Fondazione per la ricerca sulla fibrosi cistica
Ospedale Maggiore, P.le Stefani 1, 37126 Verona
tel. 045 8123438 - fax 045 8123568
e-mail: fondazione.ricercafc@azosp.vr.it
www.fibrosicisticaricerca.it

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

6ª CONVENTION D'AUTUNNO DEI RICERCATORI IN FIBROSI CISTICA

Convention of Investigators in Cystic Fibrosis

Verona, 14-15 Novembre 2008

Dal laboratorio al malato - From bench to bedside

VI Convention d'Autunno dei Ricercatori in Fibrosi Cistica

VI Italian Convention of Investigators in Cystic Fibrosis

Verona, 14 - 15 Novembre 2008
Centro Culturale "G. Marani", Ospedale Maggiore

Presentazione dello stato di avanzamento dei progetti finanziati dalla Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica 2006 - 2008
Work progress of projects funded by FFC 2006-2008

- **Fisiopatologia della proteina CFTR e terapie del difetto di base**
  Pathophysiology of CFTR protein & therapies of the basic defect
- **Genetica - *Genetics***
- **Microbiologia - *Microbiology***
- **Infiammazione - *Inflammation***
- **Ricerca clinica / epidemiologica - *Epidemiology & Clinical research***

fondazione per la ricerca sulla fibrosi cistica - onlus

Italian CF Research Foundation

Verona, Novembre 2008

Indice - Index

Introduzione - *Introduction* ..... *pag. 5*

Sommari delle presentazioni – *Presentation abstracts*

1. FISIOPATOLOGIA DELLA PROTEINA CFTR E TERAPIE DEL DIFETTO DI BASE *Pathophysiology of CFTR protein & therapy of the basic defect*

L. Galietta. Introduzione: bilancio e prospettive – *Introduction: balance and perspectives* *pag. 6*

1. **Norez C, Pasetto M, Dechecchi MC, Barison E, Anselmi C, Quiri F, Zonari D, Cerutti E, Dosio F, and Cabrini G, and Colombatti M.** *Novel methods of intracellular delivery of ΔF508-CFTR correctors (Prog. FFC#1/2006 in progress)* *pag. 7*
2. **Pedemonte N , Caci E , Caputo E , Sondo E, Boido D , Moran O, Giampieri M , Mazzei M, Zegarra-Moran O, Galietta LJV.** *Identification, optimization, and validation of potentiators and correctors for the pharmacotherapy of cystic fibrosis (Prog. FFC #3/2006 in progress)* *pag. 7*
3. **Moran O, Galfrè E, Ferrera L, Dimasi N, Galietta LJV, Melani L, Zegarra-Moran O, Longo A, Bisigano P.** *Functional and structural basis of the molecular mechanism of CFTR potentiators: towards therapeutic feasible molecule (Prog. FFC #4/2006 e FFC #2/2008, continuation)* *pag. 8*
4. **Luini A, Parashuraman S, Bao Cutrona M.** *Organisation and regulation of the secretory trafficking of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator CFTR and of its pathogenic mutant DF508-CFTR (Prog. FFC# 1/2008, new)* *pag. 9*
5. **Ballerini P, Giuliani P, D'Alimonte I, Buccella S, Nargi E.** *Guanine-based purines and cystic fibrosis: molecular mechanisms for a potential new pharmacological approach. (Prog. FFC #1/2007, in progress)* *pag. 10*
6. **Casavola V, Conese M.** *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, in progress)* *pag. 11*
7. **Mazzei M, Melloni E, Moro S, Galietta LJV.** *Computational design, biochemical study, synthesis and screening of pharmacological chaperones as correctors of δf508-CFTR (Prog. FFC #3/2007, in progress)* *pag. 12*
8. **Pagano MA, Marin O, Arrigoni G, Sarno S, Meggio F, and Pinna LA.** *Activation of protein kinase CK2 by a CFTR fragment is enhanced by the pathogenic F508 deletion. (Prog. FFC#4/2007, in progress)* *pag. 13*
9. **Loi R.** *Mechanisms of recruitment of adult bone marrow-derived cells to normal and cystic fibrosis airway epithelium. (Prog. FFC #5/2006, concluded)* *pag. 13*

2. GENETICA – *Genetics*

A Cao. Introduzione: bilancio e prospettive – *Introduction: balance and perspectives* *pag. 15*

10. **Gasparini P, Cabrini G.** *Genetic factors involved in the innate immunity influencing pulmonary disease in Cystic Fibrosis patients. (Prog. FFC 22/2006 e FFC#3/2008, continuation)* *pag. 16*
11. **Castaldo G, Cardillo G, Elce A, Tomaiuolo R.** *Molecular analysis of genes encoding CFTR interactors of SLC26 family in CF patients (Prog. FFC #19/2007, in progress)* *pag. 16*
12. **Goina E, Talotti G, Ubby I, Bussani E, Pagani F.** *Evaluation of disease-causing mutations in CFTR co-transcriptional splicing units (Prog. FFC #20/2007, in progress)* *pag. 18*
13. **Pucci P, Tomaiuolo R, Bombieri C.** *Search of novel regulatory elements in the promoter region of CFTR gene (Prog. FFC #4/2008, new)* *pag. 18*
14. **Novelli G, Pignatti PF, Strom R.** *Causes, evolution and progression of nasal polyps: role of modifier genes and a new approach through CGH array (Prog. FFC #23/2006, concluded)* *pag. 19*
15. **Rosatelli MC, Baffico M, Castellani C, Seia M, Torricelli F, Santostasi T, Faa V.** *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, concluded)* *pag. 20*
16. **Rosatelli MC.** *Feasibility of a screening program for the preconceptional identification of Cystic Fibrosis carriers in Sardinian population (Prog. FFC #5/2008, new)* *pag. 21*

3. MICROBIOLOGIA I – *Microbiology I*

G. Doering, Introduzione: microbiologia di base e genetica – *Introduction: basic and genetic microbiology - italian highlights* ***pag. 22***

17. Bertoni G, Milani A, Pavesi G, Dehò G, Bragonzi A, Montanari S, Maiorana S, Licandro E, Baldoli C. *Genome–wide identification of target genes for the design of non–conventional antibiotics against CF related pathogens. Design of non-conventional antibiotics against cystic fibrosis-related pathogens. (Prog. FFC #6/2006 e FFC#6/2008, continuation)* ***pag. 23***

18. Bragonzi A, Bianconi I, Bertoni G, Milani A, Renzi F, Scarselli M. *A genome-wide approach to the identification of novel targets for immuno-antibacterials in Pseudomonas aeruginosa (Project FFC #8/2006, concluded)* ***pag. 23***

19. Landini P, Bernardi A, Seneci P. *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, concluded)* ***pag. 24***

20. Bonomi F, Iametti S, Bertoni G, Milani A, Cisbani G. *Dissecting a surface target candidate for the rational design of novel antibacterial drugs against Pseudomonas aeruginosa (Prog. FFC#6/2007, in progress)* ***pag. 25***

21. Polissi A, Dehò G, De Castro C, Bolognesi M, Cipolla L, De Gioia L. *Essential proteins of Pseudomonas aeruginosa outer membrane biogenesis as novel targets for new anti-microbial drugs design and synthesis (Prog FFC #10/2008, new)* ***pag. 25***

22. Colonna B, Sanguinetti M, Nicoletti M, Casalino M, Fiscarelli E. *Stenotrophomonas maltophilia, a multidrug resistant emergent pathogen associated to cystic fibrosis: a post genomic approach to identify new immunological and therapeutical targets (Prog. FFC # 7/2007, in progress)* ***pag. 26***

23. Manno G. *Multicenter study on molecular epidemiology of Pseudomonas aeruginosa, and prevalence of antimicrobial resistance phenotypes (Prog. FFC#12/2007, concluded)* ***pag. 27***

24. Neri AS, Rossolini GM. *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 e FFC#9/2008, continuation)* ***pag. 29***

4. MICROBIOLOGIA II – *Microbiology II*

25. Molinaro A, Bernardini ML. *Biochemical adaptation by Pseudomonas aeruginosa to the airways of cystic fibrosis patients (Prog. FFC #8/2007, in progress)* ***pag. 29***

26. Visca P, Imperi F, Tiburzi F, Leoni L, Zennaro E, Rampioni G. *Iron uptake and quorum sensing in Pseudomonas aeruginosa virulence (Prog. FFC #10/2007, in progress)* ***pag. 30***

27. Leoni L, Visca P. *Development and validation of a novel screening system for the identification of Pseudomonas aeruginosa virulence inhibitor. (Prog. FFC #8/2008, new)* ***pag. 30***

28. Bevivino A, Ascenzioni F, Bragonzi A. *Influence of Pseudomonas aeruginosa and CF host on Burkholderia cenocepacia pathogenicity. (Prog. FFC #7/2006 concluded). Burkholderia cenocepacia pathogenicity: synergistic interactions with Pseudomonas aeruginosa and adaption to CF host (FFC# 7/2008, continuation)* ***pag. 31***

29. Rizzo R, Molinaro A, Tonin EA. *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, concluded)* ***pag. 32***

30. Riccardi G, Buroni S, Valvano M. *The role of RND drug efflux transporters in the intrinsic antibiotic resistance in Burkholderia cenocepacia (Prog. FFC #10/2006, concluded)* ***pag. 33***

31. Venturi V. *Burkholderia cepacia complex: closing down on the major virulence factors (Prog. FFC #9/2007, in progress)* ***pag. 33***

32. Campana S. *Community-acquired MRSA and hospital-acquired MRSA in cystic fibrosis patients: a multicenter study regarding antibiotic susceptibility, epidemiology, natural history and clinical relevance (Prog. FFC #12/2006 e #11/2007, concluded)* ***pag. 34***

5. INFIAMMAZIONE – *Inflammation*

G. Berton. Introduzione: bilancio e prospettive – *Introduction: balance and perspectives* ***pag. 36***

33. Romano M, Battistini L, Furnari ML. *Mechanisms of inflammation resolution in cystic fibrosis (Prog. FFC #15/2007, in progress)* ***pag. 37***

34. Dechecchi MC, Becq F, Gambari R. *Effect of correctors of defective CFTR on the Pseudomonas aeruginosa-*

dependent inflammatory response in respiratory epithelial cells (Prog. FFC #16/2006, concluded) ***pag. 38***

35. Dechecchi MC, Gambari R. *Anti-inflammatory effect of miglustat: sphingolipid ceramide metabolism as a therapeutic target for CF lung disease (Prog. FFC #12/2008, new)* ***pag. 39***

36. Melotti P, Mauri P, Sorio C. *Roles of azithromycin other than bactericidal: relevance for therapy of cystic fibrosis (Prog. FFC #17/2006, concluded)* ***pag. 39***

37. Leal T, Mauri P, Sorio C. *Effects of azithromycin (AZM) on Pseudomonas aeruginosa-induced chronic lung inflammation in cystic fibrosis (Prog. FFC #15/2008, new)* ***pag. 40***

38. Del Porto P, Ascenzioni F, Quattrucci S. *Influence of CFTR mutations in bactericidal activity of human macrophages (Prog. FFC #14/2007, in progress)* ***pag. 41***

39. Cabrini G, Gambari R. *A gene-targeted anti-inflammatory approach based on the Transcription Factor "decoy" strategy (Progetto FFC# 13/2007, in progress)* ***pag. 41***

40. Battistoni A, Berlutti F. *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 concluded). Effect of glutathione and lactoferrin on redox regulation, metal homeostasis and inflammatory responses of Cystic Fibrosis bronchial cells upon infection with Burkholderia cenocepacia. (Prog. FFC#11/2008, continuation)* ***pag. 42***

41. Quaglia F, Carnuccio R. *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, in progress)* ***pag. 43***

42. Galli F, Iuliano L, Schock CB, Goracci GF. *Pre-clinical evaluation of new vitamin E-based anti-inflammatory agents in CF (Prog. FFC#13/2008, new)* ***pag. 44***

43. Garlanda C, Bragonzi A, Moalli F. *Infections in cystic fibrosis: role of the long pentraxin PTX3 in host resistance and as therapeutic agent (Prog. FFC#14/2008, new)* ***pag. 45***

6. RICERCA CLINICA – *Clinical research*

R. Buzzetti. Introduzione: ricerca clinica, qualcosa si muove – *Introduction: clinical research, something is moving* ***pag. 46***

44. Taccetti G, Cariani L. *Early antibiotic treatment in Pseudomonas aeruginosa eradication in cystic fibrosis patients: a randomised multicentric study on two different protocols (Prog. FFC#17/2007, in progress)* ***pag. 48***

45. Minicucci L, Haupt R. *Efficacy of slow release insulin in patients with cystic fibrosis and glucide intolerance with clinical decay (Prog. FFC#21/2006, concluded)* ***pag. 48***

46. Bernasconi S, Street ME. *New Insights into insulin-resistance in cystic fibrosis: the effect of cytokines (Prog. FFC #18/2006, concluded)* ***pag. 49***

47. Guarino A, Colombo C, Morelli L. *Prevention of pulmonary exacerbations in children with cystic fibrosis through the modification of intestinal microflora (Prog. FFC #20/2006, concluded)* ***pag. 50***

48. Festini F. *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) (Prog. FFC #19/2006, concluded)* ***pag. 51***

49. Dal Molin A, Braggion C, Furnari ML, Lucidi V, Rizzi E, Cialdella P. *Prospective study about complications of totally implantable central venous access ports in people with CF (Prog. FFC #16/2008, new)* ***pag. 52***

50. Braggion C. *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 (Progetto FFC #16/2007, concluded)* ***pag. 52***

51. Ranieri VM. *Extracorporeal lung assist as bridge to lung transplantation for patients with cystic fibrosis (Progetto FFC #17/2008, new)* ***pag. 53***

52. Catastini P, Di Marco S. *Prevalence and impact of depressive and anxiety disorders in CF patients and their caregivers (Progetto FFC#18/2007, concluded)* ***pag. 54***

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI CONGRESSUALI – *Publications and congress communications* ***pag. 55***

RETE DI ISTITUTI E LABORATORI - *Institute and Laboratory Network* ***pag. 66***

REFEREES INTERNAZIONALI – *International reviewers* ***pag. 67***

PROGETTI 2006-2008 ADOTTATI - *Adopted projects (2006-2008)* ***pag. 68***

Introduzione - *Introduction*

Questo incontro, che si rinnova nell'autunno di ogni anno dal 2002, è il momento in cui i ricercatori coinvolti nel percorso di ricerca ingaggiato dalla Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica, rendono conto alla comunità scientifica del lavoro fatto, dei risultati ottenuti e degli intenti di ulteriore sviluppo della loro fatica. Di tutto questo vengono edotte anche le molte persone che hanno contribuito con le loro donazioni a sostenere il percorso, che rimane per loro – non va dimenticato – carico di concreta speranza.

La VI Convention ha in programma 52 presentazioni che si riferiscono ai 58 progetti selezionati e finanziati dal 2006 al 2008, alcuni conclusi, altri in fase avanzata ed altri appena avviati: 17 sono i progetti selezionati nel 2008 e di essi vengono presentati gli intenti ed i risultati preliminari. Un provvisorio bilancio scientifico viene fatto nell'introduzione alle diverse sessioni della convention da parte dei rispettivi chairmen, quasi tutti componenti del Comitato Scientifico della Fondazione.

