC Project#18/2004 **"Early eradication of *P. aeruginosa* and subsequent colonization in cystic fibrosis patients"**

Giovanni Taccetti (Dipart. di Pediatria, Centro Regionale FC, Azienda Ospedaliera Universitaria Meyer)

Publications

- Taccetti G. et al. "Early eradication therapy against *Pseudomonas Aeruginosa* in cystic fibrosis patients" Eur Respir. J. 2005; 26: 458-461

■ FFC Project# 19/2004 **"Quality control and update of follow-up data in the Italian cystic fibrosis registry: a starting point for the analysis of clinical data and the dissemination of results"**

Anna Bossi (Ist. Statistica e Biometria - Univ. Milano)

Abstracts

- Bossi A. et al. "Cystic Fibrosis in adulthood: data from the Italian registry" 28th European CF Conference, Crete, Greece 22-25 June 2005
- Piccinini P. et al. "Previsione a 5 anni del numero di pazienti adulti affetti da fibrosi cistica" III Congresso Nazionale SISMEC, Abano Terme: 28 settembre – 1 ottobre 2005;

■ FFC Project#16/2005 **"Diabetes, glucose intolerance and hypoglycemia in Cystic Fibrosis"**

Carla Colombo (Dipart. Pediatria - Centro FC - Fond. IRCCS Osp. Maggiore Polic. Mangiagalli e Regina Elena – Milano), Alberto Battizzetti (Fond. Centro San Raffaele del Monte Tabor – Milano)

Publications

- Battizzetti A. et al. "Spontaneous hypoglycaemia in patients with cystic fibrosis" European Journal of Endocrinology 2007; 156: 369-376

Abstracts

- Battezzati A. et al. "Cystic fibrosis related diabetes in anticipated by reduced insulin secretion during OGTT" 13th Italian Cystic Fibrosis Conference, Milan, 30 Nov. – 2 Dec. 2007, J. Cyst Fibrosis 2008; 7, suppl. 3: pp. S22-S23.
- Battezzati A. et al. "Insulin secretory defects identified from OGTT modelling are related to subsequent diabetes and worse pulmonary function in CF patients" Pediatric pulmonology, Suppl. 31, 2008. 22nd Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Orlando, Florida, 22-25 October 2008, p. 344-345

■ FFC Project 2006 "The CAIRO Project" (Analysis and review of the international scientific literature from the CF registries)

Roberto Buzzetti (Componente del Comitato di Consulenza Scientifica della Fondazione per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica), Donatello Salvatore (U.O. Pediatria, Azienda Ospedaliera San Carlo, Potenza)

Publications

- Buzzetti R. et al. "An overview of international literature from cystic fibrosis registries: 1. Mortality and survival studies in cystic fibrosis", Journal of Cystic Fibrosis 9 (2010) 75-83
- Salvatore D. et al. "An overview of international literature from cystic fibrosis registries: 2. Neonatal screening and nutrition/growth", Journal of Cystic Fibrosis 9 (2010) 75-83
- Salvatore D. et al. "An overview of international literature from cystic fibrosis registries: 3. Disease incidence, genotype/phenotype correlation, microbiology, pregnancy, clinical complications, lung transplantation, and miscellanea", Journal of Cystic Fibrosis 10 (2011) 71- 85

Abstracts

- Buzzetti R. et al. "Analysis and review of the international scientific literature from the CF registries" NACF, Anaheim, California, October 3-6, 2007
- Salvatore D. et al. "The CAIRO Project (Comparative analysis of international CF registries overviewed): analysis and review of the scientific literature from CF registries", 13th Italian Cystic Fibrosis Conference, Milan, 30 Nov. – 2 Dec. 2007, J. Cyst Fibrosis 2008; 7, suppl. 3: pp. S8-S9

■ FFC Project#19/2006 "Prolonging the duration on site of short peripheral venous catheters used to administer intravenous antibiotic courses in adult subjects with cystic fibrosis. A randomized controlled trial to evaluate the effect of different concentrations of antibiotic in normal saline solution"

Filippo Festini (Dipart. Pediatria - Centro FC Ospedale Meyer- Firenze)

Abstracts

- Festini F. et al. "Prolonging the duration of peripheral venous catheters in cystic fibrosis patients. Randomized controlled study on the effect of different concentrations of antibiotics in normal saline solution" 13th Italian Cystic Fibrosis Conference, Milan, 30 Nov. – 2 Dec. 2007, J. Cyst Fibrosis 2008; 7, suppl. 3: p. S8.

■ FFC Project#20/2006 "Prevention of pulmonary exacerbations in children with Cystic Fibrosis, through the modification of intestinal microflora"

Alfredo Guarino (Dipart. Pediatria - Univ. Federico II Napoli), Carla Colombo (Dipart. Pediatria - Centro FC - Fond. IRCCS Osp. Maggiore Polic. Mangiagalli e Regina Elena – Milano), Lorenzo Morelli (Tecnologie analitiche ed avanzate - Univ. Piacenza)

Publications

- Bruzzese E. et al. "Effect of Lactobacillus GG supplementation on pulmonary exacerbations in patients with cystic fibrosis: a pilot study" Clin Nutr. 2007 Jun;26(3):322-8

Abstracts

- Guarino A. et al. "Probiotics in cystic fibrosis: help from old friends" Pediatric pulmonology, Suppl. 31, 2008. 22nd Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Orlando, Florida, 22-25 October 2008, pp. 130-131.

■ FFC Project#16/2007 "Emission distance of Ps aeruginosa from the respiratory tract of infected persons"

Cesare Braggion (Centro Reg. Toscano FC – Osp. Meyer – Firenze)

Publications

- Festini F. et al. "A 1-m distance is not safe for children with cystic fibrosis at risk for cross-infection with Pseudomonas aeruginosa" Am J Infect Control 2010, Apr;38(3):244-5.

■ FFC Project#17/2007 "Early antibiotic treatment in Ps aeruginosa eradication"

Giovanni Taccetti (Centro Reg. Toscano FC – Osp. Meyer Firenze), Cariani L. (Lab. Microbiol., Centro Reg. F.C. – Milano)

Abstracts

- Taccetti G. et al. "Early antibiotic treatment for Pseudomonas aeruginosa eradication in cystic fibrosis patients: a randomised multicenter study of two different protocols" 23rd Annual North American Cystic Fibrosis Congress, Minneapolis, Minnesota, 15-17 October 2009
- Taccetti G. et al. "Pseudomonas aeruginosa eradication in cystic fibrosis: preliminary data from a randomized multi center study of two different early antibiotic treatment protocols" The 24th Annual North American CF Conference, October 21-23, 2010, Baltimore, Maryland
- Cocchi P et al "Diffusion of MRSA strains in the Italian CF population: a multicenter study" The 24th Annual North American CF Conference, October 21-23, 2010, Baltimore, Maryland
- Dolce D et al "Immunological monitoring of P. aeruginosa eradication in cystic fibrosis patients: comparison of methods" The 24th Annual North American CF Conference, October 21-23, 2010, Baltimore, Maryland

■ FFC Project#16/2008 "A prospective study about complications of totally implantable central venous access ports in people with CF"

Alberto Dal Molin (Ospedale Meyer - Dip.to Pediatria, Firenze), Cesare Braggion (Dip. Pediatria - Osp. Meyer – Firenze), Maria Lucia Furnari (Centro Reg. FC - Ospedale dei Bambini – Palermo), Vincenzina Lucidi (Servizio di Supporto FC Ospedale Bambini Gesù – Roma), Elena Rizzi (Centro Reg. FC – Verona), Pietro Cialdella (Centro Reg. FC – Cernigola)

Publications

- Dal Molin A. et al. "Management of totally implantable vascular access devices in patients with cystic fibrosis" Minerva Pediatr. 2009 Oct; 61(5):549-55

Abstracts

- Dal Molin A. et al. "National cohort study about complications of totally implantable central venous access ports in Italian people with CF: preliminary results" 23rd Annual North American Cystic Fibrosis Congress, Minneapolis, Minnesota, 15-17 October 2009.
- Dal Molin A et al "Multicenter prospective study about complications of totally implantable central venous access ports in Italian people with CF: preliminary results" J Cyst Fibros. 2009; 8 (Suppl.2):S95

■ FFC Project#17/2008 "Extracorporeal lung assist as bridge to lung transplantation for patients with cystic fibrosis"

Vito Marco Ranieri (Dip. Discipline Medico Chirurgiche Università degli studi di Torino Sez. Anestesia e Rianimazione)

Publications

- Ricci D. et al. "The use of CO₂ removal devices in patients awaiting lung transplantation: an initial experience" Transplant Proc. 2010 May;42(4):1255-8

■ FFC Project#23/2009 "Modulation of intestinal and extraintestinal inflammation in infants with cystic fibrosis by early modification of intestinal microflora"

Alfredo Guarino (Dipartimento di Pediatria - Università degli Studi "Federico II" Napoli), Cesare Braggion (Centro Regionale Fibrosi Cistica - Dipart. Medicina Pediatrica - Azienda Ospedaliera Universitaria Meyer - Firenze) Francesca Pardo (Centro Regionale Fibrosi Cistica - 2° U.O. di Pediatria, Ospedale dei Bambini "G. Di Cristina" - Palermo), Lorenzo Morelli (Istituto di Microbiologia - Università Cattolica del Sacro Cuore - Piacenza)

Abstracts

- Roberto E. et al. "Intestinal inflammation and intestinal microbiota composition in children with cystic fibrosis" XVII National Congress of SIGEN, Pescara, Italy, 7-9 October 2010.
- Roberto E. et al. "Intestinal inflammation and intestinal microbiota composition in children with cystic fibrosis" Digestive and Liver Disease, 42S (2010), S321-S376.
- Bruzzese E. et al. "Age-Relation pattern of intestinal microflora in children with cystic fibrosis", 44th Annual Meeting of the European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN), Sorrento, Italy, 25-28 May 2011.

