5ª Convention d'autunno dei ricercatori italiani per la fibrosi cistica

Verona

26 - 27

ottobre 2007

Palazzo

della

Gran Guardia

10 anni per la ricerca 1997 - 2007

fondazione per la ricerca sulla fibrosi cistica - onlus

Sotto l'Alto Patronato del Presidente della Repubblica

fondazione per la ricerca
sulla fibrosi cistica - onlus

Italian CF Research Foundation

Sotto l'Alto Patronato del Presidente della Repubblica Italiana

V Convention d'Autunno dei Ricercatori Italiani in Fibrosi Cistica

5th Convention of Italian Researchers in Cystic Fibrosis

nel decennale della nascita della Fondazione FFC
in the 10th anniversary of the FFC Foundation

Verona 26 - 27 novembre 2007
Palazzo della Gran Guardia
Piazza Brà, Verona

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

Work progress of projects funded by FFC

- **Genetica applicata - *Applied Genetics***
- **Ricerca clinica ed epidemiologica - *Epidemiology & Clinical Research***
- **Microbiologia - *Microbiology***
- **Infiammazione - *Inflammation***
- **Fisiopatologia della proteina CFTR e terapie del difetto di base**

Physiopathology of CFTR protein & new therapy

Indice - Summary

Tempo di bilanci ---------- *pag. 5*

1. GENETICA APPLICATA - *Applied Genetics*

L. Luzzatto Principali acquisizioni in tema di genetica CF attraverso i risultati di progetti FFC già pubblicati
Main acquisitions on CF genetics through results of FFC projects already published *pag. 6*

1. **M. C. Rosatelli, M. Baffico, C. Castellani, M. Seia, F. Torricelli, T. Santostasi** *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* (Prog. FFC #24/2006) *pag. 7*
2. **L. Cremonesi, G. Restagno, M. Seia, C. Castellani** *New approaches for noninvasive prenatal diagnosis of cystic fibrosis by fetal DNA analysis in maternal plasma* (Prog. FFC #14/2005) *pag. 8*
3. **F. Pagani** *1. Splicing affecting Genomic Variants in CFTR: Diagnostic and Therapeutic Aspects 2. Evaluation of disease causing mutations in CFTR co-transcriptional splicing units (Prog. FFC #15/2005 e Prog. FFC #20/2007)* *pag. 9*
4. **G. Novelli, P. F. Pignatti, R. Strom** *Causes, evolution and progression of nasal polyps: role of modifier genes and a new approach through CGH array* (Prog. FFC #23/2006) *pag. 10*
5. **P. Gasparini, G. Cabrini** *Genetic factors involved in the innate immunity influencing pulmonary disease in Cystic Fibrosis patients* (Prog. FFC 22/2006) *pag. 11*
6. **G. Castaldo** *Molecular analysis of genes encoding CFTR interactors of SLC26 family in CF patients (*Prog. FFC #19/2007, nuovo) (7') *pag. 12*

2. CLINICA ED EPIDEMIOLOGIA – *Epidemiology & Clinical Research*

R. Buzzetti Principali acquisizioni in tema di ricerca clinica CF attraverso i risultati di progetti FFC già pubblicati
Main acquisitions on clinical research through results of FFC projects already published *pag. 13*

7. **C. Colombo** *Diabetes, glucose intolerance and hypoglycemia in cystic fibrosis* (Prog. FFC #16/2005) *pag. 14*
8. **S. Bernasconi** *New insights into insulin-resistance in cystic fibrosis: the effect of cytokines (*Prog. FFC #18/2006*)* *pag. 15*
9. **L. Minicucci, R. Haupt** *Efficacy of slow release insulin in cystic fibrosis patients with glucose intolerance and clinical decay* (Prog. FFC #21/2006) *pag. 16*
10. **A. Guarino, C. Colombo, L. Morelli** *Prevention of pulmonary exacerbations in children with cystic fibrosis through the modification of intestinal microflora* (Prog. FFC #20/2006) *pag. 16*
11. **F. Festini** *Prolonging the duration on site of short peripheral venous catheters used to administer intravenous antibiotic courses in adult subjects with cystic fibrosis. A randomised controlled trial to evaluate the effect of different concentrations of antibiotic in normal saline solution* (Prog. FFC #19/2006) *pag. 18*
12. **G. Taccetti, L. Cariani** *Early antibiotic treatment in Pseudomonas aeruginosa eradication in cystic fibrosis patients: a randomised policentric study on two different protocols* (Prog. FFC #17/2007) *pag. 18*
13. **C. Braggion** *Control and prevention of respiratory infections in Cystic Fibrosis patients: an evaluation of the emission distance of Pseudomonas aeruginosa from the respiratory tract of infected persons through coughing and conversation* (Prog. FFC #16/2007) *pag. 19*
14. **P. Catastini, S. Di Marco** *Depression and anxiety in CF patients and their caregivers and the impact of these symptoms on compliance to medical treatment, medical outcomes and quality of life* (Prog. FFC #18/2007) *pag. 20*

3. MICROBIOLOGIA – *Microbiology*

G.Doering Microbiologia di base, genetica e clinica: ciò che è stato raggiunto e ciò che si dovrà fare in futuro
Basic, Genetic and Clinical Microbiology: what has been achieved, what has to be done in the future *pag. 21*

15. B. Colonna, M. Sanguinetti, M. Nicoletti, M. Casalino E. Fiscarelli *Stenotrophomonas maltophilia, an emergent pathogen associated to cystic fibrosis: identification and molecular characterization of virulence determinants as potential targets for new therapeutical strategies* (Prog. FFC #7/2005 e Prog. FFC #7/2007) *pag. 22*

16. V. Venturi *1. Studies of the Quorum Sensing Systems of Pseudomonas aeruginosa and Burkholderia cepacia complex 2. Burkholderia cepacia complex: closing down on the major virulence* factors (Prog. FFC #9/2005 e Prog. FFC #9/2007) *pag. 23*

17. G. Bertoni, A. Bragonzi *Genome-wide identification of target genes for the design of non-conventional antibiotics against cystic fibrosis-related pathogens* (Prog. FFC #6/2006) *pag. 24*

18. A.Bragonzi, G. Bertoni, M. Scarselli *A genome-wide approach to the identification of novel targets for immuno-antibacterials in Pseudomonas aeruginosa* (Prog. FFC#8/2006) *pag. 25*

19. P. Landini, A. Bernardi, P.Seneci *Counteracting Pseudomonas aeruginosa biofilm formation by inhibition of novel targets: regulation of the levels of the di-cyclic-GMP signal molecule* (Prog. FFC #9/2006) *pag. 25*

20. A. Bevivino, F. Ascenzioni, A. Bragonzi *Influence of Pseudomonas aeruginosa and CF host on Burkholderia cenocepacia pathogenicity* (Prog. FFC #7/2006) *pag. 26*

21. G. Riccardi, S. Buroni, M. Valvano *The role of RND drug efflux transporters in the intrinsic antibiotic resistance of Burkholderia cenocepacia* (Prog. FFC #10/2006) *pag. 27*

22. R. Rizzo, A. Molinaro, E. A. Tonin *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* (Prog. FFC #11/2006) *pag. 28*

23. A. S. Neri, G. M. Rossolini *Longitudinal study of Pseudomonas aeruginosa resistance: selection and evolution of resistance mechanisms in relation to antibiotic treatment in cystic fibrosis patients* (Prog. FFC #14/2006) *pag. 29*

24. G. Manno, R. Biassoni, E. A. Debbia, A. Sangiuolo *1.Genetic fingerprinting of Pseudomonas aeruginosa isolates from Italian cystic fibrosis patients: comparison with isolates from the environment and other clinical origins in Europe. 2. Multicenter study on molecular epidemiology, and prevalence of antimicrobial resistance phenotypes* (Prog. FFC #8/2005 e Prog. FFC #12/2007) *pag. 29*

25. S. Campana *Community-acquired MRSA and hospital-acquired MRSA in cystic fibrosis patients: a study regarding antibiotic susceptibility, epidemiology, natural history and clinical relevance* (Prog. FFC #12/2006 e Prog. FFC#11/2007) *pag. 31*

26. R. Fani *A two stage strategy for early and accurate detection of B. cepacia in routine clinical analysis involving CF patients (*Prog. FFC #13/2006) *pag. 31*

27. F. Bonomi, G. Bertoni *Dissecting a surface target candidate for the rational design of novel antibacterial drugs against Pseudomonas aeruginosa* (Prog. FFC #6/2007) *pag. 32*

28. A. Molinaro, M. L. Bernardini *Biochemical adaptation by Pseudomonas aeruginosa to the airways of cystic fibrosis patients* (Prog. FFC #8/2007) *pag. 33*

29. P. Visca. L. Leoni *Iron uptake and quorum sensing in Pseudomonas aeruginosa virulence* (Prog. FFC #10/2007) *pag. 34*

4. INFIAMMAZIONE - *Inflammation*

G. Berton Principali acquisizioni in tema di infiammazione CF attraverso i risultati di progetti FFC già pubblicati *Main acquisitions on CF inflammation through results of FFC projects already published* *pag. 35*

30. A. Pompella *Chronic Oxidative Lung Injury during Cystic Fibrosis – Protective Roles of Gamma-Glutamyltransferase and Ascorbic Acid* (Prog. FFC #11/2005) *pag. 37*

31. A. Battistoni *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* (Prog. FFC #15/2006) *pag. 37*

32. M. Romano, L. Iapichino *Lipoxin A_4 formation and signalling in cystic fibrosis* (Prog. FFC #12/2005) *pag. 38*

33. M. C. Dechecchi, F. Becq, R. Gambari *Effect of correctors of defective CFTR on the Pseudomonas aeruginosa-dependent inflammatory response in respiratory epithelial cells* (Prog.FFC #16/2006) *pag. 39*

34. P. Melotti, P. Mauri, C. Sorio *Roles of azithromycin other than bactericidal: relevance for therapy of cystic fibrosis*

(Prog. FFC #17/2006) *pag. 40*
35. G. Cabrini, R. Gambari *A gene-targeted anti-inflammatory approach based on the Transcription Factor "decoy" strategy* (Prog. FFC #13/2007) *pag. 40*
36. P. Del Porto, F. Ascenzioni, S. Quattrucci *Influence of CFTR mutations in bactericidal activity of human macrophages* (Prog. FFC #14/2007) *pag. 41*
37. M. Romano, L. Battistini, M. L. Furnari *Mechanisms of inflammation resolution in cystic fibrosis* (Prog. FFC #15/2007) *pag. 42*

5. FISIOPATOLOGIA DELLA PROTEINA CFTR E TERAPIE DEL DIFETTO DI BASE
Physiopathology of CFTR protein & new therapy

A. Cao Principali acquisizioni in tema di fisiopatologia CFTR e nuove terapie attraverso i risultati di progetti FFC già pubblicati – *Main acquisitions on CFTR physiopathology and new therapy through results of FFC projects already published: a critical evaluation* *pag. 44*

38. M. Conese, N. Capitanio, V. Casavola *Homing of bone marrow-derived stem cells to the respiratory epithelium in a cystic fibrosis mouse model: Role of bioenergetic metabolism* (Prog. FFC #2/2006) *pag. 45*
39. R. Loi *Mechanisms of recruitment of adult bone marrow-derived cells to normal and cystic fibrosis airway epithelium* (Prog. FFC #5/2006) *pag. 46*
40. F. Sangiuolo, M. De Felici, L. Guerra, M. Lucarelli *CFTR gene correction in human embryonic stem cells mediated by Small Fragment Homologous Replacement (SFHR)* (Prog. FFC #5/2005) *pag. 47*
41a.V. Casavola, M. Zaccolo *Role of the scaffolding protein NHERF in the PKA-mediated regulation of CFTR sorting and activity* (Prog. FFC #1/2005) . *pag. 48*
41b.V. Casavola, M. Conese *Cellular and molecular mechanisms of the actin cytoskeleton involvement in the NHERF1-dependent rescue of deltaF508 CFTR in human airway cells* (Prog. FFC#2/2007) *pag. 49*
42. J. V. L. Galietta, M. Mazzei, O. Moran *Identification, optimization, and validation of potentiators and correctors for the pharmacotherapy of cystic fibrosis* (Prog. FFC #3/2006) *pag. 50*
43. O. Moran, O. Zegarra, N. Dimasi *Functional and structural basis of the molecular mechanism of CFTR potentiators: towards therapeutic feasible molecules* (Prog. FFC #4/2006) *pag. 50*
44. M. Colombatti, G. Cabrini, F. Dosio *Novel methods of intracellular delivery of ΔF508-CFTR correctors* (Prog. FFC #1/2006) *pag. 51*
45. M. Mazzei, E. Melloni, S. Moro, J. V. L. Galietta *Computational design, biochemical study, synthesis and screening of pharmacological chaperones as correctors of ΔF508-CFTR* (Prog. FFC #3/2007) *pag. 52*
46. P. Ballerini *Guanine-based purines and Cystic Fibrosis: molecular mechanisms for a potential new pharmacological approach* (Prog. FFC #1/2007) *pag. 52*
47. L. Pinna *Assessing the implication of protein kinase CK2 in cystic fibrosis pathogenesis* (Prog. FFC #4/2007) *pag. 53*
48. F. Quaglia, R. Carnuccio *Novel particulate systems for the delivery of an oligonucleotide decoy to Nuclear Factor-kB: a potential strategy for treating cystic fibrosis* (Prog. FFC #5/2007) *pag. 54*
Publications and Congress Abstracts

PUBBLICAZIONI E SOMMARI CONGRESSUALI DEGLI STUDI FINANZIATI DALLA FONDAZIONE FFC
Publications and congress abstracts from studies funded by italian cf research foundation *pag. 55*
LABORATORI E CENTRI CLINICI CHE PARTECIPANO A PROGETTI DI RICERCA FFC
Laboratories and medical centres involved in FFC projects *pag. 63*
I 133 ESPERTI INTERNAZIONALI CHE HANNO COLLABORATO PER L'ANALISI / VALUTAZIONE DEI PROGETTI FFC
International scientists who collaborated in reviewing FFC research proposals *pag. 64*
PROGETTI FFC ADOTTATI *pag. 65*

Note
- I progetti presentati in questa convention sono solo quelli appena conclusi o ancora in corso o di recente avvio.
- Gli Autori indicati nell'indice sono solo i responsabili di progetto e loro partners formalmente assegnatari dei grants FFC. Altri collaboratori ai progetti sono inseriti, quando segnalati dal Responsabile di progetto, negli abstracts.

Tempo di bilanci

La Fondazione per la Ricerca in Fibrosi Cistica è da tempo entrata nel suo 11° anno di vita (ha compiuto 10 anni il 31 gennaio 2007) e in questo ottobre 2007 si sta facendo un bilancio riferito in particolare agli ultimi 6 anni, da quando cioè è partito un programma di rete di ricerca tra laboratori e centri clinici. La V Convention d'Autunno si inserisce in questo bilancio, offrendo a quanti sono interessati alla ricerca CF spunti di analisi per tracciare un seguito di questo percorso che risponda a bisogni condivisi di sviluppo delle conoscenze che ancora ci mancano. In questo, emergono alcuni criteri cui si auspica si ispirino i ricercatori: l'originalità delle proposte, intesa come consapevole addizione o integrazione ai filoni di ricerca che si stanno seguendo in altri contesti; una rafforzata attenzione all'obiettivo ultimo di cure innovative della malattia; uno sforzo ulteriore per mettere insieme collaborazioni efficaci e sinergia di competenze, che vadano anche oltre i confini del territorio nazionale; coraggiosa iniziativa per sviluppare studi clinici ed epidemiologici di cui avvertiamo, almeno in Italia, ancora forte carenza. Su queste basi la Fondazione intende accrescere nel prossimo futuro il suo supporto alla ricerca CF.

Abbiamo chiara consapevolezza che un tale programma richiede consistenti risorse, che vanno ben oltre quelle che la Fondazione ha potuto mettere insieme in questi anni, pur con l'aiuto generoso di tante persone. Ma si stanno aprendo su questo fronte nuove prospettive, su cui stiamo fortemente lavorando. Purtroppo, non mancano nel contesto nazionale azioni dispersive e confondenti che nuocciono all'intento ragionevole di unificare gli sforzi e le risorse per un obiettivo comune, cui la Fondazione ha cercato e continuerà a cercare di ispirarsi.

In altre parti di questa brochure si affrontano vari aspetti del bilancio in questione, compresi quelli dei risultati di ricerca resi pubblici su riviste internazionali e in assise scientifiche. Qui forniamo un profilo degli impegni economici assunti dalla Fondazione tra il 2002 e il 2007 per sostenere i 97 progetti di ricerca CF selezionati dal suo comitato scientifico con l'aiuto di oltre 130 esperti internazionali. Se queste risorse siano state impiegate bene è un giudizio che attendiamo anche da quanti vorranno offrirci il loro contributo critico e costruttivo.

97 progetti di ricerca CF finanziati dalla Fondazione dal 2002 al 2007

Area Ricerca	2002 (€)	2003 (€)	2004 (€)	2005 (€)	2006 (€)	2007 (€)	**2002-2007**
1. Fisiopatologia CFTR e nuove terapie	263.000 *2 progetti*	178.000 *4 progetti*	76.000 *4 progetti*	180.000 *4 progetti*	200.000 *5 progetti*	220.000 *5 progetti*	**1.117.000** *24 progetti*
2. Genetica applicata	- -	90.000 *3 progetti*	133.000 *5 progetti*	110.000 *2 progetti*	80.000 *3 progetti*	113.000 *2 progetti*	**532.000** *15 progetti*
3. Microbiologia di base e clinica	18.078 *1 progetto*	105.000 *3 progetti*	95.000 *3 progetti*	100.000 *2 progetti*	232.000 *9 progetti*	291.000 *7 progetti*	**841.078** *25 progetti*
4. Infiammazione	211.000 *1 progetto*	55.000 *1 progetto*	143.000 *4 progetti*	148.000 *5 progetti*	113.000 *3 progetti*	163.000 *3 progetti*	**833.000** *17 progetti*
5. Clinica Epidemiologia	- -	80.000 *2 progetti*	53.000 *3 progetti*	76.000 *4 progetti*	75.000 *4 progetti*	70.000 *3 progetti*	**354.000** *16 progetti*
Tot. 2002-2007	**492.000** *4 prog.*	**508.000** *13 prog.*	**500.000** *19 prog.*	**614.000** *17 prog.*	**700.000** *24 prog.*	**904.000** *20 prog.*	**3.724.000** *97 progetti*

Sommari delle presentazioni
CONVENTION ABSTRACTS

1. GENETICA APPLICATA
Applied Genetics

Main acquisitions in CF genetics through results of FFC projects already published

Lucio Luzzatto
Direttore Scientifico Istituto Tumori, Firenze. Membro del Comitato Scientifico della Fondazione FFC

Since its recognition as a discrete clinical entity, cystic fibrosis (CF) has been a paradigm for recessive inherited disorders in terms of formal genetics, population genetics, clinical genetics and genetic counseling. As soon as the recombinant DNA revolution made physical cloning of genes possible, the race for the CF gene was on, and in 1989 it was crowned by success. Unlike with many metabolic disorders, for which the biochemical basis was already known, in the case of CF perhaps the most spectacular return was that we learnt, at long last, that the gene product (known since as CFTR) was a chloride channel. This novel notion has given an entirely new direction to the study of the pathophysiology of CF, and it has also influenced many other aspects of CF research.

The Italian Cystic Fibrosis Research Foundation *(FFC) has the mission to promote research that could help in any way patients with CF and their families: therefore, with respect to genetics, the FFC has supported mainly those projects that have a bearing on diagnosis and management. In this area we have witnessed much progress in the decade since FFC has been in operation: here we will highlight only a few of the several significant advances made in the last five years by investigators funded by FFC grants.*

1. *Giuseppe **Novelli's** group have focused on genes that can influence the clinical expression of* CFTR *mutations: interestingly, some modifiers may be within the* CFTR *gene itself. It was already known that a 5T tract is present at polymorphic frequency in intron 8 of this gene and that, in trans to a severe* CFTR *mutation, it can cause a variety of clinical phenotypes. It now transpires that this depends on another tandem repeat polymorphism, namely a TG repeat next to 5T tract. These findings could help predict the phenotype of individual subjects.*
2. *The mechanism whereby a run of TG repeats may influence disease severity has been elucidated by the work of Franco **Pagani's** group: they have shown that this sequence binds nuclear factor TDP-43, which plays a direct role in splicing and therefore influences the likelihood of exon 9 being skipped. Pagano has made consistent contributions to understanding the physiology and the pathophysiology of splicing with respect to the* CFTR *gene: an important topic considering that many CF-producing mutations do affect splicing, and that the production of isoforms of the* CFTR *protein may have evolutionary significance.*
3. *Cristina **Rosatelli's** group has discovered a new mutation of* CFTR*: a large deletion involving exon 2, associated with a smaller insertion, possibly due to retro-transposition. Interestingly this mutation is polymorphic in Sardinia, and it must be taken into account with respect to diagnosis and prenatal diagnosis.*
4. *Considering the large number and variety of* CFTR *mutations, detecting all of them is a demanding task. For diagnostic purposes automated and semi-automated methodologies are highly desirable, and progress in this respect has been made by Roberto **Strom's** group.*
5. *Pier Franco **Pignatti**'s group has made consistent contributions to the systematic identification of* CFTR *mutations and their frequencies in Italy, and Alberto **Piazza** has helped to understand the population genetics of this system. One of the most intriguing results from the systematic analysis of a large number of* CFTR*-linked haplotypes in CF patients and in normal people has been the dynamics of the M/V polymorphism at position 470. First, it was already known that the common deltaF508 is strongly associated with the M allele; next, it is clear that many other CF-producing* CFTR *mutations are associated with the same M allele. **Pignatti**, in collaboration with Guido **Modiano**, has now developed a most provocative original model of how these haplotypes have evolved. One specific implication is that, in the European environment, not just CF-producing mutations, but also the M allele itself may have been subject to Darwinian selection: although the selecting agent is unknown and a hitchhiking effect cannot be ruled out.*

Overall, these projects have all helped fulfill the FFC's mission particularly with respect to (a) improving molecular diagnosis, (b) prediction of clinical phenotypes, and (c) genetic mechanisms of disease modification. While (a) and (b) are obviously of immediate clinical importance, one may hope that understanding (c) could also help designing experiments aiming to innnovative molecular therapy of CF.

Principali acquisizioni in tema di genetica CF attraverso i risultati di progetti FFC già pubblicati

Dal momento del suo riconoscimento come entità clinica distinta, la fibrosi cistica (FC) è stata un paradigma per le malattie

genetiche con ereditarietà recessiva, per quanto riguarda la genetica formale, la genetica di popolazione, la genetica clinica e la consulenza genetica.
Non appena la rivoluzione indotta dalla tecnica del DNA ricombinante ha reso possibile il clonaggio fisico dei geni, si è aperta la gara per quello della FC e il successo è stato conseguito nel 1989. Diversamente da molte malattie metaboliche, di cui era già noto il difetto biochimico, nel caso della FC forse il più spettacolare risultato è stato capire che il prodotto del gene (conosciuto da allora come CFTR) era costituito da un canale del cloro. Questa scoperta ci ha fornito un indirizzo del tutto nuovo per lo studio della fisiopatologia della FC, e ha anche influenzato molti altri aspetti della ricerca FC .

La Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica (FFC) si è data l'obbiettivo di promuovere la ricerca che possa aiutare in qualsiasi modo i malati FC e le loro famiglie: perciò, per quanto riguarda la genetica, la FFC ha dato supporto soprattutto a quei progetti che potevano avere una ricaduta nei confronti della diagnosi e del trattamento della malattia. E nell'area della genetica abbiamo potuto osservare un notevole progresso dal momento in cui si è dato inizio alle ricerche: qui noi vogliamo sottolineare solo alcuni dei numerosi e significativi avanzamenti compiuti negli ultimi cinque anni dai ricercatori sostenuti dalla Fondazione.

1) Il gruppo di Giuseppe **Novelli** ha focalizzato il suo interesse sui geni che possono influenzare l'espressione clinica delle mutazioni del gene CFTR: è interessante notare che alcuni "modificatori" possono trovarsi all'interno dello stesso gene CFTR. Si sapeva già che il tratto 5T si presenta con frequenza polimorfica nell'introne 8 di questo gene e che, se in posizione trans rispetto ad una mutazione severa, può essere responsabile della varietà dei fenotipi clinici. Ora sappiamo che questo dipende da un altro polimorfismo "tandem repeat", e cioè una ripetizione TG vicino al tratto 5T. Queste scoperte possono in qualche misura aiutarci a predire il fenotipo dei soggetti in cui vengono diagnosticate queste varianti.

2) Il meccanismo attraverso cui una sequenza di tratti TG ripetuti può influenzare la severità della malattia è stato chiaramente spiegato dal gruppo di Franco **Pagani**: essi hanno trovato che questa sequenza lega il fattore nucleare TDP-43, che riveste un ruolo diretto nello splicing e pertanto influenza la possibilità che l'esone 9 sia soggetto a skipping. Pagani ha fornito un notevole contributo alla comprensione della fisiologia e della fisiopatologia del meccanismo di splicing nei confronti del gene CFTR: un argomento importante, dal momento che molte mutazioni FC non influiscono sullo splicing del gene e che la produzione di isoforme della proteina CFTR può avere un significato nei processi di evoluzione.

3) Il gruppo di Cristina **Rosatelli** ha scoperto una nuova mutazione del gene CFTR: una grande delezione che riguarda l'esone 2, associata ad un'inserzione di dimensioni più piccole, probabilmente dovuta ad un meccanismo di retrotransposizione. È interessante il fatto che questa mutazione caratteristica della popolazione sarda deve essere presa in considerazione nelle tecniche di diagnosi della malattia, comprese quelle a livello di diagnosi prenatale.

4) Considerando il grande numero e la varietà di mutazioni CFTR, l'identificazione di ciascuna di loro è un compito impegnativo. C'è notevole esigenza di avere a disposizione nuove metodiche, automatizzate interamente o parzialmente, e il gruppo di Roberto **Strom** ha ottenuto un progresso a questo riguardo.

5) Il gruppo di Pier Franco **Pignatti** ha contribuito in maniera significativa all'identificazione sistematica delle mutazioni del gene CFTR e alla conoscenza della loro frequenza in Italia, e Alberto **Piazza** ci ha aiutato a capire la genetica di popolazione di questo sistema. Uno dei più interessanti risultati derivanti dall'analisi sistematica di un grande numero di aplotipi CFTR, nei malati FC e nella popolazione generale, è stato fornito dalla conoscenza della dinamica del polimorfismo M/V in posizione 470. Si sapeva già che la più frequente delle mutazioni, la DF508, è fortemente associata all'allele M. In seguito è apparso chiaro che molte altre mutazioni CFTR responsabili di malattia sono associate allo stesso allele M. **Pignatti**, in collaborazione con Guido **Modiano,** ha ora sviluppato un modello originale e ricco di spunti interessanti riguardo a come questi aplotipi si sarebbero evoluti. Una specifica implicazione di questo modello è che, nell'ambiente europeo, sarebbero state soggette alla selezione Darwiniana non solo le mutazioni responsabili di malattia FC, ma anche lo stesso allele M. Purtroppo non conosciamo l'agente selettivo e non siamo in grado di spiegare un meccanismo di abbinamento.

In conclusione, tutti questi progetti hanno contribuito alla realizzazione della mission della FFC, particolarmente riguardo a: a) miglioramento della diagnosi molecolare b) predizione del fenotipo clinico e c) modificazione delle conoscenze dei meccanismi genetici della malattia. Mentre a) e b) sono ovviamente di immediata importanza clinica, possiamo sperare che la comprensione di c) aiuti a ideare progetti sperimentali mirati a realizzare una terapia molecolare innovativa della malattia FC.

Maria Cristina Rosatelli

1. Rosatelli MC[1], Baffico M[2], Castellani C[3], Seia M[4], Torricelli F[5], Santostasi T[6], Faa V[1] [1]*Laboratorio Genetica Molecolare, Dipartimento di Scienze Biomediche e Biotecnologie, Sezione di Clinica e Biologia dell'Età evolutiva, Università degli Studi di Cagliari;* [2]*Laboratorio di Genetica E.O. Ospedali Galliera Genova;* [3]*Centro Fibrosi Cistica - Azienda Ospedaliera di Verona;* [4]*IRCCS Fondazione Policlinico Mangiagalli e Regina Elena, Milano;* [5]*Dipartimento Diagnostica di Laboratorio, Servizio di Diagnostica Genetica - Azienda Ospedaliero Universitaria Careggi, Firenze;* [6]*Dipartimento di Pediatria, Policlinico, Università di Bari*
(Progetto FFC #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

This work is a collaborative project involving six Italian Institutes with the aim to define rare or unknown molecular defects of the cystic fibrosis gene (CFTR gene) in Italian CF patients. The project intends to characterize 424 unidentified alleles. Moreover the project includes also those alleles not yet identified in the previous project (FFC Project # 8/2004).
The study was carried out according to a protocol including DHPLC and direct sequencing for the search of point mutations (which are responsible for nearly 98% of CF cases), break-point PCR and MLPA for detection of large deletions. Messenger RNA analysis was carried out in order to detect large deletions not yet characterized as well as splicing defects and quantitative analysis

of the mRNA for the study of CFTR expression defects.
The project was divided into 5 parts of relevant importance:

1) *Recruitment of CF patients: main clinical features of CF individuals include pancreatic insufficiency (PI), chronic lung disease with* Pseudomonas aeruginosa *infections, and sweat test over 60 mmol/l [Cl^-]. A written informed consent was obtained from all participants. The patients were collected by the partners belonging to North (Milano, Verona, Genova), Centre (Firenze), South (Bari) Italy.*

2) *DHPLC analysis and direct sequencing: the 27 exon of the gene as well as the intron-exon junctions, and the promoter region were screened by DHPLC analysis. Sequencing analysis was carried out in those subjects showing an abnormal chromatographic pattern in order to characterize the mutation.*

3) *Break-points PCR and MLPA assay: in order to detect the 7 most common large CFTR gene rearrangements we performed a multiplex PCR by which we are able to screen the CFTR gene for the following deletions: CFTRdele1, CFTRdele2, CFTRdele2-3, 3120+1kbdel8.6, CFTRdele22-23, CFTRdele22-24, CFTRdele14b-17b.*

   In order to screen for unknown CFTR gene deletions, MLPA assay was performed using the commercial kit "SALSA P091 CFTR MLPA kit" designed to detect deletions-duplications in CFTR exons, according to manufacturer's instructions.

4) *Qualitative and quantitative mRNA analysis. Nasal epithelial cells were obtained from patients and their parents by nasal brushing. The cells were suspended in Trizol and RNA was extracted according to the manufacturer's instructions.*

Up to now we defined 72 alleles.
DHPLC analysis led us to define 57 alleles. Among these, 2 are new mutations. One of these is the 1249-1G>A, already detected in one CF patient in the previous project. This mutation is localized at the 3' end of intron 7 and represents a splicing defect. The RNA analysis showed, in fact, the skipping of exon 8. The second one in a missense mutation localized in the exon 4 (G126D).
Fifteen alleles were defined by break-point PCR and MLPA assay. In 14 alleles, we detected already described rearrangements and in one allele we detected a new duplication spanning from the promoter region to exon 3 (submitted for publication). Break point definition of this new rearrangement is already in progress.
We are carrying out RNA analysis in 5 CF patients unidentified by above mentioned methods.
Overall results obtained until now are listed below:

	Selected patients	Alleles to be defined	Defined alleles by DHPLC	Defined alleles by MLPA/ PCR/RNA	Unidentified alleles
Partner 1	22	26	13	2	11
Partner 2	79	90			90
Partner 3	747	219	38	11	170
Partner 4	245	75	4	1	70
Partner 5	246	14	2	1	11

In the meantime, we performed functional studies in order to define the pathogenic role of a new splicing mutation detected in 2 unrelated CF patients selected in the previous project. This mutation is localized in 6b intron and causes an aberrant splicing, activating a cryptic exon between exon 6b and 7.
One hypothesis of the mechanism involved in the aberrant splicing may be that the mutation creates a new sequence identified as a target sequence of an SR protein. In order to elucidate the mechanisms caused by this new mutation, we carried out hybrid minigene experiments in mammalian cells. The analysis showed that the HeLa cells containing normal construct express a 100% correctly spliced transcript. On the contrary, HeLa cells containing mutated construct express a 100% not correctly spliced transcript, showing cryptic exon inclusion. By these experiments, we demonstrate that the 4 nucleotide deletion in intron 6b is the cause of altered splicing as we found in the 2 CF patients at RNA level. RNA-protein interaction studies are in progress.

Caratterizzazione e ruolo patogenetico di mutazioni sconosciute in pazienti italiani: un requisito essenziale per la prevenzione della fibrosi cistica attraverso lo screening del portatore e la diagnosi prenatale

Il progetto ha lo scopo di definire i difetti molecolari rari o sconosciuti del gene della fibrosi cistica (gene CFTR) in pazienti italiani e identificare nuovi meccanismi molecolari della malattia. Si tratta di un progetto collaborativo che coinvolge 6 centri italiani. Sono stati selezionati pazienti affetti da fibrosi cistica classica ma genotipo non definito. Tutti i pazienti selezionati sono risultati negativi al test molecolare di primo livello che ricerca le mutazioni più frequenti nella popolazione italiana. Alcuni di questi sono stati avviati ad uno screening di secondo livello che prevede l'analisi DHPLC e sequenziamento del gene CFTR. Altri pazienti, già risultati negativi allo screening di secondo livello, sono stati studiati per la ricerca di grandi delezioni o riarrangiamenti del gene sia mediante l'analisi del DNA che dell'RNA. Lo studio dell'RNA inoltre risulta essere un robusto strumento di analisi che permette di evidenziare sia grandi delezioni del gene che difetti nei processi di splicing.
Attraverso questo approccio molecolare, abbiamo finora definito 72 alleli. Abbiamo identificato 3 nuove mutazioni: 2 mutazioni puntiformi e un grosso riarrangiamento del gene. Si tratta di una duplicazione di una porzione di gene comprendente la regione promotrice e i primi tre esoni. Da un punto di vista puramente diagnostico, i risultati di questo studio consentiranno di sviluppare kit diagnostici permettendo l'identificazione rapida dei soggetti portatori tra i familiari dei pazienti affetti. Sarà inoltre possibile tracciare una accurata mappa delle mutazioni del gene CFTR in Italia e porre così le basi per l'avvio, a livello nazionale, di un programma di prevenzione della malattia nelle coppie in età fertile.

Laura Cremonesi *(terza da destra) con il suo gruppo di ricerca*

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

2. Cremonesi L[1,7], Bruno F[1], Torri A[1], Galbiati S[1], Restagno G[2], Mari C[2], Sbaiz L[2], Seia M[3], Castellani C[4], Chiari M[5], Damin F[5], Ferrari M[1,6,7].
[1]Unità di Genomica per la Diagnostica delle Patologie Umane, HSR, Milano; [2]Dipartimento di Patologia Clinica, A.O.O.I.R.M.- S. Anna,

Torino; [3]Ospedale Maggiore Policlinico Mangiagalli e Regina Elena, Milano; [4]Centro Fibrosi Cistica, Azienda Ospedaliera Verona, Verona; [5]Istituto di Chimica del Riconoscimento Molecolare (ICRM) – C.N.R, Milano; [6]Università Vita-Salute San Raffaele, Milano; [7]Diagnostica e Ricerca San Raffaele SpA, Milano (Prog. FFC #14/2005)

The main problem of noninvasive prenatal diagnosis on maternal plasma is the predominant presence of maternal DNA (>95%), which competes with the fetal one during the amplification process. This demands the use of highly sensitive methodologies. To this aim, we are employing a strategy based on PNA-clamping of the mostly maternal allele in order to enrich the amplification of the minority fetal mutated allele in maternal plasma. PNA-mediated enriched PCR is being applied coupled with different advanced accessible techniques for the development of specific tests for the identification of fetal paternally inherited mutations and polymorphisms, for noninvasive prenatal diagnosis in couples at risk for cystic fibrosis.

During the project we designed and evaluated different formats and base composition for peptide nucleic acids (PNAs) to clamp the maternal allele and enrich fetal paternally inherited mutated sequences and set up and validated conditions for microelectronic microchip analysis and pyrosequencing of 7 frequent mutations and 4 polymorphisms.

We optimized for each mutation the optimal PNA-range of concentration for efficient clamping of the maternal allele. By this approach a noninvasive prenatal diagnosis was performed on maternal plasma allowing the correct identification of the fetal paternally inherited polymorphism. In parallel, we developed conditions for the analysis of all mutations and polymorphisms by the pyrosequencing approach coupled with the PNA-clamping strategy.

We also evaluated the possibility of implementing our strategy. The major drawback of PNA-clamping is the assessment of the optimal PNA concentration which needs to be assessed for each sequence of interest. This approach is cumbersome and not suitable for large scale clinical application. For future diagnostic routine applications, any enrichment protocol should be avoided. Therefore, we wanted to verify the possibility of detecting the mutations without using the PNA clamping approach by enhancing the assay sensitivity. To this aim, to increase sensitivity in microarray genotyping assays we developed innovative slides coated by a special copolymer. The assay was then applied to maternal plasma in two couples for noninvasive prenatal diagnosis of the most common polymorphisms. The high fluorescence signal provided by the optimized newly developed substrate allowed to detect the fetal paternally inherited sequences even without the use of the PNA clamping strategy.

Nuovi approcci per la diagnosi prenatale non invasiva di fibrosi cistica attraverso l'analisi di DNA fetale nel plasma materno

Il nostro obiettivo è mettere a punto metodologie avanzate per la diagnosi prenatale non invasiva di fibrosi cistica mediante analisi del DNA fetale presente nel plasma materno. La difficoltà maggiore è che oltre il 95% del DNA nel plasma materno è costituita da sequenze di origine materna che rendono difficile identificare le sequenze fetali. Questo richiede l'impiego di tecnologie avanzate altamente sensibili. A questo scopo abbiamo impiegato due metodologie, i microchip microelettronici e il pyrosequencing. Abbiamo quindi sviluppato dei saggi per identificare con entrambe i metodi 7 mutazioni da applicare a coppie in cui i partner sono portatori di mutazioni differenti, e 4 polimorfismi frequenti presenti nel gene CFTR, per rendere possibile l'identificazione dell'allele paterno fetale anche nelle coppie in cui entrambi i partner sono portatori della stessa mutazione. Inoltre, per aumentare la sensibilità dei saggi, abbiamo impiegato una strategia di arricchimento dell'allele mutato minoritario mediante amplificazione in presenza di peptide nucleic acids (PNAs) per inibire l'amplificazione dell'allele materno e favorire quella dell'allele fetale. Con tale approccio è stata eseguita una diagnosi prenatale non invasiva ed è stato correttamente identificato nel plasma materno l'allele fetale (A) del polimorfismo 4521 G/A ereditato per via paterna.

Infine, per aumentare ulteriormente la sensibilità dei saggi, abbiamo valutato come sistema alternativo una tecnologia microarray che utilizza supporti sviluppati specificamente per una rivelazione ottimale ultrasensibile del segnale di fluorescenza che possano rendere superfluo l'utilizzo dei PNA. Infatti la maggior difficoltà nell'uso dei PNA è costituita dal fatto che il range ottimale di concentrazione dei PNA deve essere valutato per ogni mutazione e varia leggermente per ogni donna, in quanto la quantità di DNA libero sia materno sia fetale nel plasma varia da donna a donna.

Abbiamo quindi applicato tale sistema all'analisi di campioni di plasma di donne gravide prima che si sottoponessero a diagnosi prenatale invasiva. L'analisi di 2 coppie ha permesso di evidenziare l'allele fetale A del polimorfismo 4006-200 A/G ereditato per via paterna in entrambi i casi direttamente su plasma materno senza arricchimento dell'allele fetale mediante PNA, con totale concordanza dei risultati rispetto a quelli ottenuti su DNA fetale estratto dai villi coriali.

Franco Pagani *(primo da sinistra) con il suo gruppo di ricerca*

Splicing affecting Genomic Variants in CFTR: Diagnostic and Therapeutic Aspects

Evaluation of disease-causing mutations in CFTR co-transcriptional splicing units

3. Goina E, Talotti G, Ubby I, Bussani E, Pagani F
Human Molecular Genetics, ICGEB, Trieste, Italia (Prog. FFC #15/2005 e Prog. FFC #20/2007)

In CFTR gene, exonic splicing regulatory elements that overlap with the aminoacid code are involved in correct and efficient CFTR expression. CFTR mutations in these regulatory sequences may induce aberrant exon skipping in an unforeseen manner, resulting in a non-functional CFTR protein. To clarify how these elements regulate splicing is of utmost importance in order to develop new therapeutic strategies to correct the associated disease causing mutations. Using hybrid minigene splicing assays and in vivo analysis, we have described peculiar sequences we named Composite Exonic Regulatory Elements of Splicing (CERES), where several natural and artificial exonic mutants may induce various degrees of exon skipping. Interestingly both synonymous and non-synonymous substitutions can induce aberrant splicing indicating that the disease-causing mechanism of CFTR mutations may go beyond their predicted effect on the

aminoacid sequence. Thus, the effects on pre mRNA splicing have to be carefully evaluated regarding diagnosis and when testing mutation-specific therapies. In this context we have developed several hybrid minigenes useful for the diagnosis of splicing defects. The tissue specific decision to include or exclude a particular defective CFTR exon, and thus determine the onset of a CF related pathology, relies also on interaction of the pre mRNA with nuclear splicing factors. We have characterized for several mutants pathological RNA-protein interactions that affect the severity of aberrant splicing Our results establish also a new therapeutic approach by siRNA (RNA interference) to relieve a dominant negative splicing factor inhibition and correct CFTR aberrant splicing.

Varianti genomiche che modificano lo splicing: aspetti diagnostici e terapeutici nella fibrosi cistica"

La valutazione della patogenicitàdi mutazioni a carico del gene CFTR puo' presentare difficoltàdiagnostiche poichè tali mutazioni possono causare inaspettatamente un difetto di "splicing", cioè un difetto nel processamento dell'RNA messaggero. Nella regolazione dello splicing intervengono elementi esonici la cui sequenza svolge anche la funzione di codificare aminoacidi. Mutazioni in questi elementi regolatori possono indurre in un modo non prevedibile un difetto di splicing con esclusione dell'esone dal trascritto maturo e conseguente produzione di una proteina non funzionale. La identificazione dei meccanismi di base implicati nello "splicing" e lo studio delle alterazioni patologiche connesse risulta di fondamentale importanza per sviluppare nuove strategie diagnostiche e terapeutiche nella Fibrosi Cistica. Utilizzando minigeni ibridi e tecniche di splicing abbiamo identificato particolari sequenze, i CERES (Composite Exonic Regulatory Elements of Splicing) nei quali mutanti naturali ed artificiali possono indurre difetti di splicing di severitàvariabile. È interessante notare che sia mutazioni non-sinonime (missenso e non senso) che sinonime possono indurre splicing aberrante, un fatto che indica che il meccanismo che causa la malattia in questi casi va oltre il loro effetto sulla sequenza aminoacidica. Pertanto, l'effetto sul pre mRNA splicing deve essere attentamente valutato nella diagnosi e quando vengono testate terapie specifiche per correggere il difetto a livello proteico. In questo contesto, lo sviluppo di minigeni ibridi si è rivelato utile per la diagnosi di difetti di splicing in nemerosi esoni. La decisione tessuto specifica di includere o escludere un particolare esone difettivo, e pertanto di determinare la gravità di una patologia CF, è dovuto anche alla interazione del pre mRNA con i fattori di splicing nucleari. Il nostro gruppo ha caratterizzato per numerosi mutanti le interazioni patologiche tra RNA e proteine che sono in grado di modulare la severità dello splicing aberrante. L'effetto di singoli fattori sullo splicing aberrante è stato studiato mediante interferenza dell'RNA (siRNA, RNA interference), una metodica che consente di ridurre la concentrazione in vivo di questi fattori di splicing. I nostri risultati indicano un nuovo approccio terapeutico per mezzo di siRNA per correggere lo splicing aberrante.

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

4. Novelli G[1], Pignatti PF[2], Strom R[3]
[1]*Dipartimento di Biopatologie e Diagnostica per Immagini, Sezione Genetica, Università di Roma Tor Vergata, Roma;* [2]*Dipartimento Materno Infantile e di Biologia-Genetica; Università di Verona, Sezione di Biologia e Genetica;* [3]*Sezione di Biochimica Clinica, Dip. Biotecnologie Cellulari ed Ematologia, Università "La Sapienza", Roma (Prog FFC #23/2006)*

Giuseppe Novelli

Nasal polyps are lesions that emanate from any portion of the nasal mucosa or paranasal sinuses. The main cause is considered to be the inflammation, related to increased epithelial cell proliferation (important in covering the epithelial defects), and dysregulation of epithelial cell proliferation.
Moreover, no particular Cystic Fibrosis (CF) transmembrane conductance regulator (CFTR) mutation, correlating with the phenotype of nasal polyp formation in CF patients (CF-NP), has been found until now.
The general aim of this project is to establish the contribution of different kind of molecular lesions to the pathogenesis of CF and non-CF nasal polyps, like: 1) CFTR mutations and pathogenetic variants, 2) genomic variants occurring in "modifier genes", and 3) other genomic alterations at the somatic level within nasal polyps.
1) We recluted DNA from 91 subjects with non CF- nasal polyposis and performed a case-control analysis with PolyT IVS-8, (5T, 7T, 9T), in CFTR gene. The frequency of 9T allele herein reported was significantly lower than in the general Italian population (10.5% vs 25%; P = 0.025). This allele, compared to 7T and 5T alleles, produces more wild type CFTR, and could suggest that a lower concentration of 9T allele increase the possibilities to develop non CF- nasal polyposis manifestation (Odds Ratio=2.5).
2) Like modifier gene, we are studying SPINK5 gene polymorphism allele and genotype frequencies. A significant difference was observed mainly for D386N. DD genotype were present in all the CF patients with NP and in 70 % of CF patients without NP (p=0.001). This result has now been confirmed comparing poliposis CF patients and controls (p=0.002). No difference has been observed between controls and CF patients without nasal poliposis. We are performing the analysis in non-CF nasal polyp patients.
3) We aimed to understand if nasal polyposis is a consequence of acquired chromosomal alterations in hyperproliferative nasal epithelia. So, we applied array CGH (Comparative Genome Hybridization) to DNA obtained from nasal polyps of nine patients. After data analysis, no chromosomal aberrations were detected, and therefore, our data do not support the hypotesis that nasal polyposis is a consequence of acquired chromosomal alterations in hyperproliferative nasal epithelia in non-CF nasal polyps. To confirm these data, we are performing aCGH on CF-nasal polyps.