Forniamo qui sommariamente alcuni dati relativi ai 7 anni di attività della rete italiana (con contributi stranieri) di ricerca CF. Sono pervenuti complessivamente alla Fondazione 256 progetti, di cui 114 sono stati selezionati per un finanziamento (44,5%), con la valutazione combinata di 165 reviewers, quasi tutti stranieri (vedere l'elenco a pag. 67) 82 progetti sono già conclusi. Ai progetti finanziati hanno contribuito o stanno contribuendo 107 laboratori o centri clinici (72 rappresentati nell'attuale Convention), con un numero complessivo di oltre 350 ricercatori impegnati a vario titolo. La Fondazione ha assegnato complessivamente in 7 anni 85 borse di studio o contratti di ricerca. Si annoverano ad oggi 104 pubblicazioni registrate ed oltre 150 comunicazioni in congressi nazionali e internazionali. Gli investimenti economici sono dettagliati nella tabella di questa pagina. La Fondazione ha sostenuto mediamente per il 40% i costi dei progetti. Nella gara di sostegno economico alla ricerca si sono distinti in particolare alcune delegazioni della Fondazione, Associazioni regionali FC, aziende e istituti bancari ma anche privati, soprattutto attraverso l'iniziativa "Adozione Progetti": a pag. 68 segnaliamo i progetti "adottati" dal 2006 al 2008, quelli stessi di cui viene riferito in questa convention, con i rispettivi "adottanti".

This meeting, which has become a traditional autumn event since 2002, is the moment when scientists working on research projects promoted by the Cystic Fibrosis Research Foundation can update the scientific community on the work done, the results achieved and, moreover, on future goals. The content of this convention will also be shared with all those who, with their donations, have helped to support this research and who are looking with solid hope to the new research developments.

The VI Convention hosts a programme of 52 presentations regarding 58 selected projects funded from 2006 to 2008. Some of these are concluded, some are in an advanced stage and some have just been started; the goals and the preliminary results for the 17 projects selected for 2008 will also be presented. The chairmen, almost all of them members of the Foundation's Scientific Advisory Board, will introduce their session with a scientific overview.

Here is a summary of the last seven years of activities of the Italian CF network (with foreign contributions). The Foundation has received 256 project proposals in total; 114 have been selected to be funded (44,5%), with the combined evaluation of 165 reviewers, most of them foreigner scientists (see list at pag. 67) 82 Projects are already concluded. 107 laboratories or clinical centres (72 of which are represented here at the Convention) have contributed to these projects with over 350 researchers involved at various levels. The Foundation has assigned 85 grants or research contracts to young researchers collaborating in the projects over 7 years. Until this day 104 publications have been registered and more than 150 communications have been disclosed in national and international congresses. The economical investments are detailed in the table below. The Foundation has covered an average of 40% of the project costs. In the economical competition to sustain research some FFC Delegations, FC regional associations, companies, banks and individuals have stood out mostly through the initiative "Adopt a Project": at pag. 68 we present the "adopted" projects from 2006 to 2008 with their "adopters", the same projects that are presented in this convention.

114 CF projects funded by FFC Foundation from 2002 to 2008

Research area	2002 (€)	2003 (€)	2004 (€)	2005 (€)	2006 (€)	2007 (€)	2008 (€)	**2002-2008**
1. CFTR physiopathology & new therapy	263.000 *2 projects*	178.000 *4 projects*	76.000 *4 projects*	180.000 *4 projects*	200.000 *5 projects*	220.000 *5 projects*	195.000 *2 projects*	**1.312.000** *26 projects*
2. Genetics	- -	90.000 *3 projects*	133.000 *5 projects*	110.000 *2 projects*	80.000 *3 projects*	113.000 *2 projects*	195.000 *3 projects*	**721.000** *18 projects*
3. Microbiology	18.078 *1 projects*	105.000 *3 projects*	95.000 *3 projects*	100.000 *2 projects*	232.000 *9 projects*	291.000 *7 projects*	260.000 *5 projects*	**1.101.078** *30 projects*
4. Inflammation	211.000 *1 projects*	55.000 *1 projects*	143.000 *4 projects*	148.000 *5 projects*	113.000 *3 projects*	163.000 *3 projects*	345.000 *5 projects*	**1.178.000** *22 projects*
5. Epidemiology & Clinical research	- -	80.000 *2 projects*	53.000 *3 projects*	76.000 *4 projects*	75.000 *4 projects*	70.000 *3 projects*	85.000 *2 projects*	**439.00** *18 projects*
Tot. 2002-2008	**492.000** *4 proj.*	**508.000** *13 proj.*	**500.000** *19 proj.*	**614.000** *17 proj.*	**700.000** *24 proj.*	**904.000** *20 proj.*	**1.080.000** *17 proj.*	**4.751.078** *114 projects*

Nota. Nel periodo 1997-2002 la Fondazione ha inoltre supportato attività di ricerca e formazione, borse di studio, attrezzature scientifiche e allestimenti informatici presso il Centro Regionale Veneto Fibrosi Cistica per un totale di ***€ 777.217.*** *La gestione amministrativa dell'attività di ricerca della Fondazione, unitamente ai costi per meeting e convention e selezione dei progetti, ha comportato un costo complessivo di* ***€ 354.000.*** *L'investimento complessivo per la ricerca, dal 1997 (anno di nascita della Fondazione) al 2008 è stato quindi di* ***€ 5.882.295***

ABSTRACTS DELLE PRESENTAZIONI
Presentation abstracts

1. FISIOPATOLOGIA DELLA PROTEINA CFTR E TERAPIE DEL DIFETTO DI BASE
CFTR pathophysiology and therapy of the basic defect

Introduction: balance and perspectives

Luis J.V. Galietta
Head Molecular Genetics Laboratory, "G.Gaslini" Institute, Genova
Direttore Laboratorio di Genetica Molecolare, Istituto Giannina Gaslini, Genova

CFTR behaves mainly as a cAMP-activated chloride channel, although other additional functions have been also proposed. Therefore, it is generally accepted that restoration of anion transport in epithelial cells is an important goal for the treatment of the basic defect in cystic fibrosis (CF).
Various studies demonstrate that CFTR is a druggable target since small molecules are able to correct the effects of some classes of CF mutations. For example, molecules belonging to various chemical families act as "potentiators" of mutant CFTR. They stimulate CFTR channel activity by decreasing the time spent by the protein in the closed state. Therefore, they are effective on mutations belonging to class 3 such as G551D, G1349D, and others, characterized by a severe gating defect. The identification of many potentiators has been obtained by the screening of chemical libraries. These compounds show various ranges of affinity and effectiveness on CFTR mutants, including F508del. Activity and medicinal chemistry properties of potentiators need to be optimized to generate drugs for in vivo application. Improvement of potentiator activity is attempted by utilizing information from structure-activity relationships. This process may also benefit from models of CFTR global structure that have been recently generated. Docking of potentiators to putative binding sites may help in understanding mechanisms of action and help to design improved molecules. Although potentiators are clearly effective on class 3 mutants, it is not clear whether they will be useful for the F508del mutation, which is the most frequent among CF patients. Indeed, potentiators may have very little effect on F508del because the main defect in this mutation is the severely reduced targeting of CFTR protein to the plasma membrane.
The F508del trafficking defect can be ameliorated by molecules called "correctors", which have been identified by high-throughput screening or by hypothesis-driven studies. In the former case, large chemical libraries are tested with a functional assay to identify compounds that increase the amount of CFTR protein in the plasma membrane, most often with an unknown mechanism. In the latter one, known modulators of heat shock proteins or other proteins involved in protein maturation are used to improve CFTR targeting to the plasma membrane. The models of CFTR protein structure may be also useful for the rational design of correctors. However, it is still not clear how F508del mutation affects CFTR protein folding and/or stability. Therefore, the most reasonable strategy is to identify putative CFTR ligands by virtual screenings and then to assess whether they improve F508del trafficking by in vitro assays. In the search for correctors, it is important to realize that the F508del-CFTR trafficking is arrested at different cell levels. The mutant protein is detected at very early stages in the endoplasmic reticulum and rapidly degraded. However, F508del-CFTR has also a substantially reduced half-time in the plasma membrane. The study of CFTR protein "interactome", at the intracellular and peripheral levels, may help to identify new targets for pharmacological agents. Combination of molecules acting at different cell levels may be essential in obtaining a synergic F508del correction without causing significant toxic effects.

Introduzione: bilancio e prospettive

La proteina CFTR funziona principalmente da canale del cloruro regolato da cAMP, anche se sono state proposte altre funzioni aggiuntive. Si considera che il ripristino del trasporto di anioni sia proprio uno degli obiettivi principali per il trattamento del difetto di base nella fibrosi cistica (FC).
Vari studi dimostrano che la CFTR è un bersaglio farmacologico valido poiché si conoscono piccole molecole che sono in grado di correggere gli effetti di alcune delle classi di mutazioni FC. Per esempio si conoscono vari composti chimici che agiscono da "potenziatori" della proteina CFTR mutata. Questi composti stimolano l'attività del canale CFTR diminuendone il tempo speso nello stato chiuso. Per questo i potenziatori sono efficaci sulle mutazioni FC di classe 3 quali G551D e G1349D che sono caratterizzate da un difetto severo del processo di "gating". L'identificazione di molti potenziatori è stata ottenuta attraverso lo screening di "library" chimiche. I composti così identificati mostrano vari livelli di affinità ed efficacia sui mutanti di CFTR, compresa la mutazione F08del. Le proprietà dei potenziatori finora conosciuti devono essere ottimizzate per poter procedere con una possibile applicazione in vivo. Il miglioramento delle proprietà dei potenziatori può essere ottenuta sfruttando le informazioni che derivano da studi di correlazione tra struttura e attività (SAR). Si può anche procedere sfruttando i modelli recentemente proposti per la struttura tridimensionale della proteina CFTR. Utilizzando metodi di simulazione al calcolatore si può valutare il legame di potenziatori a siti specifici della proteina CFTR. Il risultato di questi studi virtuali può aiutare a comprendere il meccanismo di azione e a progettare nuove molecole attive. Non è chiaro se lo sviluppo di potenziatori possa portare un beneficio per i pazienti con la mutazione F508del perché questa mutazione provoca principalmente un difetto di maturazione e non di "gating". In effetti gran parte della proteina F508del-CFTR non raggiunge la membrana plasmatica.
Il difetto di maturazione causato da F508del può essere corretto, almeno in parte, da molecole chiamate "correttori", che sono state identificate mediante "high-throughput" screening o sulla base di ipotesi. Nel primo caso sono state vagliate grandi raccolte di composti chimici mediante saggi funzionali per trovare molecole che aumentano il trasporto della proteina CFTR mutata verso la membrana plasmatica. Nel secondo caso sono stati valutati modulatori farmacologici conosciuti di "heat shock proteins" o comunque di altre macromolecole coinvolte nei processi di sintesi e maturazione proteica. I modelli disponibili

sulla struttura tridimensionale della proteina CFTR possono essere utili in teoria anche per l'identificazione di correttori. Comunque, non è del tutto chiaro come la mutazione F508del alteri il processo di ripiegamento o la stabilità della proteina CFTR. Una possibilità è quella di usare screening virtuali per identificare ligandi della proteina CFTR e poi usare saggi funzionali in vitro per stabilire se queste molecole migliorano la maturazione del mutante F508del. L'identificazione di correttori deve tenere conto del fatto che la maturazione della proteina F508del-CFTR viene arrestata a diversi livelli. La proteina mutata viene individuata molto precocemente nel reticolo endoplasmatico dai sistemi di controllo della cellula che la avviano verso la degradazione. Tuttavia è stato dimostrato che la proteina F508del-CFTR ha una emivita molto ridotta anche nella membrana plasmatica. Lo studio del cosiddetto "interattoma" della proteina CFTR può far identificare nuovi bersagli farmacologici non solo a livello intracellulare ma anche periferico. E' possibile che la combinazione di trattamenti farmacologici che agiscono a più livelli ottenga un effetto sinergico sulla maturazione del mutante F508del minimizzando la possibilità di effetti tossici.

Marco Colombatti *(al centro) con collaboratori.*

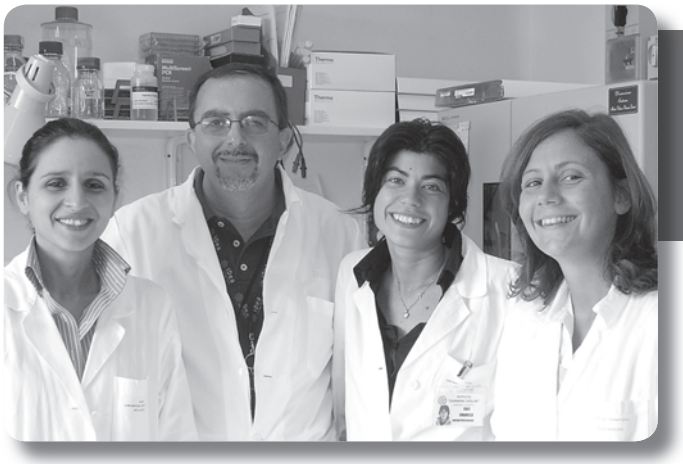
1. Novel methods of intracellular delivery of ΔF508-CFTR correctors

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, concluded)

The most common mutation of the Cystic Fibrosis (CF) gene, the deletion of Phe508, encodes a protein (ΔF508-CFTR) which fails to fold properly, thus mutated ΔF508-Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator (CFTR) is recognized and degraded via the ubiquitin-proteasome endoplasmic reticulum (ER)-associated degradation pathway (ERAD).
Chemical and pharmacological chaperones and ligand-induced transport open options for designing specific drugs to control protein (mis)folding or transport. A class of compounds that have been proposed as having potential utility in ΔF508-CFTR are those targeting the molecular chaperone and proteasome systems. In this study we have selected Deoxyspergualin (DSG) as a reference molecule for this class of compounds and for ease of cross-linking to Human Serum Albumin (HSA) as a protein transporter. Chemical cross-linking of DSG to HSA via a disulphide-based cross-linker and its administration to cells carrying ΔF508-CFTR resulted in a greater enhancement of ΔF508-CFTR function than when free DSG was used. Function of the selenium-dependent oxidoreductase system was required to allow intracellular activation of HSA-DSG conjugates.
The principle that carrier proteins can deliver pharmacological chaperones to cells leading to correction of defective CFTR functions is therefore proven and warrants further investigations.

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

La mutazione più frequente del gene della Fibrosi Cistica (FC), la delezione di Phe508, codifica per una proteina (ΔF508-CFTR) che non è in grado di ripiegarsi correttamente, quindi il ΔF508-Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator (CFTR) così mutato viene riconosciuto e degradato dai meccanismi di degradazione (ERAD) associati al sistema rappresentato da ubiquitina, proteasoma e reticolo endoplasmatico (ER).
Chaperonine di natura chimica e farmacologica offrono delle prospettive di intervento per ideare farmaci ad azione specifica che intervengano sul ripiegamento o il trasporto intracellulare delle proteine. Una categoria di farmaci che possono essere dotati di potenziale utilità nel caso di ΔF508-CFTR sono quelli indirizzati al sistema delle chaperonine e del proteasoma. Nel nostro studio abbiamo scelto la Deoxyspergualin (DSG) come molecola di riferimento per questa categoria di composti e per la maggior facilità di cross-linking all'albumina umana (HSA) utilizzata come proteina di trasporto. Il cross-linking chimico di DSG a HSA mediante un ponte disolfuro e la somministrazione del coniugato a cellule esprimenti un CFTR difettivo risultano in un notevole incremento della funzione di ΔF508-CFTR rispetto all'uso di sola DSG. L'integrità del sistema delle ossidoriduttasi selenio-dipendenti è necessaria per consentire l'attivazione intracellulare dei coniugati HSA-DSG.
È stato perciò provato il principio che proteine trasportatrici possono facilitare la somministrazione di chaperonine farmacologiche a cellule bersaglio con parziale correzione del CFTR difettivo, incoraggiando così ulteriori studi in questa area.



Luis Galietta, *secondo da sinistra, con il suo gruppo di ricerca.*

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

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, concluded)

It is possible to design a specific pharmacotherapy of cystic fibrosis (CF) basic defect by developing chemical compounds that target specifically each class of mutations. One type of compounds, named *potentiators*, stimulates the activity of CFTR protein thus correcting the defect associated to class 3 mutations. Another type, *correctors*, is able to restore CFTR maturation that is instead altered by class 2 mutations. We have studied 1,4-dihydropyridines as possible potentiators of CFTR protein. After evaluation of more than 400 felodipine analogs on cultured cells, we have identified molecules with high efficacy and potency towards different types of CF mutations. Such molecules will be studied on animal models to assess their pharmacokinetic properties and safety.
In parallel, we have studied another class of molecules, aminoarylthiazoles, that act as correctors of deltaF508 mutation. We found that aminoarylthiazoles have a dual activity: they restore the maturation of the mutant protein and, at the same type, they increase its activity. Therefore, such compounds show an interesting behavior that deserves to be investigated to understand the mechanisms through which CF mutations cause CFTR loss of function. Aminoarylthiazoles may be also potentially useful to develop effective drugs for CF therapy.