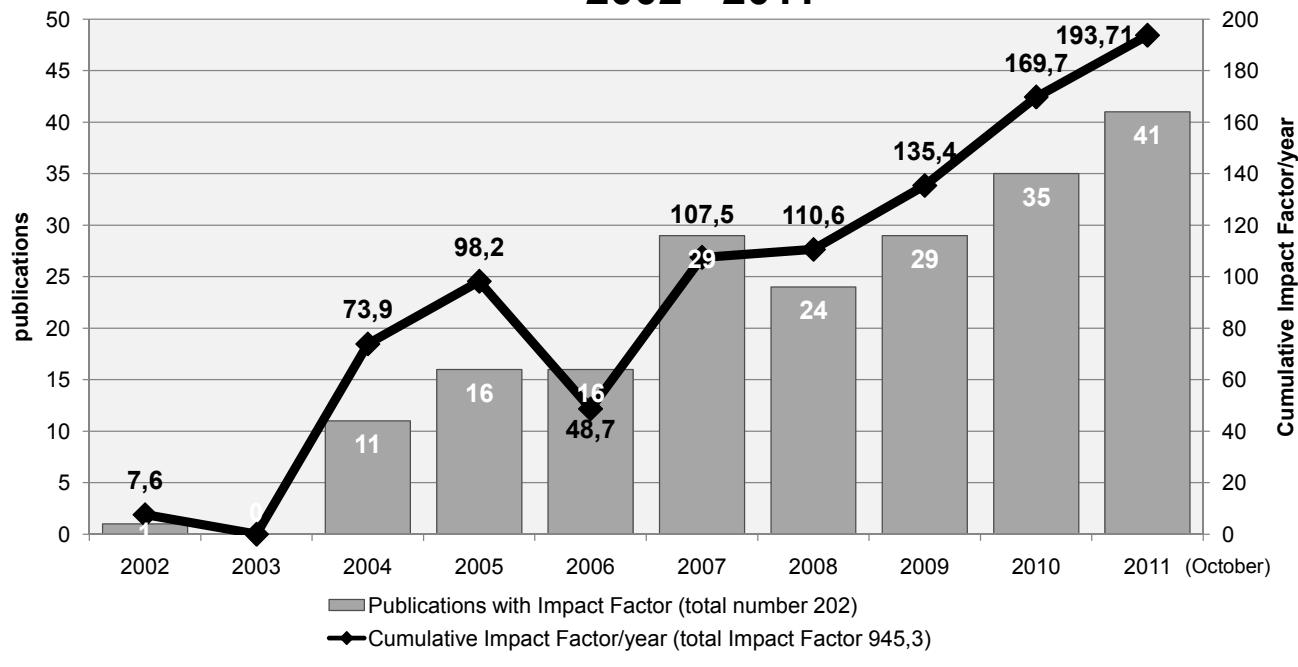
■ FFC Project#CFaCore

Alessandra Bragonzi (Divisione di Immunologia, Trapianti e Malattie infettive – Istituto San Raffaele, Milano)

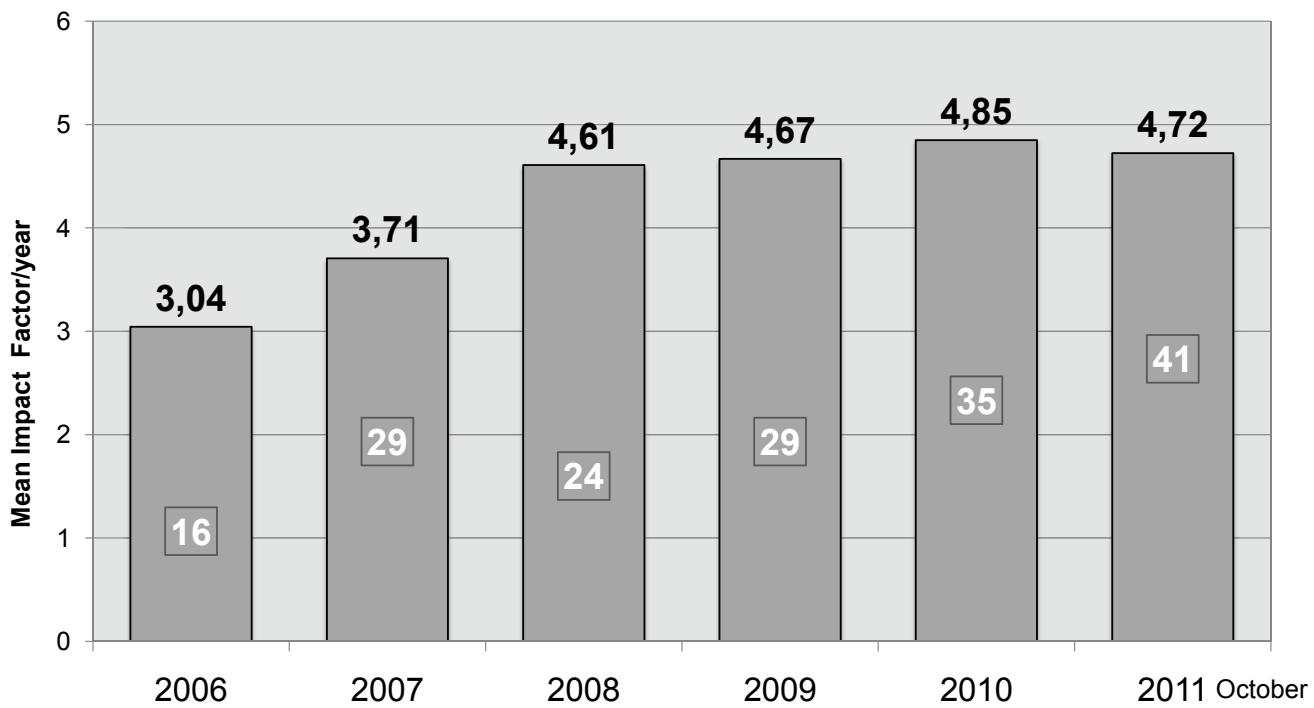
Publications

- Bragonzi A et al "Murine models of acute and chronic lung infection with cystic fibrosis pathogens" IJMM 2010, in press

FFC Scientific Publications and Impact Factor 2002 - 2011



FFC Scientific Publications (January 2006-October 2011) Mean Impact Factor/year



Institutes and laboratories involved in the projects funded by Italian CF Research Foundation from 2002 to 2011

Istituti e laboratori coinvolti nei progetti finanziati dalla Fondazione Ricerca FC dal 2002 al 2011

ABRUZZO

- Dip. Scienze Biomediche , Lab Medicina Molecolare, Università "G. D'Annunzio", Chieti
- Dip. Medicina Sperimentale, Università dell'Aquila, L'Aquila
- Dip. Biologia Cellulare ed Oncologia, Consorzio Mario Negri Sud, S. Maria Imbaro (Chieti)
- Dip. Farmacologia Translazionale, Consorzio Mario Negri Sud, Chieti
- Lab. di Biologia e Farmacologia Vascolare, Consorzio Mario Negri Sud, Chieti
- Lab. Medicina Molecolare, Ce.S.I., Universita Chieti-Pescara

CALABRIA

- Lab. Clinico Patologico ,Ospedale di Soverato, Soverato (CZ)

CAMPANIA

- Dip. Biochimica e Biotecnologie Mediche, CEINGE Biotecnologie Avanzate s.c.a.r.l. , Università Federico II, Napoli
- Dip. di Pediatria ,Università Federico II, Napoli
- Lab. Microbiologia Funzionale, Università Federico II, Napoli
- Dip. Chimica Tossicologica e Farmaceutica, Univ. Federico II, Napoli
- Dip. Farmacologia Sperimentale, Napoli
- Dip. Chimica e Biochimica organica, Univ. Federico II, Napoli
- TIGEM, Telethon, Napoli
- Dip. Scienze Farmaceutiche, Università di Salerno
- Istituto di Biochimica delle Proteine, CNR, Napoli
- Istituto di Genetica e Biofisica, CNR, Napoli
- Istituto di Chimica Molecolare, CNR, Napoli
- Dip. Biologia Strutturale e Funzionale, Università "Federico II", Napoli

EMILIA ROMAGNA

- Plesso Bio,Tecnologico Integrato, Università di Parma, Parma
- Dip. Pediatria, Università di Parma, Parma
- Dip. di Biochimica e Biologia Molecolare, Università di Ferrara, Ferrara
- Dip. Medicina Sperimentale e Diagnostica, Università di Ferrara
- Dip. Biochimica , Istituto Nazionale Ricerca Cardiovascolare, Università di Bologna e Cesena
- Dip. Tecnologie Analitiche Avanzate, Piacenza
- Dip. Scienze cliniche, Università degli Studi di Parma
- Dip. Oncologia, Ematologia e Malattie respiratorie, Università degli Studi di Modena

FRIULI VENEZIA GIULIA,

- International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB), Trieste
- Dip. di Scienze della Riproduzione e dello Sviluppo, Università di Trieste , I.R.C.C.S. Burlo Garofolo, Trieste
- Dip. Biochimica, Biofisica e Chimica Macrocellulare, Trieste
- Dip. Scienze Biomediche, Trieste