Cause, evoluzione e progressione dei polipi nasali: ruolo dei geni modificatori e nuovo approccio mediante CGH array

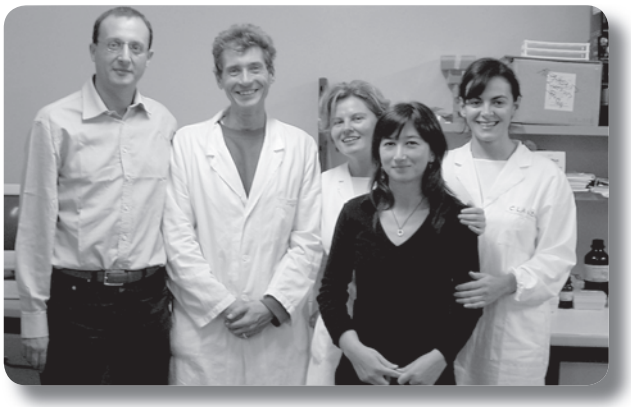
I polipi nasali derivano da un edema della mucosa che riveste la parete delle fosse nasali. La causa principale è considerata l'infiammazione, correlata ad una aumentata iperproliferazione ed a una alterata regolazione del ciclo cellulare epiteliale. Inoltre, ad oggi non è stata riportata alcuna mutazione nel gene CFTR che correla con la formazione di polipi nasali in soggetti FC.
Lo scopo fondamentale di questo progetto è quello di stabilire

il contributo di differenti danni molecolari alla patogenesi della poliposi nasale sia CF che non-CF, come 1) mutazioni e varianti patogenetiche nel gene CFTR, 2) varianti genomiche a carico di geni modificatori, 3) alterazioni genomiche al livello somatico all'interno di polipi nasali.

1) Abbiamo reclutato DNA da 91 pazienti con poliposi nasale non-FC, ed abbiamo effettuato uno studio caso-controllo con il tratto polimorfico PolyT IVS-8, (5T, 7T, 9T) nel gene CFTR . La frequenza dell'allele 9T caratterizzata è significativamente minore rispetto a quella della popolazione Italiana (10.5% vs 25%; P = 0.025). Tale allele, se comparato con il 7T ed il 5T, produce una maggiore quantità di CFTR wild type, e questo potrebbe suggerire che una concentrazione minore del 9T aumenta la possibilità di sviluppare poliposi nasale non correlate alla FC. (Odds Ratio=2.5).

2) Per quanto riguarda i geni modificatori, stiamo analizzando le frequenze alleliche e genotipiche di alcune varianti in SPINK5. Una differenza significativa è stata osservata principalmente per la variante D386N. Il genotipo DD è presente in tutti i pazienti CF con poliposi nasale e nel 70% dei pazienti CF senza poliposi nasale. Questo risultato è stato confermato comparando le frequenze di soggetti FC con poliposi e la popolazione di controllo (p=0.002). Nessuna differenza è stata riscontrata tra i controlli ed i pazienti CF senza poliposi nasale. È in corso l'analisi di SPINK5 in soggetti poliposici non-CF.

3) Lo scopo è quello di comprendere se la poliposi nasale è una conseguenza dell'acquisizione di aberrazioni cromosomiche nell'epitelio nasale in iperproliferazione. Abbiamo applicato la tecnica array CGH (Comparative Genome Hybridization) in una casistica di 9 DNA ottenuti da polipi nasali di pazienti poliposici non-CF. Dopo l'analisi dei dati, non abbiamo caratterizzato alcuna anomalia cromosomica, quindi i nostri dati non supportano l'ipotesi che la poliposi nasale è una conseguenza dell'accumulo di aberrazioni cromosomiche nell'epitelio nasale iperproliferativo. Sono in corso analisi di aCGH per confermare il risultato in biopsie di polipi nasali FC.



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

5. Gasparini P[1], Cabrini G[2]
[1]*Dipartimento Scienze Riproduttive e dello Sviluppo, Università di Trieste;* [2]*Laboratorio Patologia Molecolare, Centro Fibrosi Cistica, Azienda Ospedaliera di Verona (Prog. FFC 22/2006*

Paolo Gasparini *(primo da sinistra) con il suo gruppo di ricerca*

We have collected DNAs from 200 italian and 400 US CF patients homogeneous for CF locus (ΔF508 homozygotes) and subdivided into "mild" and "severe" regarding their lung clinical course. All patients shared the same ethnic origin (Caucasian).

An Excel database containing all clinical data of the CF patients has been created.

A set of 768 SNPs regarding more than 100 genes of the innate immunity has been designed, ready to be used on the Illumina genotypingt platform.

Preliminary results have been already obtained by genotyping SNPs of genes known to be involved in the onset of bacterial colonization, such as mannose binding lectins (MBL2)*, serum proteins involved in opsonisation and activation of the pathway of the complement* (MASP-2)*, and beta-defensins* (DEFB1 *and* DEFB4)*, which function as antimicrobial peptides secreted on the surface of the respiratory tract.*

MBL2 *genotypes A/0 and 0/0, known to be responsible for reduced production of serum MBL have been found correlated with a worst FEV1 and bacterial colonization by* P. aeruginosa *and* B. cepacia*. Extensive molecular analysis performed on the genes encoding Beta-defensins 1* (DEFB1) *and 2* (DEFB4) *allowed the identification on novel polymorphisms and gene rearrangements which have been tested in CF patients. SNPs on* DEFB4 *gene responsible for the production of an inducible peptide (hBD2), has been found to be correlated with a worst FEV1 in a sample of 70 CF patients. SNPs on* DEFB1*, encoding for hBD1 peptide constitutively prioduced by epithelial celles of the mucosae were not associated to a worst lung phenotype in CF patients.*

Finally, novel functional polymorphisms have been characterized in the promoter region (at position -607 and -137) of the interleukin–18 (IL-18) gene, which encodes a potent proinflammatory cytokine released from monocyte lineage. The two polymorphisms have a functional effect by affecting the transcription of IL18 gene.

IL18 C-607A and G-137C polymorphisms have been related to protein levels variations, being the -607 C allele and the CG haplotype associated with higher protein amounts. The analysis of IL18 polymorphisms in 50 CF patients gave us some indication of a trend towards a correlation between worst FEV1 and the presence of the haplotype CG. The data needs to be confirmed on a greater cohort of CF patients.

Fattori genetici coinvolti nella immunità innata che influenzano la malattia polmonare nei pazienti con fibrosi cistica

Abbiamo finora raccolto i DNA di 600 (200 italiani e 400 nord americani) pazienti FC selezionati per essere omogenei dal punto di vista del genotipo CF (omozigoti ΔF508) e suddivisi nelle categorie "mild" e "severe" a seconda della funzionalità polmonare e della clinica. Tutti i pazienti sono di origine Caucasoide. È stato quindi creata una banca dati (utilizzando Excel) contenente tutti I dati clinici dei pazienti.

Èstato progettato un "chip" contenente 768 SNPs a carico di più di 100 geni dell'immunità innata, pronto per essere utilizzato su piattaforma Illumina sui pazienti CF reclutati nel presente studio. Inoltre sono già stati ottenuti risultati preliminari ricercando SNPs in geni noti per essere coinvolti nella suscettibilità alle infezioni batteriche (*MBL2*), in geni coinvolti nell'opsonizzazione e nell'attivazione della via del complemento (*MASP2*) e nei geni codificanti le beta defensine 1 (*DEFB1*) e 2 (*DEFB4*), peptidi antimicrobici prodotti a livello delle mucose del tratto respiratorio.

I genotipi di MBL2 A/0 e 0/0, noti per essere responsabili di una ridotta produzione di MBL livello sierico, sono stati correlati con I peggiori valori di FEV1 e la maggior suscettibilità a colonizzazione da parte di *P. aeruginosa* e *B. cepacia*.

Sono stati poi riscontrati nuovi polimorfismi a carico dei geni *DEFB1* e DEFB4; SNPs, presenti a livello di *DEFB4* che codifica per un peptide (hBD2) inducibile sono stati associati ad un peggior fenotipo polmonare, in termini di FEV1, in 70 pazienti CF; SNPs a carico del gene *DEFB1* codificante per il peptide hBD-1

non hanno mostrato una correlazione significativa con il fenotipo clinico dei pazienti CF.
Infine sono stati caratterizzati polimorfismi (in posizione -607 e -137) a carico della regione del pormotore del gene codificante per l'interleuchina 18 (IL18) una potente citochina proinfiammatoria. tali polimorfismi sono noti per avere un effetto funzionale sulla trascrizione del gene. Gli SNPs C-607A e G-137C sono stati messi in correlazione con variazioni a carico della quantità di proteina prodotta, infatti l'allele -607C e l'aplotipo CG sono associati ad una più elevata produzione di IL18.
L'analisi preliminare dei due SNPs a carico del promotore di IL18 effettuata su 50 pazienti CF ha mostrato un trend verso l'associazione dell'aplotipo CG con un peggior fenotipo polmonare. Tali risultati andranno verificati su una casistica più ampia.

Molecular analysis of genes encoding CFTR interactors of SLC26 family in CF patients

6. Castaldo G, Cardillo G, Elce A, Tomaiuolo R
CEINGE-Biotecnologie Avanzate scarl, Napoli e Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli "Federico II" (Progetto FFC #19/2007)

Giuseppe Castaldo *(al centro) con il suo gruppo di ricerca*

The SLC26 (Solute Linked Carrier) are a relatively young gene family encoding highly versatile anion exchangers, involved in many physiological processes, like transepithelial NaCl transport and bicarbonate secretion. Actually, about 10 proteins belong to this family and some of them are related to human diseases, as SLC26A3 that is the disease gene of a rare and severe form of chronic chloride loosing diarrhoea (CLD). Recent studies show that two domains of SLC26A3 protein, the "STAS-like" and PDZ domains, play a critical role in its activation and bicarbonate secretion. This secretory mechanism requires the presence of CFTR protein (the protein altered in cystic fibrosis, CF). The main defect in CF has long been thought to be the reduced epithelial chloride transport. However, recent works turned this theory on its head, showing that the primary defect in cystic fibrosis is the inability to activate bicarbonate-driven fluid secretion caused by chloride-bicarbonate exchange. This mechanism requires the involvement of both SLC26 and CFTR intact proteins: they form a unique complex by a direct interaction between SLC26A3 "STAS-like" and CFTR "R" domains and by an indirect interaction between PDZ domains of both proteins connected by the "PDZ-Binding Protein". A percentage of CF patients do not bear mutations within the CFTR gene; it is possible that in these cases the disease-causing mutation may be present in the SLC26 gene, thus reducing the activation of the CFTR channel.
Our research group started some studies on the interaction between these systems: i) we selected CF patients with one or both unknown mutations after the CFTR scanning. In these patients we are sequencing the whole coding region of four SLC26 genes. This study should clarify if gene variants in SLC26 genes could act as disease causing in CF; ii) SLC26 genes have a different pattern of tissue expression, thus, they could act as modifier genes of CF phenotype. We selected subset of CF patients with different clinic disease expression (i.e., severe and mild pulmonary phenotype; pancreatic sufficiency or insufficiency, presence or absence of hepatic expression, atipycal and monosymptomatic CF form) to verify if SLC26 gene variants could act as modifiers of CF phenotype.

Analisi molecolare di geni che codificano per gli interattori del gene CFTR della famiglia dei geni SLC26 in pazienti con fibrosi cistica

La famiglia SLC26 (Solute Linked Carrier) è una famiglia genica relativamente giovane che codifica scambiatori ionici altamente versatili, coinvolti in molti processi fisiologici tra cui il trasporto di NaCl tra gli epiteli e la secrezione di bicarbonato. Attualmente, circa 10 proteine sono state incluse in questa famiglia, alcune delle quali correlate a malattie umane, come SLC26A3 che è il gene malattia della cloridorrea congenita (CLD), una rara e severa forma di diarrea cronica con perdita di ioni cloro.

Studi recenti mostrano come due domini della proteina SLC26A3, il dominio "STAS-like" ed il dominio PDZ, giochino un ruolo fondamentale nella sua attivazione e nella secrezione del bicarbonato. Tale meccanismo secretorio richiede la presenza della proteina CFTR (proteina alterata in corso di Fibrosi Cistica, CF). Nello stesso tempo, i due domini di SLC26A3 attivano la funzione di gating di CFTR. Per lungo tempo si è pensato infatti che il difetto principale nella CF fosse un ridotto trasporto epiteliale del cloruro. Studi recenti hanno modificato questa visione, dimostrando che il difetto principale della CF è l'incapacità di attivare la secrezione di fluidi mediante lo scambio cloruro/bicarbonato. Tale meccanismo richiede la presenza di entrambe le proteine intatte (SLC26 e CFTR): esse formano un unico complesso mediante l'interazione diretta tra il dominio "STAS-like" di SLC26A3 ed il dominio "R" di CFTR e l'interazione indiretta dei domini PDZ di entrambe le proteine mediata dalla proteina adattatrice "PDZ-Binding Protein".

Poiché è ben noto che in diversi pazienti con CF non sono presenti mutazioni nella regione codificante del gene CFTR, abbiamo ipotizzato che in questi pazienti la causa della malattia possa dipendere d a una difettosa attivazione di CFTR da parte di SLC26 eventualmente dovuta a mutazioni nel gene codificante SLC26.

Quindi, il nostro gruppo di ricerca ha intrapreso alcuni studi sull'interazione tra i due sistemi: i) abbiamo selezionato un gruppo di pazienti CF con una o entrambe le mutazioni non note dopo l'analisi dell'intera regione codificante del gene CFTR e abbiamo iniziato ad analizzare con procedure di scanning l'intera regione codificante di 4 geni SLC26, che codificano quattro proteine tutte dotate dei domini in grado di attivare CFTR. Questo studio potrebbe mostrare che varianti geniche nei geni SLC26 possono agire come "geni malattia" per la CF; ii) poiché le 4 proteine codificate dai geni SLC sono espresse in diversi tessuti ed organi, abbiamo anche ipotizzato che possano agire da geni modulatori della CF. Abbiamo quindi selezionato alcuni gruppi di pazienti CF con diversa espressione clinica (ad esempio, fenotipo polmonare severo e lieve; sufficienza ed insufficienza pancreatica; presenza o assenza di espressione epatica; forme atipiche monosintomatiche di CF) per analizzare varianti geniche degli SLC26 e verificare se possano agire come elementi modulatori del fenotipo CF.

Main acquisitions on CF clinical research through the results of FFC projects already published

Roberto Buzzetti
Epidemiologo e Statistico Medico, CEVEAS, Modena.
Membro del Comitato Scientifico della Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica

At first sight, clinical research in CF appears like "Cinderella" when compared to other areas (the "richer sisters") where research projects, publications and abstracts are in a good number and show an appraisable quality level. In the latter it is remarkable the solid position of CFTR physiopathology area (15 research projects have already lead to 27 publications and to 30 abstracts). The same happens for "products" of other areas: genetics, microbiology and inflammation. On the contrary the clinical area shows lesser results: only 5 publications and 3 abstracts (at least the ones communicated to the Foundation until now) which are deriving from 6 research projects.

There are several reasons to explain this apparent poorness. First of all we should not forget that the relative lack of clinical studies is common in all medicine fields. The metaphor of the "pyramid of evidences" already contains an answer: the pyramid is constituted by a large base of pre-clinical studies and physiopathology studies on animal models and in laboratory, while the top is constituted by a thin vertex of clinical studies, thinner and thinner as we advance from observational studies toward randomized clinical trials.

This common lack of studies becomes even more evident if we move from clinical areas such as hypertension, diabetes, tumours, and dementia (privileged areas because object of scientific and economical interests) to areas of "minor interests" such as chronic diseases of lower incidence.

In fact, out of the 16 million references in Medline there are about only 18.000 major topics about cystic fibrosis, and within these, 507 alone are randomized and controlled studies.

*All of this is confirmed in the excellent revision of medical literature operated by **Filippo Festini et al.** (2006): only one out of the 10 studies found in literature about the opportunity to segregate CF patients for infection control is a perspective observational analysis, while the others are interesting studies with a weaker planning and therefore more exposed to biases. We can notice then that even at an international level the situation is not very good.*

It is noteworthy that the few but relevant studies published thanks to projects funded by the FFC Foundation explored topic clinical fields, such as early eradication of Pseudomonas aeruginosa *(**Giovanni Taccetti's** team, 2005), CF diabetes, (**Carla Colombo's** team, 2007) and possible use of probiotics to reduce pulmonary inflammation (**Alfredo Guarino's** team, 2007). The first of these studies analyzes how long the eradication takes, the proportion of success and relapse and the respiratory functions in patients with early eradication. The second study focuses on some fundamental features of hypoglycaemia in CF diabetes. Moreover about CF diabetes interesting results may come from **Laura Minicucci's** work. This research, still in progress, is aimed to study the relation between glucose intolerance and clinic decay in a therapeutic perspective (an insuline based early approach). The third published study, a randomized and controlled pilot trial, explores the possibility to reduce pulmonary inflammation through a simple therapeutic intervention: the use of probiotics.*

Finally, we have to remember the impressive task promoted by the Foundation consisting in the systematic reviewing of published researches : the first review regards infection control, with over 400 examined bibliographic entries, the second one is still in progress (project CAIRO): it aims to evaluate how important (in terms of knowledge) have been the contributes coming from the CF registers of all the world (more than 100 bibliographical entries). The importance of both the reviews is even greater when we consider that they are the final product of educational programs organized by the Foundation on clinical research methodology. Researchers attending the educational programs decided to group to work together in the field of analysis mentioned above. A part from the results, this is an excellent sign of the CF research progresses.

Therefore, clinical research (including bibliographic research on clinical themes) is not standing still, but is moving forward, with the hope of taking advantage of more research projects (and some of these have already started), and the hope of producing significant results for the patients thanks to studies carried out through a good methodological basis.

Principali acquisizioni in tema di ricerca clinica ed epidemiologica attraverso i risultati di progetti FFC già pubblicati

La ricerca clinica in FC appare a prima vista come la "cenerentola", rispetto alle sorelle ben più ricche di progetti, di pubblicazioni, di abstract congressuali. Non sfugge infatti la massiccia presenza di aree come, ad esempio, quella della fisiopatologia CFTR (15 dei progetti di quest'area finanziati da FFC hanno già portato a 27 pubblicazioni e a 29 presentazioni congressuali); lo stesso sarebbe se ci soffermassimo sul "prodotto" delle altre aree, genetica, microbiologia, infiammazione.L'area clinica purtroppo registra delle cifre nettamente ridotte: fino ad oggi 5 pubblicazioni e 3 presentazioni congressuali (almeno quelle comunicate alla Fondazione sinora), derivanti da 6 progetti.

Le ragioni di questa apparente povertà sono molteplici. In primo luogo non va dimenticato come la relativa scarsità di studi clinici sia fisiologica in tutti i settori della medicina. La metafora della piramide delle evidenze contiene già in sé una risposta: la piramide infatti è contraddistinta da una larga base di studi pre-clinici, di fisiopatologia, su modelli animali e di laboratorio, e da uno stretto vertice costituito dagli studi clinici, vertice sempre più stretto man mano che si passa dagli studi osservazionali ai trial clinici randomizzati..

Questa fisiologica scarsità di studi diviene poi ancor più evidente passando da aree cliniche, come ipertensione, diabete, tumori, demenze, privilegiate in quanto depositarie di forti interessi scientifici ed economici, alle aree di minore "interesse" come le

malattie croniche a bassa incidenza.
Si consideri ad esempio che degli oltre 16 milioni di citazioni presenti in Medline, 18.000 circa trattano di FC (come major topic), e di questi soltanto 507 sono studi randomizzati e controllati (molti di proporzioni assai contenute).
Tutto questo trova una conferma nella bella revisione della letteratura operata da **Filippo Festini** et al. (2006): dei 10 studi reperiti in letteratura sull'opportunità della segregazione dei pazienti FC per il controllo delle infezioni, uno solo è un'analisi osservazionale prospettica, mentre gli altri sono studi interessanti, ma dal disegno meno robusto e più esposto ai bias. Anche a livello internazionale dunque le cose non sembrano andare brillantemente.
I pochi ma importanti studi pubblicati grazie a progetti sostenuti dalla Fondazione FFC hanno il merito di avere esplorato aree cliniche rilevanti, come quella dell'eradicazione precoce dello *Pseudomonas aeruginosa* (Gruppo di **Giovanni Taccetti** 2005), quella del diabete in FC (Gruppo di **Carla Colombo** 2007) e quella del possibile utilizzo dei probiotici per ridurre l'infiammazione a livello polmonare (Gruppo di **Alfredo Guarino** 2007). Il primo di questi studi analizza il tempo di eradicazione, la proporzione di successo e di ricadute, l'andamento della funzione respiratoria negli eradicati precocemente. Il secondo studio fa luce su alcuni aspetti fondamentali legati all'ipoglicemia nel diabete in FC. Sempre nel campo delle alterazioni del metabolismo del glucosio, è possibile che emergano risultati di immediato impatto terapeutico dallo studio di **Laura Minicucci**, ancora in corso, che affronta in chiave terapeutica la relazione tra intolleranza al glucosio e decadimento clinico. Il terzo studio pubblicato, un trial pilota randomizzato e controllato, esplora la possibilità di influire sull'infiammazione polmonare attraverso un intervento terapeutico di semplice attuazione, l'impiego di probiotici.
Vanno infine ricordati gli imponenti lavori di revisione promossi dalla Fondazione: quello sul controllo delle infezioni, con oltre 400 voci bibliografiche esaminate, e quella in corso (progetto CAIRO) che si propone di valutare quanto sia stato possibile ricavare in termini di conoscenze, grazie alle pubblicazioni provenienti dai registri FC di tutto il mondo (oltre 100 voci bibliografiche). La rilevanza di queste due revisioni è ancora maggiore se si tiene presente che esse costituiscono il prodotto finale di altrettanti percorsi formativi, organizzati dalla Fondazione, sulla metodologia della ricerca clinica. I discenti dei percorsi formativi hanno deciso di aggregarsi per lavorare insieme sui temi prima enunciati; e questo appare, al di là dei risultati, un ottimo segnale.

La ricerca clinica (inclusa la ricerca bibliografica su temi clinici), non è dunque ferma, ma sta muovendo importanti passi, nella speranza di arricchirsi quantitativamente e qualitativamente con nuovi progetti, alcuni già avviati recentemente, ma soprattutto di mettere in luce, grazie a studi di buon valore metodologico, elementi conoscitivi utili ai pazienti.

Diabetes, glucose intolerance and hypoglycemia in Cystic Fibrosis

7. Colombo C *Osp. Policlin. Mangiagalli e Regina Elena – Dip. Pediatria – Centro Fibrosi Cistica, Milano (Progetto FFC #16/2005)*

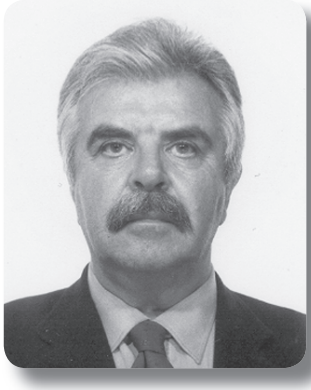
Carla Colombo

Diabetes and glucose intolerance are frequent complications in Cystic Fibrosis (CF), and may have a negative impact on clinical conditions and survival. The main objectives of this project are 1) to evaluate prevalence, incidence and relevance of disturbances of glucose metabolism in CF, 2) to characterize such alterations in terms of insulin resistance, insulin deficiency and counterregulatory responses, inflammation, nutritional impairment and natural history, 3) to provide evidence in order to design interventions ranging from insulin administration to islet transplantation. The research activity in the last year brought to the following results, based on the analysis of the glucose response to oral glucose tolerance tests (OGTT) in 175 CF patients older than 10 yrs followed at the Milan Center, with modelling of insulin secretion and sensitivity:
1) Spontaneous hypoglycemia in patients with cystic fibrosis: *spontaneous fasting hypoglycemia (<60mg/dl) was detected in 14% of studies and reactive hypoglycemia (PG<50mg/dl) in 15%. Fasting hypoglycemia is possibly related to inappropriate insulin secretion control in class I mutation carriers. Low fasting plasma glucose does not exclude glucose intolerance and diabetes in CF, and reflects worse clinical status.*
2) Contribution of defects in insulin sensitivity and beta-cell function to the changes over time in the glucose tolerance of cf patients: *Glucose tolerance is highly variable within CF subjects over time and it is subject to marked worsening as well as amelioration. Defects in beta-cell function and in insulin sensitivity are both present. The variability of glucose tolerance over time are mainly due to variations in insulin sensitivity.*
To detect predictive factors of definitive CF related diabetes development, among patients who routinarily underwent OGTT evaluations between 2002 and 2004, 14 who subsequently developed definitive diabetes were matched with patients of same sex and age who did not develop this complication. Logistic regression analysis showed that insulin secretory defects are an important determinant of subsequent diabetes developement, and the evaluation of insulin concentrations during the test may be useful in its prediction.

Diabete, intolleranza al glucosio ed ipoglicemia in fibrosi cistica

Diabete mellito e intolleranza al glucosio sono complicazioni comuni della Fibrosi Cistica (FC) e possono avere un impatto negativo sullo stato clinico e sulla sopravvivenza. Obiettivi del progetto sono: 1) valutare prevalenza, incidenza e rilevanza delle alterazioni del metabolismo del glucosio in FC, 2) caratterizzare tali alterazioni in termini di insulino-resistenza, deficit di secrezione insulinica e risposte controregolatorie, infiammazione malnutrizione e storia naturale, 3) fornire evidenze per stabilire interventi terapeutici (somministrazione insulinica, trapianto di isole pancreatiche).
L'attività eseguita ha portato ai seguenti risultati, basati sull'analisi della risposta glicemica, e della modellizzazione di sensibilità insulinica e risposta insulino-secretoria in corso di carichi orali di glucosio eseguiti annualmente in 175 pazienti di età > 10 anni seguiti presso il Centro di Milano:
1) Ipoglicemia spontanea in FC. L'ipoglicemia spontanea a digiuno (glicemia <60mg/dl) è presente nel 14% dei pazienti, e l'ipoglicemia reattiva dopo carico orale di glucosio (glicemia <50 mg/dl) è presente nel 15% dei pazienti. L'ipoglicemia a digiuno è possibilmente legata ad un inappropriato controllo soppressivo della secrezione insulinica nei portatori di mutazioni di classe I. Valori ipoglicemici a digiuno non escludono intolleranza al glucosio o diabete diagnosticati dopo carico orale di glucosio, e sono correlati ad un peggiore stato clinico.
2) Contributo dei difetti di sensibilità insulinica e di funzione

betacellulare alla variazione della tolleranza al glucosio nel tempo. La tolleranza al glucosio è molto variabile nel tempo negli stessi individui ed è soggetta sia a marcati peggioramenti che miglioramenti. Deficit di sensibilità insulinica e di funzione beta-cellulare sono entrambi presenti ed influenzano significativamente la tolleranza glicemica. Tuttavia, la variabilità di tolleranza glicemica nel tempo è dovuta soprattutto a variazioni di sensibilità insulinica. Per individuare fattori predittivi di insorgenza di diabete, tra i soggetti che avevano ricevuto un carico orale di glucosio di routine tra il 2002 e il 2004, 14 pazienti che hanno successivamente sviluppato diabete sono stati appaiati con soggetti di uguale età e sesso che non hanno sviluppato la complicanza. L'analisi logistica ha mostrato che il deficit secretorio è un importante predittore di futuro diabete e che la misurazione della curva insulinemica da carico può risultare utile nella pratica clinica.



Sergio Bernasconi

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

8. Street ME, Spaggiari C, Rossi M, Volta C, Ziveri MA, Viani I, Pisi G, Grzincich GL, Bernasconi S
Dipartimento di Pediatria, Università di Parma (Progetto FFC #18/2006)

CF patients have increased serum proinflammatory cytokine concentrations, responsible of molecular mechanisms of insulin resistance. Adiponectin and resistin are also involved in the regulation of insulin sensitivity in humans. A phase of increased insulin secretion preceding the onset of CF related diabetes (CFRD) has been hypothesised. This study aimed at evaluating: a) the eventual presence of insulin-resistance b) a possible role of adiponectin, resistin, IL-6, TNF-α and IGF-I in the regulation of glucose metabolism in these patients.

During the first year of this study we enrolled 40 patients, of these only one was prepubertal, 15 patients were aged 12-18 yr (group 2; age range: 12,17-17,42 yr) and 24 patients were aged more than 19 yr (group 3; age range: 19-39,33 yr). Eighteen healthy subjects were enrolled also as controls (age: 28±2,1 yr).

C-peptide, glycated Hb and C reactive protein (CRP) were assayed in all patients. In addition, an OGTT was done in the prepubertal patients and both an OGTT and an IVGTT were done in all the other patients according to the protocol. HOMA-IR, QUICK-I, first phase insulin response (FPIR), acute insulin response and the fasting glucose/insulin ratio were calculated accordingly.

Pulmonary function tests, Schwachman score and genotype were included also in the data base. The OGTT was classified according to the CF International criteria , the FPIR and the HOMA-IR index were evaluated according to the ISPED criteria. QUICK-I was classified according to published criteria. .

FEV1 was lower in group 3 compared with group 2 (92 vs 78 %, p<0,005), whereas C-peptide, glycated Hb and CRP were similar. Only one 35 year old female patient was insulin-resistant. Based on the response to the OGTT, 18 patients were normal, 15 had impaired glucose tolerance (IGT), 6 had CF related diabetes without fasting hyperglycaemia and one had CFRD with fasting hyperglycaemia. Based on the FPIR during the IVGTT, 7 patients were normal, and 30 had a response below the 3rd centile for pubertal stage compatible with insulin deficiency.

The crosstabulation analysis according to age groups showed the highest prevalence of normal OGTTs in group 2 (57%), whereas in group 3 only 42% had a normal response and 46% had IGT. Moreover, considering OGTTs with IGT, the percentage increased from 21% in group 2 to 79% in group 3. Similarly, the percentage of normal FPIR decreased from group 2 to 3 (29% vs 9%) and the percentage of subjects with insulin deficiency increased with age (71% in group 2 vs 91% in group 3).

Subdividing the patients according to the genotype (homozygotes for the ΔF 508 mutation, heterozygotes for the ΔF 508 mutation and other mutations) it became clear that within the same age-group being heterozygote for the ΔF 508 mutation was protective towards developing insulin deficiency, i.e. CF related diabetes.

Nuovi approfondimenti sulla resistenza all'insulina in fibrosi cistica: l'effetto delle citochine

I pazienti con FC hanno concentrazioni sieriche aumentate di citochine infiammmatorie di cui si sono scoperti meccanismi molecolari responsabili di insulino-resistenza. Anche adiponectina e resistina sono coinvolti nella regolazione della sensibilità insulinica nell'uomo. Si è ipotizzata una fase di aumentata secrezione insulinica che preceda il diabete nella FC. Lo studio si è preposto di verificare: a) l' eventuale presenza di insulino-resistenza, b)un ruolo di adiponectina, resistina, IL-6, TNF-α ed IGF-I.

Nel corso del primo anno di studio sono stati arruolati 40 pazienti, di cui un solo paziente prepubere, 15 pazienti di età compresa tra i 12 ed i 18 anni (gruppo 2; range: 12,17-17,42 anni) e 24 pazienti di età superiore ai 19 anni (gruppo 3; range: 19-39,33 anni). Sono stati attualmente reclutati 18 soggetti sani (EC: 28±2,1 anni).

In tutti i pazienti sono stati dosati C-peptide, Hbglicata e proteina reattiva-C. In aggiunta, nei prepuberi è stato effettuato un OGTT e negli altri sia un OGTT che un IVGTT. Sono stati calcolati l'indice di HOMA-IR, il QUICK-I, la first phase insulin response (FPIR), l'acute insulin response ed il rapporto glicemia/insulina. Nella banca dati sono stati riportati anche i parametri di funzionalità respiratoria, il genotipo e lo Schwachman score. L' OGTT è stato classificato secondo i criteri internazionali per la FC, la FPIR e l'indice HOMA-IR sono stati valutati secondo i criteri della SIEDP/ISPED. Il QUICK-I è stato classificato secondo i criteri pubblicati.

Il FEV1 è risultato più basso nel gruppo 3 rispetto al 2 (92 vs 78 %, p<0,005), mentre sono risultati simili C-peptide, Hb glicata e PCR. Una sola paziente di 35 anni è risultata insulino-resistente. In base alla risposta dell' OGTT, 18 pazienti sono risultati normali, 15 avevano una ridotta tolleranza glucidica (IGT), 6 un diabete legato alla FC senza iperglicemia a digiuno ed uno un diabete con iperglicemia a digiuno. In base alla FPIR in corso di IVGTT, 7 pazienti hanno presentato una risposta normale e 30 una risposta inferiore al 3° percentile per stadio puberale, compatibile con deficit di insulina.

L'analisi di crosstabulazione per gruppo di età ha messo in evidenza una prevalenza massima di risposta normale all' OGTT nel gruppo 2 (57%), mentre nel gruppo 3 solo il 42% aveva risposta normale ed il 46% una risposta compatibile con IGT. Inoltre, valutando gli OGTT con IGT, la percentuale aumentava dal 21% nel gruppo 2 al 79% nel gruppo 3. In modo analogo, una FPIR normale percentualmente diminuiva dal gruppo 2 al 3 (29% vs 9%) ed aumentava la percentuale di soggetti con deficit di insulina con l'età (71% nel gruppo 2 vs il 91% nel gruppo 3). Suddividendo i pazienti per genotipo (omozigosi per mutazione ΔF 508, eterozigosi per ΔF 508 ed altre mutazioni) è emerso che a parità di età, l'eterozigosi per la mutazione ΔF 508 risultava protettiva rispetto all'omozigosi nell'instaurarsi di un deficit di insulina.

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

Laura Minicucci *(al centro) con suoi collaboratori*

9. Minicucci L, Haupt R
Centro Fibrosi Cistica, Istituto G. Gaslini, Genova
(prog. FFC#21/2006)

The aim of this study is to evaluate tolerability and efficacy of insulin glargine in CF patients with glucose intolerance (GI). In particular we want to evaluate the effects of glargine in improving nutritional, respiratory and glycometabolic condition.
Patients, who accept to enter in the study, continue to carry out the conventional care for Cystic Fibrosis and follow a free diet. They are randomizated into two groups (Group A: Glargine yes, Group B: Glargine no) and patients in Group A receive a daily insulin dose of 0,2/U/ Kg once a day for 18 months. The project has been approved by the local Ethical Committee in 15/19 CF partecipating Centers and 7 CF Centers have already enrolled IG patients. Currently there are 38 patients (21 in Group A and 17 in Group B) in the study with a medium follow-up of 14 months (range 3-18 months).They are followed by Genova Center (13 pts), Roma Bambino Gesù Center (12 pts), Napoli Federico II Center (5 pts), Palermo Center (3 pts), Cerignola Center (2 pts), Roma La Sapienza Center (2 pts), Milano Adults Center (1 pt).
After the enrollment 6 patients interrupted the study: 4 patients (2 Group A and 2 Group B) didn't accept the randomization result, 1 patient (Group B) developed overt CFRD after 9 months, 1 patient (Group A) voluntarily interrupted the drug after 15 months without any history of drug correlated adverse effects.
In our preliminary results Group A patients, compared with Group B patients, showed a significant improvement of glycosylated hemoglobin values [Friedman's test: p=0.03] and a better, even if not statistically significant, pulmonary function test trend. No significant difference in the nutritional status between the two groups was observed.
No considerable adverse effects were reported in any patient.
All the patients in the study showed a high compliance and acceptance to the treatment. Moreover
protocol requirements didn't influence the burden of the current CF patient follow –up. To obtain statistically significant results it is mandatory to increase the number of patients on study and any effort will be done to improve enrollment in partecipating CF Centers.

Efficacia di insulina Glargine nei pazienti affetti da Fibrosi Cistica con intolleranza glucidica e decadimento clinico

Questo studio ha lo scopo di valutare l'efficacia d'insulina glargine nei pazienti affetti da intolleranza glucidica (IG) in FC. In particolare si vuole valutare se insulina glargine è efficace nel prevenire il peggioramento delle condizioni nutrizionali e della funzionalità respiratoria e a migliorare la condizione glicometabolica. I pazienti nello studio, randomizzati in due gruppi, effettuano le cure necessarie per la malattia di base e seguono una dieta libera; uno solo dei due gruppi effettua insulina glargine per via sottocutanea una volta al giorno, per 18 mesi. A tutt'oggi il progetto è stato approvato dal Comitato Etico locale in 15/19 dei Centri FC partecipanti. Sono in follow up 38 pazienti (21 Glargine SI e 17 Glargine NO) con un tempo medio di osservazione di 14 mesi (range 3 -18 mesi). I pazienti nello studio sono stati arruolati nei Centri FC di Genova (13 pz), Roma Bambino Gesù (12 pz), Napoli Federico II (5 pz), Palermo (3 pz), Cerignola (2 pz), Roma La Sapienza (2 pz), Milano Adulti (1 pz). 6 di questi pazienti sono usciti dallo studio: 4 non hanno accettato il risultato della randomizzazione (2 Glargine SI, 2 Glargine NO), 1 ha sviluppato CFRD dopo 9 mesi (Glargine NO) e 1 ha volontariamente interrotto la terapia con glargine dopo 15 mesi di trattamento pur in assenza di effetti collaterali associabili al farmaco. I risultati ottenuti da una preliminare indagine statistica dimostrano un significativo miglioramento del compenso glucometabolico nei pazienti in trattamento con insulina glargine. È stata osservata inoltre la stabilizzazione dei parametri di funzionalità respiratoria nei pazienti in terapia con glargine, a fronte del decremento osservato nei pazienti arruolati nel gruppo di controllo. Non sono state osservate differenze significative tra i due gruppi per quanto riguarda lo stato nutrizionale. Non sono stati segnalati a tutt'oggi effetti collaterali importanti associabili al trattamento con insulina glargine. Questi risultati sono da considerarsi preliminari perché il numero di pazienti arruolati, non ha ancora raggiunto il numero minimo previsto per avere risultati significativi. Ad oggi però possiamo sottolineare la buona fattibilità dello studio: i pazienti hanno dimostrato una buona accettazione del protocollo e gli sperimentatori non hanno dovuto affrontare un carico di lavoro troppo gravoso rispetto a quello necessario nel normale follow up dei pazienti FC.

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

Alfredo Guarino

10. Guarino A[1], Colombo C[2], Morelli L[3]
[1]*Clinica Pediatrica, Università Federico II, Napoli; Centro Fibrosi Cistica, Università di Milano;* [2]*Dipartimento di Pediatria, Centro Fibrosi Cistica, Fondazione IRCCS, Ospedale Maggiore Policlinico Mangiagalli e Regina Elena, Milano;* [3]*Istituto di Microbiologia Università Cattolica Sacro Cuore, Piacenza (Prog. FFC #20/2006)*

Objectives:

1. *To demonstrate that administration of probiotics in CF children results in substantial modification of intestinal microecology and reduces pulmonary exacerbation in CF patients.*
2. *To demonstrate that administration of probiotics in CF children decreases locally and outside the gut the inflammation.*

At the present 14 CF patients have been enrolled to follow the whole clinical protocol.

All enrolled patients fit the following inclusion criteria: cystic fibrosis (age range 5-15 years), diagnosed by an elevated sweat Cl^- concentration, with moderate respiratory disease, chronically infected with Pseudomonas aeruginosa *(PA), pancreatic insufficiency assessed by steatorrhea, fecal elastase concentration and clinical symptoms.*

Enrolled children have been randomly and in a double blind fashion divided in two groups. Group A started with a preparation code 400 for 6 months. Children enrolled in group B received the preparation code 401 for 6 months. Each preparation (either ORS = Oral Rehydration Solution or LGG = Lactobacillus GG) has been assumed in a single daily dose every day for the whole duration of the treatment period. At the end of the first 6 months period (period 1) the two groups will shifted to the other preparation (period 2) for further 6 months. A washout period of 4 weeks was introduced between LGG and ORS administration.

The following outcome measures were recorded at the beginning and at the end of the intervention period and during the 6 months of follow up:

Primary outcomes: 1. number of episodes of pulmonary exacerbations and antibiotic treatments; 2. number and duration of hospital admissions required for pulmonary exacerbations.

Secondary outcomes: 1. number, duration and route of administration (oral versus intravenous administration) of antibiotics; 2. pulmonary function tests (FEV1),body weight and BMI, intestinal microflora composition, before and after each intervention period.

Tertiary outcomes: 1. Intestinal function tests, including steathorrea,fecal calprotectin concentration, fecal α1 antitrpsin concentration, rectal nitric oxide concentration and intestinal permeability as judged by double sugar test. These evaluations will be performed in a subset of patients (expected 50%); 2. Nutritional assessment including serum concentrations of albumin, total proteins, colesterol and triglicerides, iron; 3. Serum Immunoglobulin concentrations (IgA, IgG and IgM) and anti-Pseudomonas aeruginosa circulating antibodies.

During the 6 month of follow up the compliance with LGG or placebo assumption has been checked with the mothers of children enrolled.

Preliminary results: the two enrolled groups were homogeneous in term of age, sex, nutritional status, severity of pulmonary disease, pancreatic insufficiency (assessed by steathorrea) and intestinal inflammation (evaluated by fecal calprotectin and rectal nitric oxide concentration). Interestingly, despite the supplementation with pancreatic enzymes mean value of steathorrea was above the normal range in the two groups. The same results was obtained for mean fecal calprotectin concentration.

During the first 6 months of follow up a total of 8 episodes of pulmonary exacerbations was registered: 3 in the group A and 5 in the group B. All the episodes registered in the group A needed a parenteral antibiotic treatment. Conversely only 60 % of the episodes registered in the group B was treated through parenteral route. Five hospital admissions for pulmonary exacerbations were recorded during the first 6 months of follow up : 2 in the group A and 3 in the group B.

Prevenzione delle infezioni polmonari in bambini con Fibrosi Cistica attraverso la modificazione della microflora intestinale

Gli obiettivi principali dello studio sono:

1. valutare l'efficacia della somministrazione di LGG nel modificare la microflora intestinale del paziente con fibrosi cistica
2. valutare l'efficacia dei LGG sul controllo delle infezioni respiratorie e sullo stato di infiammazione nel pazienti con fibrosi cistica.

A tale scopo lo studio prevedeva l'arruolamento di pazienti con fibrosi cistica con infezione cronica da Pseudomonas aeruginosa che sarebbero stati suddivisi divisi in due gruppi : uno costituito da pazienti che avrebbero assunto Lactobacillus GG per 6 mesi in associazione alle altre terapie standard ed un altro gruppo costituito da pazienti che avrebbero assunto un placebo (un prodotto analogo al prodotto in studio che non contiene il Lactobacillus GG) per lo stesso periodo di tempo.

Allo stato attuale sono stati arruolati 14 pazienti di età compresa tra i 5 ed i 15 anni di cui 7 hanno iniziato il trattamento con LGG ed altri 7 il trattamento con il placebo. Lo studio è in doppio cieco per cui non sappiamo quali pazienti stiano realmente assumendo LGG e quali il placebo. Per tutti i pazienti sono stati registrati prima di iniziare il trattamento i seguenti parametri: altezza, BMI, stadio puberale, funzionalità respiratoria (FEV1, FVC, SatO2), Rx torace, dosaggio immunoglobuline sieriche, test non invasivi di funzionalità intestinale e valutazione della microflora intestinale e l'esame colturale dell'espettorato. Durante questi primi 6 mesi di osservazione sono stati inoltre registrati il numero la durata di eventuali episodi di febbre, il numero , la durata, la motivazione ed il tipo di eventuali terapie antibiotiche prescritte.

Ogni tre mesi ciascun paziente ha effettuato un controllo clinico e laboratoristico presso il Centro di Riferimento durante il quale sono stati eseguiti esami del sangue ed analisi (la maggior parte delle analisi sono le stesse che vengono effettuate regolarmente al paziente con fibrosi cistica) e sono stati registrati eventuali problemi relativi all'assunzione del prodotto.

I dati ottenuti da una prima analisi sono i seguenti: I due gruppi di pazienti al momento dell'arruolamento erano omogenei per quanto riguarda l'età media, il sesso la compromissione respiratoria (misurata con il FEV1), la compromissione pancreatica (misurata con lo steatocrito) e l'infiammazione intestinale (valutata attraverso la misurazione della calprotectina fecale e dell'ossido nitrico rettale. Da sottolineare però che per entrambi i gruppi i valori di steatocrito e di calprotectina fecale risultavano patologici rispetto ai valori normali per l'età. Per quanto riguarda l'ossido nitrico rettale, altro marcatore di infiammazione intestinale solo in uno dei due gruppi il valore medio risultava superiore alla norma.

Nel corso dei primi 6 mesi di follow up sono state registrate 8 riacutizzazioni respiratorie delle quali 3 nel gruppo A e 5 nel gruppo B . Tutte le tre riacutizzazioni osservate nei pazienti del gruppo A hanno necessitato di un trattamento antibiotico per via sistemica mentre solo 3 delle 5 riacutizzazioni registrate nel gruppo B sono state trattate per via generale. Sempre nei primi 6 mesi sono stati inoltre registrati 5 ricoveri di cui 2 nel gruppo A e 3 nel gruppo B.