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

Esiste la possibilità di effettuare una terapia farmacologica mirata del difetto di base nella fibrosi cistica (FC) sviluppando composti chimici specifici per ciascuna classe di mutazioni. Un tipo di composti, chiamati *potenziatori*, stimola l'attività della proteina CFTR ed è quindi in grado di correggere le mutazioni di classe 3. Un altro tipo, i *correttori*, è in grado di ripristinare la corretta maturazione di CFTR quando questa è compromessa da mutazioni di classe 2. Abbiamo studiato le 1,4-diidropiridine quali possibili potenziatori della proteina CFTR. Dopo aver valutato più di 400 analoghi della felodipina su cellule in coltura, abbiamo identificato alcune molecole con elevata efficacia ed affinità verso diversi tipi di mutazioni FC. Tali molecole vanno ora sperimentate su modelli animali per valutarne le proprietà farmacocinetiche e la sicurezza.
In parallelo abbiamo studiato un'altra famiglia di molecole, gli aminoariltiazoli, che funzionano da correttori della mutazione deltaF508. Abbiamo scoperto che gli aminoariltiazoli hanno un tipo di attività duplice: ripristinano la maturazione della proteina mutata e, al tempo stesso, ne aumentano anche l'attività. Tali composti mostrano quindi un comportamento molto interessante da approfondire per capire i meccanismi con i quali le mutazioni FC causano la perdita di funzione della proteina CFTR. Gli aminoariltiazoli possono avere anche un valore piuttosto importante per lo sviluppo di farmaci efficaci per la terapia della FC.

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

Oscar Moran, *primo da sinistra, con il suo gruppo di ricerca.*

Moran O[1], Galfrè E[1], Ferrera L[12], Dimasi N[3], Galietta LJV[2], Melani L[2], Zegarra-Moran O[2], Longo A[4], Bisigano P[1]
[1]Istituto di Biofisica, CNR, Genova; [2]Laboratorio di Genetica Molecolare, Istituto Giannina Gaslini, Genova; [3]Laboratorio di Medicina Molecolare, Istituto Gannina Gaslini, Genova; [4]Istituto per lo Studio dei Materiali Nanostrutturati, CNR, Palermo
(Progetti FFC #4/2006 e FFC #2/2008, continuation)

We have undertaken a functional and structural study of the interaction of CFTR, the protein mutated in cystic fibrosis, and some potentiators of the CFTR chloride transport, in order to understand the molecular mechanism of action for these small molecules, which are candidates for the therapy of this disease. Previously, with computational molecular modelling techniques, we proposed that the binding site of CFTR potentiators is located in the interface between the nucleotide binding domains (NBDs). We introduced a series of site-specific mutations in this region of the protein, inducing changes of the binding constants for potentiators consistent with our hypothesis. These experiments have also allowed us to allege that the mechanisms of activation and inhibition (at high concentrations), observed in most potentiators, are intimately related. The fuctional study of single channel kinetics confirmed that potentiators do not interact with nucleotides (ATP) but modify the channel gating in an independent manner. On the other hand, electrophysiological experiments carried out at different pH suggest that the interaction between NBDs is not predominantly electrostatic, nor is it the interaction of potentiators and CFTR. The new project includes the study of these interactions with a series of mutants, associated or not with cystic fibrosis, in order to deepen the knowledge of the nature of the interaction of potentiators with the CFTR. To study the chemical-physical and structural properties of the interaction between potentiators and the NBDs we have obtained and purified the two domains by recombinant techniques. We have assessed that the highest stability and refolding efficiency is obtained when the two domains, NBD1 and NBD2 are present simultaneously in the preparation, and that the preparations containing the two NBDs have a greater affinity for ATP. The potentiator does not alter the binding of ATP at the NBDs, but modifies that of ADP. These data will be completed in the context of the new project to have a complete description of the pharmacology of potentiators in this preparation. Preliminary experiments of small angle X-ray scattering (SAXS) have confirmed the mono-dispersed nature of our preparation, as well as the size (giration radius) estimated from molecular models. Now, our effort is directed to the scale-up of proteins production to obtain enough material for further structural studies, to solve the structure of NBD, also in the presence of potentiators. The set-up of a parallel computer system has let us to increase our computing power by about 25-fold, allowing us to do much more extensive molecular dynamic simulations. By using advanced techniques of molecular dynamics, we have started a systematic study of the thermodynamic properties of the NBDs, the characteristics of binding of ATP and other nucleotides at NBDs. Aiming at understanding which modifications of the CFTR structure might benefit from the use of potentiators, we will look also at the interactions between the NBDs and intracellular segments of the membrane spanning domains, in models of native and mutants proteins, and in the presence of potentiators. All these research functional, chemical-physical, structural and computational approaches, will allow us to formulate a more accurate theory on the mechanism of

action of CFTR potentiators, which may facilitate the design of therapeutic compounds for cystic fibrosis treatment.

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

Abbiamo intrapreso uno studio funzionale e strutturale dell'interazione della CFTR, la proteina mutata nella fibrosi cistica ed alcuni potenziatori del trasporto del cloruro da parte di questa proteina, con lo scopo di comprendere il meccanismo molecolare d'azione di queste piccole molecole, candidate ad essere una forma di terapia per la malattia. Precedentemente, con tecniche di modellistica molecolare al calcolatore, avevamo proposto che il sito di legame dei potenziatori della CFTR fosse localizzato nell'interfaccia tra i domini leganti nucleotidi (NBD). Abbiamo introdotto una serie di mutazioni sito-specifiche su questa regione della proteina, inducendo dei cambiamenti delle costanti di legame consistenti con la nostra ipotesi. Questi esperimenti ci hanno anche permesso di affermare che i meccanismi di attivazione e di inibizione (ad alte concentrazioni), presente nella maggioranza di potenziatori, sono intimamente correlati. Lo studio funzionale mediante misure della cinetica di singolo canale ci ha confermato che i potenziatori non interagiscono con i nucleotidi (ATP) necessari al funzionamento del canale ma lo attivano in modo indipendente. D'altra parte, esperimenti elettrofisiologici realizzati a diversi pH suggeriscono che l'interazione tra i NBD non sia predominantemente elettrostatica, cosi come il legame dei potenziatori con la CFTR. Il nuovo progetto prevede lo studio di queste interazioni anche con una serie di mutanti, correlati con la fibrosi cistica e non, in modo di approfondire la natura dell'interazione dei potenziatori con la CFTR. Per realizzare uno studio chimico-fisico e strutturale dell'interazione tra i potenziatori e i NBD abbiamo ottenuto i due domini con tecniche ricombinanti e poi li abbiamo purificati. Abbiamo appurato che la maggior stabilità ed efficienza di ripiegamento (refolding) si ottiene quando i due domini, NBD1 e NBD2 sono presenti simultaneamente nella preparazione, cosi come la preparazione contenente i due NBD ha una maggior affinità per l'ATP. I potenziatori non alterano il legame dell'ATP ai NBD, ma si quello dell'ADP. Questi dati saranno completati nel ambito del nuovo progetto in modo di avere una descrizione completa della farmacologia dei potenziatori in questa preparazione e della loro interazione con gli agonisti naturali della CFTR. Esperimenti preliminari di diffusione (*scattering*) di raggi-X a basso angolo (SAXS) hanno confermato la natura monodispersa della nostra preparazione, cosi come le dimensioni (raggio di girazione) stimata nei modelli molecolari. Ora il nostro sforzo è indirizzato a un aumento della scala di produzione delle proteine, in modo da poter contare su materiale in quantità necessaria per ulteriori studi strutturali, in modo di risolvere la struttura dei NBD, anche in presenza di potenziatori.
La messa a punto di un sistema di calcolo parallelo ci ha permesso di aumentare la nostra potenza di calcolo di circa 25 volte, consentendoci di fare simulazioni di dinamica molecolare molto più estese. Utilizzando tecniche avanzate di dinamica molecolare, abbiamo iniziato uno studio sistematico delle proprietà termodinamiche dei NBD, delle caratteristiche di legame dell'ATP e altri nucleotidi ai NBD. Inoltre, studieremo le interazioni tra questi domini e i segmenti intracellulari dei domini transmembrana, in modelli di proteine native e di mutanti, con l'obiettivo di capire quali alterazioni della struttura della proteina possono trovare beneficio dall'uso di potenziatori. L'insieme di questi metodi di indagine, funzionale, chimico-fisica, strutturale e computazionale, ci permetterà di formulare una sempre più accurata teoria sul meccanismo d'azione dei potenziatori della CFTR, che eventualmente faciliteranno il disegno di composti con proprietà terapeutiche ottimali per il trattamento della fibrosi cistica.

Alberto Luini

4. Organisation and regulation of the secretory trafficking of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator CFTR and of its pathogenic mutant DF508-CFTR

Luini A, Parashuraman S, Bao Cutrona M
Dipartimento Biologia Cel–lulare ed Oncologia - Consorzio Mario Negri Sud - Chieti (Progetto FFC# 1/2008, new)

Cystic fibrosis (CF) results in most cases from folding and trafficking defects of the Cl channel CFTR. It is therefore important to understand the folding and trafficking behaviour of both the normal and the defective protein. While the folding and the endocytic trafficking of CFTR have been thoroughly investigated, the secretory trafficking of this protein remains little understood because of the lack of the necessary technologies. We will set up the required methodologies (expecially traffic synchronization approaches), a task for which we are well equipped, and we will use them to analyse the progression of CFTR along its secretory route. During the last year we have worked on the CFTR trafficking project along the following lines: we have acquired most of of the molecular and cellulat tools that are necessary for the project; we have characterized morphologically (by IF and IEM) and biochemically the localization and the trafficking of CFTR in a series of cell types; we have set up a quasi-synchronization protocol for CFTR and explored conditions to create protocols for complete synchronization; we have used these protocols to explore the effects of several molecular manipulations on CFTR trafficking; finally, we have set up a method to quantify transport of CFTR from the ER to the PM that can be adapted to high-throughput microscopy. This project will fill an important knowledge gap and will, if successful, identify traffic steps and molecules that might become therapeutic targets.

Analisi dell' organizzazione e regolazione del traffico intracellulare della forma normale e mutata della proteina CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) coinvolta nella patogenesi della fibrosi cistica

La fibrosi cistica (CF) è una malattia genetica grave e frequente che deriva da un difetto di trafic intracellulare di una proteina chiamata CFTR. È perciò importante capire il traffico sia della CFTR normale che di quella patologica. Mentre il traffico endocitico di CFTR è stato già investigato, il traffico secretorio di questa proteina rimane ancora essenzialmente sconosciuto, a causa della mancanza di tecnologie adeguate. Con il nostro studio cerceremo di mettere a punto le motodologie necessarie per studiare il traffico secretorio di CFTR. Questo è un compito per il quale siamo ben equipaggiati, sia dal punto vista tecnico che culturale. Durante lo scorso anno abbiamo già lavorato a questo progetto secondo le seguenti linee: abbiamo acquisito gli strumenti cellulari e molecolari necessari per il progetto; abbiamo caratterizzato morfologicamente e biochimicamente la localizzazione e il traffico di CFTR in una serie di cellule modello, abbiamo messo a punto un protocollo di traffico semi-sincronizzato di CFTR, ed abbiamo esplorato le condizioni per creare i protocolli per una sincronizzazione completa; abbiamo quindi usato questo primo protocollo per esplorare gli effetti di diverse manipolazioni molecolari sul traffico di CFTR. Infine, abbiamo messo a punto un metodo per quantificare il trasporto di CFTR dal reticolo endoplasmatico alla membrana plasmatica che può essere usato per studi di screening mediante microscopia ottica.
Questo progetto ci porterà ad ottenere informazioni importanti per completare la nostra conoscenza del traffico di CFTR, e per identificare molecole coinvolte in questo traffico. che potranno diventare nuovi bersagli terapeutici.

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

Patrizia Ballerini, *in basso a destra, con il suo gruppo di ricerca.*

Ballerini P, Giuliani P, D'Alimonte I, Buccella S, Nargi E
Sezione di Farmacologia e Tossicologia, Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli Studi "G. D'Annunzio" di Chieti (Progetto FFC #1/2007, in progress)

Adenine (ABPs) and guanine (GBPs)-based purines are essential components in the main processes of living cells. In addition it is known that ATP and adenosine act as intercellular messengers via activation of cell surface purinergic receptors in different cell types including those of the airways where they play a key role in the control of ion and fluid transport. This strongly indicates that the modulation of ABP receptor activity could be useful in the treatment of cystic fibrosis (CF) as also strengthened by the Phase 3 clinical study recently initiated by using the $P2Y_2$ ATP receptor agonist Denufosol. Only recently it has been recognized that also GBPs, which include GTP, guanosine (GUO) and guanine (GUA), may play roles similar to those of their adenine-based counterparts. Since no data were still available in airway epithelia in the present pilot study we wanted to evaluate whether some effects of GUO, already observed in other cell types, could be seen in these cells too. It has bee observed that GUO (150uM) increased the expression $P2Y_2$ receptors in CFBE41o-, a cell line homozygous for the ΔF508 mutation of CFTR, evaluated by western blot. Similar results were obtained in 16HBE14o- cells used as control. As second step we evaluated GUO effect on ABP release from CFBE41o- and 16HBE14o- cells pre-loaded with [^{3}H]-adenosine. As found in neural cells GUO mainly stimulated the outflow of [^{3}H]-ATP as revealed by Radio-HPLC. We then evaluated the expression of CLC-2 chloride channels and that of P-glycoprotein (P-gp). Whereas GUO (150uM) up-regulated the CLC-2 channel it was unable to modulate the expression of P-gp. The nucleoside, however, was able to modulate the P-gp activity tested by calcein assay. These data suggest that GUO is able to positively modulate the ABP system and to stimulate the expression and/or function of proteins reported to potentially complement some of the lacking CFTR functions in respiratory CF epithelial cells. Given the critical role played in CF by inflammation and based on our previous results showing that in brain microglia GUO inhibits the expression and activity of the pro-inflammatory CD40 receptor, we evaluated the possible effect of GUO on the expression of this protein in CFBE41o- and 16HBE14o- cells. Unfortunately we have been unable to obtain one-way and not conflicting results. Conflicting results were also obtained when GUO effects were tested on the expression of $P2Y_1$, $P2X_4$ and $P2X_6$ ATP receptors. The relative variability of these effects could be due to de-novo extracellular formation of GUA, the metabolic product of GUO. In this view, as observed in other cell types we found that both CFBE41o- and 16HBE14o- cell plasma membranes expressed an extracellular purinenucleoside phosphorylase (ecto-PNP), the enzyme responsible for the extracellular GUO breakdown. The enzymatic activity assayed by Radio-HPLC in membranes prepared from these cells fitted well with the expression data, indicating that they rapidly form GUA from GUO in the extracellular milieu. De-novo formed GUA could exert specific effects different from those of GUO via activation of distinct membrane receptors. In this scenario: 1) we found a specific binding site for [^{3}H]-GUO in CFBE41o- and 16HBE14o- cells with characteristics similar to those individuated in neural and immune system cells (Kd ~ 100nM; Bmax ~ 1500fmol/mg proteins), 2) GUA did not cause the displacement of [^{3}H]-GUO binding (thus suggesting they are different), 3) new functional GUO analogues, modified in position 5 or 6 of the purine ring have been individuated in collaboration with the group of Prof. Cristalli (University of Camerino). Finally, in both CFBE41o- and in 16HBE14o- cells we individuated the presence of an orphan receptor (G1) which has been selected by our group as a possible new GUO receptor. On the whole the results obtained seems to be encouraging and prompt us to continue our research in this field. Moreover we thing it is tempting to speculate that GUO or more stable GUO-analogues could represent a new therapeutic approach aimed at reducing the severity of symptoms and eventually disease progression of CF.