LAZIO

- Dip. Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Università La Sapienza, Roma
- Dip. di Biopatologia e Diagnostica per Immagini, Università Tor Vergata, Roma
- Dip. di Biologia ,Università Tor Vergata, Roma
- Dip. Biotecnologie Cellulari ed Ematologia, Università La Sapienza, Roma
- Istituto di Clinica Pediatrica, Centro Regionale FC, Università Roma 1, Roma
- Dip.di Fisiopatologia Medica Università La Sapienza, Roma
- Dip. di Biotecnologie, Protezione della Salute e degli Ecosistemi, ENEA Casaccia, S. Maria di Galeria, Roma
- Lab. di Microbiologia,Ospedale Bambin Gesù,Roma
- Lab. Microbiologia Molecolare, Università La Sapienza, Roma
- Istituto di Microbiologia,Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma
- Dip. Farmacologia, Facoltà di Medicina , Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma
- Dip. Microbiologia ,Università di Roma 3, Roma
- Dip. Salute Pubblica e Biologia Cellulare, Università Tor Vergata, Roma
- Dip. Neuroscienze Sperimentalni, Fondazione S. Lucia, Roma
- Dip. Scienze di Sanità Pubblica, Università "La Sapienza", Roma
- Dip. di Medicina Interna e Vascolare, Università "La Sapienza", Roma
- Lab. di Microbiologia Ospedale Pediatrico Bambin Gesù, Roma
- Serv. Supporto FC, Osp. Bambin Gesù, Roma
- Lab. Microbiologia Molecolare e Biotecnologia dei Microrganismi, Dip. Biologia, "Università Roma Tre"
- Lab. Microbiologia Clinica e Virologia, Dipartimento di Biologia, "Università Roma Tre", Roma;
- Dip. Scienze Biochimiche, Università "La Sapienza", Roma
- Dip. Pediatria e Neuropsichiatria Infantile, Università "La Sapienza"
- Centro fibrosi cistica, Policlinico Umberto I
- Dip. Salute pubblica e Malattie Infettive, Università "La Sapienza", Roma
- Dip. Biologia e Biotecnologie, Università "La Sapienza", Roma

LIGURIA

- Istituto di Biofisica,CNR, Genova
- Dip. di Scienze Farmaceutiche, Università di Genova, Genova
- Lab. di Fisiopatologia dell'Uremia, Istituto G. Gaslini, Genova
- Lab. Genetica Umana E.O. Ospedali Galliera, Genova
- Lab. Genetica Molecolare, Istituto G. Gaslini, Genova
- Lab. Medicina Molecolare, Istituto G. Gaslini, Genova
- Lab. Centrale Analisi, Istituto G. Gaslini, Genova
- Sezione Microbiologia, DISCAT, Genova
- ARPAL (Agenzia Reg. Protezione Ambiente Ligure), Genova
- Lab. Diagnostica e Ricerca Malattie Infettive, Dip. Pediatria,Istituto G. Gaslini, Genova
- Dip. Pediatria, Lab. Microbiologia, Istituto G. Gaslini, Genova

- Dip. Pediatria, Centro Fibrosi Cistica, Istituto G. Gaslini, Genova
- Sezione di Epidemiologia e Biostatistica, Istituto G. Gaslini, Genova
- Dip. Medicina Sperimentale , Istituto G. Gaslini, Genova
- Dip. Medicina Sperimentale , Università degli Studi di Genova
- Lab. Fisiopatologia Molecolare dei Canali Ionici, Centro Biotecnologie Avanzate, Genova

LOMBARDIA

- Istituto Statistica e Biometria, Università di Milano, Milano
- Istituto per il Trattamento Sperimentale della Fibrosi Cistica, Ospedale S. Raffaele, Milano
- Dip. Medicina Specialistica e dei Trapianti, Ospedali Riuniti, Bergamo
- Dip. Immunologia e Clinica dei Trapianti, Ospedali Riuniti, Bergamo
- Lab. di Genetica Medica A. O. Istituti Clinici di Perfezionamento, Milano
- Dip. di Scienze Biomolecolari e Biotecnologie, Università degli Studi di Milano, Milano
- Dip. di Genetica e Microbiologia, Università di Pavia, Pavia
- Dip. di Pediatria, Centro Fibrosi Cistica, Fondazione IRCCS, Policlinico Mangiagalli e Regina Elena, Milano
- Lab. di Microbiologia, Centro Fibrosi Cistica, Milano
- Unità di Genomica per Diagnosi di Patologie Umane, Fondazione Centro San Raffaele, Milano
- Istituto per le Tecnologie Biomediche, CNR, Segrate (MI)
- Lab. di Ricerca Clinica, Istituto per la Ricerca Farmacologica "M. Negri", Milano
- Dip. Chimica Organica ed Industriale, Milano
- Dip. Scienze Molecolari Agroalimentari, Milano
- Dip. Biotecnologie e Bioscienze, Università Bicocca, Milano
- Fondazione Humanitas per la Ricerca, Rozzano (Milano)
- Div. Immunologia, Trapianti e Malattie infettive, Istituto "San Raffaele", Milano
- Istituto di Ricerche Chimiche e Biochimiche, Istituto "G. Ronzoni", Milano
- Dip. Biologia e Genetica per le Scienze Mediche, Università degli Studi di Milano
- Lab. Biologia Clinica Molecolare e Citogenetica, Università Vita-Salute HSR, Milano
- Istituto Ricerche Farmacologiche Mario Negri, Lab. for medical research and consumer involvement
- Dip. Medicina Clinica e Prevenzione, Università Bicocca, Milano
- Lab. Biochimica e Biologia Molecolare, Dip. Medicina, Ospedale S. Paolo, Università degli Studi di Milano
- Dip. Scienze Farmacologiche, Università degli Studi di Milano

MARCHE

- Centro Regionale Fibrosi Cistica, Ospedali Riuniti, Ancona

PIEMONTE

- Centro FC Adulti Divisione Malattie Respiratorie, Dip. di Scienze Biologiche e Cliniche, Università di Torino, Ospedale S. Luigi Gonzaga, Orbassano, Torino
- Dip. di Genetica, Biologia e Biochimica , Università di Torino, Torino
- Dip. di Patologia Clinica, S.S. di Diagnostica Molecolare e Test Genetici Integrati, Torino
- Dip. Discipline Medico Chirurgiche, Sez. Anestesia e Rianimazione, Univ. Torino
- Dip. di Scienza e Tecnologia del Farmaco, Università di Torino
- Dip. di Scienze Cliniche e Biologiche, Università di Torino
- Centro di Biotecnologia Molecolare, Università di Torino

PUGLIA

- Dip. Fisiologia Generale ed Ambientatale , Università di Bari, Bari
- Servizio di Supporto Fibrosi Cistica, Ospedale di Cerignola, Cerignola
- Dip. Scienze Biomediche, Lab. Patologia Generale, Università di Foggia
- Dipartimento di Pediatria, Policlinico , Università di Bari
- Istituto Biomembrane e Bioenergetica, CNR, Bari

SARDEGNA

- Dip. di Scienze Biomediche e Biotecnologie, Lab. Genetica Molecolare , Ospedale Reg. Microcitemie, Cagliari
- Dip. Tossicologia, Sez. Patologia e Oncologia Molecolare, Cagliari

SICILIA

- Istituto di Biofisica, CNR, Palermo
- Centro Regionale Fibrosi Cistica, Policlinico, Messina,
- Centro Regionale Fibrosi Cistica, Ospedale dei Bambini "G. di Cristina", Palermo
- Istituto per lo Studio dei Materiali Nanostrutturati, CNR, Palermo
- Dipartimento Scienze e Biotecnologie Molecolari e Biomolecolari, Università degli Studi di Palermo

TOSCANA

- Dip. di Biologia Animale e Genetica, Università di Firenze, Firenze
- Lab. di Proteomica Funzionale, Dip. di Biologia Molecolare, Università di Pisa, Pisa
- Dip. di Pediatria, Centro Fibrosi Cistica, Ospedale Meyer, Firenze
- Servizio di supporto Fibrosi Cistica, Ospedale di Livorno, Livorno
- Dip. Patologia Sperimentale, Biotecnologie Mediche, Infettivologia ed Epidemiologia , Università di Pisa, Pisa
- Unità Bioinformatica, Centro di Ricerche Novartis, Siena
- Lab. Fisiologia Microbica e Biotecnologia, Dip. Biologia Molecolare, Policlinico "Santa Maria alle Scotte", Siena
- Dipartimento Diagnostica di Laboratorio Servizio di Diagnostica Genetica, Azienda Ospedaliera Universitaria Careggi, Firenze
- Dip. Biologia Molecolare, Sez. Chimica Biologica, Università di Siena
- Dip. Scienze Farmaceutiche, Università degli Studi di Firenze

UMBRIA

- Dipart. Med. Interna, Sez. Bioch. Appl. e Scienze Nutrizionali, Univ. Perugia
- Dipart. Med. Interna, Sez. Biochimica, Univ. Perugia
- Dip. Medicina Sperimentale e Scienze Biomediche, Univ. di Perugia
- Dip. Biotecnologie, Università di Siena

VENETO

- Medicina Interna, Università di Verona, Verona
- Istituto Veneto Medicina Molecolare, Padova
- Servizio Clinico di Genetica e Screening Neonatale, Centro Fibrosi Cistica, Verona
- Dip. di Patologia, Sezione immunologia, Università di Verona, Verona
- Sezione di Anatomia ed Istologia, Dip. di Scienze Morfologico, Biomediche , Università di Verona, Verona
- Lab. Patologia Molecolare, Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata, Verona
- Dip. Scienze della Vita e della Riproduzione, Sezione di Biologia e Genetica, Università di Verona,
- Dip. Scienze Biomediche e Chirurgiche, Divisione di Nefrologia , Università di Verona, Verona
- Dip. di Patologia, Patologia Generale, Università di Verona, Verona