Al momento attuale non è possibile valutare la significatività di questi risultati preliminari perché ancora incompleti e su un numero di pazienti non definitivo. La fase successiva dello studio prevede che al termine dei primi 6 mesi di trattamento, dopo un periodo di sospensione della durata di 1 mese, i due gruppi si invertiranno in modo che per i successivi 6 mesi chi ha assunto il placebo assumerà LGG e chi ha assunto LGG assumerà il placebo.

Prolonging the duration of peripheral venous catheters in cystic fibrosis people. Randomized controlled study on the effect of different concentrations of antibiotics in Normal Saline (CDC/FDA/NIH Clinical Trial Registry n. NCT00418470)

Filippo Festini *(a destra) con una collaboratrice*

11. Festini F
Centro Fibrosi Cistica, Osp. Meyer e Facoltà di Scienze Infermieristiche, Università di Firenze (Prog FFC #19/2006)

Patients with CF frequently have to undergo intravenous antibiotic courses. Peripherally inserted indwelling devices (PVC) are used to reduce the number of venepunctures. The irritating action of antibiotics may interrupt the vein's patency, requiring numerous venipunctures to a patient for completing a course of antibiotic treatment, which usually lasts 2 weeks, causing further suffering, pain and anxiety. With the passing of time veins become more and more difficult to find and the completion of an antibiotic course may become a problem and cause suffering to the patient.
An alternative to PVC are Central Venous Catheters but such an invasive intervention may not be indicated due to patients' clinical conditions.
This same group of research has carried out a preliminary cohort study which showed a correlation between the number of daily antibiotic infusions and the duration on site of PVCs, suggesting that a higher dilution of antibiotic may reduce its irritating action on the vein.
This study aims at investigating whether, administering the prescribed IV antibiotic with an increased dilution in Normal Saline, it is possible to reduce the irritation on the vein, reduce the risk of phlebitis and prolong the duration of the PVC, therefore reducing the number of venipunctures needed to complete an antibiotic course. If this was confirmed, an easy, safe and economic method would be available to reduce the number of venepunctures. The recruitment started in March 2007. So far 6 patients were eligible for the study and 4 were included. 2 were randomly assigned to group A -normal antibiotic dilution- and 2 to group B -higher antibiotic dilution. Preliminary results and interim analysis show that In Group A, the mean duration of PVCs was 3.75 days (SD 0.75), whereas in Group B, the mean duration of PVCs was 6.45 days (SD 0.07), Student t-test: p=0.009. No statistically significant differences result from with regard to phlebitis, infiltration and pain scores.
Preliminary data seem to confirm that an increased dilution of antibiotic in NS may lead to increase the duration on site of PVCs. However, no conclusion can be drawn so far.
The study will continue until the end of 2008 and aims at recruiting up to 60 patients.

Prolungamento della durata delle agocannule utilizzate per i cicli antibiotici in adulti con FC. Studio randomizzato controllato sull'effetto di differenti concentrazioni di antibiotico in soluzione fisiologica.

I pazienti con FC si devono sottoporre frequentemente a cicli di terapia antibiotica endovena. Per evitare che i pazienti ricevano un gran numero di venipunture vengono usati cateteri venosi periferici (CVP) o "*agocannule*". A causa dell'azione irritante dei farmaci usati, spesso non è sufficiente un solo CVP per tutta la durata prevista del ciclo di terapia antibiotica (di solito 2 settimane) ed i pazienti devono essere sottoposti ad ulteriori tentativi di reperimento della vena, che provocano dolore ed ansia. Col tempo le vene diventano sempre più difficilmente reperibili e l'esecuzione dei cicli può diventare problematica e causare sofferenza. L'alternativa all'uso dei CVP è l'inserimento di un catetere venoso centrale, che però può essere talora controindicato. Uno studio di coorte preliminare da noi condotto ha evidenziato una correlazione tra il numero di infusioni giornaliere di antibiotico e la durata del CVP in situ, suggerendo che una maggior quantità di liquidi infusi insieme all'antibiotico potrebbe ridurre l'irritazione della vena.
Questo studio si propone quindi di dimostrare che aumentando la diluizione degli antibiotici nella fisiologica usata per infonderli, è possibile ridurre l'irritazione della vena utilizzata, ridurre il rischio di flebite, prolungare la durata del CVP utilizzato e quindi ridurre il numero di venipunture necessarie per un ciclo antibiotico. Se l'ipotesi verrà confermata sarà disponibile un sistema semplice, sicuro, economico per ridurre il numero di venipunture necessarie per eseguire un ciclo antibiotico ev.
Si tratta di uno studio randomizzato, controllato, non cieco, svolto presso il reparto di degenza del Centro FC della Toscana. Il reclutamento è iniziato a marzo del 2007. Finora 6 pazienti erano eleggibili per lo studio e 4 sono stati inclusi. 2 sono stati assegnati con randomizzazione al gruppo A (normale diluizione dell'antibiotico), 2 al gruppo B (maggiore diluizione). I risultati preliminari e l'interim analysis mostrano che nel gruppo A la durata media dei PVC era di 3.75 giorni (SD 0.75) mentre nel gruppo B era di 6.45 giorni. (SD 0.07), Student t-test: p=0.009. Non risultano differenze significative nei punteggi di flebite, infiltrazione e dolore. I dati preliminari sembrano suggerire che una maggiore diluizione dell'antibiotico porta ad aumentare la durata in situ dei PVC, anche se non è possibile per ora trarre alcuna conclusione. Lo studio continuerà fino a tutto il 2008 e mira a reclutare 60 soggetti.

Giovanni Taccetti

Early antibiotic treatment in Pseudomonas aeruginosa *eradication in cystic fibrosis patients: a randomised multicentric study on two different protocols.*

12. Taccetti G[1], Cariani L[2]
[1]*Centro Fibrosi Cistica, Osp. Meyer, Firenze;* [2]*Laboratorio di Microbiologia, Centro Fibrosi Cistica, Fondazione IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico Mangiagalli e Regina Elena, Milano*
(prog. FFC#17/2007)

Chronic colonisation by P. aeruginosa is currently considered an unfavourable event in the prognosis of CF patients. In the absence of a cure for the basic defect, the prevention of chronic colonisation by means of eradication of the germ upon initial isolation appears to be a simple and efficacious method to improve long-term prognosis.

To date, there are no wide-scale casistic studies to compare the efficacy of the various treatments, having a notable cost difference. Preliminary experience nevertheless suggests that aerosol treatment with tobramycin can provide results comparable to the association of inhaled colimycin and ciprofloxacin per os.

The primary aim of this study is to compare, using statistics on a large sample of CF patients and by means of a multicentre randomised trial, the efficacy of two types of eradication treatment (inhaled tobramycin compared to ciprofloxacin per os and inhaled colistin) against the first P. aeruginosa infection. The rationale behind the choice of these treatments is based on the documented efficacy of these antibiotics in P. aeruginosa *eradication in previous experience. The treatments here under study are those that are widely used in clinical practice.*

Secondary aims are:

- *to study longitudinally antibody response to* P. aeruginosa
- *to evaluate sensitivity and resistance of* P. aeruginosa *strains at first isolation*
- *to determine a P. aeruginosa-free period after treatment*
- *to determine the genetic correlation between* P. aeruginosa *isolates in order to establish the success of the treatment*
- *to determine if eradication treatment is associated with the emergence of particular pathogens*
- *to prospectively monitor the course of pulmonary function (FEV_1 - forced expiratory volume in one second)*
- *to assess the number of pulmonary exacerbations and hospitalisations, the days of total antibiotic usage, linear growth and weight gain throughout the study period.*

In the absence of a cure, the prevention of chronic colonisation of P. aeruginosa *by means of eradication of the germ appears to be a simple and efficacious method to improve long-term prognosis. Since it has not been reported if the eradication therapy programs most recently proposed are equally efficacious, this study proposes to clarify this crucial matter with a multicentre randomised study involving a large number of patients. The early eradication of* P. aeruginosa *and the following germ-free period appear to be of particular clinical relevance since chronic colonisation is associated to progressive deterioration of pulmonary function, and the patient's life is heavily conditioned by the need for increasingly aggressive antibiotic treatments.*

Trattamento antibiotico precoce per l'eradicazione di *Pseudomonas aeruginosa* in pazienti con fibrosi cistica: uno studio multicentrico randomizzato su due protocolli

Razionale: La colonizzazione cronica da parte di *P. aeruginosa* è un evento sfavorevole per la prognosi in FC. In assenza di una terapia risolutiva per il difetto di base, la prevenzione della colonizzazione cronica tramite eradicazione del germe al momento del primo isolamento, appare come un metodo semplice e efficace per migliorare la prognosi. Non esistono attualmente studi su ampia casistica per comparare l'efficacia dei vari trattamenti utilizzabili, il cui costo è notevolmente diverso. Esperienze preliminari suggeriscono che il trattamento per via aerosolica con tobramicina possa determinare risultati sovrapponibili rispetto all'associazione di colimicina per via inalatoria e ciprofloxacin per os.

Obiettivi: L'obiettivo principale dello studio è comparare con metodi statistici, su un consistente campione di pazienti affetti da CF e in uno trial multicentrico randomizzato, l'efficacia dei due schemi di trattamento eradicante (tobramicina per via inalatoria versus ciprofloxacin per os e colistina per via inalatoria) verso la prima infezione da *P. aeruginosa*. Il razionale della scelta di tali trattamenti è basato sulla documentata efficacia di tali antibiotici nell'eradicare *P. aeruginosa* in precedenti esperienze. I trattamenti oggetto di studio sono quelli maggiormente utilizzati nella pratica clinica. Altri obiettivi sono:

- Valutare longitudinalmente la risposta anticorpale
- Studiare il pattern di sensibilità al primo isolamento
- Determinare il periodo di tempo libero dal germe
- Studiare il genotipo di ceppi di *P. aeruginosa* in caso di ulteriori colonizzazioni
- Verificare se i trattamenti eradicanti determinano l'emergenza di particolari patogeni
- Monitorare l'andamento delle prove di funzionalità respiratoria (FEV1)
- Valutare l'andamento dei parametri antropometrici, il numero di riacutizzazioni, l'ospedalizzazione e l'uso di antibiotici

Risultati attesi: Poiché non è noto se gli schemi di terapia eradicante abbiano eguale efficacia, lo studio si propone di far chiarezza in questa area critica con uno studio randomizzato policentrico coinvolgente un alto numero di pazienti. L'eradicazione precoce di *P. aeruginosa* e il seguente periodo di tempo libero dal germe appaiono di particolare rilevanza clinica poiché la colonizzazione cronica si associa a un progressivo deterioramento della funzionalità polmonare, e la vita del paziente è pesantemente condizionata dalla necessità di trattamenti antibiotici sempre più aggressivi.

Cesare Braggion

Control and prevention of respiratory infections in Cystic Fibrosis patients: evaluation of the emission distance of Pseudomonas aeruginosa from the respiratory tract of infected patients through coughing and conversation.

13. Braggion C, *Centro Fibrosi Cistica, Ospedale Meyer, Firenze (Progetto FFC #16/2007)*

International Guidelines about infection prevention suggest that CF patients should maintain a distance of at least 1 meter from other CF individuals. One of the most important way of transmission of Pseudomonas aeruginosa *(PA) is known to be by the emission of droplets during conversation and coughing. However, specific studies and scientific evidence on the safety of the distance to be kept between CF people are scarce, and 1 meter distance might be inadequate. Moreover, cross-infection prevention measures may cause social isolation in CF patients and often they are not accepted although healthcare providers recommend them.*

Our study aims to evaluate what distance can be reached by PA through emission of droplets from the respiratory tract. This would give an important contribution to the knowledge about prevention of CF cross-infections. Patients of CF centre of Tuscany aged ≥ 14 who result positive for PA in the previous sputum culture will be included in the study. Preliminary clinical evaluation of patient will include a deep pharyngeal swab or sputum culture to confirm the presence of PA. The study method consists in placing the patient in front of

a table covered with a single-use, waterproof, sterile sheet, then the patient will be asked to read a text with the aim to create the conditions of a normal conversation. Then the specimens present on the disposable sterile sheet are picked up at four distances (0-0.5m; 0.5-1m; 1-1.5m; 1.5-2m;) with sterile swabs. The procedure is repeated again with a new disposable sterile sheet, with the patient performing two forced expiration with open glottis. Bacteriological exams on the 8 samples taken will be performed to verify the presence of PA. Statistical analysis will determine the percentage of contaminated areas to assess the potential risk for a CF patient to be reached by secretion expelled by the respiratory tract at difference distances.

Controllo e prevenzione delle infezioni respiratorie in pazienti con Fibrosi Cistica: valutazione della distanza di emissione dello Pseudomonas aeruginosa dal tratto respiratorio di persone infette attraverso tosse e conversazione.

Le Linee Guida Internazionali sulla prevenzione delle infezioni associate agli ambienti di cura suggeriscono di mantenere la distanza precauzionale di almeno un metro tra i soggetti con FC. Infatti una delle principali modalità di trasmissione dello *Pseudomonas aeruginosa* (PA) si realizza attraverso l'emissione di goccioline di saliva con la conversazione e la tosse, sintomo abituale nei pazienti con FC. Tuttavia sono poche le prove scientifiche e gli studi specifici nell'ambito della FC in merito alla distanza precauzionale che potrebbe pertanto risultare inadeguata. Inoltre le misure di prevenzione delle infezioni "crociate" comportano per questi pazienti un vissuto di isolamento e spesso non sono accettate, nonostante le raccomandazioni degli operatori sanitari. Il nostro studio si pone pertanto l'obiettivo di valutare quale distanza possa essere raggiunta da PA attraverso l'emissione di goccioline dall'albero respiratorio dando così un contributo importante alle conoscenze in merito alla prevenzione delle cross-infezioni in FC. Sono inclusi nello studio i pazienti del Centro Regionale Toscano per la Fibrosi Cistica di età superiore o uguale a 14 anni risultati positivi per PA nel precedente espettorato. La valutazione clinica preliminare del paziente richiede l'esecuzione di un tampone faringeo che confermi la persistenza del microrganismo. Il metodo di studio consiste nel porre il paziente davanti ad un piano orizzontale rivestito da un telino sterile impermeabile monouso; si chiede al paziente di leggere un brano con l'intento di ricreare le condizioni di una conversazione; si raccoglie poi con tamponi sterili il materiale presente sul telino a 4 distanze predefinite (0-0,5m; 0,5-1m;1-1,5m;1,5-2m) . Si ripete la procedura di raccolta su un nuovo telino sterile dopo che il paziente ha effettuato due manovre di espirazione forzata a glottide aperta. Vengono infine eseguiti esami batteriologici sugli 8 campioni prelevati per verificare la presenza dello PA. L'analisi statistica prevede il calcolo della percentuale di aree contaminate così da definire quale sia il rischio potenziale per un paziente FC di essere raggiunto dalle secrezioni espulse dall'albero respiratorio alle diverse distanze.

Paola Catastini

Prevalence and impact of depressive and anxiety disorders in CF patients and their caregivers

14. Catastini P[1], Di Marco S[2] [1]*Centro Fibrosi Cistica, Ospedale Meyer, Firenze;* [2]*Centro Fibrosi Cistica, Ospedale dei Bambini G. Di Cristina, Palermo (prog. FFC#18/2007)*

The present study arose from dott. Quittner's proposal to European CF centers, i.e. an European collaborative study to evaluate depression and anxiety in CF patients and their caregivers. Being psychologist in Florence CF Center, I gave my adhesion, further I asked CF Italian Centers and psychologist colleagues of CF Italian Society to join an Italian study aimed at:

1) evaluating the incidence of depression and anxiety in cf patients and their family

2) creating a psychological clinical protocol to support therapy towards patients and family

A good number of Italian Centers gave their adhesions (14 Centers and 1 support Service) .

The whole Italian country was represented : 6 centers are in the North part of Italy, 4 in the Center and 5 in the South.

Each Centre will administer to CF patients the CFQ-R (Cystic Fibrosis Questionnaire-Revised), the CES-D (Italian version in regard of depression symptoms), the Hads (Hospital Anxiety and Depression Scale). The 70% of patients, who will arrive consecutively at each Center for clinics, will be studied. Patient clinical data will be collected by filling in a special form; they will be correlated to psychological data. Specific exclusion criteria were stated .

The working protocol consists in sending information letters; evaluating the clinical situation; filling in the entry data base. At present the study is going on in Florence and Leghorn. It will be carried out in 12 to 18 months.

Prevalenza e significato del disturbo depressivo e/o ansioso nei pazienti FC e nei loro familiari

Lo studio che ci accingiamo ad affrontare e che qui oggi brevemente presentiamo nasce dall'invito ricevuto dalla dottoressa Quittner, di reclutare centri europei disposti a partecipare al proprio studio per la valutazione della depressione e dell'ansia nel paziente FC e nei suoi familiari, a cui personalmente come psicologo del mio centro detti adesione.

Successivamente l'idea di interpellare altri centri italiani, altre colleghe del gruppo psicologi della Società Italiana Fibrosi Cistica, per arrivare poi fino a ciò che ad oggi presentiamo, il progetto per uno studio multicentrico italiano volto:

a) a valutare l'incidenza del disturbo depressivo nei nostri pazienti e nelle loro famiglie.
b) a usufruire di tali dati per organizzare un protocollo clinico psicologico di supporto e terapia al paziente e alla sua famiglia

Per la partecipazione allo studio sono stati reclutati 15 centri. Al fine di rendere il campione effettivamente rispondente alla distribuzione dei pazienti sul territorio nazionale e quindi anche dei diversi modelli assistenziali, i centri partners sono stati suddivisi in 6 al nord, 4 al centro e 5 al sud rispecchiando la distribuzione del Registro FC.

È previsto che ogni centro somministrerà il CFQ-R (Cystic Fibrosis Questionnaire -Revised); il CES-D (versione italiana per la valutazione degli stati depressivi), la HADS (Hospital Anxiety and Depression Scale) al 70% dei propri pazienti, secondo il loro arrivo consecutivo al Centro in occasione della visita ambulatoriale di controllo, per ognuno sarà inoltre compilata una scheda secondo le attuali condizioni cliniche che saranno poi correlate con la risposta ai test

Sono previsti specifici criteri di esclusione dallo studio.

È previsto un protocollo procedurale come di seguito indicato: - invio lettere informative - compilazione del consenso informato all'arrivo del paziente al Centro - raccolta dei parametri clinici del paziente al momento della somministrazione

-inserimento dei dati raccolti

Ad oggi lo studio ha preso il via presso il centro di Firenze e il servizio di supporto di Livorno. Si prevede che lo studio sarà concluso in un periodo compreso fra 12 e 18 mesi.

Microbiology

Basic, Genetic and Clinical Microbiology: What has been achieved, what has to be done in the future

Gerd Doering
Professore di Igiene e Microbiologia Sperimentale, Dip.to di Igiene Generale e Ambientale, Istituto di Igiene, Università di Tuebingen, Germania. Membro del Comitato Scientifico della Fondazione FFC.

Bacterial infections in CF are restricted to the airways where they are facilitated by a defective mucociliary clearance system and characterized by microaerobic/anaerobic environmental conditions in the mucus layer overlaying the respiratory epithelium. Although S. aureus *and* P. aeruginosa *are much more prevalent in CF patients, research projects related Burkholderia cepacia complex (BCC) strains seems to attract the most attention in Italy and 7/13 projects, sponsored by the FCC Foundation during the last five years, are related to various aspects of BCC [1-13].*

BCC strains are difficult to work with, due to their large genome which for one strain has only recently been unravelled, their multifactorial virulence and high intrinsic resistance to many antibiotics and finally the lack of a potent animal model which reflects the pathophysiology of BCC infections in CF patients. The aims of the group of ***Roberta Fontana*** *are to genotype BCC strains from Italian CF centres and to identify specific virulence markers of these strains to finally understand, how this pathogen can survive and grow in the CF lung [1]. The results demonstrate that* B. cenocepacia *is most prevalent among Italian CF patients, and that cross infection in Taly with BCC strains is relatively low. Such in vitro studies may now be facilitated by a new animal model for BCC lung infections which resembles the pathophysiology of BCC infections in CF patients [2]. The model could also be instrumental to complement studies of* ***Annamaria Bevivino*** *[3],* ***Giovanna Riccardi*** *[4],* ***Vittorio Venturi*** *[5-14],* ***Renato Fani*** *and* ***Roberto Rizzo*** *[15], to type and to discriminate virulent from non-virulent BCC strains, to unravel virulence factors involved in efflux pumps, quorum sensing, and the interaction of exopolysaccharides and lipopolysaccharides with components of the innate immune system. The availability of different expertises in Italian laboratories related to BCC research seems to be ideal for the formation of an Italian BCC consortium which would focus current research activities on a single project to achieve synergistic effects.*

International cooperations is a strong rationale in the work of ***Alessandra Bragonzi*** *[2, 16-19], who investigates* P. aeruginosa *alginate regulation and hypermutability in an animal model. Her data show that mutations in the mucA gene do necessarily correlate with mucoidy in* P. aeruginosa*, that oxygen-dependent regulation of alginate occurs in vivo, and that* P. aeruginosa *hypermutation is associated with a biological cost, reducing the potential for colonization of new environments and therefore strain transmissibility. On a national basis,* ***Giovanni Bertoni, Graziana Manno*** *and* ***Anna Silvia Neri*** *seem to be ideal partners to combine typing, molecular genetics, antibiotic resistance and animal models with regard to* P. aeruginosa*. An Italian consortium has already be started by* ***Silvia Campana*** *for the methicillin-resistant S. aureus isolates from CF patients in Italy. Animal models may also be useful for future works of* ***Bianca Colonna*** *who investigates the virulence of* Stenotrophomonas maltophilia *[20].*

References

1. Golini G, et al., Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2006;25:175-80.
2. Sousa S, et al., Cell Microbiol 2007;doi: 10.1111/j.1462-5822.2007.00998
3. Chiarini L, et al., Trends in Microbiol 2006;14:277-86.
4. Guglierame P, et al., BMC Microbiol 2006;6:66.
5. Venturi V. et al., Res Microbiol 2004;155:238-44.
6. Bertani I, et al., Appl Environm Microbiol 2004;70:5496-502.
7. Rampioni G, et al. J Bacteriol 2006;188:815-9.
8. Solis R, et al., FEMS Microbiol Letters 2006;259:106-12.
9. Bertani I, et al., BMC Microbiol 2007; in press
10. Devescovi G, et al., Appl Environm Microbiol 2007; in press
11 Liccardello G, et al., FEMS Microbiol Ecol 2007; :1-13.
12. Rampioni G, et al., J Bacteriol 2007; 189:1922-30.
13. Massa C, et al., Protein Express Purificat 2007;54:300-8.
14. Steindler L, et al. FEMS Microbiol Lett 2007;266:1-9.
15. Herasimenka Y, et al., Carbohydrate Res 2007;doi:10.1016
16 Bragonzi A, et al., Infect Dis 2005;192:410-9.
17. Bragonzi A, et al., Microbiology 2006;152:3261-9.
18. Montanari S et al. 2007;153:1445-54.
19. Ulrich M, et al., Mol Microbiol 2007;65:1276–87.
20. Di Bonaventura G, et al. Intern J Immunopathol Pharmacol 2007;20:109-17.

Microbiologia di base, genetica e clinica: che cosa è stato raggiunto e che cosa si dovrà fare in futuro

Le infezioni batteriche in CF sono limitate alle vie aeree, dove esse sono facilitate da un sistema di clearance mucociliare difettoso e sono caratterizzate da condizioni ambientali microaerobiche/anaerobiche nello strato di muco che sovrasta l'epitelio respiratorio. Benché *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* siano maggiormente prevalenti nei pazienti CF, i progetti di ricerca concernenti ceppi di *Burkholderia cepacia* complex (BCC) sembrano attrarre la maggiore attenzione in Italia e ben 7 su 13 progetti, sponsorizzati dalla Fondazione FFC negli ultimi 5 anni, si riferiscono a vari aspetti di BCC [1-13].

È molto difficile lavorare con ceppi di BCC, a causa del loro vasto genoma, che per un solo ceppo è stato solo recentemente determinato, alla loro virulenza multifattoriale ed alta resistenza intrinseca a molti antibiotici ed infine alla mancanza di un potente modello animale che rifletta la fisiopatologia delle infezioni da BCC nei pazienti CF. Gli obiettivi del gruppo di **Roberta Fontana** sono stati quelli di genotipizzare ceppi di BCC da centri CF italiani ed identificare specifici markers di virulenza di questi ceppi per comprendere infine come questo patogeno possa sopravvivere e crescere nel polmone CF [1]. I risultati dimostrano che *B. cencepacia* è la specie o genomovar maggiormente prevalente tra i pazienti CF italiani e che le infezioni crociate con ceppi di BCC in Italia sono relativamente rare. Tali studi in vitro possono ora essere facilitati da un nuovo modello animale di infezione

polmonare da BCC che richiama la fisiopatologia dell'infezione BCC nei pazienti CF [2]. Il modello potrebbe anche essere strumentale a complementare gli studi di **Annamaria Bevivino** [3], **Giovanna Riccardi** [4], **Vittorio Venturi** [5-14], **Renato Fani** e **Roberto Rizzo** [15], per tipizzare e discriminare i ceppi BCC virulenti da quelli non virulenti, per chiarire i fattori di virulenza interessati nelle pompe di efflusso, nel quorum sensing e nell'interazione di esopolisaccaridi e lipopolisaccaridi con componenti del sistema immune innato. La disponibilità di differenti competenze nei laboratori italiani in relazione alla ricerca su BCC sembra essere una condizione ideale per la formazione di un consorzio italiana per *B. cepacia* complex che focalizzerebbe le attività di ricerca attuali su un singolo progetto al fine di raggiungere effetti sinergici.

La cooperazione internazionale è un forte razionale nel lavoro di **Alessandra Bragonzi** [2,16,19], che studia la regolazione dell'alginato in *Ps. aeruginosa* e la ipermutabilità di di questa in un modello animale. I suoi dati mostrano che le mutazioni nel gene MucA debbono necessariamente correlare con la condizione mucoide in *Ps. aeruginosa*, che la regolazione dell'alginato ossigeno-dipendente avviene in vivo e che la ipermutabilità di *P. aeruginosa* è associata con un costo biologico, riducendo il potenziale della colonizzazione di nuovi ambienti e quindi la trasmissibilità dei ceppi. Su una base di cooperazione nazionale, **Giovanni Bertoni, Graziana Manno** e **Anna Silvia Neri** appaiono essere partners ideali per combinare tipizzazione, genetica molecolare, resistenza agli antibiotici e modelli animali con riguardo a *P. aeruginosa.* Un consorzio italiano è già stato avviato da **Silvia Campana** per gli isolati di *Staph. aureus* meticillino-resistente (MRSA). I modelli animali possono anche essere utili per il lavoro futuro di **Bianca Colonna** che sta studiando la virulenza di *Stenotrophomonas maltophilia* [20].

Stenotrophomonas maltophilia*, a multidrug resistant emergent pathogen associated to cystic fibrosis: a post genomic approach to identify new immunological and therapeutical targets*

Bianca Colonna
(seconda da destra) con il suo gruppo di ricerca

15. Colonna B[1], Sanguinetti M[2], Nicoletti M[3], Casalino M[4], Fiscarelli E[5]
[1]*Lab. di Microbiologia Molecolare Dip.Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Univ. "La Sapienza", Roma;* [2]*Istituto di Microbiologia Università Cattolica del Sacro Cuore;* [3]*Dipartimento di Scienze Biomediche, Sezione di Microbiologia, Università "G. D'Annunzio", Chieti;* [4]*Dip. di Biologia Università di Roma 3;* [5]*Lab. di Microbiologia Ospedale Pediatrico Bambin Gesù, Roma*
(Progetti FFC #7/2005 e 7/2007)

Stenotrophomonas maltophilia *is emerging as one of the most frequently isolated bacteria from cystic fibrosis (CF) patients. Infections caused by* S .maltophilia *are particularly difficult to treat because clinical isolates are resistant to many broad-spectrum antimicrobial agents. Despite its increasing role as a human pathogen, crucial information concerning the virulence factors of this microrganism is, as yet, incomplete. In the light of the innate resistance of this bacterium to the antibiotic therapies commonly used to manage CF, the reported increase in the isolation of* S. maltophilia *has become a cause of serious concern within the international CF community. It is therefore not surprising that, during recent years, scientists working on human infections related issues have shown a progressively stronger interest in studies aimed at understanding the biology of* S.maltophilia*, with special emphasis on the cellular an molecular mechanisms underlying its pathogenic potential.*
Our previous research efforts (FFC#7/2005), have led to interesting results on the expression of S.maltophilia proteins and on the molecular characterization of S.maltophilia strains isolated form sporadic and persistent CF infections. The aim of the present multicentre project (FFC#7/2007), joining academic and clinical laboratories, is to decipher the molecular and cellular mechanisms adopted by S.maltophila *to induce persistent infections in CF patients and elicit deterioration of the lung epithelium, in order to identify potential antimicrobial targets that may be useful in the search for better therapies. By means of a proteomic- and genomic-related approach we plan to investigate both, on which proteins are expressed upon entry of the bacterium into the host and on which among them display antigenic potential and on which genes are selectively present in those clinical strains responsible of persistent infections. Moreover, we will investigate on if/how* S.maltophilia *is able to form biofilms, on which genes are expressed in the biofilm state, and on the role of this microorganism in establishing inflammatory processes.*
The identification of the S.maltophilia *genes expressed in the host habitat, and therefore involved in the colonization process and in the induction of the host immune response, is a crucial step in developing new compounds suitable for a specific and efficient inhibition of bacterial pathogens, like* S.maltophilia*, which are resistant to many broad-spectrum, commonly used antimicrobial therapies.*

Stenotrophomonas maltophilia, un patogeno emergente ed antibiotico-resistente associato alla fibrosi cistica: un approccio post-genomico verso l'identificazione di nuovi bersagli immunologici e terapeutici

Stenotrophomonas maltophilia sta assumendo particolare rilievo tra i microrganismi patogeni emergenti associati alle infezioni polmonari in pazienti affetti da fibrosi cistica (FC). Le infezioni provocate da *S. maltophilia* sono difficili da trattare a causa della resistenza dei ceppi agli antibiotici ad ampio spettro. Nonostante *S. maltophilia* stia assumendo sempre maggior rilievo come patogeno, non si hanno ancora informazioni precise relative ai fattori di virulenza codificati da *S. maltophilia* ed alle proteine espresse dal microrganismo nell'ospite. Per questo, e considerando anche la sua innata resistenza agli antibiotici comunemente adottati nella terapia della FC, le infezioni da *S. maltophilia* sono diventate motivo di seria attenzione per l'intera comunità internazionale coinvolta nella cura della FC. Non sorprende, quindi che in anni recenti i ricercatori interessati alle problematiche connesse alle malattie infettive nell'uomo abbiano mostrato un interesse progressivamente crescente alla biologia di *S. maltophilia*, con particolare riguardo alla comprensione dei meccanismi cellulari e molecolari alla base della sua patogenicità.

Ricerche condotte nell'ambito del precedente progetto (FFC#7/2005) hanno permesso sia lo studio a livello globale dell'espressione delle proteine di *S. maltophilia* sia la caratterizzazione molecolare di ceppi isolati da infezioni croniche e sporadiche in pazienti FC con particolare riguardo alle capacità di adesione e di formazione di biofilm.
Lo scopo del progetto attuale (FFC#7/2007), che riunisce laboratori universitari ed ospedalieri, è quello di capire quali siano, a livello cellulare e molecolare, i meccanismi utilizzati da *S.. maltophilia* per indurre quelle infezioni croniche che determinano un grave deterioramento degli epiteli polmonari nei pazienti FC, in modo da poter identificare nuovi bersagli per una più efficace terapia antibatterica. Attraverso un approccio combinato delle più recenti tecniche di proteomica e di genomica ci proponiamo di capire quali siano le proteine espresse da *S. maltophilia* all'interno dell'ospite e quali tra esse abbiano potere antigenico e di identificare i geni selettivamente presenti nei ceppi clinici in grado di provocare infezioni croniche . Cercheremo, inoltre, di comprendere se e come *S. maltophilia* sia in grado di formare biofilm in vivo e quale sia il ruolo di questo microrganismo nell'induzione dei processi infiammatori.
L'identificazione dei geni di *S. maltophilia* espressi nell'ospite, e quindi verosimilmente coinvolti nei processi di colonizzazione dei tessuti e nell'induzione della risposta immunitaria, è una tappa fondamentale per lo sviluppo di nuovi composti in grado di contrastare efficacemente batteri patogeni batterici, quali appunto *S. maltophila*, resistenti alle terapie antibiotiche ad ampio spettro adottate comunemente.

Vittorio Venturi

1. Studies of the Quorum Sensing Systems of Pseudomonas aeruginosa *and* Burkholderia cepacia *complex 2.* Burkholderia cepacia *complex: closing down on the major virulence factors*

16. Venturi V.
Human Molecular Genetics, ICGEB, Trieste, Italia (Prog. FFC #9/2005 e Prog. FFC #9/2007)

The research program we were responsible regards some aspects of the Quorum Sensing (QS) regulatory system of two genera of microorganisms: Pseudomonas *and* Burkholderia. *Many of the bacteria belonging to these two genera are able to colonize, in a beneficial or in a pathogenic way, different plant and animal hosts, human included: their importance as opportunistic pathogen is growing up and particular attention to them is required from cystic fibrosis, immunocompromize and burns patients. Recently the number of cases of infections caused by Pseudomonas and Burkholderia is increased in number and also in variety of the species involved, for example even* B. glumae *and* B. gladioli, *that were knew to be just plant pathogen, were isolated from clinical samples. The QS is a communication and regulatory system that permits to a bacteria community the expression, in a coordinate manner, of a set of genes involved in the virulence, in the colonization ability and in biofilm construction. The importance of understanding the way of action of this regulatory system is evident considering that all these factors could make very difficult the eradication or the control of an infection. Normally a QS system required some signal molecules, that speaking of Gram-negative bacteria are homoserine lactons (AHL), a synthase for the signal molecules, generally belonging to the LuxI protein family, and a positive regulator of the synthase, classified as belonging to the LuxR group of protein. This system has the function to regulate the expression of a set of target genes and is in general under the influence of the community state (density and environmental condition) and other global regulators. The most relevant results were obtained from the projects regarding the QS of* B. glumae, P. aeruginosa, *and* P. putida. *In the first,* B. glumae, *we compared two strains: one environmental isolate, avirulent and carrying an inactive QS system, and one clinical isolate coming from a patient with granulomatosis disease. This last strain results very pathogen when used to infect the plant of rice (Oryza sativa) in a* Burkhlderia-Oryza *patogenicity model, and its QS genes were able, when introduced in the environmental avirulent strain, to ri-establish the pathogenicity ability. It was also recognize a secreted enzyme, a lipase, directly involved in the pathogenicity mechanism and directly controlled by the QS. This study demonstrates that* B. glumae *could undergo phenotypic conversion and confirm the attendance of the plant model for study the virulence. In* P.aeruginosa, *in collaboration with the group of dr. Livia Leoni from the Roma3 University, was carried out the characterization of the RsaL protein, the most important negative regulator of the QS system of Pseudomonas. This protein results able to recognize and ligate some particular region in the promoter of the synthase gene lasI , repressing its transcription. An in silico analysis proposed a model for the structure of this protein and localized some aminoacid residues fundamental for its function. The structure and the importance of the residues were validate by* in vitro *and* in vivo *experiments. Another protein involved in the regulation of QS in Pseudomonas was found in* P. putida *trough a screening performed for the isolation of mutants altered in their QS. The regulator responsible of this alteration results to codify for a Lon protease. Its role is the degradation of miss-folded or free (not joint to AHLs) PpuR , the positive regulator of the AHL synthase, in such a way to control, indirectly, the transcription of the AHLs synthase. Results of these studies have been published in international journals.*

1.Studi sul Quorum Sensing di Pseudomonas aeruginosa e Burkholderia cepacia complex. 2. Burkholderia cepacia complex: accerchiamento dei maggiori fattori di virulenza

Il progetto di ricerca condotto dal nostro laboratorio ha approfondito alcuni aspetti del sistema di regolazione chiamato Quorum Sensing (QS) in due generi batterici: *Pseudomonas* e *Burkholderia*. A questi generi appartengono batteri ambientali capaci di colonizzare, in maniera benevola o patogena, sia tessuti animali che vegetali, e la loro importanza come patogeni opportunisti nelle infezioni nosocomiali e per i pazienti affetti da fibrosi cistica, sta crescendo rapidamente sia per numero di casi sia per varietà delle specie: recentemente da campioni clinici sono state isolate specie come *B. glumae* e *B. gladioli* che erano note solo come patogeni vegetali, in particolare della pianta del riso (*Oryza sativa*). Il sistema QS da noi studiato è un meccanismo di regolazione genica che permette l'espressione coordinata da parte di una comunità batterica di un set di geni coinvolti tra l'altro nella virulenza, nella capacità di colonizzare e nella formazione del biofilm, tutti fattori che possono rendere l'eradicazione o il controllo di un'infezione batterica piu' difficoltosi. Un sistema QS modello comprende: le molecole segnale, normalmente per i batteri gram-negativi si tratta di lattoni omoserinici (AHL), una sintasi per le molecole segnale ed un regolatore positivo della sintasi stessa; a questo sistema base si aggiungono poi i geni

obbiettivo della regolazione ed ulteriori regolatori del sistema. I risultati piu' importanti ottenuti nel corso di questo studio riguardano il sistema QS di *B. glumae*, *P. aeruginosa* e di *P. putida*. Nel primo caso sono stati messi a confronto i geni QS di *B. glumae* di due ceppi: un isolato ambientale, avirulento e che si è dimostrato avere un sistema QS non attivo per via di una mutazione, ed un isolato clinico da paziente affetto da granulomatosi. L'isolato clinico si è dimostrato molto patogeno sul modello vegetale e i suoi geni QS trasferiti nel ceppo ambientale hanno ripristinato la virulenza anche in quest'ultimo decretando l'attivo coinvolgimento del sistema di regolazione QS nella patogenicita'. È stato anche individuato un enzima secreto, una lipasi, direttamente coinvolto nella virulenza e direttamente regolato dal QS. Questo studio ha dimostrato che *B. glumae* puo' andare incontro a conversioni fenotipiche ed ha evidenziato come il sistema vegetale possa essere valido per lo studio della patogenicità animale/vegetale del genere *Burkholderia*. In *P. aeruginosa*, in collaborazione con il laboratorio della dr. Livia Leoni dell'Università di Roma Tre, è stato caratterizzato il ruolo dalla proteina RsaL, il piu' importante repressore del sistema QS. Questa proteina si è dimostrata capace di legare il DNA del promotore della sintasi delle molecole segnale coinvolte nella comunicazione QS, reprimendone la trascrizione. Un'analisi *in silico* ha evidenziato la possibile struttura della proteina ed ha individuato gli aminoacidici chiave per la sua funzione repressiva che sono stati poi confermati da esperimenti *in vitro* ed *in vivo*. Un'altra proteina coinvolta nella regolazione del QS è stata individuata in *P. putida* attraverso uno screening atto ad individuare mutazioni che alterassero il sistema QS. Il gene mutato codifica per una Lon proteasi, il cui compito è degradare la proteina regolatrice PpuR, incaricata di promuovere la trascrizione della sintasi delle molecole segnale, quando questa non è nella giusta conformazione o quando non è legata alla molecola segnale stessa: un modo indiretto per controllare la sintesi delle molecole segnale. I risultati ottenuti sono stati resi accessibili alla comunità scientifica attraverso diverse pubblicazioni.

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

Giovanni Bertoni
(al centro) con i suoi collaboratori

17. Bertoni G[1], Milani A[1], Bragonzi A[2], Montanari S[2]
[1]*Dipartimento di Scienze Biomolecolari e Biotecnologie, Università degli Studi di Milano;* [2]*Istituto per il Trattamento Sperimentale della Fibrosi Cistica, Ospedale S. Raffaele, Milano*
(Progetto FFC #6/2006)

The development of alternative antibacterial therapies has to head for novel targets and/or to address novel principles of action. As a general rule, to act as antibacterial agents, the antibiotics interfere with essential bacterial functions. Currently available antibiotics target a very restricted number of the several functions that have been estimated to be essential for bacterial life. Therefore, since the large number of novel potential targets, we have, at least theoretically, broad leeway for the development of novel and improved antibiotics. However, most of these hypothetical essential functions have not yet been discovered and characterized. Certainly, this is a limiting step in the development of novel antibiotics. In a project granted by FFC started in 2004, we used an innovative genomic technology based on antisense RNA to identify a panel of essential function in Pseudomonas aeruginosa*, the most relevant cystic fibrosis-related pathogen. We selected this genome-wide approach since antisense RNA technology generates more versatile outputs for antibacterial fight. In fact, it combines the discovery of novel targets genes for small-molecules antibiotics to the possibility of direct development of non-conventional anti-microbials. With the aim of developing tools for the rational design of novel conventional drugs against* P. aeruginosa*, one of the targets that we identified through this method will be characterized at molecular level (structure and function) in the new project FFC#6-2007 (P. I: F. Bonomi; partner G. Bertoni). Instead, during the second year of this project FFC#6-2006, we will continue the study of the inhibition mediated by antisense RNA both on this target and others that we identify with the aim of developing non-conventional antibacterial based on oligomers which acts as RNA mimetics.*

Identificazione su tutto il genoma di geni target per disegnare antibiotici non convenzionali contro i patogeni correlati alla fibrosi cistica

Lo sviluppo di terapie antibatteriche alternative si deve misurare con la ricerca di nuovi bersagli e/o nuovi principi di azione. Per svolgere la loro funzione di agenti antibatterici, gli antibiotici interferiscono generalmente con funzioni che sono essenziali per la vita del batterio. Gli antibiotici attualmente disponibili hanno come bersaglio un numero ristretto delle varie funzioni, circa trecento, che sono state stimate essere essenziali per la sopravvivenza di un batterio.
Quindi, dato l'ampio numero di nuovi potenziali bersagli, esiste almeno sulla carta un buon margine d'azione per lo sviluppo di nuove generazioni di antibiotici. Tuttavia la stragande maggioranza di queste presunte funzioni essenziali deve essere ancora identificata e caratterizzata e questo è sicuramente un fattore limitante per lo sviluppo di nuovi antibiotici. Nell'ambito di un progetto finanziato dalla Fondazione iniziato nel 2004, abbiamo utilizzando una tecnologia genomica innovativa che si basa sull'interferenza dell'espressione genica mediata da RNA antisenso, con il proposito di identificare il maggior numero di funzioni essenziali di *Pseudomonas aeruginosa,* il batterio patogeno opportunista più rilevante per i malati di fibrosi cistica. Abbiamo scelto questo approccio per la sua versatilità. Infatti oltre a permettere l'identificazione di molti bersagli contro cui sviluppare nuovi antibiotici convenzionali, questa tecnologia permette anche di ottenere in modo immediato informazioni per lo sviluppo contro gli stessi target di molecole antibiotiche non convezionali ed innovative. Uno dei bersagli che abbiamo identificato con questo metodo sarà oggetto di uno studio strutturale e funzionale finalizzato al disegno razionale di nuove molecole antibiotiche convenzionali nel nuovo progetto FFC#6-2007 (Responsabile F. Bonomi; partner G. Bertoni). Invece nel secondo anno di questo progetto FFC#6-2006 proseguiremo nello studio sull'interferenza, mediata da RNA antisenso, dell'espressione di questo e altri bersagli che abbiamo identificato con lo scopo di sviluppare antibiotici non-convenzionali basati su mimetici di RNA interferenti.

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

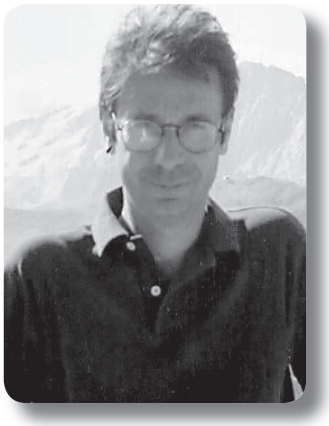
Alessandra Bragonzi
(seconda da sinistra) con le sue collaboratrici

18. Bragonzi A[1], Bertoni G[2], Scarselli M[3]
[1]*Istituto per il Trattamento Sperimentale della Fibrosi Cistica, Ospedale S. Raffaele, Milano;* [2]*Dipartimento di Scienze Biomolecolari e Biotecnologie, Università degli Studi di Milano;* [3]*Unità di Bioinformatica Centro Ricerche Chiron, Siena*
(Project FFC #8/2006)

D*espite the advent of the antibiotic era and the development of new vaccine,* P. aeruginosa *infections retains their preminent position as major cause of morbidity and mortality in CF patients. The considerable difficulty to resolve* P. aeruginosa *infections is the emergence of adaptive genotypic and phenotypic variants which result dramatically in therapy resistance. Hope for developing new therapies must be based on a though understanding of the natural history of the infection in the CF host. The progress of whole-genome sequencing and advances in bioinformatics has opened the way to large-scale screening of new targets for second-generation vaccines. This project used matched genomic approaches to identify new bacterial function with high immunogenic potential. It is extensively recognized for many human pathogens that the ideal protective antigens are those: i) particularly expressed during the specific infectious process, ii) present in a wide range of strains and iii) exposed on the cell surface membrane which makes the targets easily accessible by the immuno-antibacterials. Our previous studies on* P. aeruginosa *strains isolated from CF patients showed that* P. aeruginosa *adapts to the host/environmental conditions increasing chronic persistence and reducing the risk of bacteremia. According with these criteria, we screened a STM library of 6912 mutants in a model of chronic infection. Three screenings conducted so far lead the identification of 90 bacterial functions potentially involved in the chronic infection. In addition, the bioinformatic analysis on the PAO1 genome identified 196 proteins putatively localized on the outer membrane, 128 in the periplasmic space and 2112 associated to the inner membrane. Predicted outer membrane and periplasmic proteins represent the set theoretically more accessible to antibodies, so further analysis will be focused mainly on these two categories. These results will lead to generate a database containing good targets for antibacterials.*

Un approccio su tutto il genoma per l'identificazione di nuovi bersagli per farmaci immuno-antibatterici contro *Pseudomonas aeruginosa*

Nonostante lo sviluppo di nuove terapie antibiotiche ed immunitarie nessuna strategia di intervento è ad oggi risolutiva nell'eradicazione di *P. aeruginosa* in pazienti con FC. L'ostacolo maggiore è costituito dall'insorgenza di varianti fenotipiche e genotipiche che determinano resistenza anche multipla agli antibiotici e rendono inefficaci le terapie immunitarie. Ne consegue che, la speranza di sviluppare nuove terapie è legata alla definizione di processi adattativi coinvolti nello sviluppo di infezioni croniche e l'identificazione di nuovi bersagli batterici sensibili ai trattamenti. Recentemente il progresso scientifico fatto in campo della genomica e bioinformatica ha aperto la strada per uno screening genetico su larga scala, fornendo gli strumenti necessari per nuovi studi verso lo sviluppo di terapie più efficaci. Questo progetto utilizza una combinazione di nuovi approcci genomici, per screenare l'intero genoma di *P. aeruginosa* al fine di identificare nuove funzioni batteriche con un alto potenziale immunogenico. Funzioni batteriche facilmente accessibili ad una terapia immunitaria devono rispettare i seguenti requisiti: i) essere rilevanti durante il processo dell'infezione; ii) essere presenti in un vasto numero di ceppi; iii) essere esposte sulla membrana cellulare batterica. Nostri studi precedenti condotti su ceppi clinici di *P. aeruginosa* hanno permesso di definire che varianti adattative di *P. aeruginosa* generate durante la progressione della malattia FC aumentano la loro capacità di stabilire infezioni croniche diminuendo il potenziale di invasività. Per stabilire quali geni sono implicati in questo processo di adattamento stiamo analizzando una collezione di 6912 mutanti di *P.aeruginosa* in un modello murino di infezione cronica. Al momento l'analisi ha permesso di restringere a 90 mutanti quelli potenzialmente coinvolti nel processo di infezione. Inoltre, analisi bioinformatiche sul genoma di *P. aeruginosa* hanno identificato 196 proteine localizzate sulla membrana esterna del batterio, 128 nello spazio periplasmatico e 2112 associate alla membrana interna. Le proteine della membrana esterna e periplasmatiche rappresentano i bersagli accessibili agli anticorpi, quindi le successive analisi si concentreranno su queste. Questi risultati verranno utilizzati per generare un database di funzioni batteriche considerate buoni bersagli per antibatterici.