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

Le purine a base adeninica (ABPs) e guaninica (GBPs) sono componenti essenziali delle principali funzioni cellulari. ATP e adenosina si comportano inoltre da messaggeri extracellulari tramite attivazione di specifici recettori di membrana in cellule differenti incluse quelle delle vie aeree dove controllano il trasporto di ioni e di fluidi. La modulazione dell'attività dei recettori per le ABPs potrebbe, quindi, essere utile nel trattamento sintomatico della fibrosi cistica (FC) come ulteriormente testimoniato dalla progressione in Fase 3 dello studio del Denufosol, un agonista stabile del recettore $P2Y_2$ per l'ATP. Solo recentemente è stato riconosciuto che anche le GBPs, in particolare il GTP, la guanosina (GUO) e la guanina (GUA) possono giocare un ruolo analogo a quello della controparte adeninica. In assenza di dati a riguardo nelle cellule delle vie aeree, in questo studio pilota volevamo valutare se alcuni effetti della GUO rilevati in altri tipi cellulari (ce. nervose), potevano essere individuati anche in queste. Come primo step si è testato l'effetto della GUO sull'espressione del recettore $P2Y_2$ in CFBE41o$^-$, cellule omozigoti per la mutazione ΔF508. La GUO ha aumentato l'espressione del $P2Y_2$ valutata con la tecnica del western blot. Risultati simili sono stati ottenuti in cellule 16HBE14o (normali) utilizzate come controllo. Come secondo step è stato valutato l'effetto della GUO sul rilascio di ABPs in cellule CFBE41o$^-$ e 16HBE14o utilizzando come tracciante radioattivo la [^{3}H]-adenosina. In accordo con quanto già evidenziato nelle ce. nervose la GUO stimolava principalmente il rilascio di [^{3}H]-ATP come rivelato dall'analisi in Radio-HPLC. È stata poi valutata l'espressione sia del canale per il cloro CLC-2 che della P-glicoproteina (P-gp). La GUO ha incrementato l'espressione del CLC-2 ma non quella della P-gp La GUO, comunque, stimolava l'attività della P-gp saggiata attraverso il test della calceina. Questi dati indicano che la GUO modula positivamente il sistema delle ABPs e stimola l'espressione e/o la funzione di proteine che potrebbero svolgere una funzione parzialmente vicaria del CFTR. Dato il ruolo critico riconosciuto ai processi infiammatori nella CF e sulla base di nostri precedenti risultati che mostravano come la GUO inibisce l'espressione e la funzione del recettore pro-infiammatorio CD40 in cellule del cervello (microglia), abbiamo valutato il possibile effetto della GUO sull'espressione di questa proteina nelle cellule CFBE41o$^-$ e

16HBE14o-. Sfortunatamente non siamo riusciti ad ottenere in questi esperimenti risultati consensuali. Simili dati conflittuali si sono ottenuti anche per gli effetti della GUO sull'espressione dei recettori $P2Y_1$, $P2X_4$ e $P2X_6$ per l'ATP. La relativa variabilità incontrata poteva far pensare ad effetti legati ad una formazione de-novo a livello extracellulare di GUA, il prodotto metabolico della GUO.In quest'ottica, come già osservato in altre cellule, è stata saggiata ed evidenziata sia nelle CFBE41o- che nelle 16HBE14o- la presenza di una purinanucleosidefosforilasi extracellulare (ecto-PP), l'enzima responsabile della trasformazione di GUO in GUA. Questi dati sono stati confortati dalla valutazione dell'attività enzimatica tramite Radio-HPLC che suggeriva una significativa capacità di queste cellule di metabolizzare GUO in GUA nell'ambiente extracellulare. La GUA formata de-novo potrebbe esercitare effetti specifici differenti rispetto a quelli indotti dalla GUO attraverso l'attivazione recettori di membrana distinti. In questo scenario: 1) abbiamo trovato specifici siti di legame per la GUO nelle CFBE41o- e nelle 16HBE14o- con caratteristiche simili a quelle già individuate da noi in altre cellule, 2) la GUA non spiazza la GUO dai suoi siti di legame (suggerendo quindi che sono diversi), 3) abbiamo individuato, in collaborazione con il gruppo della Porf. Cristalli, nuovi analoghi funzionali della GUO. Infine, sia nelle CFBE41o- che nelle 16HBE14o-. è stata individuata la presenza di un recettore "orfano" (G1) che è stato selezionato dal nostro gruppo come possibile nuovo recettore per la GUO. I risultati ottenuti sembrano incoraggianti e ci spingono ad approfondire le nostre ricerche in questo campo. Ci sembra inoltre ragionevole ipotizzare che la GUO, o suoi analoghi più stabili, possano rappresentare un approccio terapeutico nuovo teso a ridurre la severità dei sintomi ed eventualmente la progressione della CF.

Valeria Casavola, *al centro in basso con il suo gruppo di ricerca.*

6. Cellular and molecular mechanisms of the actin cytoskeleton involvement in the NHERF1-dependent rescue of deltaF508 CFTR in human airway cells

Casavola V[1], Conese M[2]
[1]Dipartimento Fisiologia Generale ed Ambientale – Università di Bari, [2]Dipartimento Scienze Biomediche – Università di Foggia (Progetto FFC# 2/2007, in progress)

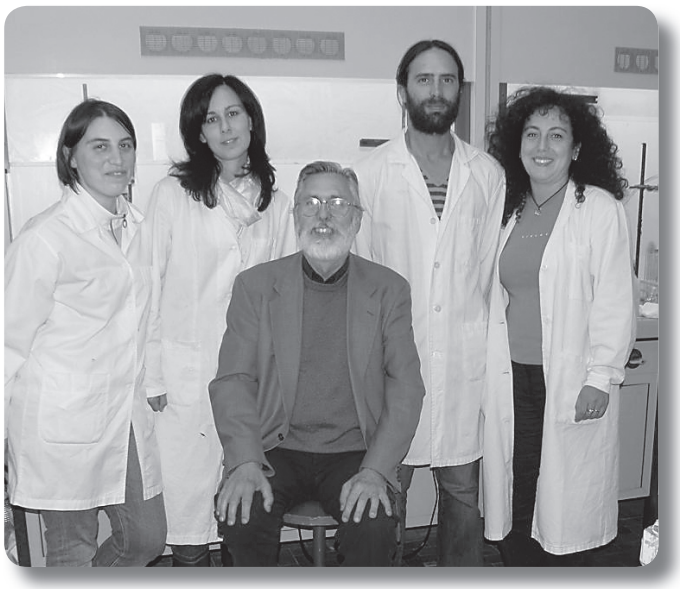
The epithelial cells of a lung affected with Cystic Fibrosis (CF) have two defects: 1) CFTR protein is not expressed in the cell membrane facing the respiratory lumen (ie. apical membrane); 2) they have a hyper production of mediators of inflammation. Both of these defects are responsible for the pathological and clinical consequences in the lung, but it is still unknown if there exists a causal relationship between them.
Our research groups have demonstrated that the mutated CFTR protein, ΔF508 CFTR, translocates to the apical membrane of CF epithelial respiratory cells following the overexpression of the NHERF1 protein which is known to interact with CFTR. Further, using confocal microscopy analysis we observed that human airway cells derived from a healthy subject have well organized actin fibers that are present mostly at the apical membrane and a higher organization of the tight junctions that link one cell to another. On the contrary, the cells derived from a patient homozygous for the ΔF508 CFTR mutation, (CFBE), have a marked disorganization of both their actin cytoskeleton and their tight junctions. Because NHERF1 is able to interact with both CFTR and the actin cytoskeleton, we analyzed the involvement of NHERF1 in the organization of the cytoskeleton and the tight junctions.
We observed that the overexpression of NHERF1 in CFBE cells induces an increase in both actin cytoskeleton and tight junction organization and also increases the physical interaction between NHERF1, ezrin and actin. Ezrin is a protein that is cytoplasmic in its inactive state and that, once activated, translocates to the membrane and makes a bridge between NHERF1 and the actin cytoskeleton. We observed using both biochemical and microscopic analyses that NHERF1 overexpression in CFBE cells induces the translocation of active ezrin to the membrane. During the second year of the project we will study the cellular mechanisms by which NHERF1 overexpression activates ezrin and 'reorganizes' the actin cytoskeleton in CFBE cells. Lastly, as preliminary results indicate that NHERF1 overexpression also induces an increase in the expression of the pro-inflammatory molecule, interleuchine (IL)-13, in the seciond year we will evaluate if IL-13 is involved in the mechanism that regulates cytoskelatal and tight junctional organization by NHERF1.

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, e, al momento attuale non è noto se esista una relazione causale tra di essi.
I nostri gruppi di ricerca hanno dimostrato che è possibile trasportare la proteina CFTR mutata, ΔF508 CFTR, sulla membrana apicale di cellule epiteliali respiratorie FC in coltura in seguito alla sovraespressione della proteina NHERF1, che è nota interagire con CFTR. Recentemente mediante analisi in microscopia abbiamo osservato che le cellule bronchiolari derivanti da un soggetto sano, mostravano fibre di actina ben organizzate e maggiormente presenti sotto la membrana apicale, nonché una maggiore organizzazione delle giunzioni strette che collegano le cellule tra loro. Al contrario, le cellule derivanti da un soggetto omozigote per la mutazione ΔF508 CFTR (CFBE) presentavano una marcata disorganizzazione dei filamenti d'actina e delle giunzioni strette. Poiché NHERF1 è in grado di interagire sia con CFTR che con il citoscheletro actinico, abbiamo analizzato il coinvolgimento di NHERF1 nell'organizzazione sia del citoscheletro actinico che delle giunzioni strette. Abbiamo riscontrato che la sovraespressione di NHERF1 nelle cellule CFBE induce un aumento dell'organizzazione citoscheletrica e delle giunzioni strette, nonché una maggiore interazione fisica fra NHERF1, ezrina e actina. Ezrina è una proteina che nella sua forma inattiva risiede nel citoplasma mentre una volta attivata, trasloca sulla membrana e fa da ponte fra NHERF1 e il citoscheletro actinico. Noi abbiamo riscontrato sia mediante analisi in microscopia che mediante metodologie biochimiche che la sovraespressione di NHERF1 nelle cellule CFBE41o- induce la traslocazione di ezrina attiva sulla membrana apicale. Durante lo svolgimento del secondo

anno del progetto studieremo i meccanismi cellulari mediante i quali la sovraespressione di NHERF1 induce l'attivazione di ezrina e "riorganizza" il citoscheletro actinico nelle cellule CFBE. Infine risultati preliminari indicano che la sovraespressione di NHERF1 induce un aumento di una molecola pro-infiammatoria, interleuchina (IL)-13. Quindi, nel secondo anno, valuteremo se IL-13 è coinvolta nel meccanismo che regola l'organizzazione del citoscheletro e delle giunzioni strette.

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



Mauro Mazzei, *al centro, con il suo gruppo di ricerca.*

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, in progress)

In most cases, Cystic Fibrosis is caused by the deletion of a phenylalanine in position 508 (DF508) in a channel protein (named CFTR) appointed to the anion transport. Such protein remains entrapped in the endoplasmic reticulum and is degraded by the quality control machinery of the cell.
Some substances, defined Correctors or Pharmacological Chaperones, help the DF508-CFTR in getting the plasma membrane.
Our attention was focused on 3 Correctors (NS004, VRT-532 and 4a) as they present some chemical moieties very similar each other, namely *p*-cresol, *p*-chlorophenol and *p*-chloroanisole. Therefore, we wished to prepare some compounds ending with those groups following the hypothesis that they could result pharmacophores for the action of correction searched by us.
Particular attention was devoted to the synthesis of *p*-chloroanisole derivatives as this group is also present in Glibenclamide (GL), a well known CFTR blocker.
As GL binds to CFTR, it is reasonable to think that in CFTR there is, at least, a site in which the *p*-chloroanisole group could adapt itself.
Therefore, we synthesized some new molecules modifying the sulfonamidic group of GL with the aim of changing the moiety responsible for the acidity that, by binding to basic aminoacids of CFTR, determines the blockade of the channel. In particular, the synthesis of *p*-chloroanisole derivatives resulted quite complex (there are 5 synthetic steps).
Pharmacological assays on the synthesized substances were performed using FRT cells coexpressing DF508 mutant, and the halide-sensitive yellow fluorescent protein YFP-H148Q/I152L, to follow the CFTR maturation towards the plasma membrane. As controls, DMSO (solvent of our compounds) and Corrector 4a were used. None of tested compounds showed a clear signal of correction.
The biochemical study on mutant CFTR was focused both to the importance of Chaperones and to proteolytic enzymes. At first, HSP90 Chaperone was studied in JA3 cells trasfected with wt- and DF508-CFTR: geldanamycin was used as HSP90 inhibitor. We did not find any difference between treated cells and controls.
The enzymatic approach resulted more appealing. It is known that low levels of Ca^{++} favour the maturation of DF508-CFTR. Calpain (CA) is a protease activated when the levels of Ca^{++} are high. We noted that CA hydrolyzes both wt- and DF508-CFTR. Remarkably, preliminary data with CA inhibitors seem preserve CFTR from digestion.

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

Nel caso della mutazione DF508 la Fibrosi Cistica origina dalla mancata maturazione, a livello del reticolo endoplasmatico, della CFTR. Le sostanze che riescono a far maturare la DF508-CFTR vengono definite Correttori (o Chaperoni farmacologici). Per fare uno studio sistematico sui Correttori abbiamo rivolto la nostra attenzione a 3 di essi (NS004, VRT-532 e 4a) in quanto presentano, in posizioni analoghe nella molecola, delle strutture tra loro simili, cioè *p*-cresolo, *p*-clorofenolo e *p*-cloroanisolo sostituiti in *orto*.
Abbiamo quindi preparato alcune serie di composti contenenti tali gruppi nell'ipotesi che questi potessero essere dei farmacofori per la correzione della CFTR. Per prima cosa, sono stati sintetizzati derivati del *p*-clorofenolo e del p-cresolo con procedure sintetiche abbastanza semplici.
Ci siamo poi dedicati a sintetizzare i derivati del *p*-cloroanisolo. Tale gruppo sembrava avere un particolare interesse in quanto presente anche nella Glibenclamide (GL), noto bloccante della CFTR.
Poiché la GL si lega alla CFTR è logico pensare che nella CFTR vi sia almeno un sito in cui il gruppo del *p*-cloroanisolo si possa adattare. Abbiamo perciò preparato delle molecole senza il gruppo acido che nella GL, legandosi ad amminoacidi basici, determina il blocco della CFTR. Tale sintesi risulta più complessa della precedente (è formata da 5 steps sintetici).
I saggi farmacologici sulle sostanze sintetizzate sono stati eseguiti su cellule FRT trasfettate con la DF508-CFTR e con una proteina fluorescente, per seguire la maturazione della CFTR verso la membrana. Come controlli sono stati utilizzati il DMSO (usato come solvente dei nostri composti) ed il Corr. 4a. Nessuno dei composti saggiati ha mostrato segni di correzione. Lo studio biochimico sulla CFTR mutata ci ha portato a valutare sia il possibile coinvolgimento di Chaperoni che quello di enzimi che operano la proteolisi della CFTR. Quale primo Chaperone è stato studiato HSP90 in cellule JA3 trasfettate con wt- e DF508-CFTR. Come inibitore di HSP90 è stata utilizzata la Geldanamicina. Non si sono avute differenze tra le cellule trattate ed i controlli.
Più interessante si è rivelato l'approccio enzimatico. È infatti noto che i bassi livelli di Ca^{++} favoriscono la maturazione della DF508-CFTR. La Calpaina (CA) è una proteasi che si attiva quando i livelli di Ca^{++} sono alti ed in queste condizioni idrolizza sia la wt- che la DF508-CFTR. I primi risultati con inibitori della CA sembrano preservare la CFTR dalla digestione.