- Lab. di Microbiologia, Istituti Ospitalieri, Verona
- Facoltà di Scienze della Formazione, Università di Verona
- Dip. Scienza e Tecnologia del Farmaco, Università di Verona
- Dip. Scienze Farmaceutiche, Università di Padova
- Dip. Chimica Biologica, Università di Padova
- Dip. Scienze Neurologiche e della Visione, Università di Verona
- Centro fibrosi cistica, Ospedale Ca' Foncello, Treviso
- Clinica Pediatrica, AO Padova

BELGIUM

- Department of Clinical Chemistry, Université Catholique de Louvain, St Luc University Hospital, Brussels
- Molecular Bacteriology Laboratory Faculty of Medicine, Free University of Brussels(Ulb)

CANADA

- Department of Microbiology and Immunology, University of Western Ontario, London, Ontario, Canada

FRANCE

- Institut de Physiologie et Biologie Cellulaires, Université de Poitiers, France
- Pediatric Cystic Fibrosis Center of Trousseau Hospital - Inserm U938 / UPMC

GERMANY

- Institute of Medical Microbiology and Hygiene, Eberhard-Karls University of Tuebingen, Tuebingen, Germany

- Institute fur Medizinische Mikrobiologie, Univeristats Klinikum, Munster

IRELAND

- Queen's University Belfast, Respiratory Medicine Research Group, Microbiology Building, Belfast, Northern Ireland

ISRAEL

- Schulich Faculty of Chemistry Technion – Israel Institute of Technology, Haifa
- Dep. of Biological Chemistry, The Weizmann Institute of Science, Haifa

UNITED KINGDOM

- Dept of Respiratory Medicine, Freeman Hospital, Applied Immunobiology and Transplantation Group, Institute for Cellular Medicine, Level 4, The Medical School University of Newcastle, Newcastle Upon Tyne, United Kingdom
- School of Biological Science, University of Liverpool
- Div. of Pharmacology, Pharmacy and Biomedical Science, Univ. of Portsmouth

SWITZERLAND

- Dept. of Pediatrics, Geneva University Hospitals, Laboratory of Clinical Investigation III, Geneva, Switzerland
- Polyphor Ltd, Switzerland

International Reviewers who collaborated with Italian CF Research Foundation for evaluation of research projects

Referees internazionali che hanno collaborato con FFC per la valutazione dei progetti di ricerca

ASIA

Hong Kong
Dennis Lo Yuk Ming

India
Amit Misra

Israel
Batsheva Kerem
Orit Reish

AUSTRALIA

Scott Bell
Tim Kidd
Manohar Garg
John Massie
John Mattick
David Reid
Cynthia Withchurch

CANADA

Adré Cantin
Tom Clandinin
Peter Durie
Hartmut Grasemann
Bob Hancock
Yeger Herman
Sheila Innis
Roger Levesque
Paul Linsdell
Gergerly Lukacs
Liu Mingyao
Robert Newton
Michael Parkins
Grace Parraga
Paul Pencharz
Danuta Radzioch
Felix Ratjen
Andrew Sandford
Molly Schmid
Aaron Shawn
Christopher Sibley
Pamela Sokol
David Speert
Miguel Valvano
Michael Wheeler
Herman Yeger
Julian Zielensky

EUROPE

Belgium
Karim Amighi
Jean Jacques Cassiman
Tom Coenye
Pierre Cornelis
Harry Cuppens
Ingeborg Liebaers
Peter Vandamme

Denmark
Niels Hojby
Christian Koch
Marie Johannesson
Jette Elisabeth Kristiansen
Søren Molin

France
Frederic Becq
Christelle Coraux
Isabelle Durieu
Alexander Edelman
Brigitte Fauroux
Claude Ferec
Chantal Gauthier
Emanuelle Girodon
Vincent Goffin
Jacky Jaquot
Jean Paul Latgé
Patricia Lemarchand
Christine Linard
Anne Munck
Patrizia Paterlini-Bréchot
Jean-Marc Rolain
Marie Catherine Romey
Juliet Royet
Isabelle Sermet
Clarisse Vandebrouck

Germany
Robert Bals
Michael De Vreese
Jahn Dieter
Gerd Döring
Stephan Fischer
Christoph Freiberg
Matthias Griese
Erick Gulbins
Dominik Hartl
Jürgen Heesemann
Barbara Kahl
Winfried Kern
Wolfgang Kuebler
Karl Kunzelmann
Hermann Schillers
Ursula Seidler
Stefan Stamm
Gratiana Steinkamp
Burkhard Tuemmler
Christiane Wolz

Italy
Antonio De Flora
Fabrizio De Ponti
Silvio Garattini
Marco Lucarelli
Marco Trabucchi

Portugal
Margarida Amaral
Jorge Leitão

Spain
Raquel Barrio

Jaume Bertranpetit
Ana Bustamante-Aragones
Xavier Estivill

Sweden
Ute Romling
Birgitta Strandvik

Switzerland
Leo Eberl
Hans Peter Fisher
Bernard Rossier

The Netherlands
Touw Daan
Peter Klijn
Lidewiji Henneman
Charlotte Robroeks
Bernt Van Der Blink

U.K. – Northern Ireland
Matthew Avison
James Birchall
Marina Botto
Alan R. Brown
Andrew Bush
Philip Calder
Steven Conway
Jane Davies
Robert Dormer
Alistair Duff
Madeleine Ennis
Glenda Esmond
Alain Filloux
Claire Glasscoe
John Govan
Michael Gray
Andrew Greening
Uta Griesenbach
Maurice Hallett
Andrew Jones
Julian Parkhill
Mauro Perretti
Tyrone Pitt
Daniela Riccardi
Martin Savage
David Sheppard
Maurice Super
Paola Vergani
John Widdicombe
Craig Winstanley

SUD AMERICA

Brazil
Margaret Cristina da Silva Boguszewski
Veralice Meireles Sales de Bruin
Mauro M. Teixeira

Costa Rica
Arturo Solis

Venezuela
Juan Bautista De Sanctis

U.S.A.**Alabama**

Bakhrom K. Berdiev
John Paul Clancy
Lisa Schwiebert

California

Carroll Cross
Beate Illek
Ronald Kopito
Terry Machen
Richard Moss
Malla M. Reddy
Charles M. Strom
Alan Verkman
Jeffrey Wine

Colorado

Frank Accurso
Brian Doctor
Jerry A. Nick
Herbert Schweizer

Connecticut

Nadia Ameen
Diane Krause
Li Tianbo

Florida

Alexander Cole
Alexandra Quittner

Georgia

Scott Grosse

Illinois

John Christman
Ann Harris
Anver Kuliev
Le Shen
Lee Shulman
Jerrold Turner

Indiana

Roman Dziarski
Won Kyoo Cho

Iowa

Dwight C. Look
Joseph Zabner

Kansas

John Gatti

Kentucky

Stefan Stamm

Jay Zwischenberger
Joseph Zwischenberger

Louisiana

Jay K. Kolls
Guoshun Wang

Maine

Robert Owens

Maryland

Gary Cutting
Robert K. Ernst
William Guggino
Sam Lai
Gary Mansfield
Jonathan Orens
Harvey Pollard
Pamela Zeitlin

Massachusetts

Joyce Marty Brady
Terence Flotte
Steven Freedman
Robert Kolter
John Ladias
Stephen Lory
Gerald Pier
Gregory Sawiki
Charles Serhan

Michigan

John Li Puma
Kathleen Stringer

Minnesota

Antoinette Moran

Missouri

Carolyn Cannon

New Hampshire

Dean Madden

New York

Isabel Aznarez
Nazzareno Ballatori
David Goldfarb
Alice Prince
Lisa Saiman
Stefan Worgall
Tilla S. Worgall

North Carolina

Robert Aris
Michael Boyle
Charles Esther

Andrew Ghio
Michael Knowles

John Riordan
Gabriel Sherif

Ohio

Melvin Berger
Maria Britto
James Chmiel
Mitchell Drumm
Dana S. Hardin
Daniel Hassett
Scott Herness
Lloyd Horrocks
Valerie Hudson
Christopher Karp
Thomas J. Kelley
Michael Konstan

Oregon

Bruce L. Geller
Xuheong Liu

Pennsylvania

Robert Bucki
Raymond Frizzell
Douglas Wilson

Tennessee

John Christman

Texas

Carolyn Cannon
Philip Thomas

Utah

Valerie Hudson
Guy Zimmerman

Vermont

Daniel J. Weiss

Virginia

Joanna Goldberg

Washington

Moira Aitken
Jane Burns
E. Peter Greenberg
Lucas Hoffmann
Samuel I. Miller
Matt Parsek
Margaret Rosenfeld

Wisconsin

Philip Farrel

Here the list of the 253 international experts who cooperated with FFC to review and to evaluate the grant proposals. Through annual public announcements issued between 2002 and 2011, the Italian CF Research Foundation received 436 grant proposals.

Among those 192 have been selected for funding. The scientists, coming from several countries, cooperated with the Scientific Committee of the FFC Foundation to review the projects submitted: each project was evaluated by at least two experts and some of them evaluated more than one project. To those scientists, who carried out such a precious job, the Foundation expresses its warmest tanks.

Attraverso bandi annuali di concorso pubblico, sono pervenuti alla Fondazione, dal 2002 al 2011, 436 progetti di ricerca CF, tra i quali 192 sono stati selezionati per un finanziamento. 253 scienziati di varie nazioni hanno collaborato con il Comitato Scientifico della Fondazione nel valutare i progetti pervenuti: ciascun progetto ha avuto l'intervento critico di almeno due esperti e alcuni di essi hanno valutato più progetti. Agli scienziati che hanno svolto questo prezioso servizio la Fondazione porge un particolare sentito ringraziamento.