Paolo Landini

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

19. Landini P[1], Bernardi A[2], Seneci P[2]
[1]*Dip. Scienze Biomolecolari e Biotecnologie Università di Milano,* [2]*Dip. chimica Organica e Industriale Università di Milano (Prog. FFC #9/2006)*

In cystic fibrosis (CF) patients bacterial colonization of upper respiratory tracts can lead to fatal pneumonia. Such infections are caused by multispecies biofilms in which Pseudomonas aeruginosa *is the dominant species. Eradication of bacterial biofilms through conventional antimicrobial therapies is often ineffective, due to their lower sensitivity to antibiotics. Biofilm formation depends*

on the intracellular amounts of the cyclic-di-GMP (c-di-GMP) signal molecule, which can stimulate production of extracellular polysaccharides (EPS), which often act as determinants for cell-cell aggregation and biofilm formation. Due to the lack of c-di-GMP in upper eukaryotes, its wide conservation among bacteria, and its importance in biofilm formation, c-di-GMP metabolism appears to be a very interesting target for the control of biofilm development. An anti-biofilm compound could be an important tool in the therapy of lung infections in CF patients either alone, for prevention of bacterial colonization, or in combination with antibiotics. In the first part of our project, we have focussed on developing a screening system to identify inhibitors of diguanylate cyclase, i.e. the proteins that synthesize c-di-GMP, which are also called GGDEF proteins from the conserved amino acid sequence of their catalytic domain. We chose two model GGDEF proteins, namely the AdrA protein from Escherichia coli *and the WspR protein from* P. aeruginosa*, both positive effectors for the production of EPS and biofilm formation. We selected* E. coli *laboratory strains unable to produce EPS; expression of either AdrA or WspR in these strains restored EPS production and significantly stimulated biofilm formation. EPS production was readily detectable by plating the AdrA- (or WspR-) expressing strains on solid media supplemented with Congo Red dye (CR medium). We could demonstrate that AdrA-dependent red phenotype on CR medium depends on its diguanylate cyclase activity; indeed,* E. coli *strains expressing a mutated form of the AdrA protein unable to catalyze c-di-GMP biosynthesis are not bound by Congo Red and form white colonies on CR medium. Thus, the CR medium test can be considered a promising screening system for potential inhibitors of GGDEF protein and of biofilm formation.*

Inibizione della formazione di biofilm da parte di *Pseudomonas aeruginosa* tramite inibitori della molecola segnale GMP-diciclico (c-di-GMP).

I pazienti affetti da fibrosi cistica soffrono spesso di forme molto gravi di polmonite cronica, causate da *Pseudomonas aeruginosa* (associata ad altri microrganismi) che crescono in forma di biofilm, cioè di comunità in grado di aderire strettamente ai tessuti dell'ospite. Le particolari proprietà fisiologiche dei biofilm batterici li rendono tolleranti al trattamento con antibiotici; inoltre la produzione da parte dei biofilm di una matrice extracellulare polisaccaridica protegge le cellule microbiche dall'attacco delle difese immunitarie dell'ospite. La produzione di polisaccaridi extracellulari è stimolata da una molecola segnale detta GMP-di-ciclico (c-di-GMP). Mentre il c-di-GMP sembra essere molto conservato tra i batteri, è totalmente assente nelle cellule degli eucarioti superiori. Quindi, gli enzimi coinvolti nel metabolismo di questa molecola possono rappresentare un bersaglio importante per il controllo dello sviluppo dei biofilm batterici. Gli enzimi in grado di sintetizzare la molecola segnale c-di-GMP appartengono ad una famiglia di proteine dette proteine GGDEF (dalla sequenza degli amminoacidi che costituiscono il dominio funzionale della proteina). Lo scopo del nostro progetto è di mettere a punto dei semplici sistemi di screening per inibitori di proteine GGDEF. Noi abbiamo focalizzato la nostra ricerca su due proteine modello: la proteina AdrA di *Escherichia coli* e la proteina WspR di *P. aeruginosa*. Abbiamo espresso queste proteine in ceppi di *E. coli* incapaci di produrre polisaccaridi extracellulari. Sia l'espressione di AdrA che di WspR è in grado di conferire nuovamente la capacità di produrre polisaccaridi, che possono essere evidenziati su terreni di coltura addizionati con il colorante Rosso Congo (CR medium). I ceppi di *E. coli* che esprimono AdrA e WspR formano quindi colonie rosse su CR medium e producono più biofilm in saggi di adesione in laboratorio. Per AdrA, abbiamo potuto dimostrare che la colorazione rossa su CR medium è effettivamente dovuta alla sua attività di sintesi di c-di-GMP: infatti ceppi di *E. coli* che esprimono una forma di AdrA mutata nel suo sito catalitico non si colorano di rosso su CR medium. Il saggio di colorazione su CR medium con ceppi di *E. coli* che esprimono AdrA o WspR può quindi essere considerato come un valido sistema di screening per inibitori delle proteine GGDEF e della formazione del biofilm.

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

Annamaria Bevivino
(prima a sinistra) con le sue partners di ricerca

20. Bevivino A[1], Ascenzioni F[2], Bragonzi A[3]
[1]*ENEA C.R. Casaccia, Dip. Biotecnologie, Roma; Università La Sapienza,* [2]*Dip.to Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Roma;* [3]*Istituto per il Trattamento Sperimentale della Fibrosi Cistica, Osp. San Raffaele, Milano (Progetto FFC #7/2006)*

The B. cepacia *complex (Bcc) has been recognized as an important opportunistic pathogen among cystic fibrosis (CF) patients since the early 1980s. Infection by Bcc bacteria usually occurs in patients who are already colonized with* P. aeruginosa *which is the main cause of chronic lung infection in CF patients. Among the Bcc species,* B. cenocepacia *is especially problematic in CF patients.* B. cenocepacia *is also present in high numbers in natural habitats such as the rhizosphere of several crop plants, where it represents one of the predominant Bcc species. Thus, the environment could be act as a constant non patient reservoir for infectious* B. cenocepacia *pathogens. In a previous project supported by Italian Cystic Fibrosis Research Foundation, Verona, Italy (FFC #11-2004), we found that environmental* B. cenocepacia *strains, although to a lesser extent than clinical strains, possess phenotypic traits and genetic markers related to virulence and transmissibility, and are able to both invade CF epithelial cell of pulmonary origin and to establish a chronic infection in the murine lung, suggesting the pathogenic potential of environmental isolates. The aims of this project were to investigate i) the influence of* P. aeruginosa *on the pathogenicity of clinical and environmental* B. cenocepacia *strains, by testing their bacterial invasion into human epithelial cells and their capacity to cause a chronic lung infection in mice; (ii) the influence of the host on* Burkholderia cenocepacia *pathogenicity, by evaluating changes of environmental* B. cenocepacia *in virulence after serial passages in mice, by using an agar bead model of lung infection. Results obtained in the first year revealed that the presence of* B. cenocepacia *affected negatively the growth of* P. aeruginosa*, which showed a marked decrease in final cell numbers in mixed cultures compared to pure cultures. The co-infection assay in vitro*

and the in vivo experiments indicated that the level of epithelial cell invasion of B. cenocepacia *increased in the presence of* P. aeruginosa *as well as its capacity to cause a chronic lung infection after serial passages in mice. This finding suggests that* B. cenocepacia *is influenced by the presence of* P. aeruginosa *and become able to adapt to the "local environmental" conditions of the murine lung tissues.*

Influenza di *Pseudomonas aeruginosa* e dell'ospite CF sulla patogenicità di *Burkholderia cenocepacia*

Fin dai primi anni ottanta, i batteri appartenenti al *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) si sono rivelati tra i più importanti patogeni opportunisti nei pazienti affetti da fibrosi cistica (FC). L'infezione da Bcc di solito si verifica nei pazienti già colonizzati da *Pseudomonas aeruginosa,* il principale patogeno per i pazienti FC. Tra le nove specie incluse nel Bcc, *Burkholderia cenocepacia* rappresenta un notevole problema nei pazienti FC. Ceppi di *B. cenocepacia* sono stati anche isolati in diversi habitat naturali, quali la rizosfera di piante di interesse agronomico, dove *B. cenocepacia* rappresenta una delle specie predominanti. Attualmente è ampiamente riconosciuto che l'ambiente possa rappresentare una riserva di patogeni opportunisti. Nell'ambito di un progetto finanziato dalla Fondazione Italiana per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica (FFC #11/2004), abbiamo esplorato la patogenicità di ceppi ambientali e clinici appartenenti alla specie *B. cenocepacia*. I risultati ottenuti ci hanno portato a concludere che i ceppi ambientali, sebbene in misura minore rispetto ai ceppi clinici, posseggono tratti correlati alla virulenza e patogenicità, sono in grado di internalizzare le cellule FC di origine polmonare e di stabilire delle infezioni croniche nel tessuto polmonare murino. Il presente progetto si proponeva due obiettivi principali: (i) analizzare l'influenza di *P. aeruginosa* sulla capacità di ceppi ambientali e clinici di *B. cenocepacia* di invadere le cellule epiteliali e di colonizzare i tessuti polmonari murini; ii) analizzare l'influenza dell'ospite sulla patogenicità di *B. cenocepacia*, valutando i cambiamenti nella virulenza di un ceppo ambientale di *B. cenocepacia,* in seguito a successivi passaggi in un modello murino. I risultati ottenuti in questo primo anno di attività hanno dimostrato che la presenza di *B. cenocepacia* causa una riduzione della crescita di *P. aeruginosa*. I saggi di co-infezione *in vitro* e gli esperimenti di infezione *in vivo* ci hanno permesso di osservare un aumento della capacità di internalizzare le cellule epiteliali umane da parte di *B. cenocepacia*, in presenza di *P. aeruginosa,* e un aumento del grado di virulenza di un ceppo ambientale di *B. cenocepacia*, in seguito a successivi passaggi di infezione in un modello murino di infezione cronica. Questi risultati suggeriscono che *B. cenocepacia* risente della co-presenza di *P. aeruginosa* e si adatta al tessuto polmonare murino sviluppando un maggiore potenziale patogeno.

Giovanna Riccardi

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

21. Riccardi G[1], Buroni S[1], Valvano M[2]
[1]*Dip. Di Genetica e Microbiologia, Università di Pavia;* [2]*Dip. di Immunologia e Microbiologia, Università dell'Ontario occidentale, Canada (Progetto FFC #10/2006)*

RND efflux systems, able to extrude different compounds out of the cell, represent one of the mechanisms responsible for the drug resistance in clinical isolates of Gram-negative bacteria. Burkholderia cenocepacia*, a microorganism that causes serious infections in fibrosis cystic patients, belongs to this group of bacteria. The intrinsic drug resistance of this microorganism to different antibiotics is one of the most important causes that impairs the eradication of this disease.*

Our group has previously identified in B. cenocepacia *genome fourteen genes coding for transport proteins belonging to the RND family. It has been shown that some of these RND complexes are constitutively expressed in* B. cenocepacia *J2315, but it has not been shown how these genes contribute to the intrinsic drug resistance in this microorganism. From our analysis, by RT-PCR, it has been shown that these genes are not expressed in* B. cenocepacia *K56-2, a strain less resistant to antibiotics compared to J2315.*

A method to test the RND role in the resistance to antibiotics is based on the inactivation of the gene of interest by knock-out experiments and on the analysis of the drug resistance of the inactivated strain. Our first attempts to inactivate the only RND gene encountered some difficulties, probably for the presence of different homologous genes in B. cenocepacia genome.

Our future perspectives are the inactivation of the entire operon (periplasmic protein, outer membrane protein and RND) in B. cenocepacia *K56-2 and J2315. Subsequently, the minimal inibitory concentrations of different antimicrobial compounds for the inactivated strains will be evaluated: this will allow us to give a role to the inactivated genes in the resistance to one or more antibiotics. Moreover, uptake/efflux experiments will be performed to characterize the mutants and the wild type strains.*

Il ruolo dei trasportatori di efflusso nella resistenza antibiotica intrinseca di *Burkholderia cepacia*

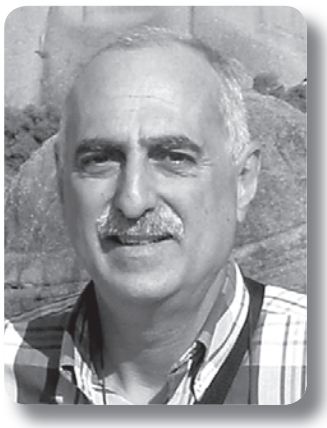
I sistemi di efflusso RND, in grado di espellere dalla cellula diversi composti, costituiscono uno dei meccanismi responsabili della farmaco-resistenza in isolati clinici di batteri Gram-negativi. Burkholderia cenocepacia, un microrganismo che causa gravi infezioni nei pazienti affetti da fibrosi cistica, appartiene a questo gruppo di batteri. La resistenza intrinseca di questo microrganismo a diversi antibiotici è una delle principali cause che ostacolano la cura di queste infezioni.

Il nostro gruppo ha precedentemente individuato nel genoma di B. cenocepacia quattordici geni codificanti le proteine di trasporto appartenenti alla famiglia RND. È stato dimostrato che alcuni di questi complessi RND sono costitutivamente espressi in B. cenocepacia J2315, ma non è ancora stato dimostrato come questi geni contribuiscano alla resistenza intrinseca in questo microrganismo. Dall'analisi da noi svolta, mediante RT-PCR, è risultato che questi geni non sono tuttavia espressi in B. cenocepacia K56-2, un ceppo meno resistente agli antibiotici rispetto a J2315.

Un metodo per testare il ruolo dei complessi RND nella resistenza agli antibiotici si basa sull'inattivazione del gene di interesse tramite esperimenti di knock-out e sull'analisi della resistenza ai farmaci del ceppo inattivato. I primi tentativi di inattivazione del solo gene RND da noi svolti, hanno incontrato qualche difficoltà, presumibilmente per la presenza di più geni omologhi nel genoma di B. cenocepacia.

I nostri obiettivi futuri comprendono l'inattivazione dell'intero operone (proteina periplasmatica, proteina della membrana esterna e RND) in B. cenocepacia K56-2 e J2315. Successivamente saranno valutate le minime concentrazioni

inibenti di diversi composti con attività antibatterica per i ceppi inattivati: ciò permetterà di attribuire un ruolo ai geni inattivati nella resistenza a uno o più antibiotici. Inoltre, saranno condotti esperimenti di uptake/efflusso dei farmaci per caratterizzare i mutanti e il ceppo wild-type.



Roberto Rizzo

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

22. Rizzo R[1], Molinaro A[2], Tonin EA[3]
[1]Dip. Biochimica, Biofisica e Chimica Macrocellulare, Università di Trieste; [2]Dip. di Chimica Organica e Biochimica, Università di Napoli; [3]Dip. Scienze Biomediche, Università di Trieste
(Progetto FFC# 11/2006)

Bacterial lipopolysaccharides (LPS) and exopolysaccharides (EPS) are important factors in bacterial infection settlement and maintenance. As a matter of fact, the interaction of LPS with specific receptors of the immune system cells and the role of EPS in biofilm formation are, among others, important biological functions involved in bacterial infections. In the frame of a project involving the investigation of lung infections produced by strains of the Burkholderia cepacia *complex, the study of the structural characteristics of LPS and EPS as well the macromolecular properties of EPS were investigated to elucidate their structure-function relationships. In addition, the gene clusters involved in the biosynthesis of polysaccharides were studied.*
Concerning LPS, the O-specific chain produced by B. multivorans was obtained from bacteria cultures and purified for the structural analysis. Chemical and spectroscopic methods were used to define the saccharidic composition and the glycosylation sites. These studies revealed the presence of two different forms of the O-chain, characterised by the following structural repeating units:
First polysaccharidic form:
[→2)-α-Man-(1→2)-α-Rha-(1→3)-α-Rha-(1]
Second polysaccharidic form:
[→2)-α-Man-(1→2)-α-(3-O-methyl)-Rha-(1→3)-α-Rha-(1]

The study of EPS was focussed on cepacian, which is the EPS produced by the majority of clinical isolates so far investigated. The use of viscometry, light scattering, atomic force microscopy and NMR indicated the ability of cepacian to form aggregates thus explaining its possible contribution to biofilm formation. In this context, the rather large rigidity of cepacian backbone influenced the mechanical properties of biofilms. In addition, experiments carried out on the deacetylated cepacian showed a decreased ability to produce aggregates thus leading to the hypothesis that acetyl groups might play an important role in biofilm formation.
Regarding the gene clusters investigation, a genomic library of a clinical isolate, able to produce two EPS's (cepacian and galactan), was constructed and screened with a labelled probe specific for the ugdH gene, coding for UDP-glucose dehydrogenase. Two independent clones, carrying the initial and the final part of the cluster, were identified. Their inserts were entirely sequenced, leading to the identification of probably 15 genes involved in EPS biosynthesis. Nevertheless, some essential genes are lacking, suggesting the existence of another cluster.

Studio delle relazioni struttura-funzione di esopolisaccaridi e lipopolisaccaridi prodotti da isolati clinici del complesso della *Burkholderia cepacia*.

Lipopolisaccaridi (LPS) ed esopolisaccardi (EPS) batterici sono importanti fattori che contribuiscono sia all'instaurarsi che al mantenimento di infezioni. Fra le attività biologiche di questi sistemi, le interazioni di LPS con cellule del sistema immunitario ed il coinvolgimento di EPS nella formazione di biofilm rappresentano due aspetti rilevanti. Nell'ambito di un progetto che riguarda le infezioni polmonari da parte del complesso della *Burkholderia cepacia*, sono state studiate sia le proprietà strutturali di LPS e EPS che le proprietà macromolecolari di EPS per chiarire le loro caratteristiche struttura-funzione. Inoltre, è stato intrapreso lo studio del cluster di geni responsabile della biosintesi di EPS.
Per quanto riguarda gli LPS, l'antigene-*O* prodotto da *B. multivorans* è stato ottenuto da colture batteriche e sottoposto ad analisi strutturale. Le procedure chimiche e spettroscopiche hanno fornito la composizione in monosaccaridi e il tipo di legami glicosidici ed hanno mostrato la presenza di due differenti forme dell'antigene-*O*, con le seguenti formule di struttura:
Prima forma:
[→2)-α-Man-(1→2)-α-Rha-(1→3)-α-Rha-(1]
Seconda forma:
[→2)-α-Man-(1→2)-α-(3-*O*-methyl)-Rha-(1→3)-α-Rha-(1]

Lo studio degli EPS è stato incentrato sul cepaciano, prodotto dalla maggior parte degli isolati clinici analizzati finora. Viscometria, diffusione della luce, microscopia a forza atomica ed NMR hanno stabilito che il cepaciano forma aggregati che possono spiegare il suo ruolo nella formazione di biofilm. Inoltre, la rigidità conformazionale della catena polimerica del cepaciano permette di modulare le proprietà meccaniche del biofilm. Esperimenti simili utilizzando cepaciano deacetilato hanno mostrato che questo ha una minor facilità di aggregazione, portando all'ipotesi di un ruolo specifico dell'acetilazione nella formazione di biofilm.
Per lo studio dei cluster genici responsabili della biosintesi del cepaciano, una banca genica, costruita da un isolato clinico produttore di due EPS (cepaciano e galattano), è stata analizzata con una sonda specifica per il gene *ugdH*, codificante per l'enzima UDP-glucosio deidrogenasi. Sono stati selezionati e sequenziati due cloni indipendenti, portatori della parte iniziale e di quella finale del cluster di interesse. Sono stati così identificati almeno 15 geni coinvolti nella biosintesi degli EPS. Tuttavia l'assenza d'alcuni geni, indispensabili per la biosintesi, rende probabile l'esistenza di un altro cluster genico da identificare.

Anna Silvia Neri

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

23. Neri AS[1], Rossolini GM[2]
[1]*Dip. Pediatria, Centro Fibrosi Cistica, Ospedale Meyer, Firenze;* [2]*Lab. Fisiologia Microbica e Biotecnologia, Dip. Biologia Molecolare, Policlinico "Santa Maria alle Scotte", Siena*
(Progetto FFC #14/2006)

P.aeruginosa *(Pa) is the most important pathogen in Cystic Fibrosis (CF). Antimicrobial therapy have contributed to increase life expectancy of CF patients but frequent and prolonged antibiotic courses are likely to be a major factor in selection of resistant strains. The objective of this project is to investigate the nature and evolution of antibiotic resistance mechanisms of* Pa *and to evaluate the correlation of these data with therapeutic regimens and clinical course.*
In a cross-sectional study of 36 isolates, obtained from a cohort of 30 CF patients, followed at the CF Center of Florence over a 10-year period, chronically colonized by Pa*, high resistance rates were observed for all major anti-pseudomonas agents except colistin.*
Investigation of metallo-β-lactamase (MBL) determinants, conferring resistance to virtually all β-lactams including carbapenems, revealed their presence in 5% of isolates.
Two distinct variants of MBL genes, bla_{VIM-1} *and* bla_{VIM-2}*, in 2 distinct patients, were identified and were detected in isolates from the same patient over a prolonged period.*
The 2 bla_{VIM} *genes were carried on different class 1 integrons associated with* aac*(6')*-Ib *gene conferring resistance to aminoglycosides.*
Given the importance of aminoglycosides in the treatment of Pa *infections, the presence of their resistance determinants such as the* aac*(6')*-Ib *and* ant*(2')*-Ia *genes (conferring resistance to gentamicin, tobramycin, amikacin) was investigated in a longitudinal collection of* Pa *strains, obtained from 6 different patients (64 isolates collected over a 4-9 years period). Results showed that 22% and 30% of the isolates harboured the* aac*(6')*-Ib *and* ant*(2')*-Ia *gene, respectively, and that 16% carried both genes.*
Bla_{VIM}, ant*(2')*-Ia *and* aac*(6')*-Ib *were detected in* Pa *from CF patients. The presence of this genes on mobile genetic element such integrons, should be a potential mechanism of transfer of those resistances within the microbial population of the CF patient, the cohort of patients attending the same CF center and the community.*
The information concerning the nature and longitudinal evolution of resistance mechanisms in chronically-infected patients will be correlated with data concerning clinical outcome and therapeutic regimens, now collected in a comprehensive database. This will improve resistance control strategies and the overall management of pulmonary infections in CF patients.

Studio longitudinale sulla selezione ed evoluzione dei meccanismi di resistenza di *Pseudomonas aeruginosa* in relazione al trattamento antibiotico in pazienti con fibrosi cistica

P.aeruginosa (*Pa*) è il più importante patogeno in FC. L'utilizzo della terapia antibiotica ha migliorato l'aspettativa di vita dei pazienti ma cicli antibiotici ripetuti e prolungati possono selezionare ceppi di *Pa* resistenti.
In questo progetto viene analizzata la natura e l'evoluzione dei meccanismi di resistenza di *Pa* e valutata la correlazione con i regimi terapeutici e l'andamento clinico.
In una selezione trasversale di 36 ceppi, ottenuti da una coorte di 30 pazienti, seguiti per un periodo di 10 anni presso il Centro FC di Firenze, cronicamente colonizzati da *Pa*, si è osservata un'alta resistenza verso tutti gli antibiotici attivi nei confronti di *Pa*, eccettuata la colistina.
La ricerca di determinanti, quali le metallo-β-lattamasi (MBL), che possono conferire resistenza a tutti gli antibiotici β-lattamici inclusi i carbapenemi, ha rivelato la loro presenza nel 5% degli isolati. Due distinte varianti di geni MBL, bla_{VIM-1} e bla_{VIM-2}, in 2 distinti pazienti, sono state identificate e ritrovate in isolati dello stesso paziente per un periodo prolungato. I 2 geni bla_{VIM} sono trasportati su distinti integroni di classe 1 (elementi genetici mobili) associati al gene *aac(6')-Ib*, che conferisce resistenza agli aminoglicosidi.
Data l'importanza degli aminoglicosidi nel trattamento delle infezioni da *Pa*, la presenza dei loro determinanti di resistenza, in particolare dei geni *aac(6')-Ib* e *ant(2')-Ia*, che conferiscono resistenza verso gentamicina, tobramicina e amikacina, è stata ricercata longitudinalmente in una collezione di ceppi isolati da 6 distinti pazienti (64 ceppi di *Pa* raccolti in 4-9 anni). I risultati mostrano che il 22% ed il 30% dei ceppi possiede il gene *aac(6')-Ib* e *ant(2')-Ia*, rispettivamente, e il 16% li possiede entrambi.
Bla_{VIM}, *ant(2')-Ia* e *aac(6')-Ib* sono stati identificati in ceppi di *Pa* di pazienti FC. La presenza di questi geni su elementi genetici mobili può rappresentare un potenziale meccanismo di trasferimento delle resistenze nella popolazione microbica del paziente FC, nei pazienti in cura presso lo stesso centro FC e nella comunità.
Le informazioni sulla natura e l'evoluzione longitudinale dei meccanismi di resistenza, in pazienti cronicamente colonizzati, verranno successivamente correlate con i dati sul decorso clinico e i protocolli terapeutici, attualmente raccolti in un database generale, così da migliorare le strategie di controllo delle resistenze e il trattamento globale delle infezioni polmonari in pazienti FC.

1. Genetic fingerprinting of Pseudomonas aeruginosa isolates from Italian cystic fibrosis patients: comparison with isolates from the environment and other clinical origins in Europe. 2. Multicenter study on molecular epidemiology of Pseudomonas aeruginosa, and prevalence of antimicrobial resistance phenotypes

Graziana Manno *(al centro) con i suoi collaboratori*

24. Manno G[1], Biassoni R[2], Debbia EA[3], Sangiuolo A[4]
[1]*Lab. Microbiologia, Dip. Pediatria, Istituto "G. Gaslini", Genova;* [2]*Lab. Medicina Molecolare, Istituto "G. Gaslini", Genova;* [3]*Sezione di Microbiologia, Dip. Sc. Chir. Spec. Anest. Trap. organo (DISCAT) "C.A. Romanzi", Università di Genova;* [4]*ARPAL (Agenzia Regionale Protezione Ambiente Ligure) Dipartimento Provinciale di Genova*
(Progetto FFC #8/2005 e Progetto FFC #12/2007)

The initial source of PA for the CF patients and the means of transmission have not been clearly established. Several surveillance study, showed a different epidemiological pattern, epidemic strains in UK and Australia, various number of patients carrying the same genotype in other CF Centres in Europe Despite the numerous epidemiology reports on the CF P. aeruginosa *(PA) infection in Europe, USA, Canada and Australia, only few studies were addressed to asses molecular epidemiology of PA in Italy. Furthermore, PA in the lung of CF patients grows in alginate biofilm matrix and is highly resistant to antibiotics, and an important link between the high antibiotic resistance rates and the presence of a high proportion of HMPs strains was documented, even if in a limited sets of CF pts. During 2004-2005-2006, the Genoa CF microbiology laboratory has organized a large collection of PA strains from patients followed in 8 geographically distinct Italian CF Centres (Verona, Milano, Genova, Gualdo Tadino, Roma, Ancona, Cerignola, and Soverato). Moreover, PA isolates from hospital, household and natural environmental sources have been also collected. The genetic fingerprint and the relatedness of the PA isolates grouped according their geographical, clinical or environmental origins will be determined by a poliphasic approach that combines three typing methods (BOX-PCR, PFGE and MLST). The first, BOX-PCR, will allow to analyze all the strains collected and to identify possible epidemic clones and shared genotypes isolated both from CF patients and from environmental sources. The genotype will be confirmed and compared by PFGE, At last, the major clonally groups will be analyzed by MLST: this technique allows the comparison of specific conserved gene sequences with the major European clones. In addition, the large number of molecular characterized PA strains available, will make possible to asses, by specific tests, the prevalence, the antimicrobial susceptibility and the clinical impact of PA isolates with hypermutable phenotypes (HMPs).*
The results of this project will allow to:

- *Trace the molecular epidemiology of PA in Italian CF patients and from other sources and to compare with the European epidemiology;*
- *Improve of the knowledge about the genetic relationships between isolates from CF patients, other infections and environmental strains;*
- *Contribute to the infection control measures in Italian CF care centres, in order to avoid or minimize cross-infection with possible epidemic/highly transmissible strains of PA;*
- *Set up of referral centre for PA typing, and a national repository of genetically characterised strains which will allow further microbiological and clinical researches on PA in CF patients in Italy.*

1. Tipizzazione genetica dei ceppi di *Pseudomonas aeruginosa* provenienti da pazienti italiani con fibrosi cistica: confronto con ceppi ambientali e di altra origine clinica in Europa.

2. Studio multicentrico sull'epidemiologia molecolare di *Pseudomonas aeruginosa* e sulla prevalenza dei fenotipi con resistenza antimicrobica

La fonte iniziale dell'infezione da *P.aeruginosa*, e le modalità di trasmissione nei pazienti con FC non sono state ancora del tutto chiarite. Alcuni cloni si sono diffusi mediante infezioni-crociate con altri pazienti colonizzati. In UK ed Australia sono stati descritti ceppi epidemici di *P.aeruginosa* con caratteristiche di multiresistenza agli antibiotici. Nel tentativo di limitare le infezioni-crociate ed identificare i ceppi epidemici od altamente trasmissibili, è importante eseguire degli studi molecolari di tipizzazione batterica, condotti sia a livello dei singoli centri FC che a livello nazionale ed internazionale. Nonosostante i numerosi studi pubblicati in USA, Canada, Australia e UK, in Italia, sino ad ora sono stati condotti pochi studi, comprendenti un numero limitato di ceppi e pazienti. *P.aeruginosa* è anche un microrganismo dotato d'elevata resistenza agli antibiotici, cresce nel polmone dei soggetti affetti da FC sotto forma di biofilm. Recentemente è stato dimostrato, anche se in un numero limitato di pazienti, che l'emergenza della resistenza è legata alla presenza di ceppi dotati di tassi di mutazione accelerati, chiamati ipermutabili, che diventano rapidamente insensibili agli antibiotici, ed hanno il sopravvento sulla popolazione sensibile, creando problemi per la terapia delle infezioni. Presso il laboratorio per la microbiologia della FC di Genova, durante il 2004/05/06, è stata allestita prospetticamente una vasta collezione di *P.aeruginosa* provenienti da pazienti seguiti in 8 centri italiani, (Verona, Milano, Genova, Gualdo Tadino, Roma Ancona, Cerignola, Soverato); inoltre sono stati raccolti ceppi provenienti da piscine, ambiente naturale, domestico ed ospedaliero. Il profilo molecolare di questa collezione di ceppi, sarà determinato con un approccio polifasico che prevede l'utilizzo di tre metodiche molecolari di tipizzazione. La prima, la BOX-PCR, permetterà di analizzare rapidamente tutti i ceppi ed identificare i possibili cloni diffusi isolati sia da FC che da altre origini. Questi profili clonali saranno confermati e comparati tra loro mediante complessa di riferimento, applicabili ad un limitato numero di ceppi (PFGE e MLST)). Infine, i gruppi clonali maggiori così identificati, saranno comparati in database "on line", contenente i profili dei cloni maggiori circolanti in Europa. Infine, la possibilità di studiare una vasta collezione di ceppi, permetterà, quantizzare il numero di ceppi ipermutabili e di determinare i profili di resistenza agli antibiotici nei pazienti italiani e di valutare metodiche per lo studio dell'attività dei farmaci antibatterici in germi cresciuti in biofilm.

I risultati del presente studio permetteranno di :

- Incrementare le conoscenze sui genotipi di *P. aeruginosa* con FC e comparare l'epidemiologia italiana a quell'europea;
- Contribuire al monitoraggio dell'efficacia delle misure di controllo delle infezioni da *P.aeruginosa* nei Centri FC italiani, con il fine di evitare o minimizzare le cross-infezioni causate da possibili ceppi epidemici o altamente trasmissibili;
- Ottenere dato, a livello nazionale, sulle resistenze emergenti agli antibiotici utilizzati in FC.
- Creare di un centro di riferimento per la tipizzazione molecolare di *P.aeruginosa* ed una ceppoteca nazionale, disponibile a supporto di ricerche in ambito microbiologico e clinico.

Silvia Campana

Community-acquired MRSA and hospital-acquired MRSA in cystic fibrosis patients: a multicenter study regarding antibiotic susceptibility, epidemiology, natural history and clinical relevance.

25. Campana S
Dip. Pediatria, Centro Fibrosi Cistica, Ospedale Meyer, Firenze (Progetti FFC #12/2006 e #11/2007)

During the first 2 years of this project 181 MRSA strains have been collected from 178 out of 2362 (7.5%) patients attending these CF centres. Participating centres supplied both biological material and clinical data. Clinical data showed as most of patients lost MRSA in a time of 12 months (51%), while 31% of patients had a colonization time of more than one year. FEV1 values showed no variations before the colonization and after the colonization, while BMI is significantly higher after MRSA colonization. It could be probably due to the median age of patients (15 years-old), and it could suggest a regular growth. Data about therapies showed that therè s no difference between therapies one year before or after MRSA colonization.
*The MRSA isolates have been identified with biochemical and molecular tests, and their susceptibility profile has been evaluated. Linezolid, vancomycin and teicoplanin were the most active tested drugs. All strains have been analyzed with Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) for epidemiological purposes, their SCCmec type has been characterized and the presence of gene encoding Panton-Valentine leukocidin have been tested. Among HA-MRSA isolates, our data showed an high prevalence of SCC*mec *I (53%) while the prevalence of SCC*mec *II (reported as the most represented among HA-MRSA) was only 1.2%. Furthermore an high prevalence was found for SCCmec IV (representing CA-MRSA strains) surprisingly all these strains were negative for PVL, suggesting a possible high transmissibility of CA-MRSA as confirmed by PFGE analysis. A major PFGE clone (32 isolates) was shared among six centers: 24 strains (77.4%) revealed a SCC*mec *type IV; the susceptibility profile of this clone is also consistent with CA-MRSA. These evidences show that CA-MRSA are now spreading also in CF population documenting the first epidemic of CA-MRSA in CF patients which are considered at risk for HA-MRSA acquisition due to frequent hospitalizations. These data show a peculiar picture of MRSA epidemiology in Italy and documented the first epidemic clone of CA-MRSA in CF patients.*

Lo *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA) acquisito in comunità o in ambiente ospedaliero dai pazienti con fibrosi cistica: studio multicentrico sulla sensibilità agli antibiotici, l'epidemiologia, la storia naturale e la rilevanza clinica.

Durante due anni di progetto multicentrico, sono stati raccolti e collezionati 181 isolati di MRSA provenienti da 178 dei 2362 (7.5%) pazienti afferenti ai Centri coinvolti, che hanno fornito sia dati clinici che materiale biologico.
Per quanto riguarda i dati clinici, è emerso come nel 51% dei casi la colonizzazione sostenuta da MRSA abbia avuto durata inferiore ai 12 mesi, mentre nel 31% dei pazienti una durata superiore a un anno. Per quanto riguarda il FEV1, non si riscontrano variazioni sostanziali tra i valori relativi all'anno precedente la colonizzazione e quelli dell'anno successivo, mentre il BMI mostra un incremento significativo nel corso dell'anno successivo alla colonizzazione, suggerendo una regolare crescita ponderale come auspicabile in base all'età media dei pazienti (15 anni). Infine, considerando le terapie somministrate, non si registrano differenze tra numero di cicli antibiotici un anno prima e un anno dopo la colonizzazione da MRSA.
Per quanto riguarda i 181 isolati clinici, dopo averli identificati con test biochimici e molecolari, ne è stata saggiata la resistenza ai farmaci scoprendo che la maggior efficacia è prodotta da linezolid, vancomicina e teicoplanina. Tutti i ceppi sono stati sottoposti ad indagine epidemiologica tramite Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), a caratterizzazione del determinante genetico noto come cassetta SCC*mec* ed è stata testata la presenza del gene codificante per la leucocidina di Panton-Valentine (PVL), tossina di comprovato interesse clinico. In base alla caratterizzazione della cassetta SCC*mec* è possibile dividere i ceppi di MRSA in Health-Associated (HA-MRSA) o Community- Associated (CA-MRSA); tra gli HA-MRSA collezionati la maggior parte presentava cassetta SCC*mec* di tipo I (53%), mentre gli appartenenti al tipo II solo 1.2% contrariamente a quanto riportato in letteratura. Inoltre, si è riscontrata un'alta prevalenza di CA- MRSA con cassetta SCC*mec* di tipo IV. Tutti gli isolati sono risultati negativi al test per la presenza di PVL. L'indagine epidemiologica ha permesso di individuare un clone di 32 isolati diffuso tra sei degli 8 centri partecipanti allo studio: 24 ceppi (77.4%) hanno SCC*mec* di tipo IV e profilo di antibiotico-resistenza che conferma l'ipotesi di un'origine comunitaria. Questi risultati mostrano, documentando per la prima volta un'epidemia di CA-MRSA in pazienti FC, come questi pazienti siano a rischio anche di epidemie di origine comunitaria e non solo associate alle frequenti ospedalizzazioni.

Renato Fani

A two-stage strategy for early and accurate detection of B. cepacia *in routine clinical analysis involving CF patients. Identification of* Burkholderia cepacia *strains by LAMP and SNuPE.*

26. Papaleo MC, Perrin E, Maida I, Russo E, Bronci E, Taraballa B, Fani R
Dip.to Biologia Animale e Genetica, Università di Firenze (Project FFC#13/2006)

Cystic Fibrosis (CF) patients are subject to colonization and infection by opportunistic pathogens, such as bacteria belonging to the Burkholderia cepacia *complex (Bcc).*
Due to their unusual taxonomic complexity, Bcc bacteria are difficult to identify. At present there is no single approach for the identification of all Bcc species; thus, there is not a rapid, specific and cost effective way to detect Bcc during routine clinical analysis.
For this reason, many research groups and clinical laboratories focused their attention on the

development of fast and efficient methods to discriminate these pathogens in order to apply a specific antibiotic therapy.
The aim of this project is the completion of a previously research, supported by FFC that included the application of the SNuPE (Single Nucleotide Primer extension) technique with the integration of the LAMP (Loop-mediated isothermal amplification), a new and fast amplification method. This new technique allows the identification of microrganisms using simple equipment which is available in all laboratories.
The experimental approach used in this work includes the following sequential steps:

1. *choice of* his *operon region as a molecular DNA target to perform the SNuPE and LAMP analisys;*
2. *sequencing of a 3,500 bp DNA fragment including the* hisB, marC, hisH, hisA, hisF *genes from 56 Bcc strains belonging to all the nine species from both clinical and environmental origin;*
3. *multialignment of the nucleotide sequences obtained. In this way several species-specific single nucleotide polimorphism (SNPs) were identified. Seven of them, localized in* hisB, marC *and* hisH*, have been chosen for the next step that was the:*
4. *design of a set of seven primers for the SNuPE technique;*
5. *obtaining of the SNuPE profiles from strains belonging to the different species;*
6. *design of a set of primers for LAMP;*
7. *amplification of a* his *operon DNA fragment from Bcc reference strains by LAMP.*

Data obtained revealed that the LAMP and SNuPE methods can represent valid alternatives to the difficult and expensive techniques in use up to now. They permit the identification of the Bcc strains; particularly the LAMP method represents a very important tool in clinical fields since it requires simple equipments that are available in all laboratories, where the rapid identification of pathogens is required.

Una strategia in due stadi per l'identificazione precoce e rapida di *Burkholderia cepacia* nell'analisi clinica routinaria che interessa i pazienti con fibrosi cistica.

I pazienti affetti da FC sono soggetti alla colonizzazione ed all'infezione da parte di patogeni opportunistii, tra i quali spiccano i batteri appartenenti al *Burkholderia cepacia* complex (Bcc). L'identificazione tempestiva ed inequivocabile dei batteri responsabili dell'infezione rappresenta una delle armi per attuare una terapia antibiotica mirata, una identificazione che può richiedere l'uso combinato di diverse metodologie e risultare pertanto lunga e difficoltosa. Numerosi centri di ricerca si sono quindi dedicati allo sviluppo di tecniche molecolari per l'identificazione rapida di tali microrganismi.
Il progetto ha avuto lo scopo di completare la ricerca già finanziata dalla FFC integrando la strategia sperimentale basata sulla metodica SNuPE (Single Nucleotide Primer Extension) con una nuova tecnologia detta LAMP, una variante della PCR grazie alla quale è possibile identificare un qualsiasi microrganismo con una limitata strumentazione reperibile in qualsiasi laboratorio di microbiologica.
La strategia sperimentale utilizzata ha previsto i seguenti passaggi sequenziali:

1) individuazione del "bersaglio" molecolare sul quale effettuare le analisi SNuPE e LAMP, bersaglio che è stato identificato nei geni della biosintesi dell'istidina;
2) determinazione della sequenza di un frammento di circa 3.500 nucleotidi comprendente i geni *hisB*, *marC*, *hisH*, *hisA*, *hisF* da 56 ceppi del Bcc appartenenti a tutte le specie note e di provenienza sia clinica che ambientale;
3) allineamento delle sequenze nucleotidiche ottenute; sono stati così individuati numerosi siti polimorfici specie-specifici, sette dei quali (localizzati all'interno dei geni *hisB*, *marC* ed *hisH*) sono stati scelti per la fase successiva, rappresentata dal
4) disegno di un set di sette primer da utilizzare nella tecnica SNuPE;
5) *ottenimento dei profili SNuPE da ceppi batterici appartenenti alle diverse specie;*
6) disegno di un set di primer utilizzati nella tecnica LAMP;
7) *amplificazione mediante LAMP di un segmento dell'operone* his *da ceppi di riferimento del Bcc*.

I dati ottenuti suggeriscono che entrambe le metodiche possono rappresentare delle valide alternative ai più complessi, costosi e laboriosi test utilizzati finora. Esse permettono l'identificazione inequivocabile di ceppi del Bcc; la tecnica LAMP assume una importanza rilevante nel campo clinico poiché necessita di strumentazione semplice, alla portata di tutti i laboratori che devono confrontarsi con il riconoscimento immediato dei microrganismi patogeni.