Lorenzo Pinna, *al centro, con il suo gruppo di ricerca.*

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

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

We have found that the functional NBD1 domain of the Cystic Fibrosis Trans-membrane Regulator (CFTR) interacts with the catalytic subunit of an important enzyme committed to the phosphorylation of many proteins, termed CK2, and that such an interaction is much tighter if NBD1 includes the genetic alteration which is the commonest cause of cystic fibrosis, i.e. the deletion of the aminoacid F508. Since CFTR with this deletion is not functionally defective per se, however it is highly unstable and rapidly degraded to small fragments, we wanted to check whether peptides reproducing the CFTR sequence surrounding the critical aminoacid, F508, might influence CK2 activity. It turned out that peptides with the pathogenic deletion stimulate the activity of the oligomeric form of CK2 toward the chaperon protein HSP90, committed, together with other chaperon proteins which are substrates of CK2, to the proper stabilization of CFTR. These data suggest that an enhancement of the activity of the oligomeric form of CK2 could represent a device to counteract the CF defect by reducing the amount of CFTR with the F508 deletion which is prematurely degraded by the cell (normally about 99%). By striking contrast the same peptides drastically inhibited the activity of the isolated CK2 catalytic subunits, whose over-expression is known to correlate with the enhancement of the tumour phenotype. This latter observation could provide a new argument to explain the remarkable frequency of the pathogenic CFTR mutation (F508 deletion), which is found in about 4% of healthy people of European descent (where it co-exist with "normal" CFTR), as it might reduce susceptibility to cancer.

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

Abbiamo osservato che il dominio funzionale NBD1 di CFTR ("cystic fibrosis transmembrane regulator") interagisce con la subunità catalitica di un importante enzima deputato alla fosforilazione delle proteine, denominato "CK2", e che tale interazione è molto potenziata se NBD1 contiene l'alterazione genetica che è la causa più frequente di fibrosi cistica (delezione dell'aminoacido F508). Poiché il principale difetto di CFTR con questa delezione non è una carente funzionalità, ma un'instabilità che ne causa una prematura degradazione, abbiamo esaminato se frammenti di CFTR attorno all'aminoacido critico (F508) influenzano l'attività di CK2. È risultato che i peptidi con la delezione patogena stimolano l'attività della forma oligomerica di CK2 nei confronti della proteina "chaperon" HSP90, deputata con altre proteine chaperon substrati di CK2 alla corretta stabilizzazione di CFTR. Ciò suggerisce che un potenziamento dell'attività di CK2 oligomerica potrebbe alleviare la sintomatologia della fibrosi cistica mediante la riduzione della quota di CFTR con delezione di F508 che viene distrutta dalla cellula (normalmente circa il 99%). Al contrario gli stessi peptidi inibiscono drasticamente l'attività delle subunità catalitiche isolate di CK2, il cui eccesso favorisce lo sviluppo di molti tumori. Questa osservazione potrebbe contribuire a spiegare la singolare diffusione della mutazione potenzialmente patogena di CFTR, trovata in circa il 4% della popolazione europea sana (che la possiede insieme alla forma normale) in quanto ciò conferirebbe il "vantaggio" di una minore suscettibilità a patologie oncologiche.

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

Roberto Loi, *secondo da sinistra, con collaboratori di ricerca.*

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

Bone marrow harbors cells that can migrate towards the respiratory mucosa and acquire phenotypic and 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 *in vitro* correction of the genetic defect. 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.
During the first year of the project we confirmed our preliminary data showing that interleukin-17 (IL-17), an inflammatory cytokine known for its chemotactic action on neutrophils, favors the migration of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells (MSC) towards normal and CF mouse airway epithelial cells in culture.

During the second year we undertook a series of *in vitro* migration studies that employ three-dimensional culture systems, better resembling the *in vivo* condition. In these studies we confirmed the chemoattractive action of IL-17 on MSCs and analyzed the action of other potentially relevant chemotactic mediators. We then assessed whether overexpression of IL-17 in the airways of wild type and CF mice was able to increase recruitment of MSCs. In summary, our *in vivo* studies did not show a significant improvement of the extent of airway repopulation by bone marrow-derived cells, that remains at a level far too low for this approach to be potentially applicable in a clinical setting.
In a parallel set of *in vivo* studies we evaluated whether the well-known immunomodulatory properties of MSCs could be used to counteract the hyperinflammatory response to *P. aeruginosa* in CF mice. Interestingly, our results indicate that bone marrow-derived cells defective in CFTR may directly contribute to the exaggerated inflammatory response that characterizes CF. The specific contribution of the different bone marrow-derived cell populations to this exaggerated inflammatory response is currently being addressed, potentially leading to the identification of new therapeutic targets for decreasing the morbidity of CF lung disease.

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

Nel midollo osseo sono presenti cellule che possono migrare verso la mucosa respiratoria e acquisire caratteristiche fenotipiche e funzionali di cellule epiteliali polmonari. Cellule prelevate dal midollo osseo di pazienti affetti da fibrosi cistica potrebbero perciò 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. Nel corso del primo anno di questo progetto abbiamo confermato nostri dati preliminari indicanti che la interleuchina-17 (IL-17), una citochina infiammatoria già nota per la sua azione chemiotattica sui granulociti neutrofili, favorisce la migrazione *in vitro* di cellule staminali mesenchimali (MSC) derivate dal midollo verso cellule epiteliali delle vie aeree derivate da topi normali e CF.
Durante il secondo anno abbiamo condotto una serie di studi di migrazione cellulare *in vitro* impiegando sistemi di coltura a tre dimensioni, che meglio rappresentano la condizione *in vivo*. Grazie a questi studi abbiamo confermato la azione chemoattrattiva esercitata dalla IL-17 sulle MSC e analizzato l'azione di altri mediatori chemiotattici potenzialmente rilevanti. Abbiamo successivamente valutato se la sovraespressione della IL-17 nelle vie aeree di topi con fenotipo normale o CF potesse risultare in un aumento del reclutamento di MSC. Nel complesso, i nostri studi *in vivo* non hanno mostrato un aumento del ripopolamento delle vie aeree da parte di cellule derivate dal midollo, che rimane a un livello troppo basso affinchè questo approccio sia potenzialmente applicabile in un contesto clinico.
In una serie parallela di studi *in vivo* abbiamo valutato se le note proprietà immunomodulatorie delle MSC fossero utilizzabili per contrastare la esagerata risposta infiammatoria verso *P. aeruginosa* in topi CF. I nostri risultati indicano che cellule derivate dal midollo carenti nella funzione di CFTR potrebbero direttamente contribuire alla esagerata risposta infiammatoria che caratterizza la CF. Lo specifico contributo delle diverse popolazioni di cellule derivate dal midollo a questa esagerata risposta infiammatoria è attualmente allo studio, potendo portare alla identificazione di nuovi bersagli terapeutici per attenuare la morbilità associata alla fibrosi cistica.

Genetics

Introduction: balance and perspectives

Antonio Cao
Director CNR Institute of Neurogenetics and Neuropharmacology. President Scientific Advisory Board, Italian CF Research Foundation.
Direttore Istituto CNR di Neurogenetica e Neurofarmacologia, Cagliari; Presidente Comitato Scientifico della Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica.

In the last few years, with the contribution of several Italian investigators supported by the CF Foundation, a consistent progress has been realized in the field of Genetics of Cystic Fibrosis, especially in the development of methodologies for mutation detection, in understanding the complexity of the splicing process related to CFTR gene mutations and in the identification of genes modifying the lung disease severity.

Concerning mutation detection, the use of the combination of "multiple ligation –dependent probe hybridisation (MPLA)" and of DHPLC-Sequencing –mRNA analysis led to define in Italian patients new gross rearrangements of CFTR gene and point mutations respectively. However, the target of the identifing the large majority of the spectrum of CF mutations is still distant. In the future, application of new rapid sequencing technology may led to identify mutations mapping in the introns and the distant regulatory elements, thereby enlarging our diagnostic capability.

Interesting investigations on the coupling of transcription and mRNA processing in regard to the modulation of the phenotypic expression of CFTR splicing mutations are in progress.

Following a long period of frustration in the definition of genes modifying the severity of lung disease, recently a number of modifying genes have been recognized, namely TGFB1, IL-8 and MBL2. Furthermore for the first time, a gene-gene interaction (TGFB1 and MBL2) associated with the pulmonary disease has been delineated. Un Italian group supported from CF Foundation by carring out an association study on genes of the innate immunity in a large number of patients of American and Italian descent have identifyed SNPs in seven different genes involved in the innate immunity associated with lung diseases severity.

The discovery of modifying genes may have practical relevance in the management of CF patients by providing clue to disease pathogenesis, that may led to new treatment, and by improving patient stratification for better prognosis and enrollment in clinical trials.

Applications of genomic wide association studies (GWA) is already ongoing in several places including Italy and may led likely to identify a large number of genes, each one with a modest effect in determining the lung disease severity as already occurred in complex diseases. Critical issues in these association studies are the necessity of replication in different populations as well the need of functional studies of the new genes identified.

Finally the CF Foundation is supporting a preconceptional screening program targeted to couples presenting at the Genetic Service for beta-thalassemia in Sardinia, where 92% of CF carriers can be identified by mutation detection (program delineated at this session). This study may indicates the feasibility of carrier identification in couples presenting at Genetic Services for counselling thereby improving prevention of Cystic Fibrosis.

Introduzione: bilancio e prospettive

Nel corso degli ultimi anni, con il contributo di ricercatori Italiani finanziati dalla Fondazione CF, si è realizzato un consistente progresso nelle nostre conoscenze della Genetica della Fibrosi Cistica specialmente nell'ambito delle metodologie per identificare mutazioni del gene CFTR, nella comprensione delle anomalie del processo di splicing dovute a mutazioni del gene e nell'identificazione di geni modificatori della gravità del fenotipo polmonare.

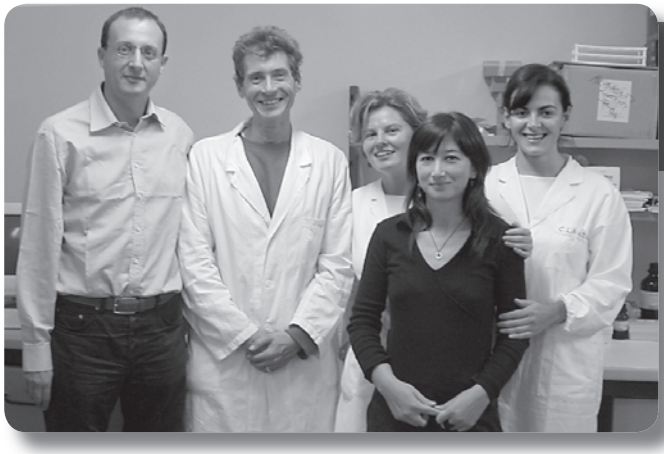
Per quanto riguarda l'identificazione di mutazioni del gene CFTR, l'applicazione della tecnica "Ligation-dependent probe hybridization (MPLA)" e della combinazione di DHPLC-Sequenziamento del gene e analisi del relativo mRNA hanno permesso di definire in pazienti italiani un nuovo riarrangiamento grossolano del gene e nuove mutazioni puntiformi rispettivamente. Tuttavia la capacità di definire al completo lo spettro delle mutazioni CF è ancora lontano. In futuro è possibile che l'applicazione di nuove rapide metodologie di sequenziamento possa consentire di identificare nuove rare mutazioni CF mappanti negli introni o in elementi regolatori localizzati a distanza dal gene aumentando in questo modo la nostra capacità diagnostica.

Ricerche interessanti sono in corso sull'associazione della trascrizione e del processamento del mRNA nei riguardi della modulazione della espressione fenotipica delle mutazioni di splicing del gene CFTR.

Dopo un lungo periodo di frustrazione, recentemente si sono potuti identificare diversi geni modificatori della gravità del fenotipo polmonare e precisamente i geni TGFB1, IL-8 e MBL2. Per la prima volta è stata delineata anche una interazione gene-gene (TGFB1 e MBL2) associata al fenotipo polmonare. Un gruppo italiano ha di recente condotto uno studio di associazione del fenotipo polmonare con numerosi geni dell'immunità innata in un vasto gruppo di pazienti di origine americana e italiana che ha portato ad identificare SNPs associati alla gravità della malattia polmonare in sette diversi geni. La scoperta di geni modificatori del fenotipo polmonare ha rilevanza pratica nel fornire informazioni sulla patogenesi della malattia, che potrebbe condurre a nuove forme di terapia, per migliorare la prognosi e consentire di stratificare i pazienti in funzione della gravità al fine di futuri esperimenti terapeutici.

Gli studi di associazione genomica (GWA) attualmente in progresso anche in Italia potrebbero portare all'identificazione di numerosi geni ciascuno dei quali con un modesto effetto sul fenotipo polmonare come si è già verificato nel settore delle malattie complesse.

Infine, occorre sottolineare che la Fondazione CF ha finanziato un progetto di screening per la CF diretto a coppie che si presentano ai Servizi di Genetica per la definizione dello stato di portatore della beta-thalassemia in Sardegna, dove è attualmente possibile identificare il 92% dei portatori CF. Questi studi potrebbero consentire di realizzare uno screening di coppie esteso in quelle popolazioni in cui lo spettro delle mutazioni CF sia stato sufficientemente definito.



Paolo Gasparini, *primo da sinistra, con il suo gruppo di ricerca.*

10. Genetic factors involved in the innate immunity influencing pulmonary disease in Cystic Fibrosis patients.

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 e FFC#3/2008, continuation)*

In our study we tried to identify modifier genes of CF lung phenotype by using two different molecular approaches. We investigated of the role of innate immune response genes analyzing a series of very well clinically characterized DF508 homozygous CF patients coming from USA (CF North America Consortium on modifier genes). We planned also to identify of new genes using a group of Italian DF508 homozygous CF patients, characterized by a more homogeneous genetic background when compared to the above mentioned series of American patients.
We selected 768 SNPs from 149 genes of the innate immunity on the basis of their possible functional role (non-synonymous coding SNPs) or known to be Tag SNPs, which represent a subset of SNPs capturing most of the haplotype diversity of each haplotype block or gene-specific region
The Illumina Golden-Gate Genotyping protocol has been used for the high throughput scanning of the innate immunity genome.
Seven SNPs have been identified as associated with the lung phenotype in the CF patients esamined. They are respectively: Nos2 *rs9906835 Tag SNP*; CCL23 *rs1003645 non-synonimous SNP*; Akt3 *rs1121276 Tag SNP*; PLA2G4C *rs11564538 non-synonimous SNP;* CXCR6 *rs2234355 non-synonimous SNP*; P2RY2 *rs35169799 non-synonimous SNP*; PLCB3 *rs3741156 non-synonimous SNP*.
To our knowledge the seven SNPs and genes identified in the present study were never described as associated to the clinical modification of the lung phenotype and represent the original contribution of our research.
Finally, it is in progress the whole genome screening in the Italian patients.