FFC projects 2009-2011 adopted by donors

Progetti FFC 2009-2011 adottati da donatori

FFC #1/2009

Interazione proteina-proteina nella fibrosi cistica: ruolo di NHERF1 nell'organizzazione citoscheletrica e nella patofisiologia delle giunzioni strette

Responsabile: Valeria Casavola (Dip. di Fisiologia generale ed ambientale, Università degli Studi di Bari)

Costo: € 50.000

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC della Vaddadige** (€ 10.000), **Nicola Petrucci e Delegazione FFC di Molfetta** (8.000), **Gli Amici di Thomas con la Delegazione FFC di Vibo Valentia** (€ 8.000), **Delegazione FFC La Bottega delle Donne Montebelluna TV** (€ 24.000)



FFC #2/2009

Sviluppo di nuove molecole per la correzione del difetto di trasporto di cloruro nella fibrosi cistica

Responsabile: J. Luis V. Galietta (Laboratorio di Genetica Molecolare Istituto "Giannina Gaslini" - Genova)

Costo: € 125.000

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Vicenza** (con il contributo dell'iniziativa "La via dei Berici")



FFC #3/2009

Dissezione mediante silenziamento genico mediato da RNA dei meccanismi molecolari che determinano il difetto di maturazione di F508del-CFTR

Responsabile: Nicoletta Pedemonte (Laboratorio Fisiopatologia Molecolare delle Catene Ioniche Centro Biotecnologie Avanzate – Genova)

Costo: € 50.000

Adottato totalmente da: **Anna Iacomini** (€ 8.000), **Gruppo di Sostegno FFC "Rita" Verona** (€ 8.000), **Delegazione FFC di Como** (€ 34.000)



FFC #4/2009

La mutazione dellF508 di CFTR come sorgente di segnali cellulari: un nuovo concetto per spiegare alcuni aspetti della Fibrosi Cistica (Progetto di continuazione)

Responsabile: Lorenzo A. Pinna (Dipartimento Chimica Biologica – Università degli Studi di Padova)

Costo: € 30.000

Adottato totalmente da: **Loifur Srl** (€ 8.000), **Amici per la Ricerca 2009 Bassano del Grappa** (€ 22.000)



FFC #5/2009

Valutazione funzionale di CFTR nei leucociti circolanti di soggetti umani: un nuovo strumento per la diagnostica e la ricerca clinica

Responsabile: Claudio Sorio (Dipartimento di Patologia Generale – Sezione Patologia generale Università degli Studi di Verona)

Costo: € 45.000

Adottato totalmente da: **Rotary Club Trentino Nord e Tomasi Gioielli** (€ 38.340), **Associazione Trentina FC Onlus** (Gruppo di Sostegno FFC) (in ricordo di Anita Furlini) (€ 6.660)



FFC #6/2009

Visualizzazione della struttura della CFTR con tecniche di microscopia a forza atomica

Responsabile: Massimo Vassalli (Istituto di Biofisica – Consiglio nazionale delle ricerche)

Costo: € 25.000

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC del Lago di Garda con i Gruppi di Sostegno di Chivasso e dell'Isola bergamasca**



FFC #7/2009

Strategie per la soppressione dell'iperassorbimento di Na+ e fluido nella malattia delle vie aeree in fibrosi cistica

Responsabile: Olga Zegarra (Laboratorio di Genetica Molecolare – Istituto "Giannina Gaslini" - Genova)

Costo: € 50.000



Adottato totalmente da: **Work in Progress Communication Srl** (€ 13.000), **Brooks Brothers Retail Brand Alliance Europe Srl** (€ 37.000)

FFC #8/2009

Fattori genetici coinvolti nella progressione del fenotipo polmonare in pazienti affetti da fibrosi cistica (Progetto di continuazione)

Responsabile: Paolo Gasparini (Dipartimento di Scienze riproduttive e dello sviluppo – Università degli Studi di Trieste)

Costo: € 60.000



Adottato totalmente da: **Gala di danza "Eleonora Abbagnato et ses amis"** (€ 35.000), **Delegazione FFC di Roma 2 con l'evento "Centro Infiniti"** (€ 15.000), **White Gallery** (€ 10.000)



FFC #9/2009

Patologia molecolare del macchinario dello splicing: aspetti meccanistici ed approcci terapeutici

Responsabile: Franco Pagani (ICGEB – Trieste)

Costo: € 70.000



Adottato totalmente da: **CIV Campionato Italiano Velocità** (€ 10.283), **DediKato 2009** (€ 26.860), **Delegazione FFC del Lago di Garda** (€ 32.857)



FFC #10/2009

Validazione di nuovi candidati vaccini in Pseudomonas aeruginosa

Responsabile: Alessandra Bragonzi (Unità di Infezione e fibrosi cistica – Divisione di Immunologia, Trapianti e Malattie infettive – Istituto San Raffaele - Milano)

Costo: € 60.000



Adottato totalmente da: **Delegazioni FFC di Como, Catania, Vittoria Ragusa e Latina con il LIFC - Associazione Siciliana - Onlus** (in ricordo di Simone)



FFC #11/2009

Impatto dell'infezione persistente da Staphylococcus aureus meticillino-resistente di acquisizione comunitaria (CA-MRSA) e di acquisizione ospedaliera (HA-MRSA) sullo stato clinico dei pazienti con fibrosi cistica: uno studio multicentrico longitudinale

Responsabile: Silvia Campana (Dipartimento di Pediatria - Centro regionale fibrosi cistica Azienda Ospedaliera Universitaria Meyer - Firenze)

Costo: € 50.000

Adottato totalmente da: **Angelini con il brand aziendale Corpotto** per l'iniziativa "la Fibrosi cistica merita un occhio di riguardo"

FFC #12/2009

Nuove strategie per la terapia delle infezioni respiratorie in pazienti CF. Utilizzo di peptidi antimicrobici naturali e sintetici

Responsabile: Renato Gennaro (Dip. di Scienze della vita – Università degli Studi di Trieste)

Costo: € 25.000

Adottato totalmente da: Delegazione FFC di Genova



FFC #13/2009

Prevenzione della formazione di biofilm di Pseudomonas aeruginosa tramite inibizione del metabolismo della molecola segnale GMP-di-ciclico (c-di-GMP)

Responsabile: Paolo Landini (Dipartimento Scienze Biomolecolari e Biotecnologia – Università degli Studi di Milano)

Costo: € 25.000

Adottato totalmente da: Delegazione FFC di Consenza 2 con l'Agriturismo La Locanda del Parco (€ 8.000), Delegazione FFC di Novara (in ricordo di Andrea e Annalisa) (€ 17.000)



FFC #14/2009

Sviluppo di un nuovo peptide antimicrobico specifico per batteri Gram-negativi. Studio della sua efficacia in modelli di infezione polmonare da *P. aeruginosa* e profilo farmacologico

Responsabile: Alessandro Pini (Dip. di Biologia Molecolare – Sezione di Chimica Biologica – Università di Siena)

Costo: € 65.000

Adottato totalmente da: "Un Natale da fiaba" con Kiwanis Club, LIFC - Associazione Toscana - Onlus e Famiglia Papini di Prato



FFC #15/2009

Ruolo dei trasportatori RND in Burkholderia cenocepacia mediante analisi con microarrays (Progetto di continuazione)

Responsabile: Giovanna Riccardi (Dipartimento di Genetica e microbiologia – Università degli Studi di Pavia)

Costo: € 30.000

Adottato totalmente da: Pastificio Rana SpA



FFC #16/2009

Studio in vivo e in vitro dell'azione di nuovi antibiotici diretti contro il citoscheletro batterico e marker di virulenza della superficie cellulare nel trattamento di infezioni da Burkholderia cepacia complex (Bcc)

Responsabile: Alba Silipo (Dipartimento di Chimica Organica e Biochimica – Università degli Studi "Federico II" – Napoli)

Costo: € 65.000

Adottato totalmente da: Delegazione FFC di Belluno



FFC #17/2009

Le strategie di evasione immune attuate da *Pseudomonas aeruginosa* nel processo di adattamento all'ospite nell'infezione cronica delle vie respiratorie in pazienti con fibrosi cistica

Responsabile: Maria Lina Bernardini (Dipartimento di Biologia Cellulare e dello Sviluppo Università "La Sapienza" Roma)

Costo: € 60.000

Adottato totalmente da: Antonio Guadagnin e Figlio di Montebelluna (€ 8.000), Delegazione FFC di Roma 2 (evento "Vorrei 2009", Roma e Potenza) (€ 35.000), Associazione Amici di Cortina (€ 17.000)



FFC #18/2009

Regolazione trascrizionale di interleuchina 8 in cellule epiteliali respiratorie

Responsabile: Giulio Cabrini (Laboratorio Patologia Molecolare – Laboratorio Chimica Clinica ed Ematologia OCM – Azienda Ospedaliera di Verona)

Costo: € 70.000

Adottato totalmente da: Delegazione FFC di Belluno (in ricordo di Silvia Sommavilla)



FFC #19/2009

Ruolo delle interazioni CFTR-connessina nel segnale di PGE2 e nella infiammazione: implicazioni per la fibrosi cistica

Responsabile: Marc Chanson (Dip. di Pediatria – Laboratorio indagini cliniche – Ospedale Universitario di Ginevra)

Costo: € 40.000

Adottato totalmente da: Delegazione FFC La Bottega delle Donne – Montebelluna TV



FFC #20/2009

Validazione genetica e farmacologica di PI3Kγ come target per il trattamento dell'infiammazione delle vie aeree nella fibrosi cistica

Responsabile: Virginia De Rose (Dip. Scienze Cliniche e Biologiche – Divisione Malattie Respiratorie – Università di Torino, AUO "S. Luigi")

Costo: € 80.000

Adottato totalmente da: Delegazione FFC di Torino



FFC #21/2009

Meccanismi della attività battericida nei macrofagi umani ed influenza delle mutazioni CFTR