Dissecting a surface target candidate for the rational design of novel antibacterial drugs against Pseudomonas aeruginosa

Francesco Bonomi *(primo a sinistra) con il suo gruppo di ricerca*

27. Francesco Bonomi[1], Stefania Iametti[1], Giovanni Bertoni[2], Andrea Milani[2]
[1]*Dipartimento di Scienze Molecolari Agroalimentari, Università degli Studi di Milano;* [2]*Dipartimento di Scienze Biomolecolari e Biotecnologie, Università degli Studi di Milano*
(Progetto FFC#6/2007)

Pseudomonas aeruginosa *is the most common and relevant bacterial pathogen for cystic fibrosis patients. This project aims at the molecular characterization (structure and function) of a membrane protein from* Pseudomonas aeruginosa*, that may represent a novel target for specific antibiotics. This protein has been identified in a previous project (FFC#10/2004), and is currently being investigated from a genetic standpoint in an ongoing project (FFC#6/2006). The protein is localized on the surface of the bacterial cell, and its biological function remains unknown, although the available information suggests that it has distinct transmembrane and catalytic domains. We plan to isolate the biologically active domain by itself, thus simplifying the procedures involved in handling membrane proteins. Once the domain will be available in a purified form, we will carry out an analysis of its possible catalytic functions. The guidelines for this analysis will be provided by sequence comparison studies*

carried out through extensive use of bioinformatics. Information on the catalytic properties will be used to set up high-throughput and highly-automated screening procedures. These will allow a rapid and efficient screening of suitable libraries of chemicals, aimed at finding compounds that may inhibit the activity of the protein and therefore may represent candidates for new antibiotics. The screening procedure will greatly benefit from any improvement of our knowledge of the structural features of the target protein. Therefore, the project also includes activities devoted to assessing the structure of the catalytic domain of the protein. The biochemical and genetic information made available from previous projects and from the activities to be carried out within the present will be used to assess the role of this protein in the physiology and biochemistry of Pseudomonas aeruginosa*, and will pave the way to further developments that could be of clinical relevance.*

Caratterizzazione di un target di superficie in *Pseudomonas aeruginosa* per il disegno razionale di nuove molecole antibiotiche

Pseudomonas aeruginosa è il batterio patogeno opportunista più rilevante per i malati di fibrosi cistica. L'obbiettivo di questo progetto è di condurre uno studio molecolare sulla struttura e la funzione di una proteina di membrana del batterio che rappresenta un nuovo potenziale bersaglio per antibiotici. Questa proteina è stata identificata nel corso del progetto FFC#10/2004, ed è attualmente oggetto di indagine genetica nel progetto FFC#6/2006. Questa proteina si localizza sulla superficie della cellula batterica ed ha una funzione biochimica per il momento ignota, anche se l'informazione disponibile suggerisce la presenza di strutture distinte per l'ancoraggio alla membrana e l'attività catalitica. Per questo motivo ci prefiggiamo di purificare una porzione della proteina che riteniamo contenere la parte rilevante per la sua attività biochimica. Una volta che avremo ottenuto il dominio in forma pura, procederemo alla determinazione della sua attività enzimatica anche sulla base della sua somiglianza strutturale con proteine note e già caratterizzate. Dopo che avremo eseguito la caratterizzazione enzimatica procederemo alla messa a punto di un metodo rapido e su piccolo formato per potere eseguire in forma robotizzata un gran numero di saggi enzimatici. Questo metodo consentirà di eseguire uno screening rapido ed efficiente di collezioni di composti chimici, che dovrebbe portare all'identificazione di molecole con attività inibitoria e quindi candidate allo sviluppo di nuovi antibiotici. Per la ricerca e il disegno razionale di molecole inibitrici è molto utile anche la conoscenza strutturale del target. Per questo motivo ci prefiggiamo anche di condurre uno studio per determinare la struttura tridimensionale del dominio coinvolto nell'attività enzimatica della proteina. Infine, sulla base delle informazioni biochimiche che avremo ottenuto, condurremo esperimenti per verificare il ruolo della proteina target nella fisiologia del batterio, in modo da comprendere la sua funzione e sviluppare possibili interventi significativi dal punto di vista terapeutico.

Biochemical adaptation by Pseudomonas aeruginosa *to the airways of cystic fibrosis patients*

Antonio Molinaro *(al centro in seconda fila) con il suo gruppo di ricerca*

28. Molinaro A[1], Bernardini ML[2]
[1]*Dip. Chimica Organica e Biochimica, Università "Federico II", Napoli;* [2]*Dip. Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Università "La Sapienza", Roma (Progetto FFC #8/2007)*

Despite advances in the treatment of infectious diseases, pathogenic microorganisms are the single most important threat to health worldwide. Respiratory tract infection with eventual respiratory failure is the major cause of morbidity and mortality in cystic fibrosis (CF). The susceptibility of CF patients to bacterial pathogens is associated with deficient antimicrobial activity of airways, and airway surface dehydration with decreased transport rate and hyper secretion of mucus. Although CF patients show increased vulnerability to a variety of pathogen infections, it has become evident that the major clinical problem to face is Pseudomonas aeruginosa *(PA) infection in which the airways of nearly all patients become permanently colonized by PA, with the same bacterial lineage that can persist continuously in the lungs for years or even decades and cannot be eradicated by any known therapy. However, the onset of chronic infection is also transformative for the bacteria because an environmental PA strain must adjust to the alien conditions of the lung and live long-term within the host. Hope for developing new treatments rests in part on understanding how bacteria adapt to the airway and resist host defence and antibiotics. This latter issue is largely based on the comprehension of the chemical alterations of virulence factors such as the lipopolysaccharide (LPS) and peptidoglycan (PGN) that are recognised by the innate immunity system of the host in the early stages of infection and that provoke the inflammation response. The successful chronic infection of PA in lung cells depends on the efficient and simultaneous suppression of all the pathways leading to innate immune response activation able to elicit inflammatory response.*
Without any doubt the evasion of the signalling is an essential part of survival strategy of PA it is very clear that this "chemical silence" is attained by changes of PGN and LPS that impair the binding and detection. The aim of this project is the structural elucidation of lipopolysaccharides, peptidoglycan and its released fragments at early and chronic stages of infection followed by the determination of their immunological activity.

Adattamento biochimico di *Pseudomonas aeruginosa* nelle vie aeree di pazienti di fibrosi cistica

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 associata sono la causa maggiore di morte in fibrosi cistica (FC). La suscettibilità dei pazienti è associata ad una attività antimicrobi molto bassa nelle vie aeree ed ipersecrezione di muco. In queste condizioni attecchisce *Pseudomonas aeruginosa* (PA), batterio opportunista, problema clinico molto rilevante per i pazienti FC. Normalmente dopo l'infezione il batterio PA può persistere per decenni e non può essere completamente eradicato da alcuna

terapia. La cronicizzazione di PA nei polmoni comporta comunque delle trasformazioni per il batterio che deve adattarsi ad un nuovo habitat. I meccanismi biochimici di adattamento sono perlopiù ignoti e rappresentano dei potenziali obiettivi per nuove terapie antibiotiche. La comprensione a livello molecolare di tali meccanismi ha come passo basilare la delucidazione strutturale dei lipopolisaccaridi e del peptidoglicano e i suoi frammenti che sono fattori di virulenza acclarati ed immediatamente riconosciuti dal sistema immunitario dell'ospite. Il successo di una infezione cronica è strettamente dipendente dalla soppressione di tutti i meccanismi di rivelazione di tali molecole da parte del sistema immunitario dell'ospite. La soppressione di tale segnalazione è ovviamente dovuta ad un cambio della struttura di queste stesse molecole, essendo la loro biosintesi da parte del batterio ineluttabile. Lo scopo di questo progetto è la delucidazione strutturale dei lipopolisaccaridi, del peptidoglicano e dei frammenti rilasciati nel mezzo di coltura da parte del batterio PA durante le prime fasi dell'infezione e dopo la cronicizzazione della stessa. La comprensione di tali meccanismi biochimici di adattamento apre nuovi orizzonti su un eventuale terapia antibatterica nei malati di fibrosi cistica con cronicizzazione dell'infezione da parte di PA.

Iron uptake and quorum sensing in Pseudomonas aeruginosa *virulence*

Paolo Visca *(secondo da destra) con il suo gruppo di ricerca*

29. Visca P[1], Imperi F[1], Tiburzi F[1], Leoni L[2], Zennaro E[2], Rampioni G[2]

[1]*Lab. Microbiologia Clinica e Virologia, Dipartimento di Biologia, "Università Roma Tre", Roma;* [2]*Lab. Microbiologia Molecolare e Biotecnologia dei Microorganismi, Dip. Biologia, "Università Roma Tre", Roma. (Prog. FFC #10/2007)*

The ubiquitous Gram-negative bacterium Pseudomonas aeruginosa *is the main agent of lung function decline and mortality in Cystic Fibrosis (CF) patients. The peculiar relationship that* P. aeruginosa *engages with the CF lung environment is the result of a complex cross-talk between the human host and the bacterium. The abundance of regulatory genes in the* P. aeruginosa *genome is at the basis of the environmental versatility of this bacterium, which is mirrored by its ability to efficiently colonise the CF lung. The* P. aeruginosa *chronic infection requires the establishment of a microbial community which evolves into a biofilm. In this microbial community the response of each cell to the environmental stimuli originating from the CF lung is coordinated with that of the other cells. The group-behaviour of* P. aeruginosa *is primarily determined by the quorum sensing (QS) system that controls the expression of several virulence genes. The local availability of nutritional factors is another determinant of* P. aruginosa *lung infection. The CF lung is particularly poor in bio-available iron, and iron depletion is sensed by* P. aeruginosa *as a primary environmental signal that leads to the activation of virulence genes expression in the host.* P. aeruginosa *persists in the CF lung thanks to the expression of iron-uptake systems which are themselves regarded to as virulence factors.*
The ultimate objective of this project is the identification of novel targets for the development of a new generation of drugs that act against P. aeruginosa*. The rationale is that infection can be blocked or mitigated by suppressing the virulence of the whole bacterial community. As previously shown for other Gram-negative bacteria, the use of these novel drugs would give the host immune system a better chance of clearing the infection, and could circumvent the problem of the emergence of drug-resistant strains. To achieve this objective, our research group has started a research in which high-throughput and systematic approaches are applied to study the interplay between QS and iron uptake circuits in* P. aeruginosa*, and their contribution to virulence and adaptation to the CF lung environment.*
The first year of the research project will be aimed at identifying and characterizing key molecular factors involved in QS and iron uptake, for further testing as potential drug-targets.

Importanza del quorum sensing e dell'acquisizione di ferro nella virulenza di *Pseudomonas aeruginosa*

L'infezione cronica sostenuta da *Pseudomonas aeruginosa* è la principale causa di perdita della funzionalità polmonare nei malati di Fibrosi Cistica (FC). Il successo di *P. aeruginosa* nel colonizzare il polmone del malato FC è garantito dalla sua capacità di adattarsi a tale ambiente, una peculiarità conferita dalla sua ricchezza di sistemi di regolazione genica. Di particolare interesse è il quorum sensing (QS), un meccanismo di regolazione genica che controlla l'espressione dei più importanti fattori di virulenza prodotti dal batterio. In *P. aeruginosa* il QS regola anche la produzione di biofilm, ovvero controlla la formazione di aggregati di matrice polimerica in cui i batteri si trovano inglobati nel polmone del malato di FC. L'aggregazione in biofilm rende *P. aeruginosa* particolarmente resistente agli antibiotici e all'attacco da parte del sistema immunitario. Un altro fattore che condiziona la capacità infettante di *P. aeruginosa* è la disponibilità locale di nutrienti. Il polmone FC è un ambiente estremamente povero di ferro. Tuttavia, *P. aeruginosa* produce dei sistemi ad alta affinità per l'acquisizione di questo metallo essenziale che gli consentono di moltiplicarsi e formare biofilm nel polmone del malato FC. La carenza di ferro è il principale fattore ambientale che induce *P. aeruginosa* a produrre fattori di virulenza.
L'obiettivo generale di questo progetto è lo studio dei meccanismi molecolari coinvolti nell'adattamento di *P. aeruginosa* al polmone del malato FC, col fine ultimo di identificare nuovi bersagli molecolari per lo sviluppo di farmaci antibatterici mirati ad inibire, in modo specifico, la produzione di fattori di virulenza. Come già dimostrato per altri batteri Gram-negativi, tale strategia potrebbe favorire la risoluzione dell'infezione da parte del sistema immunitario del paziente, evitando l'emergenza di batteri farmaco-resistenti. Utilizzando approcci sperimentali di tipo sistematico e ad elevata processività (analisi del trascrittoma e del proteoma), il nostro gruppo di ricerca ha avviato uno studio volto a chiarire i meccanismi molecolari che governano il QS, la risposta alla carenza di ferro, ed il rapporto tra questi due sistemi regolativi.
Nel primo anno di ricerca è prevista l'identificazione e la caratterizzazione di fattori molecolari coinvolti nel QS e nella risposta alla carenza di ferro che potrebbero costituire potenziali bersagli terapeutici.

Main acquisitions on CF inflammation through the results of FFC projects already published

Giorgio Berton
Direttore del Dipartimento di Patologia, Università di Verona, membro del Comitato di Consulenza Scientifica della FFC

A prolonged inflammatory response in the airways leads to irreversibile lung damage and fibrosis in different lung diseases, including cystic fibrosis (CF). A key issue to understand the pathogenesis of lung pathology in CF is whether an excessive inflammatory response is the simple result of chronic infection - due to airway surface dehydration caused by defective cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) [1]– or is a primary event that may be, at least in part, dissociated from bacterial infections. Accumulating evidence suggests that pulmonary inflammation in CF may be abnormally amplified due to a direct effect of mutated CFTR on bronchial epithelial cells resulting in an increased cytokine secretion - especially the neutrophil chemokine IL-8 - (see [2,3] for recent reviews). A few papers published in the last couple of years by italian investigators supported by Fondazione Ricerca sulla Fibrosi Cistica (FFC) provided an important contribution to conclude that enhanced cytokine secretion by lung epithelial cells represents a defective CFTR-induced response. ***Dechecchi et al****. [4] showed that two different CF bronchial epithelial cells express higher amounts of IL-8 in response to* Pseudomonas aeruginosa *compared with normal CFTR expressing counterparts. Notably, the benzo(c)quinolizinium (MBP) compound MPB-07 was reported to correct CFTR-dependent Cl conductance in CF cells and suppress* P. aeruginosa*-induced IL-8 secretion in parallel. The authors demonstrated that the action of the drug depends on its specific capability to correct the CFTR function showing that MPB-07 does not decrease IL-8 expression in epithelial cells expressing normal CFTR. Coupled with the evidence that an inhibitor of CFTR induces a pro-inflammatory phenotype in primary non-CF, human bronchial epithelial cells [5], the finding by Dechecchi et al. that a corrector of mutated CFTR reduces the pro-infiammatory phenotype of CF bronchial cells represents perhaps the most strong evidence that CFTR regulates cytokine secretion by bronchial epithelial cells. A similar conclusion derives from studies by* ***Cigana et al****., another group founded by FFC, who reported that CF bronchial epithelial cells constitutively express higher levels of IL-8 and TNFalfa [6,7]. Importantly, these authors showed that azythromycin (AZM), a macrolide that has been reported to ameliorate lung function in CF patients, in part independently from its antibiotic effect [8], significantly reduces cytokine expression in CF cells, likely via inhibition of binding of transcription factors regulating pro-inflammatory gene transcription to DNA. The paradigm that alterations in CFTR expression and/or function result in an excessive inflammatory response triggered by epithelial cells also emerges from interesting data obtained with the financial support of FFC by* ***Raia et al****. exploiting nasal biopsy tissue explants [9]. These authors showed that explants from CF patients display a pro-inflammatory phenotype and identified a possible target to pharmacologically inhibit this excessive response showing that an inhibitor of p38 mitogen activated protein kinase (MAPK), a component of the signalling network regulating cytokine secretion, inhibits* P. aeruginosa *lipopolysaccharide-induced IL-8 secretion and neutrophil recruitment. The above summarized studies do not explain the mechanism(s) by which non functional CFTR regulate cytokine secretion. It must be noted that both Dechecchi et al. and Raia et al. used cells with the ΔF508 mutation in at least one allele. Because accumulation of unfolded protein, such as the ΔF508 CFTR, in the endoplasmic reticulum (ER) has been recognized to activate a so called "unfolded protein response" (UPR) leading to activation of the MAPK JNK and the NF-kB transcription factor, the most likely explanation of most of the above summarized findings is that activation of the UPR is the mechanism of enhanced cytokine expression by CF cells. However, it's intriguing that Cigana et al. detected a pro-inflammatory phenotype also in cell lines in which CFTR expression was silenced by antisense constructs and Dechecchi et al. did not detect any effect of the ΔF508 CFTR corrector on both NF-kB and AP-1 DNA binding activity. Identification of mechanisms by which the mutated CFTR up-regulates the production and release of pro-inflammatory molecules in bronchial epithelial cells represents a major challenge for future investigations.*

It is important to note that cytokine secreted into the lung not only orchestrate inflammatory cell recruitment and tissue damage, but, as demonstrated by innovative studies performed by ***Candiano et al****. [10,11], another group supported by FFC, they regulate protein secretion by epithelial cells and the consequent composition of airway surface liquid (ASL). Characterization of these secreted proteins will certainly help to better understand alterations in ASL fluidity and, possibly, to identify essential components regulating host defences against pathogens infecting the lung of CF patients. The road taken by the italian investigators who have been working on the link between inflammation and lung pathology in CF with the support of FFC, leads to identify alterations in function and/or expression of CFTR as responsible for an excessive inflammatory response to pathogen challenge. This conclusion encourages clinical studies to challenge the attractive possibility that prolonged treatment with anti-inflammatory drugs ameliorates lung function in CF.*

Principali acquisizioni in tema di infiammazione in FC attraverso i risultati dei progetti FFC pubblicati

Una prolungata risposta infiammatoria nelle vie aeree porta a danno polmonare irreversibile e fibrosi in diverse malattie, compresa la Fibrosi Cistica (FC). Un aspetto centrale per comprendere la patogenesi del danno polmonare nella FC è se una risposta infiammatoria eccessiva è il semplice risultato dell'infezione cronica – dovuta a difetti del "cystic fibrosis transmembrane regulator" (CFTR) [1]– o è un evento primario che può, almeno in parte, essere disgiunto dalle infezioni batteriche. Si stanno accumulando evidenze che suggeriscono che l'infiammazione polmonare nella FC può essere abnormemente aumentata in seguito ad un effetto diretto della CFTR mutata nelle cellule

epiteliali bronchiali, determinante un'aumentata secrezione di citochine – specialmente la chemochina inducente il reclutamento di neutrofili IL-8 - (vedi [2,3] per una recente revisione della letteratura). Alcuni lavori pubblicati negli ultimi anni da ricercatori finanziati dalla FFC hanno fornito un importante contributo per concludere che l'aumentata produzione di citochine da parte di cellule epiteliali bronchiali rappresenta una risposta indotta dalla CFTR mutata. **Dechecchi et al**. [4] hanno dimostrato che due differenti linee bronchiali FC esprimono più elevate livelli di IL-8 in risposta a *Pseudomonas aeruginosa* rispetto a linee esprimenti CFTR normale. Di rilievo è la loro osservazione che un composto derivato dal benzo(c)chinolizinio (MPB-07) corregge la conduttanza al Cl dipendente da CFTR e, al tempo stesso, sopprime la secrezione di IL-8 indotta da *P. aeruginosa*. Gli autori hanno inoltre dimostrato che l'azione del farmaco dipende sulla sua specifica capacità di correggere la funzione CFTR; infatti, MPB-07 non ha alcun effetto sull'espressione di IL-8 da parte di cellule epiteliali bronchiali esprimenti CFTR normale. Assieme all'evidenza che un inibitore della CFTR induce un fenotipo pro-infiammatorio in cellule epiteliali bronchiali normali, [5], l'osservazione di Dechecchi et al. che un correttore di CFTR mutata riduce il fenotipo pro-infiammatorio di cellule FC, rappresenta forse l'evidenza più solida che la CFTR regola la secrezione di citochine da parte di cellule epiteliali bronchiali. La stessa conclusione deriva da studi di **Cigana et al**., un altro gruppo finanziato dalla FFC, che hanno dimostrato che cellule epiteliali bronchiali FC esprimono costitutivamente più elevati livelli di IL-8 and TNFalfa [6,7]. È importante notare che gli autori hanno osservato che l'azitromicina (AZM), un macrolide che è stato riportato migliorare le funzioni polmonari nella FC in parte indipendentemente dal suo effetto antibiotico [8], riduce significativamente l'espressione di citochine in cellule FC, probabilmente attraverso la sua capacità di inibire il legame al DNA di fattori di trascrizione regolanti l'espressione di geni codificanti per molecole pro-infiammatorie. Il paradigma che alterazioni nell'espressione e/o funzione della CFTR comportino un'eccessiva risposta infiammatoria in cellule epiteliali bronchiali emerge anche da dati interessanti ottenuti con il supporto finanziario della FFC da **Raia et al**., i quali hanno utilizzato esplanti di polipi nasali normali e FC [9]. Questi autori hanno mostrato che esplanti ottenuti da pazienti FC hanno un fenotipo pro-infiammatorio, identificando inoltre un possible bersaglio farmacologico per inibire questo fenomeno attraverso l'evidenza che un inibitore della protein chinasi attivata da mitogeni (MAP chinasi) p38, vale a dire una delle componenti della trasduzione del segnale regolante la produzione di citochine, inibisce la secrezione di IL-8 e il reclutamento di neutrofili indotti dal lipopolisaccaride di *P. aeruginosa*.

Gli studi sopra riassunti non hanno identificato i meccanismi mediante i quali una CFTR non funzionante regola la secrezione di citochine. Va però notato che sia Dechecchi et al. che Raia et al. hanno usato cellule con una mutazione ΔF508 in almeno un allele. Poichè l'accumulo di proteine con struttura anomala, come la CFTR con la mutazione ΔF508, nel reticolo endoplasmico attiva la cosiddetta "unfolded protein response" (UPR), che porta all'attivazione della MAP chinasi JNK e del fattore di trascrizione NF-kB, la spiegazione più logica di queste osservazioni è che l'attivazione di UPR rappresenta il meccanismo dell'aumentata produzione di citochine da parte di cellule FC. Tuttavia è interessante che Cigana et al. hanno osservato un fenotipo pro-infiammatorio anche in linee cellulari in cui l'espressione di CFTR è stata silenziata mediante costrutti anti-senso e che Dechecchi et al. non hanno osservato alcun effetto del correttore della CFTR ΔF508 sull'attività di legame al DNA dei due fattori di trascrizione NF-kB e AP-1. L'identificazione dei meccanismi con i quali la CFTR mutata regola positivamente la produzione ed il rilascio di molecole pro-infiammatorie da parte di cellule epiteliali bronchiali, rappresenta una sfida fondamentale per ricerche future.

È importante notare che le citochine secrete nel polmone non sono solo implicate nell'orchestrare il reclutamento di cellule infiammatorie ed il danno tessutale, ma, come dimostrato da studi innovativi di **Candiano et al**. [10,11], un altro gruppo sostenuto dalla FFC, esse regolano la secrezione di proteine da parte delle cellule epiteliali e la conseguenete composizione del liquido superficiale delle vie aeree (ASL). La caratterizzazione di queste proteine secrete fornirà certamente utili elementi per comprendere meglio le alterazione della fluidità del ASL nella FC e forse di identificare componenti essenziali capaci di regolare le difese dell'ospite contro patogeni che infettono le vie aeree dei pazienti CF.

La strada intrapresa dai ricercatori italiani che hanno condotto ricerche sul rapporto tra infiammazione e patologia polmonare nella FC con il supporto della FFC, ha contribuito a dimostrare che alterazioni della funzione e/o espressione di CFTR sono responsabili di un'eccessiva risposta infiammatoria ad agenti patogeni. Questa conclusione incoraggia studi clinici per valutare l'interessante possibilità che un trattamento prolungato con farmaci anti-infiammatori migliori la funzione polmonare nella FC.

[1] *Boucher, R.C. (2007) Evidence for airway surface dehydration as the initiating event in CF airway disease. J Intern Med. 261, 5-16.*

[2] *Rao, S. and Grigg, J. (2006) New insights into pulmonary inflammation in cystic fibrosis. Arch Dis Child. 91, 786-788.*

[3] *Rubin, B.K. (2007) CFTR is a modulator of airway inflammation. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 292, L381-382.*

[4] *Dechecchi, M.C., Nicolis, E., Bezzerri, V., Vella, A., Colombatti, M., Assael, B.M., Mettey, Y., Borgatti, M., Mancini, I., Gambari, R., Becq, F. and Cabrini, G. (2007) MPB-07 reduces the inflammatory response to Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis bronchial cells. Am J Respir Cell Mol Biol. 36, 615-624.*

[5] *Perez, A., Issler, A.C., Cotton, C.U., Kelley, T.J., Verkman, A.S. and Davis, P.B. (2007) CFTR inhibition mimics the cystic fibrosis inflammatory profile. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 292, L383-395.*

[6] *Cigana, C., Nicolis, E., Pasetto, M., Assael, B.M. and Melotti, P. (2006) Anti-inflammatory effects of azithromycin in cystic fibrosis airway epithelial cells. Biochem Biophys Res Commun. 350, 977-982.*

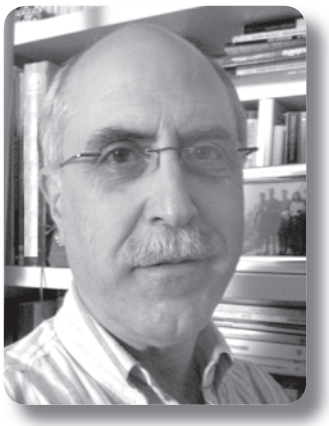
[7] *Cigana, C., Assael, B.M. and Melotti, P. (2007) Azithromycin selectively reduces tumor necrosis factor alpha levels in cystic fibrosis airway epithelial cells. Antimicrob Agents Chemother. 51, 975-981.*

[8] *Shinkai, M. and Rubin, B.K. (2005) Macrolides and airway inflammation in children. Paediatr Respir Rev. 6, 227-235.*

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

[10] *Candiano, G., Bruschi, M., Pedemonte, N., Caci, E., Liberatori, S., Bini, L., Pellegrini, C., Vigano, M., O'Connor, B.J., Lee, T.H., Galietta, L.J. and Zegarra-Moran, O. (2005) Gelsolin secretion in interleukin-4-treated bronchial epithelia and in asthmatic airways. Am J Respir Crit Care Med. 172, 1090-1096.*

[11] *Candiano, G., Bruschi, M., Pedemonte, N., Musante, L., Ravazzolo, R., Liberatori, S., Bini, L., Galietta, L.J. and Zegarra-Moran, O. (2007) Proteomic analysis of the airway surface liquid: modulation by proinflammatory cytokines. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 292, L185-198.*



Alfonso Pompella

Chronic Oxidative Lung Injury during Cystic Fibrosis – Protective Roles of Gamma-Glutamyltransferase and Ascorbic Acid

30. Pompella A
Sezione Patologia Generale e Clinica, Dip. Patologia Sperimentale, Biotecnologie Mediche, Infettivologia ed Epidemiologia, Università di Pisa (Progetto FFC #11/2005)

Infections that occur in cystic fibrosis (CF) induce the activation of inflammatory cells, which – in order to cope with aggression by pathogens – secrete in tissue large amounts of toxic compounds, first of all free radicals with strong prooxidant action. All cells of the body are endowed with antioxidant substances, which allow them to survive conditions of prolonged and excessive activation of inflammatory processes. Two such important antioxidant substances are glutathione (GSH) and vitamin C (ascorbic acid). Previous work in our laboratory has shown that glutathione (GSH) availability is linked to cellular supply of ascorbic acid, through the action of γ-glutamyltransferase (GGT). This enzyme activity is expressed in bronchial epithelia, and is also secreted in epithelial lining fluid. This Project has verified thus the possibility that a similar mechanism may favour the supply of ascorbic acid to bronchial cells. Using human BEAS-2B cells transfected with GGT cDNA, as well as WT cells exposed to ELF-like GGT concentrations, we observed that indeed much higher (5-10 fold) levels of ascorbic acid are accumulated in the presence of GSH and active GGT. The data suggest that administration of aerosolized GSH to CF patients may as well concur to sustain the vitamin C status of bronchial epithelia.

On the other hand the increased GGT levels observed in lining fluid of CF lungs might even originate from the inflammatory process itself. Molecular weight of GGT varies according to its glycosylation status, which is tissue-specific. We have compared by SDS-PAGE the GGT proteins derived from inflammatory excreates of CF and non-CF patients, from isolated human neutrophils and bronchial epithelial cells. The results show that GGT present in lung inflammatory excreates has the same molecular weight of that present in neutrophils, which are positive to GGT-specific cytochemical reaction on slides, and can release active GGT following activation (PMA, LPS, fMLP). Excess GGT activity may deplete GSH in epithelial lining fluid, as verified in a mouse CF model (homozygous Δ508 mice), thus weakening extracellular antioxidant defences. These studies, currently in progress, might introduce a marked change in perspective as far as the role actually played by GGT in lung inflammation.

Danno polmonare cronico di tipo ossidativo in corso di fibrosi cistica: ruoli protettivi della Gamma glutamiltransferasi e dell' Acido Ascorbico

I processi infettivi in corso di fibrosi cistica (FC) comportano l'attivazione delle cellule infiammatorie, che secernono abbondanti quantità di sostanze ad azione fortemente ossidante. Tutte le cellule dell'organismo sono provviste di sostanze antiossidanti, che gli permettono di difendersi in condizioni di prolungata ed eccessiva attivazione del processo infiammatorio. Due fra i principali antiossidanti sono il glutatione (GSH) e la Vitamina C. Studi precedenti del nostro laboratorio hanno dimostrato che la disponibilità di GSH può regolare l'assorbimento dell'acido ascorbico nelle cellule, mediante l'azione dell'enzima γ-glutamiltransferasi (GGT). La GGT è espressa negli epiteli bronchiali, che possono secernerla nel fluido polmonare. Il presente Progetto ha voluto verificare questo meccanismo nei processi infiammatori polmonari. Impiegando cellule bronchiali umane BEAS-2B transfettate con cDNA di GGT esposte a concentrazioni di GGT simili a quelle riscontrabili nel fluido polmonare, abbiamo osservato che livelli assai maggiori (5-10 volte) di acido ascorbico si accumulano nelle cellule in presenza di GSH e GGT attiva. Questi dati dunque in prima istanza confermano un ruolo sostanzialmente difensivo della GGT presente nel fluido polmonare, e suggeriscono che la somministrazione di GSH per aerosol ai pazienti FC – oltre ad avere effetti antiossidanti diretti – possa inoltre ricostruire le scorte epiteliali di vitamina C.
D'altra parte l'aumento dei livelli di GGT osservato nel fluido polmonare dei pazienti FC potrebbe avere anche origine dallo stesso processo infiammatorio. Il peso molecolare della GGT cambia in funzione del livello di glicosilazione, che è tessuto-specifico. Abbiamo confrontato mediante analisi SDS-PAGE la GGT ottenuta da escreati infiammatori CF e non-CF, da neutrofili umani isolati e da cellule bronchiali. I risultati mostrano che la GGT presente negli escreati polmonari infiammatori ha lo stesso peso molecolare di quella dei neutrofili, che risultano GGT-positivi se colorati su vetrino con l'apposita reazione istochimica, e possono rilasciare GGT dopo attivazione (PMA, LPS, fMLP). Un eccesso di attività GGT può depletare il GSH del fluido polmonare, come verificato in un modello murino di CF (topi Δ508 omozigoti), in questo modo indebolendo le difese antiossidanti extracellulari. Questi studi, tutt'ora incorso, potrebbero cambiare notevolmente l'interpretazione dei ruoli effettivamente svolti dalla GGT nelle infiammazioni polmonari.

Andrea Battistoni

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

31. Battistoni A
Dipartimento di Biologia, Università di Roma Tor Vergata (Progetto FFC #13/2005)

Several studies have shown that mutations in the CFTR gene cause abnormalities in the composition of the airway surface liquid of CF patients, including increased iron concentrations and low extracellular glutathione levels. High iron content in the airway secretions is apparently paralleled by general alterations in the transition metal homeostasis in the whole organism. Such defects may favour infections by opportunistic bacterial pathogens and promote inflammatory processes.
In this context, to design novel and more efficacious therapeutic treatments of chronic lung infections, our project has the following major goals: 1) to identify possible alterations in the

status of glutathione and different transition metals in cells lacking a functional CFTR gene; 2) to understand the influence of extracellular iron and glutathione on opportunistic bacterial pathogens, with specific focus on the effect of these factors on biofilm formation; 3) to evaluate the efficacy of strategies aimed at the control of iron and glutathione on the infectivity of such pathogens.

Our studies demonstrate a direct relationship between iron availability and B. cenocepacia *e* P. aeruginosa *ability to form aggregates and biofilms. Moreover, the capability of these microorganisms to invade a human bronchial cell line is affected by their aggregation state. The treatment with lactoferrin, a multifunctional iron−binding protein with significant antibacterial activity present in human secretions, inhibits the ability of these bacteria to invade cultured cells. We have also observed that* B. cenocepacia *enters with higher efficiency within CF cells than in cells containing a functional CFTR allele. Such invasion ability is strongly affected by treatments with lactoferrin.*

As far as the relationships between CFTR mutations and glutathione are concerned, we have observed, using different cell lines, that CF cells show alterations in their content of free thiols present on the cell surface. Such modification could have interesting implications concerning the cell response to the redox signals coming from the environment.

Finally, an analysis of the metal profile of a CF cell line suggests that CFTR mutations might lead to alterations in the intracellular concentration of different metals.

Contributo delle alterazioni nell'omeostasi dei metalli e del glutatione alle infezioni batteriche tipiche della Fibrosi Cistica ed esame del possibile ruolo protettivo della lattoferrina e di antiossidanti

Numerosi studi hanno dimostrato che le mutazioni nel gene CFTR causano cambiamenti nella composizione chimica dei liquidi che rivestono le superfici degli epiteli polmonari dei pazienti CF, che includono un significativo aumento della concentrazione del ferro e un abbassamento dei livelli del glutatione extracellulare. Inoltre, l'alta concentrazione di ferro nelle secrezioni polmonari sembra essere associata ad una più generale alterazione dell'omeostasi dei metalli di transizione nell'intero organismo. Questi difetti possono favorire le infezioni da batteri patogeni opportunistici e promuovere i processi infiammatori.

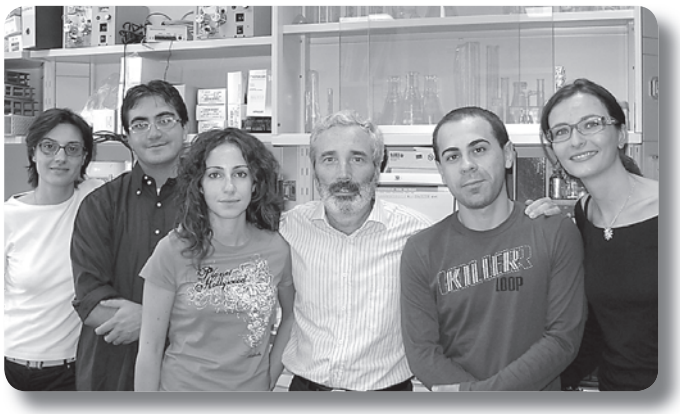
In questo contesto, allo scopo di identificare nuove strategie per il controllo delle infezioni polmonari croniche, il nostro progetto persegue diversi obiettivi: 1) identificare possibili alterazioni nello stato del glutatione e dei metalli di transizione in cellule mutate nel gene CFTR; 2) comprendere l'effetto del ferro e del glutatione extracellulare su patogeni opportunistici, con particolare interesse per il loro effetto sulla formazione di biofilm; 3) valutare l'effetto di strategie mirate al controllo del ferro e del glutatione sulla capacità infettiva di questi patogeni.

I nostri studi hanno dimostrato una relazione diretta tra la disponibilità di ferro e la capacità di *B. cenocepacia* e *P. aeruginosa* di formare aggregati e biofilm e che tali microrganismi hanno una diversa capacità di invadere cellule umane bronchiali che dipende dal loro stato di aggregazione. Il trattamento con lattoferrina, una proteina dotata di forte azione battericida presente nelle secrezioni umane, inibisce la capacità di tali microorganismi di penetrare all'interno delle cellule. Abbiamo anche osservato che *B. cenocepacia* entra con maggiore efficienza in cellule CF che in cellule contenenti un allele CFTR funzionale. Tale capacità di invasione è fortemente influenzata dal trattamento con lattoferrina.

Per quanto riguarda le relazioni tra mutazione CFTR e glutatione, abbiamo osservato, utilizzando diverse linee cellulari, che le cellule CF mostrano alterazioni nel contenuto di tioli presenti sulla superficie cellulare. Questa modifica potrebbe avere importanti implicazioni per quanto riguarda le risposte cellulare ai segnali redox provenienti dall'ambiente.

Infine, un'analisi del profilo metallico di una linea cellulare CF suggerisce la possibilità che le mutazioni CFTR possano causare cambiamenti nella concentrazione intracellulare di diversi metalli.

Lipoxin A_4 formation and signalling in cystic fibrosis



Mario Romano *(al centro) con il suo gruppo di ricerca*

32. Romano M[1], Iapichino L[2]
[1]*Laboratorio di Medicina Molecolare, Dipartimento di Scienze Biomediche, Università "G. D'Annunzio", Chieti-Pescara;* [2]*Centro Regionale di riferimento fibrosi cistica − 2° U.O. di Pediatria, Ospedale dei Bambini "G. Di Cristina", Palermo*
(Progetto FFC #12/2005)

An exuberant and sustained respiratory inflammatory reaction can be observed in CF patients , even in the absence of bacterial colonization. This may imply that cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) could modulate mechanisms of inflammation and its resolution. Consistently, broncho-alveolar lavage (BAL) fluids from CF patients display reduced levels of the anti-inflammatory, pro-resolution lipoxin (LX)A_4. Thus, CFTR may exert previously unappreciated functions in immune-regulation and inflammation resolution.

Main objectives of the present project are:

1. The definition of CFTR impact on functions of immune-inflammatory cells, which may be relevant for resolution of inflammation.

2. The identification of CF-associated alterations in inflammation resolution pathways.

In preliminary experiments, we have obtained the first evidence that CFTR is expressed in subsets of circulating mononuclear cells, suggesting a major role of this molecule in innate immune responses. We have also denoted that expression of toll-like receptor 2 (TLR2), a main modulator of the immune response, is upregulated in normal respiratory cells following CFTR knockdown by RNA interference (siRNA).

Likewise, we have observed that human platelets express CFTR and that platelets from CF patients generate reduced amounts of lipoxins. Furthermore, we have denoted that expression of ALX, a main anti-inflammatory receptor, is strongly reduced in human airway cells carrying the ΔF508 CFTR mutation.

We plan to examine CFTR expression and function in immune cells, focusing on pathways relevant for inflammation resolution. We will also determine whether CFTR regulates platelet functions related to the inflammatory response. Finally, we will investigate on transcriptional regulation of ALX.

We believe that the identification of novel functions of CFTR may

open new avenues for a better understanding of the inflammatory reaction in CF and, as a consequence, for innovative therapy of this disease.

La lipoxina A_4 nella fibrosi cistica: biosintesi e traduzione del segnale

I pazienti con fibrosi cistica (FC) presentano una reazione infiammatoria respiratoria esuberante e persistente anche in assenza di colonizzazione batterica. Questo può fare ipotizzare che il regolatore della conduttanza transmembrana (CFTR) sia in grado di modulare mecchanismi della risposta infiammatoria e della sua risoluzione. D'altro canto, liquidi di broncolavaggio di pazienti con FC presentano livelli ridotti del lipide anti-infiammatorio lipoxina A_4 (LXA_4). È quindi verosimile che CFTR esprima funzioni finora poco conosciute sulla regolazione della risposta immune e della risoluzione della reazione infiammatoria.
Principali obiettivi del presente progetto sono:
1. Definizione dell'impatto di CFTR su funzioni di cellule della risposta immune-infiammatoria, che possono regolare la risoluzione dell'infiammazione.
2. Identificazione di alterazioni di pathways della risoluzione della risposta infiammatoria nella FC.

In esperimenti preliminari abbiamo ottenuto la prima evidenza dell'espressione di CFTR in uno specifico sottogruppo di cellule mononucleate. Questo potrebbe indicare il coinvolgimento di CFTR nelle risposte dell'immunità innata. Abbiamo inoltre osservato che l'inibizione dell'espressione di CFTR, mediante interferenza con RNA, in cellule respiratorie umane normali determina un aumento dell'espressione del recettore toll-like 2 (TLR2), considerato un regolatore primario della risposta immune.
Inoltre, abbiamo osservato che le piastrine umane esprimono CFTR e che piastrine di pazienti con FC producono ridotte quantità di lipoxine. D'altro canto, abbiamo evidenziato che l'espressione del recettore anti-infiammatorio ALX è fortemente ridotta in cellule respiratorie con la mutazione ΔF508 CFTR.
Nell'ambito del presente progetto, esamineremo espressione e funzioni di CFTR in cellule immuni, focalizzando il nostro studio su pathways rilevanti per la risoluzione della risposta infiammatoria. Cercheremo inoltre di determinare se CFTR possa regolare funzioni piastriniche correlate alla risposta infiammatoria. Infine, studieremo la regolazione della trascrizione di ALX.
Crediamo che l'identificazione di nuove funzioni di CFTR possa aprire nuove prospettive per la comprensione della risposta infiammatoria nella FC e di conseguenza per la messa a punto di nuove terapie per questa malattia.

Maria Cristina Dechecchi

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

33. Dechecchi MC[1], Nicolis E[1], Tamanini A[1], Bezzerri V[1], Quiri F[1], Cabrini G[1]; Becq F[2], Norez C[2], Mettey Y[2]; Gambari R[3], Lampronti I[3], Borgatti M[3]
[1]Laboratorio di Patologia Molecolare e Lab. di Chimica Clinica ed Ematologia, Azienda Ospedaliera-Universitaria di Verona; [2]Institut de Physiologie et Biologie cellulaires, UMR CNRS, Universitè de Poitiers; [3]Dipartimento di Biochimica e Biologia Molecolare, Università di Ferrara.
(Progetto FFC #16/2006)

The aim of this project is to evaluate the possibility to reduce the pro-inflammatory status through the pharmacological modulation of the CFTR defect, by using correctors of F508del CFTR. The analysis of more than 2000 derivatives from small chemical molecules libraries identified 11 potential correctors, 20 activators and 6 highly potent CFTR inhibitors. The most interesting correctors identified so far are Miglustat and the benzo(c)quinolizinium (MPB) derivatives. MPB-07 down modulates the P.aeruginosa *dependent expression of the pro-inflammatory mediators IL-8 and ICAM-1 in CF bronchial cells [Dechecchi et al, Am. J. Resp. 2007].*
First year results**:** *miglustat significantly reduces the expression of IL-8 and ICAM-1 in IB3-1 and CuFi-1 cells, upon infection by PAO1. In parallel, correction of F508del CFTR function was observed after miglustat treatment in both IB3-1 and CuFi-1 cells. Miglustat has no major effects on overall binding activity of transcription factors NF-kB and AP-1, activated by PAO1 in IB3-1cells. The inflammatory response induced by TNF-alpha or IL-1beta is also significantly reduced in IB3-1 and CuFi-1 cells treated with miglustat. NB-DGJ, which is not a corrector of function of F508del CFTR, down modulates the induction of IL-8 and ICAM-1 in IB3-1 and CuFi-1 cells. In addition, both miglustat and NB-DGJ reduce the inflammatory response to PAO1 in non CF NuLi-1 cells.*
Conclusions and future directions: *miglustat and NB-DGJ, one inactive analogue, have an anti-inflammatory effect in bronchial cells independently of the correction of F508del CFTR, by interfering with the pro-inflammatory signaling downstream the receptors for pathogens and pro-inflammatory cytokines. Since miglustat is already approved for the treatment of Gaucher disease and other glycosphingolipidoses, it may be an interesting candidate for the inflammatory lung disease in CF. To understand the site of anti-inflammatory action of miglustat, the molecular mechanism(s) will be investigated. The effect of other correctors on the expression of pro-inflammatory mediators, induced by* P. aeruginosa *infection of respiratory epithelial cells, will be also tested in parallel.*

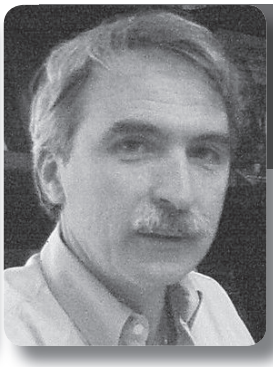
Effetto di correttori del difetto di CFTR sulla risposta infiammatoria a *P. aeruginosa* in cellule epiteliali respiratorie

Questo studio si basa sull'ipotesi che correggendo il difetto della proteina CFTR si possa ridurre la risposta infiammatoria, in particolare quella indotta da *P. aeruginosa.* L'analisi di piu' di 2000 composti chimici, condotta presso l'Istituto di Fisiologia e Biologia Cellulare dell'Università di Poitiers in Francia, ha evidenziato 11 correttori, 20 attivatori e 6 inibitori della proteina CFTR. I correttori piu' interessanti, individuati finora, sono i derivati dei composti benzochinolizinici (MPB) e il miglustat. Abbiamo dimostrato che MPB-07 riduce la risposta infiammatoria indotta da *P. aeruginosa* e ripristina la funzione di trasporto del cloro CFTR-dipendente in cellule bronchiali FC [Dechecchi et al, 2007]. Grazie al finanziamento di questa ricerca da parte della FFC abbiamo valutato gli effetti del miglustat sulla risposta infiammatoria a *P. aeruginosa* in cellule bronchiali. Durante il primo anno di finanziamento abbiamo dimostrato che il miglustat riduce in maniera significativa l'espressione dei mediatori dell'infiammazione IL-8 e ICAM-1 nelle cellule bronchiali FC IB3-1 e CuFi-1, in parallelo corregge la funzione di trasporto del cloro e non ha effetti sull'attivazione globale del fattore di trascrizione NF-*k*B. Nelle stesse cellule il miglustat riduce anche la risposta infiammatoria indotta da TNF-alfa o da IL-1beta. Il composto NB-DGJ, analogo al miglustat non è in grado di correggere il trasporto di cloro ma riduce la risposta infiammatoria non soltanto nelle cellule FC IB3-1 e CuFi-1 ma anche nelle cellule bronchiali non FC,

NuLi-1. In conclusione il miglustat e il suo analogo NB-DGJ hanno un effetto anti-infiammatorio nelle cellule bronchiali, indipendente dalla correzione della funzione di CFTR DF508. Il miglustat e NB-DGJ sembrano interferire con i segnali di attivazione della risposta infiammatoria, attraverso meccanismi molecolari che verranno indagati nella prosecuzione di questo studio. Poichèil miglustat è il principio attivo di un farmaco già utilizzato per il trattamento della sindrome di Gaucher e di altre glicosfingolipidosi, potrebbe essere un candidato interessante per la patologia polmonare in FC, grazie ai suoi effetti anti-infiammatori, evidenziati nel nostro studio. Durante il secondo anno di finanziamento di questo progetto sarà parallelamente valutato se altri correttori del difetto di CFTR siano in grado di ridurre la risposta infiammatoria a *P. aeruginosa* nelle cellule respiratorie FC.