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

Al fine di identificare i geni modificatori responsabili dell'eterogeneità del fenotipo polmonare in pazienti omozigoti DF508 per il locus CF sono stati utilizzati due approcci: a) analizzare una serie di polimorfismi a carico di 149 geni coinvolti nell'immunità innata (quali i geni responsabili della chemiotassi dei neutrofili e dei leucociti, nella risposta proinfiammatoria del lume bronchiale e nell'omeostasi dei liquidi delle vie respiratorie, così come peptidi antimicrobici naturali e recettori della clearance mucociliare). A tale proposito, è stata studiata una coorte di pazienti CF ben caratterizzati dal punto di vista clinico (fornita dal "Cystic Fibrosis North American Consortium"); b) screening dell'intero genoma allo scopo di identificare nuovi geni modificatori, utilizzando un gruppo di pazienti italiani con un background genetico più omogeneo rispetto alla coorte precedente.
Sono stati selezionati 768 SNPs, distribuiti in 149 geni dell'immunità innata, sulla base del loro possible ruolo funzionale (SNPs non sinonimi) o Tag SNPs noti per rappresentare un blocco di SNPs caratterizzante una regione o un gene specifico.È stata utilizzata la tecnologia Illumina Golden-Gate per la studiare la distribuzione dei 768 SNPs nei pazienti CF selezionati.
L'analisi mediante la piattaforma Illumina Golden-Gate ci ha permesso di identificare 7 SNPs associati alla modulazione del fenotipo polmonare. Gli SNPs sono rispettivamente:
Nos2 *rs9906835 Tag SNP*; CCL23 *rs1003645 SNP non-sinonimo*; Akt3 *rs1121276 Tag SNP*; PLA2G4C *rs11564538 SNP non-sinonimo;* CXCR6 *rs2234355 SNP non-sinonimo*; P2RY2 *rs35169799 SNP non-sinonimo*; PLCB3 *rs3741156 SNP non-sinonimo*.
I 7 SNPs identificati come potenziali modulatori del fenotipo polmonare nei pazienti CF non sono mai stati descritti precedentemente in letteratura come associati alla CF in pazienti selezionati per essere omozigoti DF508 con le caratteristiche della coorte Americana studiata.
Tali risultati rappresentano un contributo originale del nostro studio alla comprensione dei meccanismi molecolari legati alla modificazione del fenotipo polmonare nei pazienti CF.
È infine in corso lo studio di tutto il genoma del gruppo di pazienti Italiani, sempre utilizzando la piattaforma Illumina con tecnologia Infinium, al fine di verificare i risulatti ottenuti sui geni dell'immunità innata ed eventaulemte aggiungere nuovi geni e SNPs candidati ai 7 SNPs identificati fino ad ora.
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.

Giuseppe Castaldo, *al centro, con il suo gruppo di ricerca.*

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

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, in progress)

Saline fluids production in humans is modulated by bicarbonate ion secretion. This secreting mechanism requires the presence of CFTR protein produced by lung, liver, pancreas, gut, genital

and sweat gland epithelial cells. When CFTR activity is impaired there is a failure in salt transport; fluids became more dense causing Cystic Fibrosis (CF). For many years the main defect in CF was considered a reduced a deficit in the chloride ion transport. Recent studies raised up this vision, demonstrating that the main defect in CF is not a failing in chloride transport per se but the impotence of mutant CFTR proteins to activate the chloride/bicarbonate exchange (Choi et al. 2001). Following studies extended the bind between CFTR and bicarbonate (Ko et al. 2002), demonstrating that CFTR enhances the activity of three SLC26 family proteins, specific anionic exchangers of chloride/bicarbonate. In another study the authors demonstrated that CFTR and SLC26A3 proteins physically interact each other (Ko et al. 2004): the bind between these two transporters results in unique, reciprocal activation of transport activity and this explains why the fluid and bicarbonate secretion depends on the expression of both proteins. The interaction is not only functional. The authors showed that if the cell yields SLC26A3 protein at the same time the production of CFTR protein rise up, and vice versa (Greeley et al. 2001), suggesting that CFTR modulates the expression of SLC26 family genes. On the basis of these molecular studies, we hypothesized that SLC26 family genes could play a role in CF pathogenesis. There are many hypothesis that can be done: a mutation in the binding domain of SLC26 protein could reduce or abolish the interaction with CFTR; a mutation could reduce the amount of SLC26 protein, making the anionic exchange less effective; or, more in general, a mutation in a SLC26 gene could have epistatic effect on CFTR expression or transport. Moreover, a mutation in a SLC26 gene could be a causative mutation in CF patients with only one identified mutation in CFTR gene. To verify these hypothesis, we analyzed 4 genes of SLC26 family and in particular: SLC26A3 (alias DRA) expressed by gut, SLC26A6 (alias PAT-1) expressed by pancreas, SLC26A8 (alias TAT-1) expressed by testis and SLC26A9 expressed by lung. These genes were tested in CF patients that showed one of these features: meconium ileum, recurrent pancreatitis or pancreatic sufficiency, bronchiectasies, sterility problems (Congenital bilateral absence of vasa deferentes, CBAVD; oligoasthenoteratospermia). Moreover, we have analyzed CF patients with one or none identified CFTR mutation, patients with the same CFTR genotype but discordant phenotypes. The preliminary results of these genes sequencing (9000 sequences about) can be resumed in this way:

- SLC26A3 (alias DRA)
  - 14 sequence variations identified
    - 6 previously described
    - 8 novel variations
- SLC26A6 (alias PAT-1)
  - 18 sequence variations identified never described
- SLC26A6 (alias TAT-1)
  - 14 sequence variations identified
    - 6 previously described
    - 8 novel variations
- SLC26A9
  - 29 sequence variations identified
    - 6 previously described
    - 23 novel variations

The most of these 75 variations have a very low frequency; the remaining have a notable frequency. As a consequence, the next step will be to research these variation in a normal cohort and to assess if there is a statistically remarkable difference in these variants distribution.

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

La produzione dei fluidi salini del corpo umano è modulata dalla secrezione dello ione bicarbonato. Tale meccanismo secretorio richiede la presenza della proteina CFTR che è prodotta dalle cellule dell'epitelio polmonare, epatico, pancreatico, intestinale, genitale e delle ghiandole sudorifere. Quando CFTR non funziona, si produce uno squilibrio nel trasporto dei sali e dei fluidi, che diventano più densi causando la Fibrosi Cistica (CF). Per lungo tempo si è pensato che il difetto principale nella CF fosse un deficit nel trasporto dello ione cloruro. Studi condotti negli ultimi anni hanno modificato questa visione dimostrando che il difetto principale della CF non è una mancanza del trasporto di cloruro in sé, ma l'incapacità delle proteine CFTR "difettose" di attivare lo scambio cloruro/bicarbonato (Choi et al., 2001). Studi successivi (Ko et al., 2002) hanno esteso il collegamento tra CFTR e bicarbonato, dimostrando che CFTR specificamente fa aumentare l'attività di tre proteine della famiglia SLC26, scambiatori specifici della coppia cloruro/bicarbonato. In uno studio successivo si è dimostrato che la proteina CFTR e la proteina SLC26A3 interagiscono fisicamente tra di loro (Ko et al., 2004): il legame tra i due trasportatori risulta in un'unica, reciproca stimolazione delle loro attività di trasporto, cosa che spiega come mai la secrezione di fluidi e bicarbonato dipenda dall'espressione di entrambe le proteine. L'interazione non è solo di tipo funzionale. Gli autori hanno dimostrato che se la cellula produce la proteina SLC26A3, parallelamente aumenta anche la produzione della proteina CFTR e viceversa (Greeley et al., 2001), suggerendo che CFTR regola l'espressione dei geni SLC26. Alla luce di queste nuove delucidazioni sui meccanismi molecolari, si è pensato che i geni della famiglia SLC26 potessero giocare un ruolo nella patogenesi della CF. In particolare, una mutazione in una proteina SLC26 potrebbe alterare o abolire l'interazione con CFTR, ridurre la quantità di proteina SLC26 rendendo lo scambio cloruro/bicarbonato meno efficace e, più in generale, una mutazione in un gene SLC26 potrebbe modulare l'espressione e l'attività di CFTR. Una seconda ipotesi è che mutazioni in geni SLC26 possano fungere da mutazioni causali di CF in pazienti in cui è stata riscontrata una sola mutazione nel gene CFTR.

Per verificare queste ipotesi, sono stati analizzati 4 geni della famiglia SLC26 ed in particolare: SLC26A3 (alias DRA) espresso dall'intestino, SLC26A6 (alias PAT-1) espresso dal pancreas, SLC26A8 (alias TAT-1) espresso dal testicolo ed SLC26A9 espresso dal polmone.

Tali geni sono stati analizzati in pazienti CF che presentavano una delle seguenti caratteristiche: ileo da meconio, pancreatiti ricorrenti o sufficienza pancreatica, bronchiectasie, problemi di sterilità (Agenesia Bilaterale dei dotti deferenti o CBAVD; oliagoastenoteratospermia). Inoltre questi geni sono stati analizzati in pazienti CF con una o nessuna mutazione nota del gene CFTR e pazienti con lo stesso genotipo CFTR e fenotipo discordante.

I risultati preliminari del sequenziamento di questi geni (circa 9000 sequenze di DNA eseguite) possono essere riassunti in questo modo:

- Gene SLC26A3 (DRA)
  - 14 variazioni di sequenza identificate
    - 6 precedentemente descritte
    - 8 nuove
- Gene SLC26A6 (PAT-1)
  - 18 variazioni di sequenza identificate, nessuna precedentemente descritta
- Gene SLC26A8 (TAT-1)
  - 14 variazioni di sequenza identificate
    - 6 precedentemente descritte
    - 8 nuove
- Gene SLC26A9
  - 29 variazioni di sequenza identificate
    - 6 precedentemente descritte
    - 23 nuove

La maggior parte di queste 75 varianti hanno una frequenza molto bassa, mentre le rimanenti hanno una frequenza considerevole. Di conseguenza, il secondo passo sarà quello di ricercare queste varianti in una coorte di soggetti normali e vedere se c'è una differenza statisticamente significativa nella distribuzione di queste varianti.

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

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

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

Although the splicing process is widespread in eukaryotic organisms and considerable detail is known about the basic general mechanism, often cystic fibrosis's genomic variations unexpectedly produce splicing alterations. In this context, we have performed a detailed analysis of the effect of mutations in two CFTR exons, exon 9 and 12, which lead to the identification of new splicing regulatory elements and recently to the identification of novel splicing regulatory factors (PUF, CUBP and ETR3). We show that these factors may act as tissue specific splicing regulator that modulate the severity of splicing defects and thus represent potential therapeutic targets. In addition our study has shown that even synonymous mutations can be disease causing by inducing aberrant splicing. In fact, for the CFTR exon 12 a significant amount of them (about one quarter) induce exon skipping. Furthermore, these studies have highlighted the complexity of the splicing and exon recognition processes, identifying a significant number of previously unknown non canonical elements that extend beyond the classical ones and can be unexpectedly the target of splicing mutations. On the other hand it is clear that even if splicing mutations act locally inducing for example skipping of its own exon or selection of cryptic sites, they can be modulated co-transcriptionally. We have explored this additional level of regulation of CFTR pre-mRNA splicing which extends beyond the local assembly of splicing factors and occurs at the level of transcription. We provide evidence that the correct biosynthesis of a mature CFTR mRNA requires not only a local assembly of splicing factors at the intron-exon boundaries but a competent transcriptional machinery that take into account the reciprocal influences between the transcriptional kinetics and local assembly of the splicing factors. For example changes in PolII transcription elongation can have a profound effect on normal and mutant CFTR exon 9 pre mRNA splicing. This close association (coupling) between transcription and mRNA processing may have an important role in modulating the phenotypic expression of some CFTR mutations. The modulation of the co-transcriptional splicing efficiency might increase the splicing efficiency, stabilize and increase the CFTR mRNA and consequently have a potential therapeutic effect.

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

Sebbene il processo di splicing sia diffuso in molti eucarioti and molti dettagli sono conosciuti riguardo ai meccanismi di base coinvolti, spesso varianti geniche possono essere la causa in modo difficilmente prevedibile di difetti di splicing. A tal riguardo unaanalisi dettagliata dell'effetto di mutazioni localizzate negli esoni del CFTR, l'esone 9 e l'esone 12, ha portato alla identificazione di nuovi elementi regolatori dello splicing e recentemente alla identificazione di nuovi fattori di splicing interessati (PUF, CUBP e ETR3). Questi fattori possono agire come regolatori dello splicing in modo tessuto specifico con prevalente funzione inibitoria e pertanto potrebbero rappresentare nuovi modulatori della severità dei difetti di splicing e potenziali bersagli terapeutici. Inoltre il nostro studio ha mostrato che anche le mutazioni sinonime possono rappresentare causa di malattia poichè inducono splicing aberrante. Infatti nell'esone 12 del CFTR un numero significativo pari a circa un quarto di mutanti sinonimi induce exon skipping con produzione di una proteina non funzionale. Questi studi hanno mostrato la complessità del processo dello splicing e del riconoscimento degli esoni ed hanno portato allaidentificazione di un numero significativo di elementi non canonici che si estendono oltre i classici conosciuti e che possono essere inaspettatamente il bersaglio di mutazioni. Inoltre, è chiaro che anche se le mutazioni di splicing agiscono localmente inducendo per esempio exon skipping o la selezione di siti criptici, esse sono sotto l'inflenza della trascrizione. Abbiamo valutato questo livello addizionale di regolazione che si estende oltre l'assemblaggio locale dei fattori di splicing. I nostri dati indicano che la corretta biosintesi dell'RNA maturo richiede non solo l'assemblaggio locale dei fattori di splicing intorno alle sequenze esoniche ma la presenza di una macchina trascrizionale che tiene in considerazione le influenze reciproche tra la cinetica trascrizionale e l'assemblaggio dei fattori stessi. Per esempio modificazioni nella elongazione della polimerasi possono avere un effetto sullo splicing aberrante dell'esone 9 del CFTR. Questa stretta associazione funzionale (coupling) tra la trascrizione e il processamento dell'RNA potrebbe avere un ruolo importante nella modulazione la espressione fenotipica di alcuni mutanti di splicing. La modulazione della efficienza di splicing co-trascrizionale potrebbe aumentare l'efficienza di splicing, stabilizzare e incrementare l'RNA messaggero del CFTR e conseguentemente risultare in un potenziale beneficio terapeutico.

13. Search of novel regulatory elements in the promoter region of CFTR gene

Pietro Pucci, *in piedi al centro, con il suo gruppo di ricerca.*

Pucci P[1], Tomaiuolo R[1], Bombieri C[2]
[1]CEINGE - Biotecnologie Avanzate s.c.a.r.l. - Univ. Federico II Napoli; [2]Istituto di Biologia Genetica – Università di Verona
(Progetto FFC #4/2008, new)

Over 1500 mutations have been identified in the CFTR gene so far. However, the scanning of the whole coding region of the CFTR gene reveals only about 92% of CF alleles. Thus, in about 10% of chromosomes from CF patients CFTR mutations are still unidentified. Unknown mutations can be localized in non-coding regulatory CFTR regions. In particular, very few mutations have been found in the promoter region and in putative regulatory

regions like the intron regions.
Mutated promoter sequences might be unable to properly bind specific regulatory proteins or may give origin to new binding sites for different factors leading to a misregulation of CFTR expression and then to the onset of the disease. Furthermore, the identification of novel protein factors involved in CFTR gene regulation in healthy individuals and in CF patients might result in a better understanding of molecular mechanisms underlying the disease and potentially, in the development of novel therapies. Expression of the CFTR gene shows a clear temporal and developmental regulation, but the regulatory mechanisms are poorly understood and only few regulatory elements have been identified so far. In the light of these considerations, elements controlling the complex developmental and tissue-specific expression of the CFTR gene might lie outside the basal promoter region and have not been jet characterized.
The aims of this project are 1) to analyze the promoter regions of CFTR gene to evaluate the presence of mutations in a large group of patients bearing "classic" and "atypical" CF; 2) to identify promoter variants causative of CF; 3) to search for the regulatory proteins able to interact either with the wild type or the mutated promoter DNA sequences.
The wild type and the mutated promoter sequences showing altered expression capabilities will be used in affinity chromatography experiments according to the "fishing for partners" approach to isolate and to identify putative regulatory proteins affecting the CFTR gene expression regulation.
Identification of novel protein factors involved in CFTR gene regulation in healthy individuals and in CF patients might result in a better understanding of the molecular mechanisms underlying the disease and potentially, in the development of novel therapies.

Ricerca di nuovi elementi regolatori nella regione del promotore del gene CFTR.