Responsabile: Paola Del Porto (Dip. di Biologia cellulare e dello Sviluppo – Università degli Studi "La Sapienza" – Roma)

Costo: € 25.000

Adottato totalmente da: Delegazione FFC di Latina (€ 12.500), Lega Italiana FC - Associazione Laziale - Onlus (€ 12.500)



FFC #22/2009

Origini della gamma-glutamiltransferasi del fluido polmonare e suoi effetti nella modulazione del bilancio redox, dell'infiammazione e della disfunzione respiratoria in corso di fibrosi cistica

Responsabile: Alfonso Pompella (Dip.to di Patologia sperimentale – Università degli Studi di Pisa)

Costo: € 20.000

Adottato totalmente da: Associazione Trentina FC Onlus (GdS FFC) (in ricordo di Mauro Walgoi)



FFC #23/2009

Modulazione dell'infiammazione intestinale ed extraintestinale in lattanti con fibrosi cistica come conseguenza di una precoce manipolazione della microflora intestinale

Responsabile: Alfredo Guarino (Dip.to di Pediatria – Università degli Studi "Federico II" Napoli)

Costo: € 30.000

Adottato totalmente da: Lega Italiana FC - Associazione Toscana - Onlus (€ 15.000), For Me srl – Prato (€ 15.000)



FOR ME Srl



STAR MANAGEMENT
CREDITO BERGAMASCO

FIDENZA VILLAGE
OUTLET FASHION



Progetto FFC CFaCore 2009-2012

Attivazione e supporto di un servizio di ricerca su modelli animali per la rete italiana di ricerca sulla fibrosi cistica

Responsabile del servizio: Alessandra Bragonzi

Sede del servizio: Ospedale San Raffaele, Milano

Costo: € 400.000

Adottato parzialmente da: Amici della Ricerca di Milano (€ 63.920), Star Management Srl (€ 10.000), Credito Bergamasco SpA (€ 30.000), Comitato Correggio (€ 70.000), Fidenza Village Outlet (€ 10.000), Delegazione FFC Villa d'Almè Bergamo (€ 12.000), Delegazione di Bologna con Saima SpA (dedicato a Vanessa Savini) (€ 60.000), Donatori Campagna SMS 2009 con il supporto di Vodafone, Tim, Telecom Italia, Wind, Italia "3" (€ 40.978), Donatori Campagna SMS 2010 con il supporto di Vodafone, Tim, Telecom Italia, Wind, Italia "3" (€ 80.461), Iper Famila (€ 20.000)

Adottabile parzialmente per € 2.641

FFC #1/2010

Studio molecolare e funzionale del canale epiteliale del sodio (ENaC) in soggetti con FC e FC atipica

Responsabile: Cristina Bombieri (Dip. Scienze della Vita e della Riproduzione – Sezione di Biologia e Genetica, Univ. di Verona)

Costo: € 60.000

Adottato totalmente da: Delegazione FFC di Imola (€ 10.000), Delegazione FFC di Rovigo (€ 20.000), Amici per la Ricerca 2010 Bassano del Grappa e Loifur Srl (€ 30.000)

FFC #2/2010

Nuovi modelli cellulari e nuove molecole terapeutiche rivolte alle mutazioni "stop" del gene CFTR

Responsabile: Monica Borgatti (Dip. Biochimica e Biologia Molecolare – Univ. Ferrara)

Costo: € 40.000

Adottato totalmente da: Delegazione FFC di Ferrara con la collaborazione del Gruppo di Sostegno di Comacchio

FFC #3/2010

Un approccio basato sulle cellule staminali pluripotenti indotte (iPS) per rigenerare l'epitelio polmonare affetto da fibrosi cistica

Responsabile: Roberto Loi (Dip. Tossicologia – Sez. Oncologia e Patologia Molecolare – Univ. di Cagliari)

Costo: € 50.000

Adottato totalmente da: Philip Watch – Morellato & Sector Group

FFC #4/2010

Nuovi candidati terapeutici per correggere il traffico intracellulare della proteina CFTR-DF508 mutata

Responsabile: Alberto Luini (TIGEM, Napoli)

Costo: € 45.000

Adottato totalmente da: Lega Italiana FC - Associazione Siciliana - Onlus

FFC #5/2010

Ricerca di inhibitori dei chaperoni (complesso HSP70/HSC7) utili per correggere la DF508-CFTR

Responsabile: Mauro Mazzei (Dip. Scienze Farmaceutiche, Università di Genova)

Costo: € 100.000

Adottato totalmente da: Philip Watch – Morellato & Sector Group



FFC #6/2010

Nuovi marcatori biologici per la valutazione dell'efficacia di nuove terapie della fibrosi cistica

Responsabile: Paola Melotti (Centro Regionale Fibrosi Cistica, OCM Verona)

Costo: € 55.000

Adottato totalmente da: Delegazione FFC di Verbania (€ 8.000), Associazione Trentina FC Onlus (Gruppo di Sostegno FFC) (in ricordo di Silvia Sommavilla) (€ 10.000), Consorzio Promotre s.c.r.l. (€ 15.000), Antonio Guadagnin e Figlio di Montebelluna (€ 10.000), Alessandra Bocanera (€ 12.000)

FFC #7/2010

Proprietà strutturali delle componenti intracellulari della proteina CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator)

Responsabile: Oscar Moran (Istituto di Biofisica, CNR, Genova)

Costo: € 90.000

Adottato totalmente da: Delegazione FFC di Cosenza 2 (€ 8.000), Work in Progress Communication "Sapore di Sale 2010" (€ 12.000), Gruppo di Sostegno FFC di Monterotondo (€ 13.000), Delegazione FFC di Genova (€ 10.000), Delegazione FFC Il Sorriso di Jenny (€ 8.000), LIFC Associazione Toscana Onlus con il Comitato Provinciale di Livorno (€ 8.000), Donatori Cartasi (31.000)



FFC #8/2010

Interazione fra attività di CFTR e infezione da Pseudomonas nelle cellule epiteliali respiratorie e ruolo della proteina NHERF1

Responsabile: Anna Tamanini (Lab. Patologia Molecolare, Lab. Analisi Cliniche ed Ematologiche, Az. Ospedaliera Universitaria Integr., Verona)

Costo: € 30.000

Adottato totalmente da: Delegazione FFC "Bottega delle Donne" Montebelluna TV



FFC #9/2010

Staphylococcus aureus: fattori patogenetici e ruolo nella progressione dell'infezione cronica polmonare in pazienti con fibrosi cistica

Responsabile: Daniela Maria Cirillo (Emerging Bacterial Pathogens Unit, Div. of Immunology, Transplantation and Infectious Disease, Scientific Institute H. S. Raffaele, Milano)

Costo: € 70.000

Adottato totalmente da: Delegazione FFC di Milano (€ 52.000), Associazione "Gli Amici di Claudia" Onlus di Cirignola (€ 8.000), Delegazione FFC di Bergamo Villa d'Almè (€ 10.000)



FFC #10/2010

Studio di nuove molecole (lattonasi termostabili) per combattere il sistema di aggregazione di Pseudomonas aeruginosa in fibrosi cistica

Responsabile: Giuseppe Manco (Ist. Biochimica delle Proteine, CNR Napoli)

Costo: € 65.000

Adottato totalmente da: Audemars Piguet Italia (€ 15.000), Delegazione FFC di Vibo Valentia (€ 8.000), Delegazione FFC di Novara (in ricordo di Andrea e Annalisa) (€ 10.000), "Una sera con noi" con Kiwanis Club e Famiglia Papini di Prato (€ 32.000)



FFC #11/2010

Sviluppo di nuovi approcci terapeutici contro le infezioni microbiche nei pazienti con fibrosi cistica: analisi biochimica di frammenti di parete cellulare
Responsabile: Antonio Molinaro (Dip. Chimica Organica e Biochimica, Università Napoli)

Costo: € 80.000

Adottato totalmente da: *Pastificio Rana SpA*



FFC #12/2010

Segnali intracellulari dell'infezione da *Pseudomonas aeruginosa* come bersaglio di nuovi farmaci

Responsabile: Paolo Pinton (Dip. Medicina Sperimentale e Diagnostica, Univ. Ferrara)

Costo: € 60.000

Adottato totalmente da: *Delegazione FFC di Bologna*



FFC #13/2010

Il trasporto di un componente della membrana cellulare (lipopolisaccaride) di *Pseudomonas aeruginosa* come bersaglio per lo sviluppo di nuovi farmaci antibatterici

Responsabile: Alessandra Polissi (Dip. Biotecnologie e Bioscienze, Università Milano Bicocca)

Costo: € 70.000

Adottato totalmente da: *Donatori SMS solidale 2010* con il supporto di *Vodafone, Tim, Telecom Italia, Wind, Italia "3"*



FFC #14/2010

Strategie non convenzionali per il trattamento dell'infezione da *Pseudomonas aeruginosa*: inibizione dell'omeostasi del ferro e del quorum sensing

Responsabile: Paolo Visca (Dipart. Biologia, Univ. Roma Tre, Roma)

Costo: € 50.000

Adottato totalmente da: *Delegazione FFC di Vittoria Ragusa* (€ 30.000), *Delegazione FFC del Lago di Garda con i Gruppi di Sostegno di Chivasso, dell'Isola bergamasca e della Valpolicella VR* (€ 20.000)



FFC #15/2010

Valutazione dell'utilità di approcci terapeutici mirati ad aumentare i livelli di glutathione nelle vie aeree dei pazienti con Fibrosi Cistica per controllare le infezioni batteriche polmonari ed il danno indotto da batteri