Paola Melotti

Carlo Sorio



Pierluigi Mauri

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

34. Melotti P[1], Cigana G[1], Bergamini G[1], Quiri F[1], Assael BM[1]; Bragonzi A[2]; Mauri P[3], Benazzi L[3], Basilico F[3], Rosti E[3]; Sorio C[4], Vezzalini M[4], Mafficini A[4], Della Peruta M [4]
[1]Centro Fibrosi Cistica, Azienda Ospedaliera, Verona; [2]Ist. Terapia Sperimentale Fibrosi Cistica, Ist. Scientifici S. Raffaele, Milano; [3]Ist. Tecnologie Biomediche CNR, Segrate Milano; [4]Dip. Patologia, Patologia Generale, Università di Verona
(Progetto FFC #17/2006)

Azithromycin is a drug of common use for cystic fibrosis (CF) therapy. Most of its mechanisms of action are still unknown. Therefore particular interest is focusing on the identification of its targets relevant for therapy of CF. Such advances would allow to optimize the use of this drug. The results of this multicenter study are showing anti-inflammatory effects of AZM, which is able to inhibit two molecules (Glutathione S Transferases, GST-T1, GST-M1) active in the glutathione system, which is involved in regulation of the inflammatory status. In particular we have determined that the activity of these proteins is higher in CF cells than in non-CF and that AZM restores in CF cells the normal activities of both molecules. Such findings support the hypothesis of anti-inflammatory properties of AZM.
We are using different strains of a bacterium, which particularly colonizes many CF patients, Pseudomonas aeruginosa (Pa). Our experimental tools include cellular models (derived from airway epithelial cells from CF or non CF patients) as well as animal models (mice) whose airways are infected with Pa. In particular using an original and advanced method set up in the dr. Mauri's laboratory at CNR in Segrate, Milan, we are analysing the proteins released by bacteria and epithelial cells in conditions very similar to those present in the airways of CF patients. To this aims cells are exposed to pro-inflammatory molecules and bacteria are grown in the presence of low levels of oxygen. In these conditions we are investigating the effects of AZM on protein secretion by epithelial cells focusing in particular on those involved in the inflammatory process. We are evaluating also the effects of AZM on bacterial protein secretion with particular interest on factors causing airway damage. Better understanding of pathogenesis of CF and identification of mechanisms of action of AZM would be relevant for the eventual proposal of other molecules with similar and possibly higher effects than AZM for therapy of CF.

Ruoli non antibiotici dell'azitromicina: rilevanza per la terapia della fibrosi cistica.

L'azitromicina (AZM) è un farmaco sempre più utilizzato nella terapia della FC di cui sono ancora oscuri in gran parte i meccanismi di azione. Si considera di particolare interesse pertanto individuare i suoi bersagli rilevanti per la terapia della FC. Tali avanzamenti permetterebbero infatti l'ottimizzazione dell'uso di tale farmaco. Nell'ambito di questo progetto multicentrico sta proseguendo l'individuazione di effetti anti-infiammatori dell'AZM che è risultata in grado di inibire due molecole (glutatione S trasferasi, GST-T1 e GST-M1) attive nel sistema del glutatione, fattore rilevante nel modulare lo stato infiammatorio. In particolare, avendo riscontrato che in cellule CF l'attività delle due proteine in esame è maggiore rispetto a cellule non FC, si è determinato che relativamente a queste due molecole, l'AZM ripristina in cellule epiteliali FC le condizioni normali. Tali risultati consolidano la possibilità che il farmaco abbia effetti anti-infiammatori.
Si stanno utilizzando diversi ceppi di un batterio che colonizza in maniera caratteristica molti pazienti affetti da fibrosi cistica, Pseudomonas aeruginosa (Pa). I modelli sperimentali sono cellulari (derivati da epitelio delle vie aeree di pazienti affetti o non affetti da FC) ed animali (topi) le cui vie aeree vengono infettate da Pa. In particolare con un metodo di analisi proteomica originale e sofisticata messa a punto nel laboratorio del dr. Mauri presso il CNR a Segrate (MI) si analizzano le proteine rilasciate dai batteri e dalle cellule epiteliali in condizioni rese il più possibile analoghe a quelle presenti nelle vie aeree dei pazienti con fibrosi cistica. A tal fine le cellule sono esposte a molecole pro-infiammatorie o a fattori batterici rilasciati da Pa quando i batteri sono cresciuti con limitata disponibilità di ossigeno. In tali condizioni si stanno analizzando gli effetti dell'AZM sulla secrezione di proteine da parte delle cellule epiteliali considerando in particolare quelle coinvolte nella risposta infiammatoria. Si valuta l'effetto del farmaco anche sulla produzione di fattori batterici soffermandosi su quelli in grado di danneggiare le vie aeree.
Una miglior comprensione dei processi che stanno alla base delle manifestazioni della malattia e l'individuazione di meccanismi d'azione dell'AZM porrebbero le basi per l'eventuale proposta terapeutica di altre molecole con effetti simili e possibilmente superiori a quelli del farmaco in esame.

A gene-targeted anti-inflammatory approach based on the Transcription Factor "decoy" strategy

35. Bezzerri V[1], Borgatti M[2], Dechecchi MC[1], Lampronti I[2], Nicolis E[1], Mancini I[2], Tamanini A[1], Fabbri E[2], Quiri F[1], Bianchi N[2], Piccagli L[2], Salvatori F[2], Breveglieri G[2], Rizzotti P[1], Gambari R[2], Cabrini G[1]
[1] Laboratorio di Patologia Molecolare, Laboratorio Chimica Clinica ed Ematologia, Azienda Ospedaliera Universitaria di Verona; [2] Dipartimento di Biochimica e Biologia Molecolare-Sezione di Biologia Molecolare/Università di Ferrara
(Project # 13/2007)

Roberto Gambari *(primo a sinistra) con il suo gruppo di ricerca*

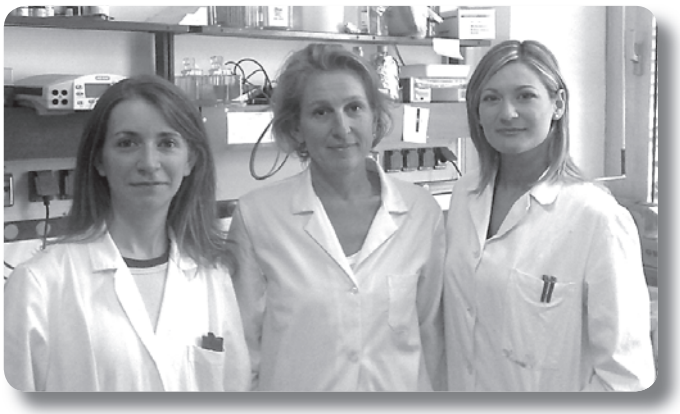
Giulio Cabrini *(primo a destra) con il suo gruppo di ricerca*

The major objective of the project is to explore novel approaches to reduce the expression of pro-inflammatory genes induced by P.aeruginosa *in the respiratory tract of cystic fibrosis (CF) patients, with special regards to those involved in leukocyte chemotaxis, by competitive inhibition of the transcription factors (TFs) activating their expression. In parallel, the project wishes to obtain complementary information on the mechanisms of regulation of expression of these pro-inflammatory genes, in order to identify alternative targets for novel anti-inflammatory approaches.*
Airway tract disease in CF patients is characterized by chronic infection with strikingly few pathogens, first of all P.aeruginosa*. The excessive neutrophil-dominated inflammation in CF lung is ineffective in eradicating the chronic infection and it is believed to be the major mechanism in progressive lung tissue damage. Therapeutic approaches to control the process of chemotaxis, which is initiated by bronchial epithelial cells and drives the migration of leukocytes within bronchial lumen, can result beneficial in reducing the progressive fibrosis of CF lungs.*
TF "decoy" molecules inhibiting interaction of NF-kB and other TFs with gene promoters will be tested in CF bronchial epithelial cells exposed to P.aeruginosa in vitro*. Their effect will be investigated both by screening the activation of fluorescent reporter genes under the control of different promoters and by measuring the expression of proinflammatory genes, both at transcript and protein levels. Medicinal plant extracts known to interfere with the TF/DNA interactions relevant to the expression of chemo/cytokines will be also tested.*
The final goal is to identify novel molecular tools and target TFs to control the adverse effects of inflammation in CF lungs.

Nuovi approcci sperimentali di terapia anti-infiammatoria per la patologia polmonare basati sulla strategia "decoy" dei fattori di trascrizione nucleare

Il principale obiettivo del progetto è di studiare nuovi approcci per ridurre l'espressione di geni pro-infiammatori indotti da *Pseudomonas aeruginosa* nelle vie respiratorie dei pazienti affetti da fibrosi cistica (FC), con particolare riguardo a quelli coinvolti nella chemiotassi leucocitaria, mediante inibizione competitiva dei fattori di trascrizione (FT) nucleare che attivano la loro espressione. In parallelo, il progetto intende ottenere informazioni complementari sui meccanismi di regolazione della espressione di questi geni pro-infiammatori, allo scopo di identificare nuovi bersagli per una terapia anti-infiammatoria mirata.
La abnorme risposta infiammatoria nei polmoni di pazienti FC, dominata dalla presenza di neutrofili polimorfonucleati, è inefficace nell'eradicare l'infezione batterica e si ritiene essere il principale meccanismo del danno polmonare progressivo. Approcci di cura per controllare il processo della chemiotassi, che è attivato da segnali pro-infiammatori originanti inizialmente dalle cellule epiteliali bronchiali e che guida la migrazione dei leucociti nel lume bronchiale, può risultare di beneficio nel ridurre la progressiva fibrosi dei polmoni FC.
Molecole che agiscano da esca ("decoy") per inibire il legame di FT nucleare con i promotori dei geni coinvolti nella risposta pro-infiammatoria verranno verificati in cellule epiteliali bronchiali esposte a *P.aeruginosa*. Estratti e principi attivi purificati da piante medicinali note per inibirel'interazione tra FT e promotori verranno studianti in parallelo.
Il traguardo finale del progetto è di contribuire a chiarire il ruolo di FT nella regolazione della espressione di geni pro-infiammatori ed identificare nuove molecole per ridurre gli effetti collaterali della infiammazion e cronica polmonare nei pazienti affetti.

Influence of CFTR mutations in bactericidal activity of human macrophages



Paola Del Porto *(al centro) con collaboratrici di ricerca*

36. Del Porto P[1], Ascenzioni F[1], Quattrucci S[2]
[1]*Dip. Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Università "La Sapienza", Roma;* [2]*Centro Regionale Fibrosi Cistica, Clinica Pediatrica, Policlinico Umberto I di Roma*
(Progetto FFC #14/2007)

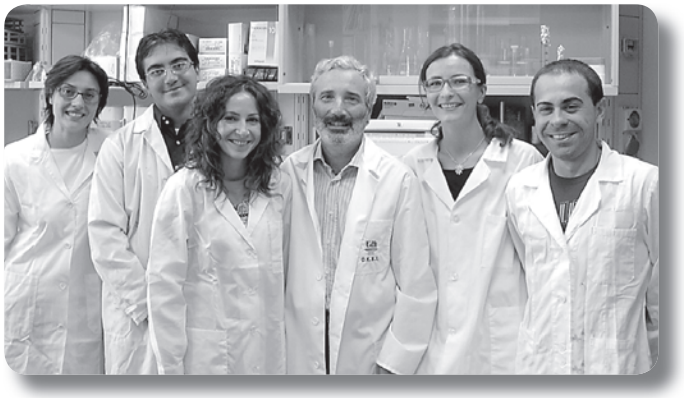
Patients with cystic fibrosis (CF) are highly susceptible to chronic infection by P. aeruginosa *and tissue damage subsequent to ongoing inflammation in the lung represents the main cause of morbidity and mortality. An excessive lung inflammatory response to bacteria is also a major feature of lung disease in CF and it is characterized by poor clearance of bacteria and by an increased number of phagocytes. Although the airway epithelial cells are the dominant cell type affected by CFTR dysfunction in the lung, the interaction of microbes with the pulmonary host immune system may be important in determining the extent of the inflammatory response to these pathogens and the lack of bacterial clearance that characterize the disease. Among cells of the innate immune system, alveolar macrophages, are the resident mononuclear phagocytes in the respiratory tract. Besides their scavenger function upon interaction with pathogens alveolar macrophages release a variety of cytokines that play a*

major role in the inflammatory response. Recently it has been reported that human and murine alveolar macrophages express CFTR and that alveolar macrophages from cftr-/- mice display a reduced capability to kill ingested P. aeruginosa*. Moreover, although controversial defective bacterial killing has been linked to altered CFTR-dependent acidification of lysosomes of alveolar macrophages. To verify whether defective macrophage function is relevant to cystic fibrosis we propose to determine the bactericidal activity of macrophages from CF patients. To this aim macrophages isolated from the sputum or* in vitro *differentiated from monocytes will be challenged with laboratory or clinical strains of* P.aeruginosa*. The fate of bacteria after infection will be evaluated by flow cytofluorimetric assays (live/dead staining) and by bacteriologic methods (CFU/ml). A laboratory strain of PAO1 engineered with EGFP-containing plasmid will be also used to trace the intracellular bacteria. Results from this study will allow to assess whether defective macrophage function is important in the pathophysiology of CF disease and to analyze the molecular mechanisms underlying it.*

Influenza delle mutazioni nel gene CFTR nella attività battericida dei macrofagi umani

I pazienti affetti da fibrosi cistica (FC) sono altamente suscettibili alle infezioni polmonari croniche da parte di batteri quali *P. aeruginosa* ed il danno tissutale che consegue alla risposta infiammatoria rappresenta una delle maggiori cause di malattia e mortalità. Un' eccessiva risposta infiammatoria alle infezioni batteriche, associata ad un aumento del numero di fagociti ed a una ridotta eliminazione dei batteri, caratterizza la patologia polmonare nei pazienti FC. Sebbene le cellule dell'epitelio polmonare siano quelle maggiormente colpite dalle alterazioni della proteina CFTR, difetti nell'interazione fra agenti infettivi e le cellule del sistema immune dell'ospite potrebbero essere implicati nella disregolazione della risposta infiammatoria e nella mancata eliminazione dei batteri che si osserva nei pazienti FC. È noto infatti che fra le cellule del sistema immune innato, i macrofagi alveolari sono deputati sia alla eliminazione dei microorganismi inalati che alla secrezione di citochine ad attività regolatoria della risposta infiammatoria. Recentemente, è stato dimostrato che i macrofagi alveolari umani e murini esprimono CFTR e che tali cellule nei topi cftr-/- non sono in grado di eliminare *P. aeruginosa* a causa di un difetto di acidificazione dei fagolisosomi. Infatti, sebbene i dati siano contrastanti, l'attività di CFTR è stata direttamente implicata nei meccanismi di acidificazione dei lisosomi. Sulla base di tale premessa, ci proponiamo di verificare se i macrofagi dei pazienti FC presentano alterazioni dell'attività battericida. A tale fine, macrofagi differenziati *in vitro* da monociti e macrofagi alveolari isolati dallo sputo di pazienti FC saranno infettati *in vitro* con ceppi di laboratorio e ceppi clinici di *P. aeruginosa*. La capacità delle cellule di eliminare il batterio sarà valutata attraverso saggi citofluorimetrici (live/dead staining) e di microbiologia classica (CFU/ml). Tra i vari ceppi di *P. aeruginosa* in studio ci proponiamo di includere anche un ceppo di laboratorio esprimente EGFP che ci permetterà di determinare la localizzazione intracellulare del batterio. I risultati di questo studio permetteranno di chiarire se difetti della funzione macrofagica contribuiscono alla patofisiologia FC e di analizzare i meccanismi molecolari responsabili di tali difetti.

Mechanisms of inflammation resolution in cystic fibrosis



Mario Romano *(al centro) con il suo gruppo di ricerca*

37. Romano M[1], Battistini L[2], Furnari ML[3]
[1]*Laboratorio di Medicina Molecolare, Dipartimento di Scienze Biomediche, Università "G. D'Annunzio", Chieti-Pescara;*
[2]*Unità di Neuroimmunologia e Citofluorimetria, Dipartimento di Neuroscienze Sperimentali, Centro Europeo di Ricerca sul Cervello, Fondazione Santa Lucia, Roma;*[3]*Centro Regionale di riferimento fibrosi cistica – 2° U.O. di Pediatria, Ospedale dei Bambini "G. Di Cristina", Palermo (Progetto FFC #15/2007)*

Lung inflammation represents a primary cause of mortality and morbidity in patients with cystic fibrosis (CF). Metabolites and receptors of the arachidonic acid cascade play a key role in the onset and resolution of the inflammatory response. We have investigated whether CF is characterized by alterations in expression/function of enzymes and/or receptors of the arachidonic acid cascade and whether these alterations may be related with the ΔF508 CFTR mutation. In particular, we have examined the anti-inflammatory lipoxygenase product lipoxin A_4 and its receptor FPRL1/ALX. We have also investigated on the relationships between CFTR gene, arachidonic acid metabolism and receptors of the Toll-like (TLR) family, these last being key regulators of infections of the respiratory tract.

In experiments with normal or ΔF508 CFTR-mutated human respiratory epithelial cells, we have evaluated:

1. *Expression and activity of enzymes of the arachidonic acid cascade such as 5-, 12-, 15- lipoxygenase (LO) and leukotriene A_4 hydrolase.*
2. *Expression of FPRL1/ALX and of TLR2, TLR4 and TLR5.*

We have observed that in comparison with normal cells, the ΔF508 CFTR-mutated cells displayed increased expression and activity of the pro-inflammatory enzyme 5-LO, and also of 12-LO. In contrast, they expressed lower levels of FPRL1/ALX. Furthermore, the ΔF508 CFTR-mutated cells showed increased expression of TLR2, TLR4. TLR5 compared to normal cells.
To establish potential direct interactions between these changes and CFTR expression, we have silenced CFTR in normal respiratory epithelial cells using RNA interference. We have consistently denoted an increase in TLR2 expression in silenced cells.
We have also examined circulating cells involved in the immune-inflammatory reaction, such as polymorphonuclear neutrophils (PMNs), monocytes and platelets isolated from 6 normal individuals, 8 homozygous and 10 heterozygous patients for the ΔF508 CFTR mutation and 7 patients with the Kartagener syndrome.
PMNs and monocytes from CF patients had increased 5-LO activity as compared to normal controls. Moreover, CF platelets displayed reduced capability to generate lipoxins, regardless of a slightly increased expression of 12-LO, the platelet lipoxin synthase enzyme.
Collectively, these results support the concept that alterations in CFTR functions may promote a reduction in the endogenous anti-inflammatory potential and the expression of receptors involved in bacterial damage of the respiratory epithelium.

Meccanismi di risoluzione dell'infiammazione in fibrosi cistica

L'infiammazione polmonare rappresenta una causa primaria di mortalità e morbilità in pazienti affetti da fibrosi cistica (FC).

Metaboliti e recettori della cascata dell'acido arachidonico rivestono un ruolo chiave nell'insorgenza e nella risoluzione della risposta infiammatoria. Abbiamo quindi cercato di determinare se nella FC si verifichino alterazioni di espressione e/o funzione di enzimi e/o recettori della cascata dell'acido arachidonico e in quale relazione esse siano con la mutazione ΔF508 CFTR. Abbiamo focalizzato la nostra attenzione sul lipide anti-infiammatorio lipoxina A_4, generato dal metabolismo lipossigenasico dell'acido arachidonico, e sul suo recettore ALX. Abbiamo inoltre esaminato le relazioni tra gene CFTR, metabolismo dell'acido arachidonico e recettori della famiglia Toll-like (TLR), i quali svolgono un ruolo centrale nelle infezioni delle vie respiratorie.

In esperimenti condotti con cellule dell'epitelio respiratorio umano, normali o con la mutazione ΔF508 CFTR, abbiamo valutato:

1. Espressione ed attività di enzimi della cascata dell'acido arachidonico, quali 5-, 12-, 15-lipossigenasi (LO) e leukotriene A_4 idrolasi.
2. Espressione di FPRL1/ALX e dei TLR2, TLR4 e TLR5.

Abbiamo osservato che le cellule con la mutazione ΔF508 CFTR presentano elevati livelli e attività dell'enzima pro-infiammatorio 5-LO, oltre che di 12-LO, e livelli molto bassi del recettore anti-infiammatorio ALX. Le cellule FC presentano inoltre una elevata espressione di TLR2, TLR4 e TLR5 se paragonate a cellule normali.

Al fine di stabilire eventuali relazioni dirette tra le anomalie sopraindicate e l'espressione del gene CFTR, abbiamo silenziato CFTR nelle cellule epiteliali normali, mediante interferenza con RNA. Nelle cellule silenziate abbiamo osservato un consistente incremento dei livelli di espressione di TLR2.

Abbiamo inoltre esaminato cellule circolanti che parteticipano attivamente alla risposta immuno-infiammatoria quali polimorfonucleati neutrofili (PMNs), monociti e piastrine isolati da 6 soggetti normali, 8 pazienti omozigoti e 10 eterozigoti per la mutazione ΔF508 CFTR e 7 pazienti con sindrome di Kartagener.

I risulati ottenuti mostrano che i PMNs e i monociti dei pazienti con FC presentano una più elevata attività 5-LO rispetto a quella delle cellule isolate da soggeti normali. Inoltre, le piastrine dei pazienti con FC mostrano una ridotta capacità di generare lipoxine rispetto a quelle dei soggetti normali, nonostante il livelli di espressione della 12-LO, l'enzima piastrinico che possiede attività lipoxino-sintasica, tendono ad essere più elevati nei pazienti.

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

5. FISIOPATOLOGIA DELLA PROTEINA CFTR E TERAPIE DEL DIFETTO DI BASE

Physiopathology of CFTR protein and therapies of the basic defect

Main acquisitions on CFTR physiopathology and new therapy through results of FFC projects already published: a critical evaluation

Antonio Cao
Direttore Istituto CNR di Neurogenetica e Neurofarmacologia, Cagliari; Presidente Comitato Scientifico della Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica

The Scientific Committee of the Cystic Fibrous Foundation assigned me the mission to evaluate critically the projects on pathophysiology as well as on therapeutic efforts aimed to correct its basic molecular lesion, funded by the CF Foundation in the last few years.

I read all the projects, the relative published papers and the last grant applications belonging to this CF area of research and tried to make some critical considerations. This is certainly a difficult task but I will try to make an objective evaluation considering the value and the impact of publications made, the eventual patents obtained and the prospective of the line of research of each investigator.

The lines of research of major relevance according to this evaluation are the following:

1. *identification of low molecular weight compounds capable to restore the gating and conductance and or the folding defect.*
2. *regulation of CFTR sorting and activation*
3. *gene therapy by lentiviral vectors*
4. *gene therapy through homologous recombination*
5. *pathophysiology and prospective of therapy of the defective biliary secretion.*

Among these, the researches most productive and potentially capable to lead the development of a useful pharmacological therapy are those aimed to identifying chemical compounds with the potentiality of correcting the basic molecular defect. Two categories of drugs are being explored i.e. those which may correct the trafficking or processing defect of CFTR (correctors) and those that may improve the gating abnormality (potentiators). The most common AF508 mutation led to both a trafficking and gating defect whereas other mutations, belonging to class III, for instance the G55ID are characterised by a simple gating deficiency. The investigators led by ***Luis Galietta*** *have carried out a high throughput screening of small molecule library either regarding drug already in use for other purposes or of completely new chemical substances (150,000 substances and 1,500 analogues of active compounds). A number of drugs acting as correctors or potentiators have been discovered including 1,4 dihydropyridines molecules (of which the best appear felodipine and its analogs) aminoarylthiazoles and others. However, none of the drugs discovered so far can enter into a Phase I trial, because of toxicity, lack of preclinical experiments and knowledge on Pharmacodynamics and Pharmacocinetics. However, progress in this field may be realised by setting up a molecular model of CFTR. This group of investigators published a number of important papers in first class international journals. This line of research may result in the long run to produce molecules useful for the treatment of cystic fibrosis.*

The second line of research deserving mention concerns the regulation of CFTR sorting and activation. In this context it should be noted that a recent paper published on "Cell" by W.E. Balch group has identified by proteomic analysis a large number of interaction between CFTR and other proteins (protein interactome) and shed light on the possibility by acting on chaperones to rescue misfolding of CFTR.

Casavola and Zaccolo *groups have carried out an interesting research in this field which led to elucidate the role of the interaction between N+/H+ exchanger regulator factor and CFTR in the processing and the function of CFTR. The research has been published in international journals of high impact. Further understanding of these pathways of protein-protein interaction may lead to develop useful therapeutic approaches.*

The third group of research that I would like to discuss briefly is the temptative of gene therapy by lentiviral vectors which have the great advantage of being capable of transfect non dividing cells and may show long persistance of the gene in the transfected epithelial cells.

Researches carried out by the ***Conese*** *group circunvented the problem of paucity of viral receptors on the apical surface of epithelial cells by using pseudotyped LV vector (VSV-G), defined heparan-sulphate as the receptor of the LV vectors, and documented the lack of inflammatory potential of the vector. The results are published in international journals covering this field. However, the progress in this field has been very slow, indicating the necessity of further basic experiments to improve transfection and stability before initiating preclinical studies.*

Correction of the basic defect in monogenic disorders by homologous recombination represents obviously the "holy Grail" in this field. The ***Novelli*** *group have carried out very preliminary experiments by using small DNA fragment homologous to the genomic target in mouse embryo stem cells and were able to introduce the 3bp deletion of AF508 in the corresponding region of the mouse CFTR gene. A single paper in a journal dedicated to this field has been published so far. The process of homologous recombination, however, is a very inefficient system to correct a molecular defect. Further basic experiments should be carried out to demonstrate the feasibility of this approach. Furthermore the present Italian Legislation represents a serious obstacle for the advancement of such therapy.*

Before finishing I would like to mention the investigations of the ***Strazzabosco*** *group aimed to identify chemical compounds able to stimulate biliary secretion in cholangiocytes in a cAMP-independent manner and therefore improve the cholangiopathy typical of CF. Interesting preliminary experiments have been published on international journals of great impact.*

In conclusion, I believe that in the field of pathophysiology and gene therapy, several initiatives mentioned in my talk deserve more attention and support by the Scientific Committee of the CF Foundation in order to obtain useful therapeutic applications.

Principali acquisizioni in tema di fisiopatologia della proteina CFTR e di terapie del difetto di base

attraverso i risultati di progetti FFC già pubblicati: una valutazione critica

Il Comitato Scientifico della Fondazione per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica mi ha affidato il compito di valutare criticamente i progetti relativi alla fisiopatologia ed ai tentativi di correzione del difetto molecolare di base finanziati negli ultimi anni dalla Fondazione. Per fare questo lavoro ho letto tutti i progetti relativi a quest'area, valutando sia le ricerche già pubblicate che i progetti presentati di recente per il finanziamento alla Fondazione. Il lavoro affidatomi è molto difficile essendovi la possibilità di commettere grossolani errori di valutazione. Cercherò nel mio discorso di fare delle considerazioni critiche basandomi sull'analisi dei lavori pubblicati in merito sia al loro valore intrinseco sia al loro impatto, sulla acquisizione di eventuali brevetti e sulle prospettive di sviluppo di ciascuna linea di ricerca.

Secondo la mia valutazione le linee di ricerca più produttive finanziate dalla Fondazione CFTR sono le seguenti:

1. Identificazione di composti chimici capaci di correggere il difetto di maturazione e/o il difettoso canale del cloro di CFTR.
2. Regolazione della maturazione e attivazione di CFTR.
3. Terapia genica con vettori lentivirali
4. Terapia genica via ricombinazione omologa.
5. Fisiopatologia e prospettive di terapia del difetto di secrezione biliare.

Nell'ambito di queste linee, quella più produttiva e potenzialmente capace di sviluppare una terapia farmacologia mutazione-specifica è la ricerca guidata da **Luis Galietta** concernente l'identificazione di composti chimici capaci di correggere o migliorare il difetto molecolare di base. Al momento attuale sono in corso di valutazione due gruppi di farmaci di cui uno dotato delle capacità di correggere il difetto di traffico tipico della mutazione AF508 ed indicati con il nome di correttori e l'altro potenzialmente capace di attivare il canale apicale del Cloro, funzione principale del CFTR (potenziatore).

La mutazione AF508 determina sia un difetto di traffico che una alterata funzione del canale.

Le mutazioni di Classe 3, come ad esempio la G55ID, mostrano solamente un difettoso canale. Lo screening di farmacoteche, sia di prodotti già in commercio per altri scopi sia di molecole completamente nuove, ha condotto ad identificare un gruppo di composti potenzialmente importanti, tra cui le 1,4 diidropirimidine ed il gruppo degli aminotiazoli.

Queste ricerche sono state pubblicate in riviste internazionali di elevato impatto. Tuttavia va sottolineato che nessuno dei farmaci identificati può essere avviato ad una sperimentazione di Fase 1 per l'elevata tossicità, la mancanza di esperimenti preclinici, e la assenza di studi di farmacodinamica e farmacocinetica. Di grande utilità per lo sviluppo in futuro di questi progetti è la realizzazione di un modello molecolare della molecola CFTR. Queste ricerche hanno a mio avviso le potenzialità di condurre allo sviluppo di molecole specifiche per il trattamento di specifici difetti del gene CFTR.

Il secondo gruppo di ricerche che merita di essere menzionato è quello riguardante la regolazione della maturazione e della attivazione di CFTR. A questo proposito va menzionato un importante lavoro pubblicato di recente dal gruppo di W.E. Balch su Cell che ha identificato con analisi di proteomica un elevato numero di interazioni tra CFTR ed altre proteine (protein interactome) potenziando così le possibilità di correggere il difetto di maturazione di CFTR agendo sul sistema degli "chaperon". I gruppi di **Casavola e Zaccolo** hanno condotto interessanti ricerche in questo campo che hanno portato a chiarire il ruolo della interazione tra il fattore regolatore dello scambio Na/H ed il CFTR sulla maturazione e attivazione del CFTR stesso. Queste ricerche sono state pubblicate su riviste internazionali ad elevato impatto. Tuttavia sono necessarie ulteriori ricerche di proteomica per poter sviluppare in questo campo degli approcci terapeutici.

Il terzo gruppo di ricerche che vorrei menzionare riguarda i tentativi di terapia genica con l'uso di vettori lentivirali che hanno il grande vantaggio di poter transfettare con successo cellule non in mitosi e la capacità di una persistenza protratta nelle cellule epiteliali transfettate. Le ricerche condotte in questo campo dal gruppo di **Conese** sono state capaci di superare il problema del limitato numero di recettori lentivirali nella superficie delle cellule epiteliali con l'uso di vettori contenenti il capside del "vescicular stomatitis virus" ed hanno infine documentato la mancanza di potenzialità infiammatoria del vettore. I risultati di queste ricerche sono stati pubblicati su riviste internazionali di questo specifico settore. Va notato, tuttavia, che il progresso in questo campo è stato estremamente lento ad indicazione della necessità di ulteriori esperimenti di base, prima che si possano avviare studi preclinici.

La possibilità di correggere il difetto di base delle malattie monogeniche con la ricombinazione omologa è stata ed è la grande speranza dei numerosi ricercatori attivi in questo campo. Il gruppo di Novelli ha condotto in questo settore esperimenti preclinici usando piccoli frammenti di DNA con sequenze omologhe al bersaglio genomico in cellule staminali embrionali del topo ed è stato capace di introdurre la delezione di 3bp tipica della AF508 nelle regioni del gene omologo murino. Queste ricerche sono state pubblicate in una rivista internazionale dedicata a queste ricerche. Va tuttavia rilevato che la ricombinazione omologa è un sistema scarsamente efficiente per correggere il difetto di base di una malattia monogenica. Va rilevato d'altronde che la legislazione italiana attuale rappresenta un ostacolo serio per condurre queste ricerche. Prima di terminare vorrei infine menzionare le ricerche condotte dal gruppo di **Strazzabosco** con lo scopo di identificare composti capaci di stimolare la secrezione biliare da parte dei colangiociti in maniera cAMP-indipendente e pertanto potenzialmente capaci di migliorare la tipica colangiopatia della CF. Esperimenti preclinici interessanti in questo settore sono stati pubblicati dal gruppo su riviste internazionali di elevato impatto.

In conclusione, ritengo che il gruppo di ricerche nel campo della fisiopatologia e dei tentativi terapeutici di correzione del difetto di base menzionato meritano il totale supporto della Fondazione CF per poter produrre risultati utili per una eventuale cura.

Massimo Conese *(a destra) con Donatella Piro*

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

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

[1]Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Foggia, Foggia; [2]Istituto per il trattamento sperimentale della Fibrosi

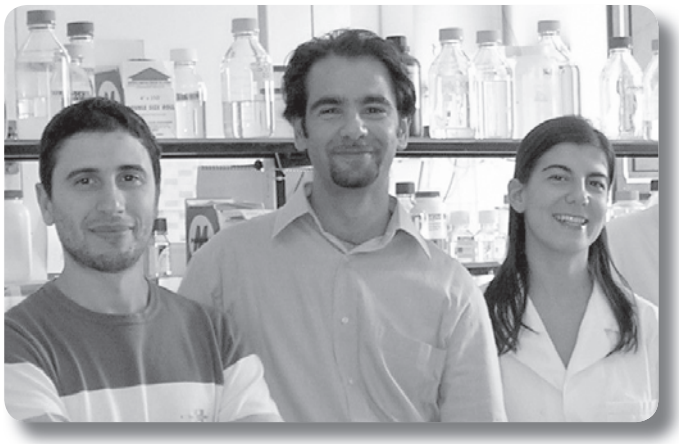
Cistica, Osp. S. Raffaele, Milano; [3]Dipart. di Fisiologia Generale e Ambientale, Università di Bari, Bari. (Progetto FFC #2/2006)

The first aim of this study is to investigate the phenotype and the energetic metabolism of stem cells obtained from murine bone marrow to find differences, if any, in subpopulations. In parallel, CFTR expression and function were studied. The final aim of this study is to "select" bone marrow-derived hematopoietic stem cells (HSCs) with high capacity of homing and transfer a wild-type CFTR to the CF lung. HSCs were isolated from total bone marrow of C57Bl/6 mice by means of a negative immuneselection. This procedure enriched bone marrow in HSCs up to 20%, as evaluated by cutofluorimetry analysis of Sca-1 marker. The intracellular content of mitochondria was not homogeneously distributed in the Sca-1+ cell population displaying a clear inverse correlation of their density with the expression of the Sca-1 marker. To obtain a more homogeneous population, whole bone marrow was processed by through anti-Sca1 positive selection, which resulted in 95% HSCs. Positively selected Sca-1+ HSCs showed two populations distributed by their different dimension. The smaller the cell the higher Sca-1 expression and the lower the mitochondrial content; on the contrary, the bigger the cell the lower Sca-1 expression and the higher the presence of energised mitochondria. Immunocytochemistry revealed that Sca-1+ cells express CFTR on their membrane. Spectrofluorimetric and "imaging" techniques on single cells determined the presence of a functional PKA-dependent CFTR chloride channel. These results show that HSCs do not have a homogeneous mitochondrial content, which may influence their capacity to migrate to a damaged lung. On the other hand, CFTR expression and function by HSCs, independently from the energetic metabolism, indicates that once homed to the lung of CF patients, they should be able to correct the electrophysiological defect of lung cells.

Migrazione di cellule staminali corrette nel polmone di topi con fibrosi cistica e recupero dell'attività funzionale di CFTR: ruolo del metabolismo energetico.

Lo scopo primario del progetto è di studiare se esiste una correlazione tra il metabolismo bioenergetico delle cellule staminali derivate da midollo osseo (BM-SC) ed il loro fenotipo, nonché con la presenza di una CFTR funzionale. Il fine ultimo del progetto è quello di "selezionare" una popolazione BM-SC che abbia la più alta capacità di migrare in un modello di malattia polmonare ai fini di una terapia cellulare della Fibrosi Cistica (FC). Le BM-SC sono state isolate da midollo osseo di topi C57Bl/6 con un procedimento che purifica le cellule staminali mediante immunoselezione negativa. L'analisi fenotipica mostrava che queste cellule non erano omogenee né per un "marker" delle cellule staminali (ovvero per Sca-1, positivo per il 20%) né per il contenuto mitocondriale. Inoltre, maggiore era il contenuto di Sca-1 minore era la presenza di mitocondri energizzati. Al fine di ottenere una popolazione più omogenea, è stato usato un procedimento che isola le cellule staminali mediante immunoselezione positiva. Le cellule isolate in questo modo mostravano omogeneità per la espressione di Sca-1 (positiva al 95%) ma erano distinguibili in due sottopopolazioni in base alle loro dimensioni. L'analisi contemporanea di Sca-1 e del contenuto mitoncondriale rivelava che le cellule più piccole esprimevano più Sca-1 e meno mitocondri energizzati; al contrario, le cellule più grandi presentavano maggiore contenuto di mitocondri con alto potenziale di membrana ma meno Sca-1. Le cellule isolate positivamente sono state quindi analizzate per la presenza di una proteina CFTR funzionale. L'analisi al microscopio mostrava che le cellule Sca-1 positive esprimevano anche la CFTR. Mediante metodiche di spettrofluorimetria e di "imaging" a livello di singola cellula, è stato anche possibile dimostrare che la CFTR era funzionante in queste cellule come canale del cloro PKA-dipendente. I risultati ottenuti mostrano come la popolazione di BM-SC non sia omogenea per il metabolismo energetico e suggeriscono che queste differenze possano avere un'influenza sulla migrazione di queste cellule nel polmone danneggiato, come quello che si ha nei pazienti con Fibrosi Cistica. La presenza di una CFTR funzionale, indipendentemente dal metabolismo energetico, indica che questa popolazione potrebbe avere un ruolo nel trasferire una CFTR funzionale nel polmone dei pazienti con FC, il fine ultimo della terapia cellulare.

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



Roberto Loi *(al centro) con collaboratori di ricerca*

39. Loi R
Sezione di Oncologia e Patologia Molecolare, Dipartimento di Tossicologia, Università di Cagliari (Progetto FFC #5/2006)

Recent studies have indicated that the bone marrow harbours cells that can be induced to migrate towards the respiratory mucosa and to acquire phenotypic functional characteristics of pulmonary epithelial cells. Cells collected from the bone marrow of cystic fibrosis patients could therefore be potentially utilized to repopulate the diseased pulmonary epithelium through their transplantation in the same patient, following correction of the genetic defect, in vitro. *An obstacle to this approach is represented by the fact that the number of bone marrow-derived cells that engraft in the pulmonary epithelium is too low to have therapeutic relevance. It is therefore essential to understand which are the mechanisms responsible for the migration of bone marrow cells to the lung and their structural and functional integration in the pulmonary epithelium microenvironment. A better understanding of these mechanisms is necessary to improve the efficiency of the pulmonary epithelium repopulation and to ensure the safety of the treatment, in the hope to develop in the future a cellular therapy approach for cystic fibrosis. In preliminary in vitro studies we were able to achieve limited repair of airway epithelium in a mouse model of cystic fibrosis through administration of bone marrow-derived mesenchimal stem cells (MSC). Furthermore, we observed that interleukin-17 (IL-17), an inflammatory cytokine known for its chemotactic action on neutrophils, favors the migration of MSC towards mouse airway epithelial cells in culture. Through cell migration studies performed in several in vitro systems, we were able to confirm the chemotactic action of IL-17 on MSCs, that were shown to express the specific membrane receptor. We are currently expanding these studies through the culture of MSCs in three-dimentional matrices, that better*

resemble the in vivo condition. The migration of MSCs will be next evaluated in animal models in which the CFTR and the IL-17 gene have been deleted. The goal of this project, through the study of the mechanisms responsible for the migration of MSCs, is to contribute to establish a scientific basis necessary to develop a cell therapy approach for cystic fibrosis in the future.

Meccanismi di reclutamento di cellule staminali derivate dal midollo osseo nell'epitelio polmonare normale o affetto da fibrosi cistica.

Recenti studi hanno evidenziato che nel midollo osseo sono presenti cellule che possono essere stimolate a migrare verso la mucosa respiratoria e ad acquisire caratteristiche fenotipiche e funzionali di cellule epiteliali polmonari. Cellule prelevate dal midollo osseo di pazienti affetti da fibrosi cistica potrebbero percio' essere potenzialmente utilizzate per ripopolare l'epitelio polmonare malato mediante trapianto nello stesso paziente, previa correzione del difetto genetico *in vitro*. Un limite di questo approccio è rappresentato dal fatto che il numero di cellule di derivazione midollare che si integrano nell'epitelio polmonare è ancora insufficiente affinchè questo approccio possa avere rilevanza terapeutica. È perciò essenziale capire quali sono i meccanismi responsabili della migrazione delle cellule dal midollo osseo al polmone e della loro integrazione strutturale e funzionale nel microambiente dell'epitelio polmonare. Una migliore comprensione di questi meccanismi è necessaria per migliorare l'efficienza del ripopolamento dell'epitelio polmonare e per garantire la sicurezza del trattamento, nella speranza di sviluppare in futuro una terapia cellulare per la fibrosi cistica.
In studi preliminari *in vivo*, siamo stati in grado di ottenere un limitato riparo dell'epitelio delle vie aeree in un modello murino di fibrosi cistica attraverso la somministrazione di cellule staminali mesenchimali derivate dal midollo (MSC). Abbiamo inoltre osservato che la interleuchina 17 (IL-17), una citochina infiammatoria nota per la sua azione chemiotattica sui granulociti neutrofili, favorisce la migrazione di MSC verso cellule epiteliali delle vie aeree in colture primarie murine.
Attraverso studi di migrazione cellulare condotti su diversi sistemi *in vitro*, abbiamo confermato la azione chemiotattica della IL-17 sulle MSC, le quali posseggono lo specifico recettore di membrana. Stiamo attualmente approfondendo questi studi mediante la colture di MSC in matrici a tre dimensioni, che meglio simulano le condizioni presenti *in vivo*. La migrazione delle MSC verrà successivamente valutata in modelli animali in cui il gene CFTR e il gene che codifica il recettore per la IL-17 sono stati deleti.
L'obbiettivo di questi progetto, attraverso lo studio dei meccanismi responsabili della migrazione delle MSC, è di contribuire a stabilire una base scientifica necessaria per arrivare in futuro ad una terapia cellulare per la fibrosi cistica.

CFTR gene correction in human embryonic stem cells mediated by Small Fragment Homologous Replacement (SFHR)

Federica Sangiuolo
(prima a destra in basso) con il suo gruppo di ricerca

40. Sangiuolo F[1], De Felici M[2], Guerra L[3], Lucarelli M[4]
[1]*Sezione di Genetica, Dip di Biopatologia e Diagnostica per Immagini, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università Tor Vergata Roma;* [2]*Dipartimento Sanità Pubblica e Biologia Cellulare, Università degli Studi "Tor Vergata", Roma;* [3]*Dipartimento di Fisiologia Generale ed Ambientale, Università di Bari;* [4]*Dip. Biotecnologie Cellulari ed Ematologia, Università di Roma "La Sapienza", c/o Azienda Policlinico Umberto , Roma*
(Progetto FFC #5/2005)

All clinical trials developed today for Cystic Fibrosis have obtained expression levels of the corrected gene too low for therapeutic benefit.
Gene targeting process involves targeting the mutation in situ *for gene correction and for restoration of a normal gene function. Recent advances in gene targeting have led to the suggestion that gene correction based on homologous recombination might be used as clinical therapy for genetic disease. SFHR is a gene targeting strategy that involves the introduction of small DNA fragments (SDFs) (up to 1 kb) into cells. These SDFs involve homologous exchange between their sequences and the endogenous (genomic or episomal) ones, resulting in phenotypic changes.*
The aim of this project was to modify in vitro *a human embryonic cell line using the SFHR technique. In the same time, the methylation status of both fragment and genomic DNA has been evaluated and their influence on the gene targeting efficiency.*
By targeting gene repair to stem cell populations, it is possible that long-term correction might be achieved through clonal expansion. However, epigenetic changes have been observed during stem cells in vitro *"manipulation" and in particular after gene targeting.*
The goals were:

1. *Molecular and immunohystochemical characterisation of a human embryonic stem cell line;*
2. *Design, synthesis and production of a small DNA fragment homologous to human CFTR locus;*
3. *Optimisation of nucleofection protocols and of molecular analysis of human ES cells modified at CFTR locus;*
4. *Evaluation of the methylation status of both fragment and genomic DNA on the transfection efficiency.*

Protocolli di terapia genica del gene CFTR in cellule staminali embrionali umane utilizzando la tecnica SFHR (Small Fragment Homologous Replacement)

La Fibrosi Cistica (FC) è una malattia per cui ad oggi non esiste una terapia risolutiva. Per questo motivo è auspicabile lo sviluppo di un programma di terapia genica efficace in grado di modificare stabilmente il locus CFTR.
La tecnica Small Fragment Homologous Replacement (SFHR) è una tecnica di *gene targeting* che utilizza frammenti di DNA lunghi fino ad 1 Kbase, sintetizzati *in vitro* mediante PCR. L'evento di modificazione è sito-specifico e permanente, mantenendo la regolazione del gene modificato da parte dei meccanismi endogeni. Considerando che le cellule staminali (ES) hanno la capacità di autorinnovarsi, la modificazione genetica di un piccolo

numero di cellule può dar vita ad una popolazione di cellule terapeutiche in divisione a lungo termine. È possibile inoltre che il differenziamento cellulare e quindi il grado di condensazione della cromatina, possono influenzare l'efficienza del "targeting". Per questi motivi le ES risultano i "targets" ideali per esperimenti di correzione genica.
Lo scopo principale di questo progetto è stato quello di modificare *in vitro* una linea cellulare staminale embrionale umana utilizzando la tecnica SFHR. Parallelamente è stata valutata l'influenza che il grado di metilazione dei frammenti introdotti all'interno delle cellule può esercitare sull'efficacia di integrazione del frammento stesso.
Le molteplici capacità differenziative delle cellule staminali embrionali e l'impiego della tecnica SFHR in tali cellule potrebbero portare alla risoluzione dei problemi ad oggi esistenti nei protocolli sperimentali di terapia genica, tra cui quello del target cellulare da modificare e della scelta di un vettore appropriato per l'epitelio respiratorio.
I risultati raggiunti nell'ambito di tale progetto sono stati:

1. caratterizzazione molecolare e immunoistochimica della linea staminale embrionale umana,
2. disegno, clonaggio e produzione del frammento corrispondente al locus CFTR umano,
3. ottimizzazione dei protocolli di nucleofezione, di analisi molecolare delle cellule staminali modificate al locus CFTR,
4. valutazione dell'influenza dello status di metilazione del frammento e del DNA genomico sull'efficienza di transfezione.