Fino ad oggi sono state identificate oltre 1500 mutazioni nel gene *cftr* responsabile per la Fibrosi Cistica, ma di queste solo il 92% risiede nella porzione del DNA codificante per la proteina CFTR. Le rimanenti mutazioni sono state individuate in diverse regioni del gene tra cui quella deputata alla regolazione dell'espressione (la regione del promotore) ed altre che si ipotizza possano essere coinvolte nei processi di maturazione del prodotto genico (le regioni introniche).
Quindi non è escluso che fattori genici indipendenti dal gene CFTR e/o fattori che si trovano all'interno del gene stesso, possano rappresentare un sistema finemente integrato, responsabile della patogenesi della malattia. In una parte dei pazienti CF la malattia potrebbe essere dovuta ad alterazioni dei meccanismi di regolazione dell'espressione genica, piuttosto che alla presenza di difetti della struttura della proteina. Infatti, studi condotti a partire dal 1992 hanno rivelato come la regolazione dell'espressione genica di CFTR, sia non solo sotto il controllo dello specifico promotore, ma anche di numerosi meccanismi molecolari tessuto-specifici e tempo-specifici in cui è fondamentale il ruolo svolto da altri fattori proteici. Le mutazioni riscontrate nella regione del promotore, infatti, potrebbero alterare il legame di altre proteine a questa regione causando così una alterazione dei meccanismi di controllo e generando livelli alterati della proteina CFTR
Il presente progetto di ricerca si propone di identificare i fattori proteici responsabili della regolazione del gene CFTR capaci di legarsi specificamente alla regione del promotore. Inoltre, verrà analizzata la regione del promotore del gene CFTR per valutare la presenza di mutazioni sia in pazienti con la forma "classica" che in pazienti con la forma "atipica" della malattia allo scopo di identificare le mutazioni causative di CF nel promotore. A questo punto si procederà all'identificazione delle proteine coinvolte nel legame con le regioni mutate per isolare ed identificare nuovi fattori proteici importanti per la regolazione del gene CFTR e per comprendere le basi molecolari delle alterazioni presenti in questi pazienti. La conoscenza dei fattori proteici che interagiscono in maniera specifica con le sequenze di DNA recanti le mutazioni trovate nei malati, potrebbe aprire nuovi spiragli nella comprensione delle cause di alcune manifestazioni cliniche fino ad oggi inspiegabili.

Giuseppe Novelli

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

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, concluded)*

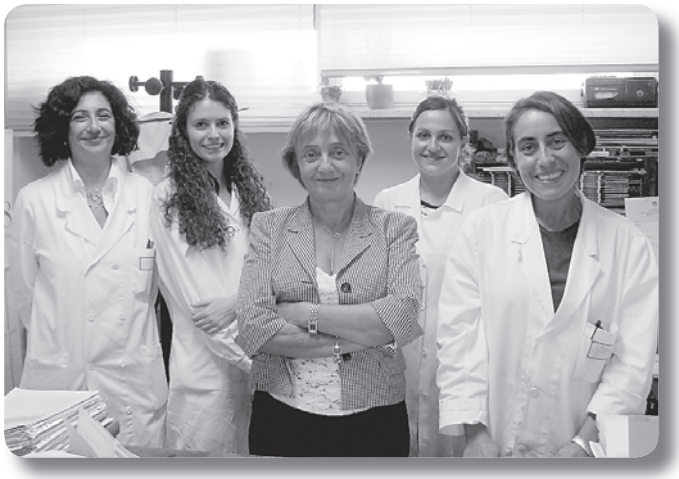
Nasal polyps are lesions that emanate from any portion of the nasal mucosa or paranasal sinuses. The main cause is considered to be the inflammation, related to increased epithelial cell proliferation (important in covering the epithelial defects), and dysregulation of epithelial cell proliferation. Morover, no particular cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) mutation, correlating with the phenotype of nasal polyp formation in cystic fibrosis 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 79 subjects with non CF- nasal polyposis and performed a case-control analysis with CFTR mutations and polymorphismlike PolyT IVS-8, (5T, 7T, 9T). The screening of 49 CFTR mutations allowed o characterize two mutations (DF508 and L997F) in the nasal polyposis populations (0,025%). These data are not statistically significative if compared with the frequencies of CFTR mutation in the population (0,04%). Moreover, direct sequencing of ex 9 and 10 didn't show any association between CFTR geneand IVS8-polyT, IVS8-polyTG and M470V polymorphisms. These data show the lack of association between mutation frequencies and polymorphism in CFTR in non CF nasal polyposis patients. 2) To analyse if *SPINK5* gene variants could modulate the development of nasal polyposis association analyses of 5 SPINK5 gene SNPs with the presence of nasal polyposis was performed in 4 sample sets: 79 patients with nasal poliposis but not affected by CF, 39 CF patients with nasal polyposis, 104 CF patients without nasal poliposis and 51 controls. A significant association between the rs6892205-SNP and nasal polyposis was found in almost all the analyses performed. The association of D386N with nasal polyposis was limited to CF group only. The results were confirmed by the haplotype analysis; the higher risk haplotype found was 228772T-6892205G-D386-420K-2052532C. It is possible to speculate for the SPINK5 gene a possible role in the inflammatory process involved in the pathogenesis of nasal polyposis. 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 13 patients (non-CF =9 and CF =4). 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.

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 79 pazienti con poliposi nasale non-FC, ed abbiamo effettuato uno studio caso-controllo con il tratto polimorfico PolyT IVS-8, (5T, 7T, 9T) ed una serie di mutazioni molto comuni nella popolazione italiana. Tuttavia, non è stata identificata nessuna correlazionen statisticamente significativa.
2) Allo scopo di determinare se polimorfismi del gene SPINK5 possono modulare lo sviluppo di poliposi nasale, sono stati svolti studi di associazione tra 5 SNPs del gene SPINK5 e la presenza di poliposi nasale in 4 gruppi di soggetti: 79 soggetti con poliposi nasale ma non affetti da FC, 39 pazienti FC con poliposi nasale, 104 pazienti FC senza poliposi nasale e 51 controlli. Una associazione significativa è stata osservata tra la SNP rs6892205 e la presenza di poliposi nasale in tutte le analisi condotte, mentre una associazione con la variante D386N è stata identificata limitatamente ai pazienti FC con poliposi nasale. Il risultato è stato confermato anche dall'analisi degli aplotipi. L'aplotipo a maggior rischio è risultato essere 228772T-6892205G-D386-420K-2052532C. È possibile quindi supporre che il gene SPINK5 giochi un ruolo nel processo infiammatorio coinvolto nella patogenesi dei polipi nasali.
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 13 DNA ottenuti da polipi nasali di pazienti poliposici non-CF (n=9) e CF (n=4). 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.

15. Characterization of the unknown mutations in Italian patients and assessment of their pathogenic role: a prerequisite for prevention of Cystic Fibrosis by carrier screening and prenatal diagnosis



Maria Cristina Rosatelli, *al centro, con il suo gruppo di ricerca.*

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, concluded)

The aim of the project is to define rare or unknown molecular defects of the cystic fibrosis gene (CFTR gene) in Italian patients and to study the mechanisms involved in the CFTR gene expression. This is a collaborative project involving 6 Italian centers. We selected 441 patients affected by classical form of cystic fibrosis with 373 undefined alleles after first level screening that tests the most common mutations in the Italian population. Several of these patients were tested at second level screening characterized by DHPLC analysis and CFTR gene sequencing. Another group of patients, already negatives at second level screening, were studied either at DNA and RNA level in order to detect large deletions as well as complex rearrangements of the gene. RNA analysis represents a powerful tool for identification of gross gene deletions as well as splicing defects. By these molecular approaches, up to now, we defined 322 alleles. Among these, we identified 4 new mutations: 3 point mutations and 1 large gene rearrangement. It consists of a duplication spanning from the promoter region to exon 3. At diagnostic level, the results of this project will led us to set up diagnostic kits allowing the identification of carrier subjects among affected patient's relatives. We already have more data about the distribution of the CF alleles in Italy in order to start a prevention program in reproductive age couples.

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 441 pazienti affetti da fibrosi cistica classica con 373 alleli non definiti dopo il test molecolare di primo livello che ricerca le mutazioni più frequenti nella popolazione italiana. Alcuni di questi pazienti sono stati avviati ad uno screening di secondo livello che prevede l'analisi DHPLC e sequenziamento del gene CFTR. Altri, 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 si è rivelato 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 322 alleli. Abbiamo identificato 4 nuove mutazioni: 3 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. Grazie ai risultati ottenuti attraverso questo progetto, siamo in grado di 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.

16. Feasibility of a screening program for the preconceptional identification of Cystic Fibrosis carriers in Sardinian population

Rosatelli MC[1],
[1]*Laboratorio Genetica Molecolare Dipartimento di Scienze Biomediche e Biotecnologie, Sezione di Clinica e Biologia dell'Età evolutiva, Università degli Studi di Cagliari;*
(Progetto FFC #5/2008, new)

Our project intends to develop a pilot study of molecular screening of cystic fibrosis in Sardinian population. In Sardinia, the studies carried out by our Laboratory in the last 15 years led to map the mutational spectrum of CF and to set up a "Sardinian" diagnostic kit with a detection rate of 92%: it means that we are able to identify 92% of Sardinian carriers. Some of these studies were supported by the FFC Foundation. This detection rate led us to develop a pilot study for CF population screening in reproductive period. This model of study could be exported in other Italian regions.
The project intends to roll out all the same subjects to whom the beta thalassemia screening program is successfully addressed. We will collaborate with Genetic Counselling and Screening Services located in the Ospedale Regionale per le Microcitemie which will present the project to all subjects that intend to participate.
In the future we will valuate the possibility to export this type of screening in other Italian regions.

Fattibilità di un programma di screening per l'identificazione pre-concezionale di portatori di Fibrosi Cistica nella popolazione sarda

Il progetto si propone di sviluppare uno studio pilota di screening molecolare di coppia nella popolazione sarda per la prevenzione della fibrosi cistica. In Sardegna gli studi eseguiti negli ultimi 15 anni dal nostro Laboratorio, alcuni dei quali finanziati dalla Fondazione, hanno permesso di delineare lo spettro mutazionale della fibrosi cistica e di sviluppare un kit diagnostico "sardo" che presenta una efficienza diagnostica del 92%: è cioè in grado di diagnosticare il 92% dei portatori. Questa efficienza diagnostica per la FC mette la Sardegna nella condizione ideale per l'avvio di un progetto pilota di prevenzione della patologia basato sullo screening della popolazione in epoca riproduttiva. Il progetto si propone di utilizzare i canali di informazione e arruolamento della popolazione da sottoporre allo screening che già sono attivi in Sardegna per lo screening della beta talassemia. A questo scopo si avvarrà della collaborazione del Servizio di Screening e Consulenza Genetica dell'Ospedale Regionale per le Microcitemie che avrà il compito di proporre ai soggetti, che ivi afferiscono per lo screening della talassemia, di sottoporsi contemporaneamente all'indagine molecolare per la fibrosi cistica. L'attuazione di questo progetto permetterà di identificare le coppie a rischio aumentato di generare figli affetti da FC. Attraverso la collaborazione con il Servizio di Consulenza Genetica, sarà inoltre possibile fornire alle coppie a rischio tutti gli strumenti disponibili per una procreazione consapevole. Verrà valutata la possibilità di esportazione e di utilizzo dello screening a livello nazionale.

3. MICROBIOLOGIA I

Microbiology I

Introduction: Basic and Genetic Microbiology- Italian Highlights

Gerd Doering
Department General & Environmental Hygiene, Institute of Hygiene, University of Tuebingen, Germany. Editor-in-Chief Journal of Cystic Fibrosis. Member Scientific Advisory Board Italian CF Research Foundation.
Dip. Igiene Generale e ambientale, Istituto di Igiene, Università di Tuebingen, Germania. Editore Capo del Journal of Cystic Fibrosis. Membro comitato Scientifico Fondazione Ricerca FC.

Chronic bacterial lung infections are still the major cause of morbidity and mortality in individuals with CF and several projects have been financially supported by the FCC. **Bertoni** uses genomic technology to identify essential function in *P. aeruginosa* with the aim to develop alternative antibacterial therapies using synthetic oligomers mimicking antisense RNA. **Bragonzi** is screening the *P. aeruginosa* genome using microarray, insertional mutagenesis and *in silico* analysis with the aim to develop a novel vaccine for CF. **Landini** searches for inhibitors of proteins which synthesise cyclic-di-GMP, a signal molecule which affects biofilm formation in Gram-negative bacteria. **Bonomi** has characterized a transglutaminase of *P. aeruginosa* and looks for inhibitors of this membrane protein. **Polissi** investigates the concept that surface LPS represents a major target for the antibacterial activity of the host and designs and synthesizes inhibitors for two selected proteins involved in LPS synthesis. **Colonna** investigates *Stenotrophomonas maltophilia*, a multiple antibiotic resistant microorganism, using a proteomics approach to identify proteins selectively expressed at the host temperature and involved in biofilm formation *in vivo* using a genome-related approach. **Manno** analyses the clonal relatedness of *P. aeruginosa* strains in Italy and found that strains are not related to major European clones, that 40% of patients were colonized with hypermutable strains which were to a high percentage resistant to antibiotics and that person to-person transmission in the CF centres exists. **Neri,** investigating antibiotic resistance mechanisms of *P. aeruginosa,* found that despite the large amount of antibiotics to which CF patients had been exposed for prolonged periods, the contribution of acquired resistance genes and mutation-mediated resistance mechanisms are limited in the evolution of phenotypic resistance in these strains. However, CF patients with resistant *P. aeruginosa* showed more severe lung disease, more frequent pulmonary exacerbations and received higher doses of intravenous antibiotics. **Molinaro** studies the endotoxic and immunostimulating parts of LPS and found that LPS of persistent *P. aeruginosa* strains contains a high percentage of hexacylated and heptacylated lipid A. **Visca** aims to identify and characterize key molecular factors involved in iron uptake and quorum sensing to identify suitable targets for new-drugs development such as RsaL. **Bevivino** is interested in the communication between pathogenic microorganisms and the resident microflora particularly the interactions between *P. aeruginosa* and *B. cenocepacia* within biofilms in vitro and in animal models and found that the co-presence of the *B. cenocepacia* and *P. aeruginosa* strains has a profound effect on their rate of internalization into epithelial cells of pulmonary origin. **Rizzo** investigates the primary structure of LPS produced by clinical isolates of *B. cepacia* and *B. multivorans* including the acetylation pattern and the gene clusters involved in the biosynthesis of the exopolysaccharide cepacian. **Riccardi** studies *B. cenocepacia* efflux pumps using molecular genetics. **Venturi** concentrates on virulence factors regulated by quorum sensing in *Pseudomonas* and *Burkholderia* using *C. elegans* and the *G. mellonella* virulence models. **Campana** investigates Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain epidemiology in Italy and found that community-acquired strains which are highly virulent and pathogenic are now replacing HA-MRSA in hospital settings and are now spreading in CF patients.