Responsabile: Andrea Battistoni (Dip. Biologia, Univ. di Roma Tor Vergata, Roma)

Costo: € 55.000

Adottato totalmente da: *Delegazione FFC di Roma 2* con gli eventi Vorrei e Vinoforum 2010



FFC #16/2010

La modulazione del metabolismo degli sfingolipidi come bersaglio terapeutico per la malattia polmonare in fibrosi cistica

Responsabile: Maria Cristina Dechechchi (Lab. Patologia Molecolare, Lab. Chimica Clinica ed Ematologica, Az. Ospedaliera Universitaria Integr., Verona)

Costo: € 60.000

Adottato totalmente da: *Assist Group Srl* (€ 30.000), *Latteria Montello SpA* (€ 20.000), *Delegazione FFC di Imola* (€ 10.000)



FFC #17/2010

Caratterizzazione molecolare della trimetilangelicina (TMA) e di analoghi strutturali in fibrosi cistica: effetti anti-infiammatori e potenziamento dell'attività biologica del CFTR

Responsabile: Roberto Gambari (Dip. Biochimica e Biologia Molecolare, Univ. Ferrara)

Costo: € 60.000

Adottato totalmente da: *Delegazione FFC di Torino*



FFC #18/2010

La pentrassina lunga PTX3 nella resistenza alle infezioni e come candidato agente terapeutico nella fibrosi cistica

Responsabile: Cecilia Garlanda (Fondazione Humanitas per la Ricerca, Milano)

Costo: € 80.000



Adottato totalmente da: *Coca Cola Light Tribute to Fashion*

FFC #19/2010

Analisi metabolomica mediante spettrometria in risonanza magnetica nucleare: un nuovo approccio alla comprensione dell'infiammazione ed al monitoraggio della terapia farmacologica in bambini e giovani adulti con fibrosi cistica



Responsabile: Paolo Montuschi (Dip. di Farmacologia, Facoltà Medicina, Univ. Sacro Cuore, Roma)

Costo: € 45.000



Adottato totalmente da: *Comune di Cernobbio Festival Città di Cernobbio* (€ 15.000), *Delegazione FFC di Lecce* (€ 15.000), *LIFC Associazione Lucana Onlus* (€ 15.000)



FFC #20/2010
Identificazione di nuovi potenziali agenti terapeutici per la fibrosi cistica ad attività multipla selettiva

Responsabile: Annamaria Naggi (Ist. di Ricerche Chimiche e Biochimiche "G. Ronzoni", Milano)

Costo: € 45.000



Adottato totalmente da: *Delegazione Lago di Garda con i GdS dell'Isola Bergamasca, di Chivasso e della Valpolicella*



FFC #21/2010
La risposta infiammatoria Th17 nella fibrosi cistica: nuove acquisizioni per la terapia dell'infiammazione e lo studio di polimorfismi genetici



Responsabile: Luigina Romani (Dip. Medicina Sperimentale e Scienze Biomediche, Univ. Perugia)

Costo: € 80.000



Adottato totalmente da: *Coca Cola Light Tribute to Fashion* (€ 7.500), *Francesca Guadagnin* (€ 8.000), *Delegazione FFC di Belluno* (€ 64.500)



FFC #22/2010
Interazioni tra piastrine e leucociti nell'infiammazione della fibrosi cistica: possibili sbocchi terapeutici

Responsabile: Mario Romano (Dip. Scienze Biomediche, Univ. Chieti-Pescara, Chieti)

Costo: € 60.000



Adottato totalmente da: *LIFC Associazione Lucana Onlus*



FFC #23/2010
Lo screening neonatale della fibrosi cistica in Italia. Indagine valutativa sugli aspetti tecnico-scientifici, organizzativi e psico-relazionali

Responsabile: Teresa Repetto (A.O.U. "A. Meyer", Centro Regionale Toscano Fibrosi Cistica, Firenze)

Costo: € 35.000



Adottato totalmente da: *I Familiari e Amici di Luisa Alghero* (€ 12.000), *Delegazione FFC di Latina* (in ricordo di Alessandro Lombardi) (€ 23.000)



FFC#1/2011
Proprietà di Trimetilangelicina nel recupero di DF508-CFTR

Responsabile: Valeria Casavola (Dip. Fisiologia generale ed ambientale, Università di Bari)

Costo: € 90.000



Adottato totalmente da: *Delegazione FFC di Vicenza*



FFC#2/2011

Sintesi di derivati del PTC124 con capacità di correggere i codoni di stop prematuri presenti nel gene CFTR e di aumentarne la biodisponibilità

Responsabile: Aldo Di Leonardo (Dip. Scienze e Bioteconomie Molecolari e Biomolecolari, Università di Palermo)

Costo: € 40.000

Adottato parzialmente da: Delegazione FFC di Lecce (€ 20.000)

Adottabile per € 20.000



FFC#3/2011

Alterazione di segnali generati dalla Protein Chinasi CK2 in cellule che esprimono ΔF508-CFTR. Aspetti funzionali e prospettive terapeutiche

Responsabile: Lorenzo Pinna (Dip. Chimica Biologica, Università di Padova)

Costo: € 40.000

Adottato totalmente da: Delegazione FFC della Valdadige (€ 20.000), Associazione Trentina FC Onlus con la Fiaba "Il Villaggio di Natale" (in ricordo di Massimiliano e Sebastiano) (€ 20.000)



FFC#4/2011

Ruolo della compartimentazione e dell'attività del sistema AMPc/PKA nella regolazione dell'espresso-funzionale di CFTR

Responsabile: Stephan Reshkin (Dip. Fisiologia generale ed ambientale, Università di Bari)

Costo: € 65.000

Adottato totalmente da: Delegazione FFC di Avellino (€ 15.000), ParkingGo Oasi Srl (€ 10.000), Amici per la Ricerca 2011 Bassano e Loifur Srl (€ 30.000)

Adottabile per € 10.000



Parkin^{GO}
LOIFUR

FOUNDAZIONE
Cariverona

FFC#5/2011

Studio Europeo sui geni modificatori in fibrosi cistica

Responsabile: Harriet Corvol (Pediatric CF Center of Troussseau Hospital - Inserm U938 / UPMC, Paris, France)

Costo: € 100.000

Adottato totalmente da: Fondazione Cassa di Risparmio di Verona

Fondazione
Bruno Maria Zaini

ATTIVITÀ SOCIALE

FFC#6/2011

Studio del ruolo di mutazioni nel gene CFTR nel modulare l'espressione fenotipica della fibrosi cistica mediante analisi dell'mRNA

Responsabile: Stefano Duga (Dip. Biologia e Genetica per le Scienze Mediche, Università di Milano)

Costo: € 50.000

Adottato totalmente da: Fondazione Bruno Maria Zaini

FFC#7/2011

Nuove strategie per applicazioni cliniche alla diagnosi prenatale non invasiva di fibrosi cistica: analisi di alleli fetali mutati nel plasma materno

Responsabile: Maurizio Ferrari (Lab. Biologia Clinica Molecolare e Citogenetica, Università Vita-Salute HSR, Milano)

Costo: € 60.000

Adottabile

FFC#8/2011

Analisi dello screening del portatore di fibrosi cistica su un ampio territorio

Responsabile: Carlo Castellani (Centro Regionale FC, Azienda Ospedaliera Universitaria, Verona)

Costo: € 65.000

Adottabile

FFC#9/2011

Lo screening del portatore sano per la fibrosi cistica: la voce dei cittadini

Responsabile: Paola Mosconi (Ist. Ricerche Farmacologiche Mario Negri, Lab. for Medical Research and Consumer Involvement)

Costo: € 35.000

Adottato totalmente da: Delegazione FFC La Bottega delle Donne di Montebelluna



FFC#10/2011

Sviluppo pre-clinico di Peptidomimetici attraverso la via inalatoria per il controllo delle infezioni da Pseudomonas aeruginosa in modelli murini

Responsabile: Alessandra Bragonzi (Infection and Cystic Fibrosis Unit, Division of Immunology, Transplantation and Infectious Disease, San Raffaele Scientific Institut, Milano)

Costo: € 35.000

Adottato totalmente da: Delegazione FFC di Milano



FFC#11/2011

Infezioni da *Staphylococcus aureus* in pazienti con fibrosi cistica: disegno, sintesi e determinazione dell'attività antibatterica in vitro di nuovi beta-lattamici e molecole linezolidide-simili come nuovi potenziali agenti antibatterici

Responsabile: Clementina Elvezia Cocuzza (Dip. Medicina Clinica e Prevenzione, Univ. Milano-Bicocca)

Costo: € 50.000

Adottato totalmente da: Delegazione FFC della Catania (€ 25.000), Delegazione FFC Il Sorriso di Jenny (€ 8.000), Associazione Trentina FC Onlus (in ricordo di Sara Zini) (€ 17.000)



FFC#12/2011



Nuovi antibiotici versus *Burkholderia cepacia* a partire da batteri antartici

Responsabile: Renato Fani (Dip. Biologia dell'Evoluzione, Università di Firenze)

Costo: € 65.000

Adottato totalmente da: Donatori SMS Solidale 2011

Poste mobile tiscali.

tele tu

FFC#13/2011

Identificazione e caratterizzazione di nuovi farmaci contro l'infezione cronica da *Pseudomonas aeruginosa*

Responsabile: Livia Leoni (Dip. Biologia, Università di Roma Tre, Lab. Microbiol. Molecolare e Biotec. Microrganismi)

Costo: € 40.000

Adottato totalmente da: Delegazione FFC della Vercanica V.C.O. (€ 10.000), Delegazione FFC della Valpollicella (€ 20.000), Antonio Guadagnin & Figlio (€ 10.000)



FFC#14/2011

Sviluppo di nuovi peptidi e lipopeptidi attivi nel trattamento di patogeni polmonari: studi *in vitro* ed *in vivo*