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

Valeria Casavola
(seconda fila, terza da sinistra) con il suo gruppo di ricerca

41a. Casavola V[1], Zaccolo M[2]
[1]Dip.to di Fisiologia Generale e Ambientale, Università di Bari; [2] Istituto Veneto di Medicina Molecolare, Padova
(Progetto FFC#1/2005)

Compartmentalization of CFTR in a multiprotein complex is crucial for the regulation of its functional expression and the efficiency of PKA-dependent activation of chloride efflux. The aim of the project just finished was to analyze the mechanisms and the dynamics of the interaction of the scaffolding protein, NHERF1, with CFTR in polarized monolayers of two human bronchiolar cell lines: the normal 16HBE14o- cell line and the CF cell line homozygous for the ΔF508 mutation, CFBE41o-.
Confocal analysis demonstrated that NHERF1 distribution was associated to the apical membrane in 16HBE14o- while being primarily cytoplasmic in CFBE41o- monolayers. Functional studies showed that NHERF1 over-expression in 16HBE14o- monolayers increased both apical CFTR expression and the Protein Kinase A (PKA)–dependent CFTR mediated chloride efflux, whereas transfection with NHERF1 mutated in the binding groove of the PDZ domains or truncated for the ERM domain inhibited both apical CFTR expression and chloride efflux. These data demonstrate an important role for NHERF1 in regulating CFTR localization and stability on the apical membrane of normal cell monolayers. Importantly, NHERF1 overexpression in CFBE41o- cells induced both a significant redistribution of CFTR from the cytoplasm to the apical membrane and the PKA-dependent activation of chloride efflux.
This rescue of ΔF508CFTR-dependent chloride secretion induced by NHERF1 overexpression could be favored by the formation of the multiprotein complex actin cytoskeleton-ezrin-NHERF1-CFTR. Confocal analysis demonstrated that 16HBE14o- monolayers displayed well-organized stress fibers at the apical side of cells, while the CFBE41o- displayed substantial disassembly of actin filaments. Importantly, over-expression of NHERF1 in the CFBE41o- monolayers led to an F-actin cytoskeleton reorganization into well-organized stress fibers on the apical side that closely resemble the normal cells. The cytoskeleton-associated protein, ezrin, that when phosphorylated is a linker between cell membranes and the cytoskeletal network, is more diffuse in the cytoplasm of CFBE41o- and localized to the apical region in 16HBE14o- monolayers. Also in this case, the overexpression of NHERF1 in CFBE41o- cells caused a shift of ezrin distribution from the cytoplasm to apical region.
A similar behaviour was found when we analyzed cAMP levels in response to the stimulation of adenylate cyclase by FRET measurements: the cAMP levels were significantly higher in the membrane region of 16HBE14o- compared to that found in CFBE41o- cells. All this data together suggest that CFBE41o- cells display a different compartmentalization of the molecular signals of cell transduction that could be critical in the regulation of the trafficking and the retention of ΔF508CFTR in the apical membrane.

La compartimentazione della proteina-canale CFTR in complessi multiproteici è necessaria per regolare la sua espressione e aumentare l'efficienza con cui la protein chinasi AMPc dipendente (PKA) ne regola l'efflusso di cloro.

La proteina NHERF (NHE Regulatory Factor) interagisce mediante i suoi due domini PDZ con l'estremità C-terminale di CFTR. L'obiettivo del progetto appena concluso è stato quello di analizzare i meccanismi e le dinamiche delle interazioni con cui NHERF regola l'espressione apicale e la funzionalità di CFTR in due linee cellulari bronchiali umane: le 16HBE14o- derivate da un soggetto sano e le CFBE41o- derivate da un paziente FC omozigote per la mutazione ΔF508.

La proteina NHERF1 ha una differente distribuzione nelle due linee cellulari: nelle cellule FC è diffusa nel citoplasma mentre nelle cellule "sane" è localizzata al di sotto della membrana apicale. Studi funzionali condotti nelle cellule 16HBE14o- hanno dimostrato che NHERF1, interagendo mediante i suoi domini PDZ con la sequenza C-terminale di CFTR ne regola sia l'espressione sulla membrana che l'efflusso di cloro. L'over-espressione di NHERF1 incrementa l'efflusso di cloro CFTR-dipendente cellule "sane" e, interessantemente nelle cellule FC CFBE41o- induce una ridistribuzione del ΔF508CFTR dal citoplasma alla membrana plasmatica e un ripristino della secrezione di cloro. Inversamente l'inibizione della sintesi della proteina NHERF1 riduce fortemente l'espressione funzionale di

CFTR nelle cellule "sane" rendendole simili alle cellule FC.
Abbiamo inoltre dimostrato che, mediante l'interazione con NHERF1, il citoscheletro actinico modula l'espressione e l'attività di CFTR. NHERF1 infatti interagisce con la proteina ezrina che, una volta fosforilata, oltre a legare la subunità regolatoria della PKA, interagisce con l'actina citoscheletrica. Dati morfologici e biochimici hanno evidenzato che in cellule 16HBE il citoscheletro actinico è altamente organizzato e l'ezrina fosforilata è prevalentemente localizzata sotto la membrana apicale mentre in cellule FC il citoscheletro actinico è più disorganizzato e l'ezrina fosforilata è distribuita diffusamente nel citoplasma. L'over-espressione di NHERF1 nelle cellule FC ristabilisce parzialmente l'organizzazione citoscheletrica e determina uno shift dell'ezrina fosforilata dal citoplasma alla regione apicale.
Un'ulteriore conferma della diversa compartimentazione dei meccanismi cellulari di trasduzione del segnale deriva da esperimenti di FRET (Fluorence Energy Transfer) in cui abbiamo esaminato l'incremento dei livelli di AMPc in risposta a stimolazione con attivatori dell'adenil ciclasi sia in prossimità della membrana plasmatica che nel citoplasma. Abbiamo osservato che, mentre nelle cellule FC l'incremento di AMPc è maggiore nel citoplasma, nelle cellule "sane" tale incremento è maggiore nella regione prossima alla membrana. I dati ottenuti hanno messo in luce una differente compartimentalizzazione dei meccanismi cellulari di traduzione che potrebbero essere critici nella regolazione del traffico di CFTR sulla membrana.

Cellular and molecular mechanisms of the actin cytoskeleton involvement in the NHERF1-dependent rescue of delta F508 CFTR in human airway cells

Valeria Casavola

41b. Casavola V[1], Conese M[2]
[1]Dip.to di Fisiologia Generale e Ambientale, Università di Bari; [2]Dip.to Scienze Biomediche, Università di Foggia
(Progetto FFC #2/2007)

The epithelial cells of a lung affected with Cystic Fibrosis (CF) have two defects: 1) they do not have the protein CFTR expressed in the cell membrane facing the respiratory lumen (apical membrane); 2) a hyperproduction of mediators of inflammation. Both of these defects are responsible for the pathological and clinical consequences in the lung, but it is still unknown if there exists a causal relationship between them. That is, does mutated CFTR have a role in the hyperproduction of inflammatory molecules or are these independent phenomenon. During a previous collaboration, our two research groups demonstrated that, in CF respiratory airway cells, it is possible to induce transport of the mutated CFTR protein to the apical membrane of affected cells by overexpressing a partner protein of CFTR, called NHERF1. This protein creates a favorable cellular environment at the apical membrane that permits the correct functional expression of the mutated CFTR. Indeed, in our experimental conditions mutated CFTR recovers its original function as an apical membrane ion channel. In this project we propose to study the mechanism underlying this phenomenon of 'recovery' of the mutated CFTR protein function. To do this, we will study how NHERF1 interacts with other intracellular molecules known to be important for transport of CFTR to the apical membrane, such as: ezrin RhoA/ROCK and F-actin of the cytoskeleton. Secondly, to better understand the role of CFTR in the hyperproduction of inflammatory molecules, we will evaluate the normalization of the levels of these substances after the overexpression of NHERF1. The results obtained in this study will permit us to understand: 1) the relationships existing between CFTR and other intracellular proteins and how these interactions help CFTR to arrive at the apical membrane and function correctly once there; 2) the relationship between these interactions of CFTR and its partner proteins with the hyperproduction and secretion of inflammatory molecules by the CF cells. At the end of this study, we will have a better understanding of possible novel therapeutic targets that will permit us to correct the defect that is at the basis of CF and its resulting inflammatory pulmonary disease.

Meccanismi cellulari e molecolari del coinvolgimento del citoscheletro di actina nel recupero di CFTR-DF508 dipendente da NHERF1 nelle cellule delle vie aeree umane

Le cellule dell'epitelio del polmone affetto da Fibrosi Cistica (FC) presentano due difetti: 1) la mancanza della proteina CFTR sulla parte di membrana prospiciente il lume delle vie respiratorie (membrana apicale); 2) l'iperproduzione di mediatori dell'infiammazione. Entrambi questi difetti sono responsabili delle conseguenze patologiche e cliniche a livello polmonare, ma è anche vero che non è noto se esista una relazione causale tra di essi. I nostri gruppi di ricerca hanno dimostrato, con una precedente collaborazione, che è possibile trasportare la proteina CFTR mutata sulla membrana apicale di cellule epiteliali respiratorie FC in seguito alla sovraespressione di una proteina partner di CFTR, chiamata NHERF1. Questa proteina crea un ambiente cellulare favorevole a livello della membrana apicale che permette una corretta funzionalità della proteina CFTR. Infatti, nelle nostre condizioni sperimentali la CFTR mutata riacquistava la sua funzionalità di canale ionico. In questo progetto proponiamo di studiare il meccanismo alla base di questo fenomeno di "recupero" della proteina CFTR mutata. A tal fine, studieremo come NHERF1 sia in relazione con altre molecole intracellulari, importanti per il trasporto di CFTR alla membrana apicale, tra cui: ezrina , RhoA/ROCK e il citoscheletro di actina. In secondo luogo, per comprendere il ruolo di CFTR nella iperproduzione di molecole infiammatorie, valuteremo la normalizzazione di queste molecole dopo sovraespressione di NHERF1. I risultati ottenuti in questo studio ci permetteranno di comprendere: 1) le relazioni esistenti tra proteina CFTR ed altre proteine intracellulari e come queste interazioni aiutino la CFTR ad arrivare sulla membrana apicale e a funzionare correttamente; 2) le relazioni tra CFTR, queste proteine partner, e la ipersecrezione di molecole infiammatorie da parte di cellule FC. Alla fine di questo studio avremo una maggiore comprensione di possibili bersagli terapeutici che ci permetteranno di correggere il difetto di base della FC e la malattia infiammatoria polmonare.

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

Luis Galietta *(al centro) con il suo gruppo di ricerca*

42. Pedemonte N [1], Caci E [1], Caputo E [1], Sondo E[1], Boido D [2], Moran O[2], Giampieri M [3], Mazzei M[3], Zegarra-Moran O [1], Galietta LJV[1]
[1]Lab. di Genetica Molecolare, Istituto Giannina Gaslini, Genova; [2]Istituto di Biofisica, CNR, Genova; [3]Dip. di Scienze Farmaceutiche, Università di Genova (Progetto FFC #3/2006)

Potentiators and correctors are chemical compounds able to stimulate the activity or to restore the normal maturation of mutant CFTR protein, respectively, thus representing a useful tool to overcome the primary defect in many cystic fibrosis patients. The aim of our project is to identify novel potentiators and correctors, to improve their pharmacological properties, and possibly to elucidate their mechanism of action. Regarding potentiators, we have completed a study on a panel of 1,4-dihydropyridines (DHPs), a class of molecules that includes many drugs used to treat hypertension. Our goal was to elucidate the structure-activity relationship of DHPs in order to identify the optimal chemical structure needed to activate CFTR. For this purpose, we tested 333 DHPs on cells expressing three CFTR mutants: F508del, G551D, or G1349D. In parallel, we also tested the same DHPs on cells expressing voltage-dependent calcium channels, the primary target of DHPs as anti-hypertensive agents. Our experiments have evidenced DHPs with a high affinity for CFTR and, at the same time, a strongly reduced activity on calcium channels. Our studies continue with the purpose to further improve the properties of DHPs by analyzing novel structures. The identification of improved DHPs and the discovery of novel potentiators is also pursued by using computer-assisted analysis. The structure of active and inactive potentiators, including DHPs, has been used to develop methods able to predict the possible activity of novel molecules. In this way, it will be possible to perform virtual screenings of millions of molecules to identify new potentiators. The hits from the screening will be tested in vitro on cells expressing mutant CFTR.
We have also analyzed the activity of different F508del correctors like the bithiazole corr-4a and the quinazolines VRT-325 and VRT-640. For our studies, we have compared the results obtained from FRT and A549 cells, both expressing F508del-CFTR after stable transfection. In contrast to potentiators, which work with similar potency and effectiveness in both cell lines, corrector activity seem to be cell type dependent. Interestingly, we have also observed that combinations of correctors generate additive or even synergistic effects. Our findings suggest that correctors affect F508del-CFTR biogenesis at different levels and that combination of compounds may lead to significant improvement of mutant CFTR function.

Identificazione, ottimizzazione e convalida di potenziatori e correttori per la farmacoterapia della fibrosi cistica

I potenziatori e i correttori sono composti chimici in grado, rispettivamente, di stimolare l'attività o di ripristinare la maturazione della proteina CFTR mutata. Essi rappresentano quindi uno strumento potenzialmente utile per correggere il difetto primario in molti pazienti con fibrosi cistica. Lo scopo del nostro progetto è l'identificazione di nuovi potenziatori e correttori, il miglioramento delle loro proprietà farmacologiche e, possibilmente, la comprensione del loro meccanismo di azione. Per quanto riguarda i potenziatori, abbiamo completato uno studio su un pannello di 1,4-diidropiridine (DHP), una classe di molecole che include molti farmaci per il trattamento dell'ipertensione. Abbiamo saggiato le DHP su cellule con espressione di tre tipi di CFTR mutata: F508del, G551D e G1349D. In parallelo, abbiamo saggiato le stesse molecole anche su cellule che esprimono i canali del calcio voltaggio-dipendenti, il bersaglio primario delle DHP anti-ipertensive. I nostri esperimenti hanno evidenziato alcune DHP con alta affinità per la proteina CFTR e, al tempo stesso, con attività fortemente ridotta per i canali del calcio. I nostri studi continuano con il fine di migliorare ulteriormente le proprietà delle DHP saggiando nuove molecole della stessa famiglia. L'identificazione di nuovi potenziatori viene anche effettuata mediante studi di simulazione al computer. La struttura tridimensionale di composti attivi e inattivi è stata utilizzata per generare metodi in grado di predire la capacità di nuove molecole di funzionare da potenziatori. In questo modo sarà possibile lo screening virtuale di milioni di composti chimici.
Abbiamo anche analizzato l'attività di diversi correttori del mutante F508del quali il bitiazolo corr-4a e le quinazoline VRT-325 e VRT-640. Per i nostri studi abbiamo confrontato i risultati ottenuti da due linee cellulari diverse: FRT e A549, entrambe con espressione stabile della proteina F508del-CFTR. A differenza dei potenziatori, i correttori sembrano avere affinità ed efficacia dipendenti dal tipo cellulare utilizzato per l'espressione della proteina mutata. Abbiamo inoltre osservato che la combinazione di più correttori genera effetti additivi o perfino sinergici. I nostri risultati suggeriscono quindi che la biogenesi della proteina mutata F508del-CFTR è influenzata dai correttori con meccanismi diversi e che la combinazione di più composti può generare effetti funzionali particolarmente interessanti.

Functional and structural basis of the molecular mechanism of CFTR potentiators: towards therapeutic feasible molecules

43. Moran O[1], Galfrè E[1], Ferrera L[12], Dimasi N[3], Galietta LJV[2], Melani L[2], Monteverde M[2], Zegarra-Moran O[2].
[1]Istituto di Biofisica, CNR, Genova; [2]Laboratorio di Genetica Molecolare, Istituto Giannina Gaslini, Genova; [3]Laboratorio di Medicina Molecolare, Istituto Gannina Gaslini, Genova (Progetto FFC #4/2006)

Oscar Moran

Among the different mutations of the gene CFTR that causes cystic fibrosis, type III mutations permit the protein to mature and reach the plasma membrane but cause a reduction of the chloride transport across the epithelia that is probably correlated with the pathophysiology of the disease. There are several substances, named "potentiators", that can increase the activity of class III mutations in such amount that they could probably recover a proper function. However, to render these substances feasible as therapeutic agents, it is necessary to have a basic knowledge of the interaction between the drug and its target. We have identified a possible receptor for several of these potentiators in a specific domain of the CFTR by a combined approach of pharmacology, molecular modelling and site directed mutagenesis. We are working in the characterisation of the action of potentiators on the CFTR, to understand its molecular mechanisms, identifying the specific interactions that determine the activity of these drugs, utilizing two approaches: 1-A functional study done analysing the behaviour of a single CFTR molecule, and its variation by the potentiators application using electrophysiological techniques. 2-A study of the purified recombinant domains of the CFTR protein, to obtain physicochemical and structural data on the drug-target interaction. We are confident that the correct understanding of the basic principles that determine the action and efficacy of the CFTR potentiators will provide us with the key elements to design therapeutic feasible drugs for the treatment of cystic fibrosis.

Basi funzionali e strutturali del meccanismo molecolare dei potenziatori di CFTR: verso molecole terapeutiche utilizzabili

Fra le diverse mutazioni del gene CFTR che causa la fibrosi cistica, le mutazioni di tipo III causano una riduzione del trasporto del cloruro attraverso le membrane che probabilmente è correlata con la patofisiologia della malattia. Ci sono parecchie sostanze, chiamate "potenziatori", che possono aumentare l'attività della CFTR, in modo di recuperare la funzionalità in proteine mutanti difettose. Tuttavia, per rendere queste sostanze fattibili come agenti terapeutici, è necessario avere una conoscenza di base dell'interazione fra il farmaco ed il suo bersaglio. Recentemente abbiamo identificato un recettore putativo per molti di questi potenziatori in un dominio specifico della proteina CFTR mediante l'applicazione combinata di metodi farmacologici, di modellistica molecolare e di mutagenesi sito specifica. Ora stiamo occupando nella descrizione del meccanismo d'azione dei potenziatori nella CFTR, con lo scopo di identificare le interazioni specifiche che determinano l'attività di queste sostanze a livello molecolare, utilizzando due metodi: 1- L'analisi funzionale del comportamento una singola molecola di CFTR, e la sua relativa variazione dovuta all'applicazione dei potenziatori, mediante la tecnica del "patch clamp". 2 – Lo studio di domini della proteina del CFTR, ottenuti mediante tecniche ricombinanti, a fine di acquisire dati fisico-chimici e strutturali sull'interazione farmaco-bersaglio. Siamo sicuri che la corretta conoscenza dei principi di base che determinano l'azione e l'efficacia dei potenziatori di CFTR fornirà gli elementi chiave per progettare le farmaci per una terapia farmacologica della fibrosi cistica.

Marco Colombatti

Novel methods of intracellular delivery of ΔF508-CFTR correctors

44. Norez C[2], Pasetto M[1], Dechecchi MC[2], Barison E[1], Anselmi C[1], Quiri F[2], Zonari D[3], Cerutti E[3], Dosio F[3], and Cabrini G[2] and Colombatti M[1].
[1]Dipartimento di Patologia, Sezione di Immunologia, Università di Verona, [2]Laboratorio di Patologia Molecolare, Azienda Ospedaliera di Verona, [3]Dipartimento di Scienza e Tecnologia del Farmaco, Università di Torino. (Progetto FFC #1/2006)

One of the most common genetic defects in cystic fibrosis is deletion of the aminoacid F508 from the chloride channel (CFTR). This mutation results in impaired structure and function of CFTR which is less expressed (or absent) at the cell surface and less efficient in chloride transport across the cell membrane. However a whole range of so called corrector molecules are being investigated. These can facilitate membrane expression of CFTR by interfering with the quality control systems operating within the cell which are normally responsible for the destruction of defective molecules. Corrector molecules however require high dosages and are able to correct only a small fraction of mutated CFTR. In a previous phase of our research we have demonstrated that a corrector molecule (i.e. deoxyspergualin, DSG) can be chemically cross-linked to a carrier protein (human serum albumin, HSA) to obtain a pharmacologically active agent endowed with greater stability, greater efficacy and effective only when released within the cell.

Nuove strategie di trasporto intracellulare di farmaci per la correzione del fenotipo ΔF508-CFTR

Uno dei difetti genetici più frequenti nella fibrosi cistica è rappresentato dalla mutazione ΔF508 a carico del canale del cloro (CFTR). Tale mutazione implica un difetto nel funzionamento di CFTR che risulta meno disponibile alla superficie delle membrane cellulari e meno efficiente nel trasporto del cloro. Sono tuttavia allo studio delle molecole farmacologiche ("correttori") che possono facilitare il raggiungimento della membrana cellulare da parte di CFTR interferendo con i sistemi di controllo cellulare che distruggono le proteine difettose. I "correttori" tuttavia necessitano di alti dosaggi e sono in grado di correggere soltanto una piccola frazione di CFTR mutata. In una fase precedente della ricerca abbiamo dimostrato che è possibile legare chimicamente un "correttore" (desossispergualina, DSG) ad una proteina trasportatrice (albumina umana, HSA).
Effettuando esperimenti più dettagliati e confrontando l'attività di DSG e di coniugati chimici HSA-DSG abbiamo potuto osservare che coniugati HSA-DSG rappresentano dei potenziali agenti farmacologici dotati di maggiore stabilità e maggiore efficacia nel correggere la funzione di CFTR in cellule portatrici di una sua versione inefficiente (F508delCFTR) e funzionano solo se rilasciati all'interno della cellula, conferendo maggiore specificità alla loro azione.
I nostri risultati aprono la strada ad una ricerca sistematica di combinazioni di proteina trasportarice-correttore per una efficace correzione del difetto funzionale di CFTR in molte situazioni.

Computational design, biochemical study, synthesis and screening of pharmacological chaperones as correctors of δf508-CFTR

Mauro Mazzei *(terzo da sinistra) con il suo gruppo di ricerca*

45. Mazzei M[1], Melloni E[2], Moro S[3], Galietta LJV[4]
[1]*Dipartimento Scienze Farmaceutiche, Università di Genova;*
[2]*Dipartimento Medicina Sperimentale, Università di Genova;*
[3]*Dipartimento Scienze Farmaceutiche, Università di Padova;*
[4]*Lab. Genetica Molecolare, Istituto Giannina Gaslini, Genova*
(Progetto FFC #3/2007)

The most important mutation causing cystic fibrosis is the lacking of phenylalanine in position 508 of CFTR (DF508-CFTR). The protein is formed but remains entrapped in the endoplasmic reticulum (ER) where it is recognized by the quality control system of the cell and routed to the degradation. A particular role in this metabolic fate is played by Hsp70 and Hsp90 chaperones together with a cluster of other co-chaperones. In recent years, some chemicals were found to traffic the mutant protein from ER to plasma membrane. Such compounds were named pharmacological chaperones (PC). Their activity was probably due to interaction with the chaperone system but the true mechanism is still unknown. Moreover, the active concentration of PC is too high to possess a clinical interest. The aim of the present project is the finding of new PC as correctors for DF508-CFTR. Our principal goal is the search for new substances interfering with the Hsp90 chaperone and its co-chaperone Aha1, whose downregulation was shown to ameliorate the trafficking of DF508-CFTR. The study will start exploring in silico the possible binding sites among the cited chaperones and designing molecules apt to interact with those binding sites. Substances found by the molecular modeling will be synthesized in our chemical Laboratories. First, our compounds will be tested on BAE-1 cells (with low levels of Hsp90) and Jurkat cells (overexpressing Hsp90) to understand the role of the concentration of Hsp90 in the CFTR trafficking. Then, substances will be tested on FRT cells and on human epithelial cells to evaluate their activity on DF508-CFTR. Compounds will be optimized to obtain a better selectivity and lower toxicity, following the suggestions derived from the computational modeling, in view of clinical trials.

Disegno computerizzato, studio biochimico, sintesi e screening di chaperoni farmacologici come correttori di DF508-CFTR

La mutazione più importante che causa la Fibrosi Cistica è la mancanza della Fenilalanina in posizione 508 della CFTR (DF508-CFTR). In tal caso la proteina viene sintetizzata ma rimane intrappolata nel reticolo endoplasmatico (ER), dove viene riconosciuta dal sistema di controllo di qualità della cellula e viene avviata alla degradazione. Un ruolo particolare nel destino metabolico della DF508-CFTR è giocato dai chaperoni Hsp70 e Hsp90 e dall'insieme dei co-chaperoni. Recentemente alcuni composti chimici hanno mostrato di poter trasferire la proteina mutata dall'ER alla membrana plasmatica. Questi composti vengono chiamati chaperoni farmacologici. Tale attività viene attribuita alla loro interazione con il sistema dei chaperoni presenti nella cellula, ma il loro meccanismo d'azione non è chiaro. Inoltre la concentrazione a cui i chaperoni farmacologici finora trovati sono attivi è troppo alta per un vero interesse clinico.

Lo scopo del presente progetto è il ritrovamento di nuovi chaperoni farmacologici quali correttori selettivi della DF508-CFTR. Il nostro obiettivo è la ricerca di sostanze che possano interferire con Hsp90 (o con suoi co-chaperoni, quale Aha1), allo scopo di migliorare il trafficking della DF508-CFTR. Lo studio prenderà avvio dall'esplorazione in silico dei possibili siti di legame tra i citati chaperoni e molecole disegnate per interferire con i suddetti siti di legame. Il ruolo del chaperone Hsp90 verrà meglio compreso da esperimenti di trasfezione della DF508-CFTR in cellule esprimenti sia grandi quantità di Hsp90 (cellule Jurkat) che minori quantità (cellule endoteliali BAE-1). In dette cellule verranno quindi testate le sostanze da noi sintetizzate per studiare l'effetto della concentrazione di Hsp90 nel trafficking della DF508-CFTR. Questi potenziali chaperoni farmacologici verranno poi provati su cellule FRT e su cellule di epitelio umano per valutare la loro attività nei confronti della DF508-CFTR. I composti verranno poi ottimizzati al fine di migliorarne la selettività ed abbassarne la tossicità, in vista di future prove cliniche.

Guanine-based purines and cystic fibrosis: molecular mechanisms for a potential new pharmacological approach.

Patrizia Ballerini *(seconda da destra) con il suo gruppo di ricerca*

46. Ballerini P
Sezione di Farmacologia e Tossicologia, Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli Studi "G. D'Annunzio" di Chieti
(Progetto FFC #1/2007)

The important role played by adenine-based purines (ABPs) (ATP and adenosine) is sufficiently known in the airways. Its significance is also attempted by research of new and more stable $P2Y_2$ receptor agonists, such as Diquafosol and Denufosol, which have already given stimulating results when employed in phasel/ phasell pharmacological studies. In the CNS, where extracellular

guanine-based purines (GBPs) have been sufficiently studied, they play roles similar to those exerted by the adenine-based counterpart. If some of the effects mediated by guanosine (Guo) were pointed out also in airway epithelial cells, where GBPs system has not yet been studied, they could be considerably interesting for the identification of new therapeutic strategies for CF. Based on the results obtained in other cell types, this project is aimed at evaluating the ability of GBPs to correct, potentiate or balance the altered ions an fluids secretion induced by the presence of a mutated CFTR protein, in airway epithelium.
In particular it has been already reported that, in neuronal cells, Guo increases: 1) the release of ATP, 2) the expression of $P2Y_1$ and $P2Y_2$ receptors, 3) the expression of members of the ATP-binding cassette protein superfamily (CFTR belongs to it), 4) the expression of CLC-2 chloride channels, 5) the chloride currents. Moreover Guo protects against damage from ubiquitination process of misfolded proteins in glioma cells and inhibits the expression of pro-inflammatory protein CD40, in microglial cells.
Based on these results, the present project, is proposed as a preliminary study aimed at assessing whether Guo treatment of normal or CF airway epithelial cells (with CFTR mutation ΔF508/ΔF508) is capable of increasing: 1) ATP release, 2) the expression of: ATP specific receptors, chloride channels (mainly CLC-2 and CLC-3), P-glycoprotein (which could, even though partially, substitute CFTR) and ΔF508-CFTR. Moreover it will be tested whether Guo is able to enhance chloride currents and to reduce the expression of CD40. The expected results, which might include an enhancement in adenine-based purine tone, an increase of chloride ion secretion and a possible anti-inflammatory effect, could indicate Guo as new potential drug for CF therapy to be administered alone or in combination with other compounds, already experimented or under evaluation.

Purine a base guaninica e fibrosi cistica: meccanismi molecolari per un nuovo, potenziale approccio farmacologico.

Il ruolo svolto dalle purine extracellulari a base adeninica (ABPs) (ATP e adenosina) è già sufficientemente noto anche a livello delle vie aeree. La sua rilevanza nell'ambito della terapia della Fibrosi Cistica (FC) è testimoniata dalla ricerca di nuovi e più stabili agonisti per il recettore $P2Y_2$ che, come il Diquafosol ed il Denofusol, hanno dato risultati incoraggianti in studi di Fase I/II. Nel SNC, dove sono state ampiamente studiate, le purine extracellulari a base guaninica (GBPs) hanno ruoli molto simili a quelli delle ABPs. Alcuni degli effetti mediati dalla Guanosina (Guo) e documentati nelle cellule nervose, potrebbero rivelarsi particolarmente interessanti ai fini dell'individuazione di nuove strategie terapeutiche per la FC. Questo progetto si propone come studio preliminare volto a valutare, sulla base di risultati ottenuti in altri tipi cellulari, se GBPs ed in particolare la Guo sono in grado di correggere, potenziare o compensare l'alterata secrezione di ioni e fluidi che, a livello dell'epitelio delle vie aeree è causata dalla presenza di una proteina CFTR mutata.
In particolare è già stato dimostrato che la Guo, in cellule nervose, incrementa: 1)il rilascio di ATP 2)l'espressione dei recettori $P2Y_1$ e $P2Y_2$, 3) l'espressione di proteine trasportatrici appartenenti alla superfamiglia delle ABC-proteine (di cui il CFTR fa parte), 4)l'espressione di canali per il cloro (CLC-2), 5)le correnti di cloro. Inoltre la Guo protegge cellule di glioma dal danno indotto dall'accumulo di proteine misfoldate e riduce l'espressione e la funzione della proteina pro-infiammatoria CD40 in cellule di microglia.
Sulla base di questi risultati, il presente progetto valuterà se, in cellule epiteliali delle vie aeree normali e con mutazione del CFTR (ΔF508/ΔF508) il trattamento con Guo, è in grado di aumentare: a)il rilascio di ATP, b) l'espressione di: specifici recettori per l'ATP, di canali per il cloro (in particolare CLC-2 e CLC-3), della P-glicoproteina (potrebbe avere un'azione vicariante il CFTR), del ΔF508-CFTR. Si testerà inoltre la capacità della Guo di incrementare le correnti al cloro e di ridurre l'espressione del CD40. I risultati attesi, che comprendono un eventuale aumento del tono delle ABPs, un incremento della secrezione di ioni cloro ed un possibile effetto antinfiammatorio, potrebbero indicare la Guo come un nuovo potenziale farmaco per la terapia della FC da somministrare solo o in combinazione con altri già sperimentati o in via di sperimentazione.

Activation of protein kinase CK2 by a CFTR fragment is enhanced by the pathogenic F508 deletion.

Lorenzo Pinna *(al centro prima fila) con il suo gruppo di ricerca*

47. Pagano MA, Marin O, Arrigoni G, Sarno S, Meggio F, and Pinna LA
Dipartimento di Chimica Biologica, Università di Padova
(Progetto FFC#4/2007)

A recent report disclosing functional connections between CFTR and protein kinase CK2 (KJ Treharne et al JBC 282, 10804-813, 2007) prompted us to investigate the mechanism by which the first nucleotide binding domain (NBD1) of CFTR is phosphorylated by CK2 in a manner which appears to depend on F508, the residue whose deletion is the commonest cause of cystic fibrosis. We found that NBD1 wild type and, to a lesser extent NBD1 deltaF508, can be phosphorylated by the isolated CK2 catalytic subunit (alpha) but not by CK2 holoenzyme, composed by two catalytic and two regulatory (beta) subunits, unless the artificial activator polylysine is added. Such an unusual behavior assigns CFTR to a small subset of CK2 substrates ("class II") whose phosphorylation is inhibited instead of being stimulated by the beta subunit. MS analysis of the residue(s) phosphorylated by CK2 led to the identification of phospho-S422, either alone or in conjunction with phospho-S423, and of phospho-S567, both displaying the CK2 consensus, while no evidence for the phosphorylation of the CK2 consensus site S511, close to F508, could be obtained. In accordance with this outcome a synthetic peptide encompassing residues 500 to 518 of NBD1 and including S511, is not phosphorylated by CK2 to any appreciable extent. Interestingly however such a peptide triggers the phosphorylation of NBD1, and of calmodulin as well (another class II substrate of CK2), but not of regular (class I) substrates of CK2, by CK2 holoenzyme. The stimulatory efficacy of the CFTR 500-518 peptide is dramatically enhanced if the F508 residue is deleted in it. These data, albeit preliminary, support a working

hypothesis whereby the intracellular generation of unfolded and/or degraded CFTR, with special reference to its deltaF508 mutant, leads to the (hyper)ativation of CK2 toward a specific subset of endogenous targets. These include chaperons required for the correct folding of CFTR and possibly other proteins committed to the fate of CFTR. Future experimentation will be aimed at assessing the occurrence of this novel mechanism of CK2 activation in living cells and identifying CK2 targets relevant to cystic fibrosis pathogenesis.

L'attivazione della protein chinasi CK2 da parte di un frammento di CFTR viene aumentata dalla delezione patogena di F508.

La recente scoperta di interazioni funzionali tra CFTR e la protein chinasi CK2 (KJ Treharne et al. JBC 282, 10804-813, 2007) ci ha indotti ad esaminare il meccanismo mediante il quale il primo "nucleotide binding domain" (NBD1) di CFTR viene fosforilato da CK2 in un modo apparentemente dipendente da F508, il residuo la cui delezione è la causa più comune di fibrosi cistica. Abbiamo trovato che NBD1, sia normale, sia, in maniera ridotta, con la delezione di F508, viene fosforilato dalla subunità catalitica di CK2 ma non dall'oloezima composto da due subunità catalitiche e due regolatorie (beta), a meno che non venga aggiunto l'attivatore artificiale polilisina. Questo comportamento inconsueto include CFTR tra I substrati CK2 di classe II, la cui fosforilazione è inibita, anzichè stimolata dalla subunità beta. Un'analisi MS dei residui fosforilati da CK2 ha portato all'identificazione di fosfo-S422, da solo o insieme a fosfo-S423, e di fosfo-S567, entrambi con il consenso per CK2, mentre non si è potuta trovare alcuna evidenza della fosforilazione di S511, vicina a F508. In effetti un peptide sintetico includente S511 (500-518) non viene fosforilato da CK2. Tale peptide invece promuove la fosforilazione di NBD1 ed anche di calmodulina (un altro substrato di classe II), ma non quella di substrati canonici (classe I) dap arte dell'oloenzima CK2. L'efficacia stimolatoria del peptide CFTR 500-518 è enormemente aumentata se in esso viene deleto il seridue F508. Questi dati, benchè preliminari, depongono a favore di un'ipotesi di lavoro secondo cui la generazione di CFTR destrutturata e/o degradata, ed in particolare del suo mutante deltaF508, porta all'attivazione di CK2 nei confronti di alcuni target endogeni. Questi includono gli chaperon richiesti per la corretta conformazione di CFTR e probabilmente alter proteine implicate nel destino di CFTR. Gli esperimenti futuri mireranno a verificare l'esistenza di questo nuovo meccanismo di attivazione di CK2 nelle cellule e ad identificare in queste i bersagli di CK2 rilevanti ai fini della patogenesi della fibrosi cistica.

Novel particulate systems for the delivery of an oligonucleotide decoy to Nuclear Factor-kB: a potential strategy for treating cystic fibrosis

Fabiana Quaglia *(seconda da destra in alto) con il suo gruppo di ricerca*

48. Quaglia F[1], Carnuccio R[2]
[1] Dip.to di Chimica Farmaceutica e Tossicologica, Università di Napoli Federico II; [2] Dip.to di Farmacologia Sperimentale, Università di Napoli Federico II

An increasing research interest has been recently focused in gene therapy as a viable alternative to conventional therapies for cystic fibrosis (CF). On this matter, decoy oligonucleotide (dec-ODN) able to interfere with Nuclear Factor-kB pathway may be of great help in reducing NF-kB mediated pulmonary chronic inflammation, which is the primary cause of bronchioectasis, pulmonary fibrosis and respiratory failure. Nevertheless, the development of effective oligonucleotide (ODN)-based therapies faces two major challenges, that is ODN poor cell penetration and extensive in vitro/in vivo *degradation as well as short duration of biological effect. To overcome these issues, the use of poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) microparticles, able to protect the delivered molecule in biological environments and/or release the drug in a controlled way, has been suggested. Preliminary results obtained in our labs suggest that PLGA microspheres allow the full protection of an ODN decoy to NF-kB in biological fluids, significantly improve its uptake into cells, providing a sustained release of the encapsulated ODN lasting more than one month. The aim of this project is to develop safe and effective PLGA-based particulate systems for CF gene therapy by an decoy ODN against NF-kB. The project, which will be carried out in two years, comprises a technological study aimed to develop PLGA microparticles for the delivery of dec-ODN, eventually containing PEI as cell penetration enhancer. Particular attention will be paid to particle formulations intended for pulmonary administration, especially in term of optimization of their aereodynamic properties. All the particles will be fully characterized for morphology, size, loading efficiency and release in simulated biological fluids. The most promising particulate systems will be tested on specific cell lines to assess activity whereas the fate of microparticles after pulmonary administration will be investigated in animal models.*

Nuovi sistemi di microparticelle per la veicolazione di un oligonucleotide decoy al fattore di trascrizione NF-kB: una nuova strategia terapeutica per il trattamento della fibrosi cistica

Negli ultimi anni, un crescente interesse della ricerca scientifica nella fibrosi cistica (CF) è stato rivolto alla terapia genica quale valida alternativa alle terapie convenzionali. In tale ambito, l'impiego di oligonucleotidi *decoy* (dec-ODN) capaci di interferire con la trascrizione del fattore di trascrizione nucleare NF-kB appare un utile strumento terapeutico in quanto potenzialmente in grado di ridurre l'infiammazione polmonare cronica, principale causa delle bronchiectasie, della fibrosi polmonare e della conseguente insufficienza respiratoria cronica. Lo sviluppo delle terapie basate sull'impiego di oligonucleotidi (ODN), tuttavia, è al momento fortemente ostacolato dal loro scarso profilo farmacocinetico e da un effetto biologico non persistente. Al fine di superare tali problematiche, un approccio promettente prevede l'incapsulazione di ODN in microsfere a base di acido poli(lattico-co-glicolico) (PLGA) che permettono da un lato di proteggere l'ODN incapsulato dalla degradazione nei fluidi biologici e, dall'altro, di rilasciarlo in maniera controllata per tempi prolungati. Risultati preliminari, ottenuti nei nostri laboratori, dimostrano che tali

sistemi, opportunamente formulati, permettono di preservare l'integrità strutturale dell'ODN, ne promuovono la penetrazione cellulare, e consentono di realizzare un rilascio prolungato per più di un mese.
Sulla base di tali premesse scientifiche, scopo di questo progetto è lo sviluppo di microparticelle a base di PLGA per la veicolazione di un dec-ODN contro NF-kB per la terapia genica della CF. Il progetto, che si articolerà in un arco temporale di due anni, prevede la progettazione e realizzazione di microsfere a base di PLGA per la veicolazione polmonare del dec-ODN tal quale o complessato con polietileneimmina (PEI) per aumentarne l'uptake cellulare. Particolare attenzione sarà dedicata alla caratterizzazione delle proprietà aerodinamiche delle particelle intese per somministrazione polmonare. Tutte le formulazioni saranno studiate per morfologia, dimensioni, efficienza d'incapsulazione e cinetiche di rilascio in fluidi biologici simulati. L'attività dei sistemi più promettenti sarà valutata su linee cellulari specifiche mentre la biodistribuzione delle microparticelle dopo somministrazione polmonare sarà studiata su modelli animali.

sistemi, opportunamente formulati, permettono di preservare l'integrità strutturale dell'ODN, ne promuovono la penetrazione cellulare, e consentono di realizzare un rilascio prolungato per più di un mese.
Sulla base di tali premesse scientifiche, scopo di questo progetto è lo sviluppo di microparticelle a base di PLGA per la veicolazione di un dec-ODN contro NF-kB per la terapia genica della CF. Il progetto, che si articolerà in un arco temporale di due anni, prevede la progettazione e realizzazione di microsfere a base di PLGA per la veicolazione polmonare del dec-ODN tal quale o complessato con polietileneimmina (PEI) per aumentarne l'uptake cellulare. Particolare attenzione sarà dedicata alla caratterizzazione delle proprietà aerodinamiche delle particelle intese per somministrazione polmonare. Tutte le formulazioni saranno studiate per morfologia, dimensioni, efficienza d'incapsulazione e cinetiche di rilascio in fluidi biologici simulati. L'attività dei sistemi più promettenti sarà valutata su linee cellulari specifiche mentre la biodistribuzione delle microparticelle dopo somministrazione polmonare sarà studiata su modelli animali.

PUBBLICAZIONI E SOMMARI CONGRESSUALI DEGLI STUDI FINANZIATI DALLA FONDAZIONE FFC

Publications and congress abstracts from studies funded by italian cf research foundation

1. APPLIED GENETICS

- Progetto FFC# 4/2003 **"Identification of CF modifier genes by family studies and microarray analysis"** P.I. Giuseppe Novelli - Università di Tor Vergata – Roma (Dip. Biopatologia e Diagnostica per Immagini)

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. 2004;74:176-179
- Sangiuolo F. et al. "Toward the pharmacogenomics of Cystic Fibrosis – an update" Future Medicine – Pharmacogenomics, 2004; 5 (7):861-878
- 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. "Differenti 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 el. "CAP70: nuovo gene modificatore del fenotipo nella Fibrosi Cistica?" 7° Congresso Nazionale S.I.G.U. 2004

- Progetto FFC# 5/2003 **"Molecular pathology of CFTR pre mRNA splicing. Diagnostic and therapeutic aspects"** P.I. Franco Pagani – ICGEB 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. 2004; 74:1322-1325
- Amaral M. D. et al. "Quantitative methods for the analysis of CFTR transcripts/splicing variants" Journal of Cystic Fibrosis 2004; 3:17-23;
- Zuccatto 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 2004; 279:16980-16988

- Progetto FFC# 6/2003 **"Assessing the possible utilization of CFTR-M470V genotyping for CF risk determination"** P.I. Pierfranco Pignatti – Università di Verona (Dip. Biol. Genetica)

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;14(1):85-93.
- Ciminelli B.M. et al. "Highly preferential association of NonF508del Cf mutations with the M470 allele" Journal of Cystic Fibrosis 2007; 6:15–22.

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;

- Progetto FFC# 5/2004 **"Screening of CFTR gene rearrangements in Italian CF patients"** P.I. Giuseppe Castaldo - Università Federico II, Napoli (CEINGE – Biotecnologie Avanzate s.c.a.r.l.)

Publications
- Bombieri C. et al. "Frequency of large CFTR gene rearrangements in Italian CF patients" 2005 – European Journal pf 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 2004; 3:135-136

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 Mendellan Disorder – The American Society of Human Genetics, 54th Annual Meeting;
- Tomaiuolo R. et al. "Screening di macrodelezioni del gene CFTR in pazienti CF originari del sud Italia" 37° Congresso Nazionale SIBIOC (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

- Progetto FFC# 7/2004 **"The Cystic Fibrosis mutation spectra in Italy: regional distribution and the European framework"** P.I. Alberto Piazza – Università di Torino (Dip. Genetica, Biol. e Biochimica)

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;

- Progetto FFC# 8/2004 **"CF: characterization of the unknown mutations in Italian patients and assessment of their pathogenic role"** P.I. Maria Cristina Rosatelli Università di Cagliari (Dip. Scienze Biomol. e Biotecnol.).

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; 8(4):499-503

- Progetto FFC# 9/2004 **"Selection and functional characterization of CFTR intronic sequence variations potentially causing atypical forms of CF: modulation of CFTR alternative splicing?"** P.I Roberto Strom - Università La Sapienza - Roma (Dip. Biotecn. Cellulari ed Ematologia)

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; 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;72:39-46

- Progetto FFC#15/2005 **"Splicing Affecting Genomic Variants in *CFTR*: Diagnostic and Therapeutic Aspects"** P.I. 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; 35:606-613

2. EPIDEMIOLOGY AND CLINICAL RESEARCH

- Progetto FFC "**Infection Control".** Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica, Verona. P.I. Roberto Buzzetti

Publications
- Buzzetti R., Braggion C., Festini F., Mastella G., Salvatore D., Taccetti G. "Controllo e prevenzione delle infezioni respiratorie nel paziente affetto da fibrosi cistica" Ed. Fondazione Ricerca 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

- Progetto FFC "**The CAIRO Project"** (Analysis and review of the international scientific literature from the CF registries). Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica, Verona. Responsabili: Roberto Buzzetti e Donatello Salvatore

Abstracts
- Buzzetti R. et al. "The CAIRO project. Comapartive Analysis of the International CF Registries Overviewed" NACF, Anaheim, California, October 3-6, 2007

- Progetto FFC #18/2004 "Early eradication of ***P. aeruginosa*** and subsequent colonization in cystic fibrosis patients" P.I. Giovanni Taccetti - Osp. Meyer – Firenze (Centro Fibrosi Cistica)

Publications
- Taccetti G. et al. "Early eradication therapy against Pseudomonas Aeruginosa in cystic fibrosis patients" Eur Respir. J. 2005; 26:458-461;

- Progetto FFC #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" P.I. Anna Bossi - Università di Milano (Ist. Statistica e Biometria)

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;

- Progetto FFC #16/2005 **"Diabetes, glucose intolerance and hypoglycemia in Cystic Fibrosis"** P.I. Carla Colombo - Fond. IRCCS, Osp. Magg. Policl. Mangiagalli e Regina Elena – Milano (Dip. Pediatria – Centro Fibrosi Cistica)

Publications

- Battezzati A. et al. "Spontaneous hypoglycaemia in patients with cystic fibrosis" European Journal of Endocrinology 2007; 156:369-376

- Progetto FFC #20/2006 "**Prevention of pulmonary exacerbations in children with Cystic Fibrosis, through the modification of intestinal microflora"** P.I. Alfredo Guarino – Univ. Federico II – Napoli (Dip. Pediatria)

Publications

- Bruzzese E. et al. " Effect of Lactobacillus GG supplementation on pulmonary exacerbations in patients with cystic fibrosis: a pilot study" Clin. Nutr 2007, doi:10.1016/j.clnu.2007.01.004

3. MICROBIOLOGY

- Progetto FFC# 4/2002 **"Taxonomy and virulence markers of B. cepacia strains associated with respiratory infections in patients with cystic fibrosis"** P.I. Roberta Fontana - Università di Verona (Dip. Patologia)

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;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. "Distribuition 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 – Instanbul, Turkey – 1-4 April 2001

- Progetto FFC# 8/2003 **"Gene regulation and adaptive mutation of Pseudomonas aeruginosa in a chronic lung infection model for Cystic Fibrosis"** P.I. Alessandra Bragonzi – Istituto Trattamento Sperimentale Fibrosi Cistica, Osp. S. Raffaele, Milano

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 Pulmunology, 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

- Progetto FFC# 9/2003 **"Development of a rapid diagnostic test to discriminate *B. cepacia* complex species and genomovars in routine clinical analysis involving CF patients"** P.I. Renato Fani - Università di Firenze (Dip. Biol. Animale e Genetica)

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;

- Progetto FFC# 10/2003 **"The quorum sensing of the emerging fibrocystic pathogen B. cepacia"** P.I. Vittorio Venturi – ICGEB Trieste

Publications

- Venturi V. et al. "Quorum sensing in B. cepacia complex" Research in Microbiology 2004; 155:238-244
- 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, 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

- Progetto FFC# 10/2004 **"Genome–wide identification of target genes for the design of non–conventional antibiotics against CF related pathogens"** P.I. Giovanni Bertoni Università di Milano (Dip. Scienze Biomol. e Biotecnol.)

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 interferring antisense RNA" 1st European CF Young Investigator Meeting, Lille, Aug. 29-31, 2007

- Progetto FFC# 11/2004 **"Evaluation of the pathogenicity of environmental and clinical isolates of Burkholderia cepacia complex alone and in the presence of Ps aeruginosa"** P.I. Annamaria Bevivino - Enea Casaccia, Roma (Dip. Biotecnologie)

Publications

- Chiarini L. et al. "Burkholderia Cepacia complex species: health hazards and biotechnological potential" Trends in Microbiology 2006; 14:277-286

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

- Progetto FFC# 12/2004 **"Antimicrobial resistance in Burkholderia cepacia complex from CF patients: identification, characterization and role of efflux transporters in intrinsic and acquired drug resistance"** P.I. Giovanna Riccardi - Università di Pavia (Dip.to Genetica e Microbiologia)

Publications
- Guglierame P. et al. " Efflux pump genes of the resistance-nodulation division family in Burkholderia cenocepacia genome" BMC Microbiol. 2006; 6:66

- Progetto FFC#6/2005 e FFC#12/2006 **"Community-acquired MRSA and hospital- acquired MRSA in cystic fibrosis patients : a multicentre study regarding antibiotic susceptibility, epidemiology, natural history and clinical relevance"** P.I. Silvia Campana - Osp. Meyer, Firenze, Centro Fibrosi Cistica

Publications
- Campana S, 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" – J Cllin Microbiol, 2007 (In press)

Abstracts
- Piluso A. et al. " A national overview of MRSA epidemiology: emergence of an epidemic clone" North American CF Conference, Baltimore 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

- Progetto FFC#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"** P.I. Bianca Colonna - Univ. La Sapienza, Roma (Dip. Biologia Cellulare e Sviluppo)

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;20:109-117

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 Moxifloxacina su Stenotrophomonas Maltophilia isolati da fibrosi cistica" Congresso Società Italiana di Microbiologia (SIM), Genova 15-18 ottobre 2006.

- Progetto FFC#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."** P.I. Graziana Manno - Istituto G. Gaslini, Genova (Dip. Pediatria)

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

- Progetto FFC#9/2005 **"Studies of the Quorum Sensing Systems of Pseudomonas and Burkholderia"** P.I. Vittorio Venturi - ICGEB Trieste**.**

Publications
- Rampioni G. et al. "The Quorum sensing negative regulator RsaL of Pseudomonas Aeruginosa binds to the *las*I Promoter" Journal of Bacteriology 2006; 188:815-819.
- 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 Microbiology, 2007;7:71-79
- Devescovi G. et al. "A clinical isolate of Burkholderia glumae causes severe disease symptoms in rice; involvement of a quorum sensing regulated secreted lipase" Applied and Environmental Microbiology, 2007;73:4950-58
- 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) 1-13
- Rampioni G. et al. "The Pseudomonas quorum sensing regulator RsaL belongs to the tetrahelical superclass of H-T-H proteins" Journal of Bacteriology, 2007;189:1922-1930
- Massa C. et al. "Isolation, heterologous and characterization of an endo-polygalacturonase produced by the phytopathogen Burkholderia cepacia". Protein Expression and Purification Elsevier 2007; 54: 300-308
- Steindler L. et al. "Detection of quorum sensing N-acyl homoserine lactone signal molecules by bacterial biosensors" FEMS Microbiol. Lett. 266 (2007): 1-6

- Progetto FFC#6/2006 **"Genome-wide identification of target genes for the design of non-conventional antibiotics against cystic fibrosis-related pathogens**" P.I. Giovanni Bertoni - Università di Milano (Dip. Scienze Biomolecolari e Biotecnologie)

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

- Progetto FFC #7/2006 **Influence of Pseudomonas aeruginosa and CF host on Burkholderia cenocepacia pathogenicity** P.I. Annamaria Bevivino - Enea, Casaccia, Roma (Dip. Biotecnologie)

Abstracts
- Pirone L. et al. Influence of Pseudomonas aeruginosa on the growth rate and internalization of *Burkholderia cenocepacia.*) V° Convegno nazionale FISV, Riva del Garda (TN), 26-29 sett. 2007

- Progetto FFC#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"** P.I. Roberto Rizzo - Università di Trieste (Dip. Biochimica, Biofisica e Chimica Macrocell.)

Publications
- Herasimenka Y. et al. "Exopolysaccharides produced by Inquilinous limosus, a new pathogen of cystic fibrosis patients: novel structures with usual components" Carbohydrate. Res. (2007), doi:10.1016/j.carres.2007.07.012

Abstracts
- Cescutti P, et al. Exopolysaccharides as bacterial defence tools: the case of *Burkholderia cepacia* complex. XV European Meeting on Carbohydrates, Lubecca, September 2-7

- Progetto FFC#14/2006 "**Longitudinal study of *Pseudomonas aeruginosa* resistance: selection and evolution of resistance mechanisms in relation to antibiotic treatment in cystic fibrosis patients"** P.I. Anna Silvia Neri - Osp. Meyer, Firenze (Centro Fibrosi Cistica)

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 metalloβ-lactamase producing Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis patients" 30th European CF Conference, Belek, Turkey; 13-16 June 2007

4. INFLAMMATION

- Progetti FFC#3/2002, FFC#10/2005 e FFC#17/2006 **"Roles of azithromycin other than bactericidal: relevance for therapy of cystic fibrosis"** P.I. Paola Melotti - Azienda Ospedaliera di Verona (Lab. Patologia Molecolare)

Publications
- Cigana C. et al. "Azithromycin selectively reduces tumour necrosis factor alpha levels in Cystic Fibrosis airway epithelial cells" Antimicr Agents Chemother. 2007; 51:975-981
- Cigana C. et al. "Anti-inflammatory effects of azithromycin in cystic fibrosis airway epithelial cells" Biochem Biophyl Res Communic. 2006;350:977-982
- 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;7:7.

Abstracts
- Cigana C. et al. " Azythromycin 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 (TNFα) 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 azythromycin 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
- "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

- Progetto FFC# 7/2003 **"Proteomics of the airway surface liquid: implications for cystic fibrosis"** P.I. Olga Zegarra Moran – Istituto G. Gaslini – Genova (Lab. Genetica Molecolare)

Publications
- Candiano G. et al. "Gelsolin secretion in interleukin 4 treated bronchial epithelia and in asthmatic airways" Am J Respir Crit Care Med. 2005;172:1-7,
- Candiano G. et al. "Proteomic Analysis of the Airway Surface Liquid: Modulation by Proinflammatory Cytokines" A. J. of Physiology, 2006-10-12, in press

- Progetto FFC# 14/2004 **"Interaction in vitro between CF pathogens and epithelial cells expressing the CF transmembrane conductance regulator (CFTR)"** P.I. Maria Cristina Dechecchi – Azienda Ospedaliera di Verona (Lab. Patologia Molecolare)

Abstracts
- Dechecchi 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
- Dechecchi 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;
- Dechecchi 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, Hersonissos, Crete, Greece; 22-25 June 2005
- Dechecchi 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;

- Progetto FFC# 15/2004 **"Novel diagnostic and therapeutic approaches for CF"** P.I. Roberto Gambari - Università di Ferrara (Dip. Biochimica e Biol. Molecolare)

Abstracts
- Bezzerri 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
- Lampronti I. et al. "Medicinal plant extracts inhibit the induction of pro-inflammatory genes in bronchial epithelial cells" 21st Annual North American Cystic Fibrosis Conference - Anaheim, October 3-6 2007
- Bezzerri V. et al "Modulation of expression of genes involved in leukocyte chemotaxis by interferring with nuclear transcription factors" 21st Annual North American Cystic Fibrosis Conference - Anaheim, October 3-6 2007

- Progetto FFC# 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**" P.I. Valeria Raia - Università Federico II di Napoli (Dip. Pediatria, Centro Fibrosi Cistica)

Publications
- Raia V. et al. "Inhibition of p38 mitogen activated protein kinase controls airway inflammation in cystic fibrosis" Torax 2005; 60:773-780

- Progetto FFC# 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"** P.I. Andrea Battistoni – Università Tor Vergata – Roma (Dip. Biologia)

Publications
- Berlutti 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" Journal of Immunopathology and Pharmacology, 2007, In press

- Progetto FFC# 16/2006 **"Effect of correctors of defective CFTR on the *Pseudomonas aeruginosa*-dependent inflammatory response in respiratory epithelial cells"** P.I. Maria Cristina Dechecchi – Azienda Ospedaliera di Verona (Lab. Patologia Molecolare)

Publications
- Dechecchi M. C. et al. " MPB-07 reduces the inflammatory response to Pseudomonas aeruginosa in Cystic fibrosis bronchial cells" Am. J Respir Cell Mol Biol 2007;36:615-624

Abstracts
- Dechecchi 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
- Dechecchi M. C. et al. " Correctors of F508del CFTR reduce the inflammatory response to Pseudomonas aeruginosa in CF respiratory epithelial cells" ECFS Conference, Tavira, Algarve (Portugal), April 25-29

5. CFTR PHYSIOPATHOLOGY AND NEW THERAPY

- Progetto FFC#1/2002 **"Mini-chromosomes: a new approach for cystic fibrosis gene therapy"** P.I. Fiorentina Ascenzioni - Univ. La Sapienza, Roma (Dip. Biologia Cellulare e Sviluppo)

Publications
- Auriche C. et al. "Functional human CFTR produced by a stable minichromosome" EMBO Reports 2002; 3:862-868

- Progetto FFC#2/2002 **"Evaluation of efficiency, efficacy and safety of CFTR-gene delivery mediated by lentivirus vectors in model systems of cystic fibrosis airway epithelium"** P.I. Massimo Conese – DIBIT Milano, S. Raffaele (Ist. Terapia Sperimentale CF)

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'eparansolfato" 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 tranfer 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

- Progetto FFC# 1/2003 **"CFTR regulation by protein-protein interactions"** P.I. Valeria Casavola – Università di Bari (Dip. Fisiol. Gen. ed Ambientale)

Publications
- Abrahamsen H. et al. "TCR – and CD28 Mediated Recruitment of Phosphodiesterase 4 to Lipid Rafts Potentiates T Cell Receptor Signaling" J Immunol. 2004; 15:4847-58
- 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 pseudopodial-located rhoA/ROCK/p38/NHE1 signal module regulates invasion in breast cancer cell lines" Molecular Biology of the Cell 2005; 16:3117-3127

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;

- Progetto FFC# 2/2003 **"Activators of the CFTR ionic transport: identification and molecular modelling of the binding sites"** P.I. Oscar Moran – CNR Genova (Istituto di Biofisica)

Publications
- Galietta L. et al. "Identification of CFTR activators and inhibitors: chance or design?" Current opinion in Pharmacology; 2004; 4:497-503
- 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 2005; 62:446-460
- Moran O. et al. "A quantitative description of the activation and inhibition of CFTR by potentiators: Genistein" FEBS Letters 2005; 579:3979-3983

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;

- Progetto FFC# 3/2003 **"Screening of drugs approved for human use to identify novel pharmacological tools for Cystic Fibrosis"** P.I. Luis Galietta – Istituto G. Gaslini – Genova (Lab. Genetica Molecolare)

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 2005; 68:1736-1746
- Pedemonte N. et al. " Small-molecule correctors of defective ΔF508-CFTR cellular processing identified by high-throughput screening" J Clinical Investigation 2005; 115:2564-2571

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 Poster;

- Progetto FFC# 11/2003 **"Pathogenesis and treatment of Cystic Fibrosis-related liver disease"** P.I. Mario Strazzabosco – Ospedali Riuniti di Bergamo (Dip. Med. Specialistica e dei Trapianti)

Publications
- Spirlì 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 2005; 39

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

- Progetto FFC# 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"** P.I. Lisa Bambara - Policlinico, Università di Verona (Medicina Interna B)

Publications
- Scambi C. et al. "Can 5-methyltetrahydrofolate modify the phospholipids fatty acid pattern in cystic fibrosis paediatric patients?" J Cystic Fibrosis 2006; 5:197-199

- Progetto FFC# 2/2004 **"Chemoreceptor mechanism in CFTR expressing cells: molecular bases and role in control of secretion"** P.I. Francesco Osculati, Università di Verona (Dip. Scienze Morfologico Biomol.)

Publications
- Merigo F. et al. " Secretory cells of the airway express molecules of the chemoreceptive cascade" Cell Tissue Res. 2007; 327:231-247

- Progetto FFC# 3/2004 **"Natural and synthetic amino acids as chemical chaperones to promote CFTR folding"** P.I. B. M. Rotoli – Univ. di Parma (Dip. Med. Sperimentale)

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;

- Progetto FFC# 4/2004 **"Role of adenovirus receptors in the activation of mitogen activated protein kinase pathways and nuclear factor – kB in human airways epithelial cells"** P.I. Anna Tamanini –– Azienda Ospedaliera Verona (Lab. Patologia Molecolare)

Publications
- Tamanini A. et al. "Interaction of Adenovirus type 5 fiber with the Coxsackie Adenovirus receptor activates inflammatory response in human respiratory cells" J Virology 2006; 80:11241-11254;

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 – Evora, 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.

- Progetto FFC#1/2005 "Role of the scaffolding protein NHERF in the PKA-mediated regulation of CFTR sorting and activity" P.I. Valeria Casavola - Università di Bari (Dip. Fisiol. Gen. ed Ambientale)

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 2005; 280:40925-40933
- Favia M. et al. "NHE3 inhibits PKA-dependent functional expression of CFTR by NHERF2 PDZ interactions" Biochemical and Biophysical Research Communications 2006;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

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.

- Progetto FFC#2/2005 **"Macrolides and ion transport across CFTR"** P.I. Emanuele Giordano - Istituto Nazionale di Ricerca Cardiovascolare, Università di Bologna

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

- Progetto FFC#4/2005 **"Novel generation lentiviral vectors: evaluation of inflammatory potential in human respiratory cells"** P.I. Giulio Cabrini – Azienda Ospedaliera di Verona (Lab. Patologia Molecolare)

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
- Bezzerri 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

- Progetto FFC#5/2005 **"CFTR gene correction in human embryonic stem cells mediated by Small Fragment Homologous Replacement (SFHR)"** P.I. Federica Sangiuolo – Univ. Tor Vergata – Roma (Dip. Biopatologia e Diagnostica per Immagini)

Publications
- Sangiuolo F. et al. "CFTR gene targeting in mouse embryonic stem cells mediated by small fragment homologous replacement (SFHR)" FBS, 2006, in press

- Progetto Progetto FFC #3/2006 **"Identification, optimization, and validation of potentiators and correctors for the pharmacotherapy of cystic fibrosis"** P.I. JV Luis Galietta - Istituto G. Gaslini - Genova (Lab. Genetica Molecolare)

Publications
- Pedemonte N, et al. "Structure-activity relationship of 1,4-dihidropiridines as potentiators of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. Molec Pharmacol 2007;72:197-2007

- Progetto FFC#4/2006 "Functional and structural basis of the molecular mechanism of CFTR potentiators: towards therapeutic feasible molecules" P.I. Oscar Moran - CNR - Genova (Istituto di Biofisica)

Publications
- O. Zegarrra Moran et al. "Functional analysis of mutations in the putative binding site for CFTR potentiators: interaction between activation and inhibition" The Journal of Biological Chemistry 2007; 282:9098-9104
- L. Ferrera, et al. "Characterization of a 7,8-Benzoflavone Double Effect on CFTR Cl- Channel Activity" J Membrane Biol 2007; epub DOI 10.1007/s00232-007-9066-4

Speciale riconoscimento a cinque ricercatori *FFC Award 2007*

In occasione del decennale della Fondazione il suo Comitato Scientifico ha ritenuto di attribuire uno speciale riconoscimento a cinque ricercatori che si sono particolarmente distinti in ciascuna delle cinque principali aree di ricerca promosse dalla Fondazione dal 2002 al 2007

Cristina Dechecchi (Laboratorio Patologia Molecolare, Az. Ospedaliera-Universitaria di Verona): per i suoi studi mirati al controllo dell'infiammazione in fibrosi cistica

Luis Galietta (Labor. Genetica Molecolare, Ist. G. Gaslini , Genova): per i suoi studi sullo screening di farmaci correttori e potenziatori della proteina CFTR difettosa

Franco Pagani (ICGEB, Padriciano, Trieste): per i suoi studi sui meccanismi e fattori che regolano lo splicing e sulle anomalie dello splicing del gene CFTR

Giovanni Taccetti (Centro Fibrosi Cistica, Ospedale Meyer, Firenze: per i suoi studi clinici sul trattamento precoce dell'infezione da Pseudomonas aeruginosa in fibrosi cistica

Vittorio Venturi (ICGEB, Padriciano, Trieste): per i suoi studi sul "quorum sensing" nei batteri implicati nell'infezione polmonare CF

Laboratori e centri clinici che partecipano a progetti di ricerca FFC

Sono 94 i laboratori e centri clinici che dal 2002 al 2007 hanno partecipato con loro ricercatori ai 97 progetti di ricerca selezionati e finanziati dalla Fondazione. Alcuni laboratori o centri sono stati coinvolti in più progetti.

ABRUZZO
- Dip. Scienze Biomediche, Università "G. D'Annunzio", Chieti
- Dip. Medicina Sperimentale, Università dell'Aquila, L'Aquila

CALABRIA
- Lab. Clinico Patologico, Ospedale di Soverato, Soverato (CZ)

CAMPANIA
- Dip. Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università Federico II, Napoli
- Dip. Pediatria, Università Federico II, Napoli
- Lab. Microbiologia Funzionale, Università Federico II, Napoli
- Dip. Chimica Organica e Biochimica, Università di Napoli
- Dip. Chimica Tossicologica e Farmaceutica, Univ. Federico II, Napoli
- Dip. Farmacologia Sperimentale, Università di Napoli

EMILIA ROMAGNA
- Plesso bio-tecnologico integrato, Università di Parma, Parma
- Dip. Pediatria, Parma
- Dip. Biochimica e Biologia Molecolare, Università di Ferrara, Ferrara
- Dip. Biochimica, Istituto Nazionale Ricerca Cardiovascolare, Università di Bologna e Cesena
- Dip. Tecnologie analitiche avanzate Università, Piacenza

FRIULI VENEZIA GIULIA
- International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB) Trieste
- Dip. Scienze della Riproduzione e dello Sviluppo, Università di Trieste, I.R.C.C.S. Burlo Garofolo, Trieste
- Dip. Biochimica, Biofisica e Chimica Macrocellulare, Università di Trieste
- Dip. Scienze Biomediche, Università di Trieste

LAZIO
- Dip. Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Università La Sapienza, Roma
- Dip. Biopatologia e Diagnostica per Immagini, Università Tor Vergata, Roma
- Dip. 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. Fisiopatologia Medica, Università La Sapienza, Roma
- Dip. Biotecnologie, protezione della salute e degli ecosistemi, ENEA Casaccia, S. Maria di Galeria, Roma
- Lab. Microbiologia, Ospedale Bambin Gesù, Roma
- Lab. Microbiologia Molecolare, Università La Sapienza, Roma
- Istituto di Microbiologia, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma
- Dip. Microbiologia, Università di Roma 3, Roma
- Dip. Salute Pubblica e biologia cellulare, Università Tor Vergata, Roma
- Dip. Pediatria, Centro Reg. Fibrosi Cistica, Roma
- Dip. Neuroscienze Sperimentali, Fondazione S. Lucia, Roma

LIGURIA
- Istituto di Biofisica, CNR, Genova
- Dip. Scienze Farmaceutiche, Università di Genova, Genova
- Lab. Fisiopatologia dell'Uremia,, Istituto G. Gaslini, Genova
- Lab. Genetica umana E.O. Ospedali Galliera, 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
- Centro Fibrosi Cistica, Istituto G. Gaslini, Genova
- Sezione di Epidemiologia e Biostatistica, Istituto G. Gaslini, Genova
- Dip. Scienze Sperimentali, Istituto G. Gaslini, 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
- Lab. Genetica Medica A.O. Istituti Clinici di Perfezionamento, Milano
- Dip. Scienze Biomolecolari e Biotecnologie, Università degli Studi di Milano, Milano
- Dip. Genetica e Microbiologia, Università di Pavia, Pavia
- Dip. Pediatria, Centro Fibrosi Cistica, Fondazione IRCCS, Policlinico Mangiagalli e Regina Elena, Milano
- Lab. 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. Ricerca Clinica, Istituto per la Ricerca Farmacologica "M. Negri", Milano
- Dip. Chimica Organica ed Industriale, Università di Milano
- Dip. Scienze Molecolari Agroalimentari, Università di Milano

MARCHE
- Centro Fibrosi Cistica, Ospedale dei Bambini, Ancona

PIEMONTE
- Centro FC Adulti Divisione Malattie Respiratorie, Dip. Scienze Biologiche e Cliniche, Università di Torino, Ospedale S. Luigi Gonzaga, Orbassano (TO)
- Dip. Genetica, Biologia e Biochimica, Università di Torino,Torino
- Dip. Patologia Clinica, S.S. Diagnostica Molecolare e Test Genetici Integrati, Università diTorino

PUGLIA
- Dip. Fisiologia Generale ed Ambientatale, Università di Bari, Bari
- Servizio Fibrosi Cistica, Ospedale di Cerignola, Cerignola
- Dip. Scienze Biomediche, Università di Foggia

SARDEGNA
- Dip. Scienze biomediche e biotecnologie, Lab. Genetica Molecolare, Ospedale Reg. Microcitemie, Cagliari
- Dip. Tossicologia, Sez. Patologia e Oncologia Molecolare, Università di Cagliari

SICILIA
- Istituto di Biofisica, CNR, Palermo
- Centro Fibrosi Cistica, Policlinico, Messina,
- Centro Regionale FC, Ospedale dei Bambini "G. Di Cristina", Palermo

TOSCANA
- Dip. Biologia Animale e Genetica, Università di Firenze, Firenze
- Lab. Proteomica Funzionale, Dip. Biologia Molecolare, Università di Pisa, Pisa
- Dip. Pediatria, Centro Fibrosi Cistica, Ospedale Meyer, Firenze
- Servizio Fibrosi Cistica, Ospedale di Livorno, Livorno
- Dip. Patologia Sperimentale, Biotecnologie Mediche, Infettivologia ed Epidemiologia, Università di Pisa, Pisa
- Unità Bioinformatica, Centro di Ricerche Chiron, Siena
- Dip. Biologia Molecolare, 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. patologia, Sezione immunologia, Università di Verona, Verona
- Sezione di Anatomia ed Istologia, Dip. Scienze Morfologico, Biomediche, Università di Verona, Verona
- Lab. Patologia Molecolare, Centro Fibrosi Cistica, Verona
- Dip. Materno ed Infantile, Biologia Genetica, Università di Verona, Verona
- Dip. Scienze Biomediche e Chirurgiche, Divisione di Nefrologia, Università di Verona, Verona
- Dip. Patologia, Università di Verona, Verona
- Lab. microbiologia, Istituti Ospitalieri, Verona
- Facoltà di Scienze della Formazione, Università di Verona, Verona
- Dip. Scienza e Tecnologia del Farmaco, Università di Verona, Verona
- Dip. Scienze Farmaceutiche, Università di Padova
- Dip. Chimica Biologica, Università di Padova

CANADA
- Dip. Microbiologia e Immunologia, University of Western Ontario

FRANCIA
- Istituto di fisiologia e biologia cellulare, Università di Poitiers

GERMANIA
- Istituto di Microbiologia Medica ed Igiene, Università di Tuebingen

I 133 ESPERTI INTERNAZIONALI CHE HANNO COLLABORATO PER L'ANALISI / VALUTAZIONE DEI PROGETTI FFC

EUROPA

Italia
Fabrizio De Ponti
Antonio De Flora
Silvio Garattini
Marco Trabucchi
Marco Lucarelli

Spagna
Raquel Barrio
Xavier Estivill

Regno Unito
Marina Botto
Jane Davies
Glenda Esmond
Uta Griesenbach
Maurice Hallett
Anna Harris
Andrew Jones
Robert Newton
Martin Savage
David Sheppard
Maurice Super
Andrew Bush
Steven Conway
John Govan
Gary Mansfield
Tyrone Pitt
Alistair Duff
Claire Glasscoe
Michael Gray
Robert Dormer

Francia
Christine Linard
Juliet Royet
Frederic Becq
Alexander Edelman
Claude Ferec
Vincent Goffin
Emanuelle Girodon
Alain Filloux

Belgio
Tom Coenye
Harry Cuppens
Peter Vandamme
Karim Amighi
Ingeborg Liebaers
Jean Jacques Cassiman

Svizzera
Hans Peter Fisher
Leo Eberl

Germania
Matthias Griese
Felix Ratjen
Christoph Freiberg
Karl Kunzelmann
Stefan Stamm
Burkhard Tuemmler
Robert Bals
Erick Gulbins
Dieter Jahn
Gratiana Steinkamp
Gerd Doering

Danimarca
Niels Hojby
Christian Koch

Olanda
Peter Klijn
Lidewji Henneman
Bernt Van Der Blink

Portogallo
Margarida Amaral

Svezia
Ute Romling
Birgitta Strandvik

U.S.A.

Washington
Moira Aitken
Jane Burns

Missouri
Carolyn Cannon

Colorado
Brian Doctor
Herbert Schweizer
Frank Accurso
Madi Reddy

Indiana
Roman Dziarski
Won Kyoo Cho

Illinois
Lee Shulman
Jerrold Turner

Wisconsin
Philip Farrel

Massachussetts
Steven Freedman
Robert Kolter
Brady Joyce Marty
John Ladias
Gerald Pier
Charles Serhan

Kansas
John Gatti

Virginia
Joanna Goldberg
David Goldfarb

Ohio
Scott Herness
Lloyd Horrocks
Michael Konstan
Melvin Berger
James Chmiel
Valerie Hudson
Christopher Karp

North Carolina
Michael Knowles
John Riordan

California
Ron Kopito
Jeffrey Wine
Alan Verkman
Richard Moss
Andrew Sandford
MM Reddy

Minnesota
Antoinette Moran

Maryland
Jonathan Orens
Gary Cutting
William Guggino
Pamela Zeitlin

Maine
Robert Owens

Florida
Alexandra Quittner
Alexander Cole

Alabama
Lisa Schwiebert
Raymond Frizzell

Iowa
Joseph Zabner
Dwight C. Look

New York
Stefan Worgall
Alice Prince
Lisa Saiman

Louisiana
Wang Guoshun

Texas
Philip Thomas

Pennsylvania
Douglas Wilson

Tennessee
John Christman

CANADA
Peter Durie
Paul Pencharz
Pamela Sokol
Julian Zielensky
Aaron Shawn
Adré Cantin
Roger Levesque
David Speert
Herman Yeger

COSTA RICA
Arturo Solis

ISRAELE
Batsheva Kerem

HONG KONG
Dennis Lo Yuk Ming

INDIA
Amit Misra

AUSTRALIA
Tim Kidd
John Mattick
Cynthia Withchurch

Attraverso bandi annuali di concorso pubblico, sono pervenuti alla Fondazione, dal 2002 al 2007, 213 progetti di ricerca CF, tra i quali 97 sono stati selezionati per un finanziamento.

133 esperti ricercatori 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 ed alcuni esperti hanno valutato più progetti.

Ai 133 ricercatori che hanno svolto questo prezioso servizio la Fondazione porge un particolare sentito ringraziamento

Here the list of the 133 international experts that cooperated with FFC to review and to evaluate the grant proposals

Through annual public announcements issued between 2002 and 2007, the Italian CF Research Foundation received 213 grant proposals. Among those, 97 have been selected for funding

133 researchers, coming from several countries, cooperated with Scientific Committee of the Foundation to review the projects received: each project has been evaluated by at leas two experts and some experts evaluated more than one project.

To those 133 researchers, who carried out such a precious job, the Foundation expresses its warmest thank

PROGETTI FFC ADOTTATI

Dei 97 progetti selezionati e finanziati dalla Fondazione FFC dal 2002 al 2007, 66 sono stati adottati, totalmente o parzialmente, da Aziende, Fondazioni Bancarie, Associazioni FC, Delegazioni FFC, Scuole e Privati. Di seguito, la lista dei progetti adottati e di coloro che li hanno fatti propri, con un grazie particolare della Fondazione.

FFC #1/200 - Minicromosomi: un nuovo approccio per la terapia genica della Fibrosi Cistica.
Responsabile: Fiorentina Ascenzioni (Univ. La Sapienza - Roma);
Costo: 131.000 Euro.
Adottato totalmente da:
La Bottega delle donne - Delegazione FFC di TV

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

FFC #12/2004 - **Resistenza antimicrobica in ceppi di Burkholderia cepacia complex isolati da pazienti fibrocistici: identificazione, caratterizzazione e ruolo dei trasportatori di efflusso nella resistenza intrinseca ed acquisita ai farmaci**.
Responsabile Giovanna Riccardi
(Dip. Genetica e Microbiol. - Univ. Pavia);
Costo: 18.000 Euro.
Adottato totalmente da:
Mauro Furlini e Sigg. Zini (14.600 Euro)
e Delegazione FFC Trento (5.400 Euro)
in ricordo di "Sara"

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

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

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

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

FFC #18/2004 - **Eradicazione precoce di Pseudomonas aeruginosa e sua successiva colonizzazione in pazienti con fibrosi cistica**.

Responsabile Giovanni Taccetti
(Centro Fibrosi Cistica - Osp. A. Meyer, Firenze);
Costo: 15.000 Euro.
Adottato totalmente da: Milior S.p.A. - Prato

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

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

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

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

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

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

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

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

FFC # 8/2005 - Tipizzazione molecolare (studio del DNA) di ceppi di Pseudomonas aeruginosa isolati da pazienti italiani FC e loro comparazione con profili presenti nel "database europeo" di ceppi clinici e ambientali.
Responsabile: Graziana Manno
Lab. Microbiologia; Istituto G. Gaslini, Genova
Costo: 30.000 Euro.
Adottato totalmente da: Aziende Prov. di FE e BO (20.650 Euro)
(*) Delegazione FFC di Ferrara (5.850 Euro)
In Job Verona (3.500 Euro)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

FFC #1/2006
Nuove strategie di trasferimento intracellulare di farmaci per

la correzione del genotipo DF508-CFTR
Responsabile: Marco Colombatti (Dip. Patologia, Università di VR)
Costo: € 30.000
Adottato parzialmente da: Loifur Srl Mason Vicentino (€ 10.000), Kiwanis Club Prato (€ 20.000)

FFC #2/2006
Migrazione di cellule staminali corrette nel polmone di topi con fibrosi cistica e recupero dell'attività funzionale di CFTR: ruolo del metabolismo energetico.
Responsabile: Massimo Conese
(Istituto Trattamento Sperimentale della Fibrosi Cistica – Ospedale S. Raffaele, Milano)
Costo: 35.000 €
Adottato totalmente da: Donatori Campagna SMS 2006

FFC #3/2006
Identificazione, ottimizzazione e convalidazione di composti chimici per la terapia farmacologia della fibrosi cistica.
Responsabile: Luis Galietta (Istituto G. Gaslini - Laboratorio Genetica Molecolare – Genova)
Costo: € 60.000
Adottato totalmente da:
Delegazione FFC "La Bottega delle Donne" Montebelluna (TV)

FFC #4/2006
Basi funzionali e strutturali del meccanismo molecolare dei potenziatori della CFTR: verso molecole potenzialmente terapeutiche.
Responsabile: Oscar Moran (Istituto di Biofisica, CNR, Genova)
Costo: € 45.000
Adottato parzialmente da:
Gruppo Progetto Madri per la Ricerca (€ 24.450), Delegazione FFC di Bologna (€ 20.550)

FFC #5/2006
Meccanismi di reclutamento di cellule staminali derivate dal midollo osseo nell'epitelio polmonare normale o affetto da fibrosi cistica.
Responsabile: Roberto Loi
(Università di Cagliari - Dip. Tossicologia - Sez. Patologia e Oncologia Molecolare)
Costo: € 30.000
Adottato totalmente da: Calzedonia S.p.a.

FFC #6/2006
Identificazione genomica di target batterici per disegnare nuovi antibiotici contro i batteri patogeni correlati alla fibrosi cistica.
Responsabile: Giovanni Bertoni
(Università di Milano - Dip.to Scienze Biomolecolari e Biotecnologie)
Costo: € 25.000
Adottato totalmente da:Gruppo Aziende Ferraresi e Bolognesi Delegazione FFC di Ferrara, Gruppo di sostegno FFC Comacchio

FFC #7/2006
Influenza di Pseudomonas aeruginosa e dell'ospite FC sulla patogenicità di Burkholderia cenocepacia.
Responsabile: Annamaria Bevivino
(ENEA Casaccia - Dip.to Biotecnologie, Roma)
Costo: € 35.000
Adottato totalmente da: Delegazione FFC di Latina

FFC #8/2006
Analisi del genoma di Pseudomonas aeruginosa per l'identificazione di bersagli utili per lo sviluppo di una nuova terapia immunitaria.
Responsabile: Alessandra Bragonzi
(Istituto Trattamento Sperimentale della Fibrosi Cistica, Ospedale S. Raffaele, Milano)
Costo: € 40.000
Adottato parzialmente da:
Antonio Guadagnin & Figlio Srl – Montebelluna (€ 8.000) e Sig. Martinelli Giovanni Pietro Almè (Bergamo) (€ 8.000)

FFC #9/2006
Uno screening biologico per nuove classi di agenti antimicrobici contro Pseudomonas aeruginosa inibitori dei segnali cellulari che presiedono alla formazione del biofilm.
Responsabile: Paolo Landini (Università di Milano - Dip.to Scienze Biomolecolari e Biotecnologie)
Costo: € 30.000
Adottato totalmente da:
Delegazione FFC di Belluno e Gruppo Rocciatori di Belluno

FFC #10/2006
Ruolo delle pompe di efflusso RND di Burkholderia cenocepacia nella resistenza intrinseca agli antibiotici.
Responsabile: Giovanna Riccardi
(Università di Pavia - Dip.to Genetica e Microbiologia)
Costo: € 25.000
Adottato totalmente da: Delegazione FFC del Lago di Garda

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

FFC #13/2006
Identificazione di ceppi di Burkholderia cepacia mediante sistema SNP.
Responsabile: Renato Fani (Università di Firenze - Dip.to Biologia Animale e Genetica)
Costo: € 15.000
Adottato totalmente da: For me Srl - Prato

FFC #14/2006
Studio longitudinale sulla selezione ed evoluzione dei meccanismi di resistenza di Pseudomonas aeruginosa in relazione al trattamento antibiotico in pazienti con fibrosi cistica.
Responsabile: Anna Silvia Neri (Ospedale Meyer - Centro FC, Dip.to Pediatria – Firenze)
Costo: € 20.000
Adottato totalmente da:
Sig. Roberto Danieli (Asolo TV);
Sig. Alberto Vaccari (Thiene VI);
Sig. Antonio Pavan (Costabissara VI)

FFC#15/2006
Contributo delle alterazioni nell'omeostasi dei metalli e del glutatione alle infezioni tipiche della fibrosi cistica ed esame del possibile ruolo protettivo della lactoferrina e di antiossidanti.
Responsabile: Andrea Battistoni
(Università Tor Vergata – Dip. Biologia – Roma)
Costo: € 40.000
Adottato parzialmente da:
MCC SPA – Capitalia (€ 8.000)
Delegazione FFC Roma 2 (€ 32.000)

FFC#16/2006
Effetto di correttori del difetto di maturazione di CFTR sulla risposta infiammatoria all' infezione da Pseudomonas aeruginosa in cellule epiteliali respiratorie.
Responsabile: Maria Cristina Dechecchi
(Laboratorio di Analisi Chimico Cliniche ed Ematologiche, Ospedale Civile Maggiore, Verona)
Costo: € 43.000
Adottato totalmente da:
Associazione Veneta FFC

FFC#17/2006
Ruoli non antibiotici dell'azitromicina: rilevanza per la terapia della fibrosi cistica.
Responsabile: Paola Melotti (Centro Fibrosi Cistica, Ospedale Civile Maggiore, Verona)
Costo: € 30.000
Adottato parzialmente da:
"In Job Verona" con "Printing Informa-house Organ" di Mondadori Printing (€ 10.000),

Delegazione FFC di Molfetta (€ 8.000),
Gruppo di Sostegno FFC "Rita Callegari" (€ 8.000)

FFC #18/2006

Nuove acquisizioni sull'insulino-resistenza nella fibrosi cistica: l'effetto delle citochine.
Responsabile: Sergio Bernasconi
(Università di Parma - Dip.to Pediatria)
Costo: € 20.000
Adottato totalmente da: Intreco Spa Ponzano Veneto

FFC #19/2006
Prolungamento della durata delle agocannule utilizzate per i cicli antibiotici endovenosi da parte di pazienti adulti con fibrosi cistica. Studio randomizzato controllato sull'effetto di differenti concentrazioni di antibiotico in soluzione fisiologica.
Responsabile: Filippo Festini (Università di Firenze; Ospedale Meyer; Dip.to Pediatria)
Costo: € 10.000 Adottato totalmente da: Furla Spa Bologna

FFC #20/2006
Prevenzione delle esacerbazioni polmonari in pazienti con fibrosi cistica attraverso modulazione della flora batterica intestinale.
Responsabile: Alfredo Guarino
(Università Federico II di Napoli, Dip.to Pediatria)
Costo: € 20.000
Adottato totalmente da: Latteria Montello (TV)

FFC #21/2006
Efficacia di insulina a lento rilascio (glargine) nei pazienti affetti da Fibrosi Cistica e da intolleranza al glucosio con decadimento clinico.
Responsabile: Laura Minicucci (Istituto G. Gaslini - Dip.to Pediatria - Centro FC, Genova)
Costo: € 25.000
Adottato totalmente da: Delegazione FFC di Bologna

FFC #22/2006
Ruolo di polimorfismi a carico di geni dell'immunità innata nella modulazione della malattia polmonare in pazienti affetti da fibrosi cistica.
Responsabile: prof. Paolo Gasparini
(Università di Trieste - Dip.to Scienze dello Sviluppo e Riproduttive)
Costo: € 30.000
Adottato parzialmente da: GVS Spa Zola Predosa (Bo) (€ 10.000), Delegazione FFC di Avellino (€ 15.000)

FFC #23/2006
Cause, evoluzione e sviluppo dei polipi nasali: il ruolo dei geni modificatori ed un nuovo approccio mediante la tecnica di CGH array.
Responsabile: Giuseppe Novelli (Università Tor Vergata, Dip.to Biopatologia e Diagnostica per Immagini, Roma)
Costo: € 20.000 Adottato totalmente da:
Christopher Ricardo Cystic Fibrosis Foundation (Pa, USA)

FFC #24/2006
Caratterizzazione e ruolo patogenetico di mutazioni sconosciute in pazienti FC italiani: un requisito essenziale per la prevenzione della fibrosi cistica attraverso lo screening del portatore e la diagnosi prenatale.
Responsabile: Maria Cristina Rosatelli
(Università di Cagliari; Laboratorio Genetica Molecolare)
Costo: € 30.000 Adottato totalmente da: Silvana Ratti di Pesaro

FFC #4/2007 Ruolo della proteinchinasi CK2 nella patogenesi della fibrosi cistica
Responsabile: Lorenzo Pinna (Università Padova – Dip. Chimica Biologica) Costo: € 35.000
Adottato parzialmente da: Banco Popolare di Verona e Novara (€ 20.000)

FFC #6/2007
Caratterizzazione di un target di superficie in Pseudomonas aeruginosa per il disegno razionale di nuove molecole antibiotiche
Responsabile: Francesco Bonomi (Università di Milano - Dip. Scienze Molecolari Agroalimentari)
Costo: € 77.000
Adottato totalmente da: Delegazione FFC di Vicenza

FFC #7/2007
Stenotrophomonas maltophilia, un patogeno emergente ed antibiotico-resistente associato alla fibrosi cistica: un approccio post-genomico verso l'identificazione di nuovi bersagli immunologici e terapeutici
Responsabile: Bianca Maria Colonna (Università La Sapienza - Roma, Dip. Biologia Cellulare e dello Sviluppo)
Costo: € 44.000
Adottato parzialmente da:
Vicenzi Biscotti Spa S. Giovanni Lupatoto (€ 8.000)

FFC #11/2007
Stafilocco aureo meticillino resistente (MRSA) acquisito in comunità e MRSA acquisito in ospedale in pazienti affetti da fibrosi cistica: studio multicentrico su suscettibilità antibiotica, epidemiologia locale e globale, storia naturale e rilevanza clinica
Responsabile: Silvia Campana
(Centro Fibrosi Cistica - Ospedale Meyer - Firenze)
Costo: € 25.000
Adottato totalmente da: Famiglia Riggi (Milano) a ricordo di Giulia

FFC #12/2007
Pseudomonas Aeruginosa in pazienti FC: studio multicentrico di sorveglianza epidemiologica molecolare.
Responsabile: Graziana Manno
(Istituto Gaslini, Genova)
Costo: € 34.000
Adottato parzialmente da: Delegazione FFC di Rovigo (€ 10.000)

FFC #15/2007 Meccanismi della risoluzione della risposta infiammatoria nella fibrosi cistica
Responsabile: Mario Romano
(Università di Chieti – Dip. Scienze Biomediche)
Costo: € 45.000
Adottato totalmente da: SKY Italia Spa

FFC #16/2007
Controllo e prevenzione delle infezioni respiratorie nel paziente affetto da Fibrosi Cistica: valutazione della distanza di emissione di Pseudomonas aeruginosa dalle vie respiratorie di persone infette, attraverso la tosse e la conversazione
Responsabile: Cesare Braggion (Ospedale Meyer Centro Regionale Toscano FC, Dip.to Pediatria, FI)
Costo: € 10.000
Adottato totalmente da:
Gruppo di Sostegno FFC "Associazione Trentina FC"

FFC #18/2007
Depressione e ansia nei pazienti FC e nei loro curanti: ruolo nell'aderenza alle cure, negli esiti clinici e nella qualità di vita.
Responsabile: Paola Catastini - Centro FC Firenze
Costo: € 7.000
Adottato totalmente da: Delegazione FFC di Vittoria - Ragusa

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

- Zagatti Wiliam snc • Ferramenta Chendi snc
- Moda Service sas di Argentesi • Trw Automotive Italia S.p.A.
- L.T.E. Lift Truck Equipment S.p.A.
- Officine Meccaniche Sirio srl
- G.R.B. S.p.A. • H.T.S. High Technology Services
- Credibo • OMI • ASA • Emporio Marangoni
- Ristorante La luna nel pozzo • Villa Belfiore • Verde Delta
- Comune di Migliarino • Comune di Ostellato
- Pro loco di Ostellato

(**) **Istituti scolastici veronesi**

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

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

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

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

Consiglio di Amministrazione

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

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

Comitato di Consulenza Scientifica

Presidente:	Antonio Cao
Consiglieri:	Giorgio Berton
	Roberto Buzzetti
	Lucio Luzzatto
	Gerd Doering

Per donazioni:

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

www.fibrosicisticaricerca.it

Impaginazione:
Paolo Tosi

Copertina:
Giovanna Dolfini

Stampato il 20 ottobre 2007
Tipolitografia Artigiana
S. Giovanni Lupatoto (VR)

10 anni
per la ricerca
1997 - 2007

fondazione per la ricerca
sulla fibrosi cistica - onlus

Ospedale Maggiore - Piazzale Stefani, 1 - 37126 Verona
tel. 045 8123438 - fax 045 8123568

e-mail: fondazione.ricercafc@azosp.it
www.fibrosicisticaricerca.it