Responsabile: Maria Luisa Mangoni (Dip. Scienze Biochimiche, Univ. "La Sapienza", Roma)

Costo: € 70.000

Adottato totalmente da: Carla Silva Ubertalli (in ricordo di Marcella Ubertalli Ferrero) Ventimiglia (€ 50.000)

Adottabile per € 20.000

FFC#15/2011

Sviluppo, produzione e caratterizzazione di peptidi antimicrobici (CAMPs) attivi sulla forma sessile dei patogeni opportunisti *Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia cenocepacia*

Responsabile: Eliodoro Pizzo (Dip. Biologia Strutturale e Funzionale, Università "Federico II", Napoli)

Costo: € 35.000

Adottato totalmente da: *Delegazione FFC di Imola*



FFC#16/2011

Achromobacter xylosoxidans*, patogeno emergente in pazienti affetti da Fibrosi Cistica: dalla caratterizzazione molecolare allo sviluppo di strategie terapeutiche basate sull' attività del batterio predatore *Bdellovibrio

Responsabile: Serena Quattrucci (Dip. Pediatria e Neuropsichiatria Inf., Univ. "La Sapienza", Polycl. Umberto I, Centro fibrosi cistica, Roma)

Costo: € 40.000

Adottato parzialmente da: *Delegazione FFC di Monterotondo Roma* (€ 10.000), *Delegazione FFC di Latina* (€ 20.000), *Amici della Ricerca di Palermo* (€ 10.000)



FFC#24/2011

Sviluppo preclinico del peptide antimicrobico M33. Efficacia contro le infezioni polmonari da *Pseudomonas aeruginosa*

Responsabile: Alessandro Pini (Dipartimento di Biotecnologie, Università di Siena)

Costo: € 38.000

Adottato parzialmente da: *Delegazione FFC di Legnago* (€ 15.000), *Delegazione FFC di Varese* (€ 10.000)

Adottabile per € 13.000



FFC#17/2011

Mediatori anti-infiammatori derivati dall'acido docosaeaxenoico nell'esalato condensato e nello sputo di adulti affetti da fibrosi cistica

Responsabile: Marina Aiello (Dip. Scienze cliniche, Università di Parma)

Costo: € 45.000

Adottato totalmente da: *Delegazione FFC di Bologna*



FFC#18/2011

I meccanismi di induzione dell'inflammasoma e del rilascio di IL-1 β stimolati da *Pseudomonas aeruginosa* forniscono le basi per strategie terapeutiche innovative nel trattamento dell'infiammazione nei malati di Fibrosi Cistica

Responsabile: Maria Lina Bernardini (Dip. Biologia e Biotecnologie, Università "La Sapienza", Roma)

Costo: € 90.000

Adottabile



FFC#19/2011

Fosfolipasi C beta come bersaglio terapeutico candidato del segnale proinflammatorio nelle vie respiratorie della fibrosi cistica

Responsabile: Giulio Cabrini (Dip. Patologia e Diagnostica, Università di Verona)

Costo: € 90.000

Adottato totalmente da: *Delegazione FFC di Belluno*

FFC#20/2011

Risposta dell'ospite all'adattamento di *Pseudomonas aeruginosa* durante la colonizzazione cronica delle vie aeree

Responsabile: Cristina Cigana (Infection and Cystic Fibrosis Unit, Division of Immunology, Transplantation and Infectious Diseases, San Raffaele Scientific Institute, Milano)

Costo: € 75.000

Adottato parzialmente da: *Delegazione FFC di Bergamo Villa d'Almè* (€ 10.000), *Amici della Ricerca di Milano* (€ 10.000), *Latteria Montello 70° compleanno nonno Armando* (€ 10.000)

Adottabile per € 45.000



FFC#21/2011

Fosfodiesterasi tipo-4 (PDE4) come potenziale bersaglio farmacologico per ridurre l'infiltrazione neutrofilica e il danno polmonare nella fibrosi cistica

Responsabile: Virgilio Evangelista (Lab. di Biologia e Farmacologia Vascolare, Cons. Mario Negri Sud, Chieti)

Costo: € 90.000

Adottabile

FFC#22/2011

Modulazione del metabolismo di ceramide nella terapia della fibrosi cistica

Responsabile: Riccardo Ghidoni (Lab. Biochimica e Biologia Molecolare, Dip. Medicina, Osp. S. Paolo, Università di Milano)

Costo: € 90.000

Adottabile

FFC#23/2011

Particelle respirabili modificate con poli(etilenimina) per la veicolazione di un oligonucleotide decoy contro il fattore di trascrizione nucleotide NF- B: una nuova strategia per la terapia combinata della fibrosi cistica?

Responsabile: Fabiana Quaglia (Dip. Chimica Farmacologica e Tossicologica, Università "Federico II", Napoli)

Costo: € 40.000

Adottato totalmente da: *Delegazione FFC del Lago di Garda con i CdS dell'Isola Bergamasca e di Chivasso*



FFC#25/2011

DWI un nuovo strumento per valutare l'infiammazione nei pazienti con fibrosi cistica con esacerbazione respiratoria

Responsabile: Giovanni Morana (Servizio Fibrosi Cistica, Ospedale Ca' Foncello, Treviso)

Costo: € 70.000

Adottato parzialmente da: *Paolo Isoni con Marta Marzotto* (€ 15.040), *Dedikato 2011* (€ 11.000), *Delegazione FFC di Lucca* (€ 10.000)

Adottabile per € 33.960



FFC#26/2011

Valutazione funzionale dei monociti umani come nuovo strumento per la ricerca clinica e preclinica in fibrosi cistica

Responsabile: Claudio Sorio (Dip. di Patologia e Diagnostica, Università di Verona)

Costo: € 70.000

Adottato totalmente da: *Donatori SMS Solidale 2011*



CF research costs borne by FFC Foundation 1997-2011 (€)											
Research area	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2002-2011
1. CFTR physiopathology & new therapy	263,000 2 proj.	238,000 5 proj.	76,000 4 proj.	205,000 5 proj.	205,000 5 proj.	220,000 5 proj.	195,000 2 proj.	375,000 7 proj.	470,000 8 proj.	235,000 4 proj.	2,482,000 47 proj.
2. Genetics	-	90,000 3 proj.	113,000 4 proj.	110,000 2 proj.	80,000 3 proj.	113,000 2 proj.	195,000 3 proj.	130,000 2 proj.	-	310,000 5 proj.	1,140,000 24 proj.
3. Microbiology	18,000 1 proj.	105,000 3 proj.	95,000 3 proj.	145,000 4 proj.	232,000 9 proj.	291,000 7 proj.	260,000 5 proj.	270,000 6 proj.	395,000 6 proj.	373,000 8 proj.	2,784,000 52 proj.
4. Inflammation	211,000 1 proj.	55,000 1 proj.	163,000 5 proj.	123,000 4 proj.	113,000 3 proj.	163,000 3 proj.	345,000 6 proj.	295,000 6 proj.	485,000 8 proj.	520,000 7 proj.	2,473,000 43 proj.
5. Epidemiology & Clinical Res	-	20,000 1 proj.	53,000 3 proj.	31,000 2 proj.	75,000 4 proj.	70,000 3 proj.	85,000 2 proj.	130,000 3 proj.	35,000 1 proj.	140,000 2 proj.	639,000 21 proj.
Core facilities	-	-	-	-	-	-	200,000 QuantitGENE	400,000 CfACore	6,500 Primary Cult	7,200 Primary Cult	613,700 3 proj.
Partial costs	492,000	508,000	500,000	614,000	705,000	857,000	1,280,000	1,600,000	1,391,500	1,585,200	7,998,500
Research projects	4 proj.	13 proj.	19 proj.	17 proj.	24 proj.	20 proj.	17 proj.+1	24 proj.+1	23 proj.+1	26 proj.+1	187 proj.+3 fac
General costs	21,500	32,000	46,000	54,000	61,000	65,000	76,000	82,000	85,000	97,000	619,500
Total costs	513,500	540,000	546,000	668,000	766,000	922,000	1,356,000	1,682,000	1,476,500	1,682,200	10,152,200

Research support at Verona CF centre 1997-2002: € 777,217

Total research investment 1997-2011: € 10,929,417



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

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

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

Consiglio di Amministrazione
Presidente: Vittoriano Faganelli
Vicepresidente: Matteo Marzotto
Consiglieri: Eugenio Bertolotti
Andrea Bolla
Luigi Bozzini
Sandro Caffi
Paolo Del Debbio
Giuseppe Ferrari
Annamaria Giunta
Gianni Mastella
Michele Romano
Luciano Vettore

Direzione Scientifica
Tel. 045 8123567
Direttore Scientifico: Gianni Mastella
e-mail: gianni.mastella@ospedaleuniverona.it

Comitato di Consulenza Scientifica
Presidente: Antonio Cao
Consulenti: Giorgio Berton
Roberto Buzzetti
Gerd Döring
Lucio Luzzatto

Per donazioni:

- Conto corrente postale n. 18841379
- Bonifico Unicredit Banca
IT 03 N 02008 11718 000009465517
- Bonifico Banca Popolare Verona
IT 60 V 05188 11708 000000048829
- On-line sul sito: www.fibrosicisticaricerca.it
- 5 x mille dell'IRPEF

Grafica: Ada Frapporti

Stampato il 23 novembre 2011
Tipolitografia Artigiana
San Giovanni Lupatoto (VR)

www.fibrosicisticaricerca.it



*fondazione per la ricerca
sulla fibrosi cistica - onlus*
Italian Cystic Fibrosis Research Foundation

In collaborazione con



Azienda Ospedaliera
Universitaria Integrata
Verona