Introduzione: microbiologia di base e genetica

L'infezione batterica cronica del polmone è ancora la causa principale di morbilità e di mortalità nei doggetti con fibrosi cistica e numerosi progetti su questo problema sono stati supportati finanziariamente dalla Fondazione RIcerca Fibrosi Cistica. **Bertoni** usa la tecnologia genomica per identificare funzioni essenziali di *P. aeruginosa* con l'obiettivo di sviluppare terapie antibiotiche alternative per mezzo di oligomeri sintetici che imitano l'RNA antisenso. **Bragonzi** sta screenando il genoma di *P. aeruginosa* impiegando tecniche di microarray, mutagenesi inserzionale ed analisi *in silico* con l'obiettivo di sviluppare un nuovo vaccino per CF. **Landini** studia inibitori di proteine che sintetizzano GMP-di-ciclico, una molecola segnale che interessa la formazione di biofilm nei batteri Gram-negativi. **Bonomi** ha caratterizzato una transglutaminasi di *P. aeruginosa* e sta ricercando inibitori di questa proteina di membrana. **Polissi** sta sviluppando il concetto che i lipopolisaccaridi (LPS) di membrana rappresentano un bersaglio maggiore per l'attività antibatterica dell'ospite e sta disegnando e sintetizzando inibitori per due proteine selezionate che sono coinvolte nella sintesi di LPS. **Colonna** studia il batterio *Stenotrophomonas maltophilia,* un microrganismo resistente a molti antibiotici, impiegando un approccio proteomico per identificare proteine selettivamente espresse alla temperatura corporea e coinvolte nella formazione di biofilm *in vivo* usando un approccio genoma-correlato. **Manno** analizza i legami clonali di ceppi di *P. aeruginosa* isolati in Italia, trovando che tali ceppi non sono imparentati con i maggiori cloni Europei e che il 40% dei pazienti sono colonizzati con ceppi ipermutabili che in alta percentuale sono resistenti agli antibiotici. Inoltre, conferma che esiste nei centri italiani trasmissione di *P. aeruginosa* da persona a persona. **Neri**, studiando i meccanismi di resistenza agli antibiotici, ha trovato che, nonostante la grande quantità di antibiotici ai quali i pazienti CF sono stati esposti per lunghi periodi, il contributo di geni della resistenza acquisita e di meccanismi di resistenza mediata da mutazioni è limitata nell'evoluzione della resistenza fenotipica in questi ceppi. Tuttavia, i pazienti CF con *P. aeruginosa* resistente mostravano una malattia polmonare più grave e più frequenti esacerbazioni polmonari; essi inoltre avevano ricevuto più alte dosi di antibiotici endovena. **Molinaro** studia le parti endotossiche e immunostimolanti dei LPS, trovando che i LPS di ceppi persistenti di *P. aeruginosa* contengono un'alta percentuale di lipide A exacilato ed eptacilato. **Visca** ha l'obiettivo di identificare e caratterizzare i fattori molecolari chiave coinvolti nell'assunzione di ferro e nella formazione del quorum sensing al fine di individuare dei bersagli per lo sviluppo di nuovi farmaci quali il RsaL. **Bevivino** è interessata alla comunicazione tra i microrganismi patogeni e la flora residente, particolarmente per quanto concerne le interazioni tra *P. aeruginosa* e *B. cenocepacia* all'interno dei biofilm *in vitro* e in modelli animali, trovando che la compresenza di ceppi di *B. cenocepacia* e di *P. aeruginosa* ha un profondo effetto sul loro grado di internalizzazione entro le cellule epiteliali di origine polmonare. **Rizzo** studia la struttura primaria di LPS prodotti da isolati clinici di *B. cepacia*

e di *B. multivorans*, includendo il modello di acetilazione e i gruppi di geni coinvolti nella biosintesi degli esopolisaccaridi cepacici. **Riccardi** sta stdiando le pompe di efflusso di *B. cenocepacia* usando tecniche di genetica molecolare. **Venturi** si concentra sui fattori di virulenza regolati dal quorum sensing in *Pseudomonas e Burkholderia* usando come modelli per la virulenza *C. elegans* e *G. mellonella*. **Campana** infine ha studiato l'epidemiologia in Italia di ceppi di *Staphylococcus aureus* Meticillino-resistente (MRSA), trovando che i ceppi di acquisizione comunitaria che erano altamente virulenti e patogenici stanno ora rimpiazzando nelle sedi ospedaliere gli MRSA di tradizionale acquisizione ospedaliera e questi si stanno anche diffondendo tra i pazienti CF.

17. 1. Genome–wide identification of target genes for the design of non–conventional antibiotics against CF related pathogens. 2. Design of non-conventional antibiotics against cystic fibrosis-related pathogens.

Giovanni Bertoni, *primo da sinistra, con il suo gruppo di ricerca.*

Bertoni G[1], Milani A[1], Pavesi G[1], Dehò G[1], Bragonzi A[2], Montanari S[2], Maiorana S[3], Licandro E[3], Baldoli C[3]
[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;* [3]*Dipartimento di Chimica Organica e Industriale, Università degli Studi di Milano*
(Progetto FFC #6/2006 e FFC#6/2008, continuation)

The development of alternative antibacterial therapies has to head for novel targets, usually essential functions for bacterial life, and/or to address novel principles of action. 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 based on synthetic oligomers mimicking antisense RNA that, unlike conventional antibiotics, impact target expression and not its functionality. The project FFC#6-2006 has been focusing mainly on the study of the inhibition, mediated by antisense RNA, on the targets identified in the initial genomic approach. This study continues within the project FFC#6-2008 where, using the bioinformatics applied to the structural analysis of RNA and synthetic chemistry, we aim at the development of non-conventional antibiotics based on oligomers acting as RNA mimetics.

1. Identificazione su tutto il genoma di geni target per disegnare antibiotici non convenzionali contro i patogeni correlati alla fibrosi cistica.
2. Disegno di 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, generalmente funzioni essenziali per la vita del batterio patogeno, e/o nuovi principi di azione. 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 nuove 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 questa tecnologia, oltre a permettere l'identificazione di bersagli per lo sviluppo di nuovi antibiotici convenzionali, fornisce informazioni per disegnare molecole antibiotiche non convezionali basate su oligomeri sintetici mimetici di RNA interferenti che, a differenza degli antibiotici convenzionali, inibiscono l'espressione del target e non la sua funzionalità. Il progetto FFC#6-2006 si è focalizzato principalmente sullo studio sull'interferenza, mediata da RNA antisenso, dell'espressione dei bersagli che abbiamo identificato con l'approccio genomico iniziale. Questo studio continuerà nel progetto FFC#6-2008, dove utilizzeremo anche la bioinformatica applicata all'analisi strutturale dell'RNA e la chimica sintetica per lo sviluppo di antibiotici non-convenzionali basati su mimetici di RNA interferenti.

Alessandra Bragonzi, *seconda da sinistra, con il suo gruppo di ricerca.*

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

Bragonzi A[1], Bianconi I[1], Bertoni G[2], Milani A[2], Renzi F[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, concluded)

P. aeruginosa lung infection is the major cause of morbidity and mortality in patients with CF. During chronic colonisation the bacteria adapts to the CF niche due to the disease-specific environmental conditions of the host, such as anaerobic mucus layer and the pressure of innate immune defence system. Consistent with its larger genome size and environmental adaptability, *P. aeruginosa* changes continuously its gene expression according to the host/environmental conditions overwhelming natural defence and resulting dramatically in therapy resistance. To date, the limited

knowledge of sensible bacterial targets has been an important barrier in developing effective therapies against *P. aeruginosa* in patient with CF. The main aim of this proposal was to identify and characterize novel vaccine candidates of *P. aeruginosa*, the most relevant pathogen in CF. To achieve this aim, *P. aeruginosa* genome has been screened by matched genomic approaches (microarray, insertional mutagenesis, *in silico* analysis) to generate a database of good targets for antibacterials. We have identified good bacterial antigens such as those: i) expressed under the host/pathogen condition, ii) involved in the pathogenesis of chronic infection iii) exposed on the bacterial surface which will be useful to design a novel immuno-antibacterials. These results will settle the basis of a novel immunotherapy to contrast *P. aeruginosa* lung infections and to improve quality of life and life expectancy of CF patients.

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 *Pseudomonas 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 ha utilizzato una combinazione di nuovi approcci genomici (trascrittomica, genomica funzionale e bioinformatica), per scandagliare l'intero genoma di *P. aeruginosa* al fine di identificare nuove funzioni batteriche con un alto potenziale immunogenico. Il progetto ha identificato 49 nuove funzioni di *P. aeruginosa* che soddisfano i seguenti requisiti: i) espresse in condizioni di aerobiosi e anaerobiosi e rilevanti durante il processo di infezione acuta o cronica; ii) presenti in un vasto numero di ceppi e iii) potenzialmente accessibili agli anticorpi in quanto esposte sulla membrana esterna o periplasmatica. Le funzioni identificate hanno un potenziale immunogenico che verrà valutato in modelli animali preclinici. Inoltre, una buona parte di questi nuovi antigeni (23/49: 47%) non ha funzione nota e verrà studiata in diversi modelli in vitro ed in vivo. I risultati di questo progetto possono essere utilizzati per disegnare nuove strategie di intervento e trattamenti terapeutici in pazienti con FC.

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

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

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, concluded)

The main goal of this project was to set up a screening system for inhibitors of proteins involved in the metabolism of cyclic-di-GMP (c-di-GMP), an important bacterial signal molecule. The c-di-GMP signal molecule is crucial for biofilm formation; in turn, biofilm formation is a virulence factor in many chronic infections, including chronic pneumonia in Cystic Fibrosis patients. c-di-GMP is synthesized by diguanylate cyclases, also called GGDEF proteins from the amino acid sequence of their catalytic site. In bacteria, in particular in Gram negatives, genes encoding proteins involved in c-di-GMP biosynthesis and degradation are highly redundant (up to 60 genes); this situation, very unusual for prokaryotic genomes, would suggest that c-di-GMP-related genes play an important role for the bacterial cell. Indeed, c-di-GMP strongly affects exopolysaccharide (EPS) biosynthesis, biofilm formation, morphological differentiation and even antibiotic resistance. Thus, inhibitors of c-di-GMP biosynthesis should prevent biofilm formation in bacteria; such inhibitors could display direct antimicrobial activity or, alternatively, they might be used in combination with known antimicrobial agents to enhance their effect. In addition, higher eukaryotes lack the c-di-GMP signaling system, which suggests that inhibitors of c-di-GMP biosynthesis would display selective activity on bacterial cells. Within the two year-period of this project we have been able to set up a screening for GGDEF protein inhibitors suitable for processing a large number of chemical compounds and for scale-up to High-throughput Screening systems. A first screening campaign using a chemical library of just over 1,000 compounds has already been carried out, and inhibitors of biofilm formation could be identified. Future experiments will determine if these inhibitors can indeed impair diguanylate cyclase activity and if they can provide an effective tool as anti-biofilm and antimicrobial agents.

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

I biofilm sono comunità microbiche adese a superfici solide, come ad esempio i tessuti vitali dell'ospite, in grado di produrre grandi quantità di matrice extracellulare, costituita prevalentemente da polisaccaridi. Questa matrice extracellulare protegge le cellule del biofilm batterico dalla risposta immunitaria dell'ospite e anche dal trattamento con antibiotici. In pazienti di fibrosi cistica, la formazione del biofilm batterico è un fattore di virulenza fondamentale per lo sviluppo dell'infezione batterica delle vie respiratorie. La produzione di polisaccaridi per la formazione della matrice extracellulare dei biofilm dipende da una molecola segnale, il GMP-diciclico (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 del c-di-GMP rappresentano un bersaglio interessante per l'inibizione della formazione dei biofilm batterici da agenti antimicrobici. Un inibitore delle proteine coinvolte nel metabolismo del c-di-GMP che impedisca la formazione del biofilm potrebbe infatti rivelarsi uno strumento molto efficace nella terapia delle polmoniti in pazienti CF, particolarmente se usato in combinazione con antibiotici ad azione battericida. Nel progetto di ricerca da noi svolto abbiamo messo a punto un saggio microbiologico per identificare composti chimici in grado di inibire gli enzimi coinvolti nel metabolismo del c-di-GMP e di contrastare la formazione del biofilm batterico. Grazie al sistema da noi messo a punto, abbiamo già potuto identificare alcuni composti chimici che si sono dimostrati efficaci nell'inibizione del biofilm nel nostro sistema sperimentale e il cui potenziale antibatterico verrà ulteriormente studiato. Il saggio microbiologico da noi sviluppato verrà reso disponibile ad altri gruppi di ricerca, sia accademici sia industriali, interessati all'identificazione di agenti antimicrobici in grado di inibire la formazione del biofilm.

Francesco Bonomi, *primo da sinistra, con il suo gruppo di ricerca.*

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

Bonomi F[1], Iametti S[1], Bertoni G[2], Milani A[2], Cisbani G[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, in progress)

Pseudomonas aeruginosa is the most relevant bacterial pathogen for cystic fibrosis patients. This project aims at the molecular characterization of a membrane protein from *P. aeruginosa*, that may represent a novel target for specific antibiotics. This protein has been identified in a previous project (FFC#10/2004), and is 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 a bioinformatic analysis suggests that it has distinct transmembrane and catalytic domains. However, the nature of its catalytic activity remains unknown, and in particular it is unclear whether it corresponds to a protease or to a transglutaminase. In the first year of the project, the putative biologically active domain has been produced as a recombinant protein overexpressed in *E. coli*, and techniques for its purification have been worked out. Meanwhile, we have designed a sensitive assay for one of the possible activities of this domain, that may act as a transglutaminase in the biosynthesis of components of the bacterial wall. The assay is based on fluorescent probes conjugated to peptides that are substrates for this family of enzymes, and is set up to be used in high-throughput automated screening procedures. The purified domain was found to be devoid of proteolytic activity both on synthetic substrates and on proteins that may easy undergo proteolytic degradation. Preliminary evidence suggests that the protein may indeed be a transglutaminase, and this will be corroborated as soon as larger amounts of the protein will be available. This work will allow the screening of suitable chemical libraries, aimed at finding compounds that inhibit the activity of the protein and therefore may be candidates for new antibiotics. The project also aims at assessing the structure of the catalytic domain of the protein. This biochemical and genetic information will assess the role of this protein in the physiology and biochemistry of *P. 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 più rilevante per i malati di fibrosi cistica. Questo progetto intende condurre uno studio molecolare sulla struttura e la funzione di una proteina di membrana del batterio che può rappresentare un nuovo potenziale bersaglio per antibiotici. Questa proteina è stata identificata nel corso del progetto FFC#10/2004, ed è oggetto di indagine genetica nel progetto FFC#6/2006 che continuerà nel FFC#6/2008. Essa si localizza sulla superficie della cellula batterica, ed approcci bioinformatici suggeriscono strutture distinte per l'ancoraggio alla membrana e l'attività catalitica. Tuttavia la natura della sua attività catalitica rimane sconosciuta, ed in particolare non è chiaro se si tratta di una proteasi o transglutaminasi. Nel primo anno di attività, la porzione della proteina che ipotizziamo contenere la parte rilevante per la sua attività biologica è stata clonata, espressa come proteina ricombinante, e purificata. Nel contempo, è stato messo a punto un saggio ad alta sensibilità per verificare la possibile attività biologica. Il saggio consente di valutare con efficacia l'attività transglutaminasica ed è basato sull'impiego di sonde fluorescenti coniugate a peptidi che sono noti substrati di questa classe di enzimi. La proteina purificata non ha evidenziato attività proteolitica né su substrati sintetici né su proteine facilmente degradabili. Risultati preliminare hanno invece permesso di ipotizzare un'attività transglutaminasica, che verrà confermata non appena sarà disponibile una quantità significativa di proteina. Nel suo complesso questo progetto consentirà di eseguire uno screening rapido ed efficiente di molecole con attività inibitoria e quindi candidate allo sviluppo di nuovi antibiotici, anche utilizzando informazioni sulla struttura tridimensionale del dominio catalitico. Queste informazioni biochimiche e genetiche permetteranno di definire il ruolo della proteina target nella fisiologia del batterio, e di sviluppare possibili interventi significativi dal punto di vista terapeutico.

21. Essential proteins of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane biogenesis as novel targets for new anti-microbial drugs design and synthesis

Alessandra Polissi

Laura Cipolla

Paola Sperandeo

Silvia Sommaruga

Polissi A[1], Dehò G[2], De Castro C[3], Bolognesi M[2], Cipolla L[1], De Gioia L[1]
[1]*Dipartimento. Biotecnologie e Bioscienze - Università Bicocca Milano;* [2] *Dipartimento Scienze Biomolecolari e Biotecnologie Università di Milano;* [3]*Dipartimento di. Chimica e Biochimica Organica - Università. Federico II - Complesso Universitario Monte Sant'Angelo Napoli*
(Prog FFC #10/2008, new)

The cell envelope of gram-negative bacteria consists of an inner (IM) and an outer (OM) membrane separated by the periplasmic space, which contains the peptidoglycan layer. The OM is an asymmetric bilayer, with phospholipids in the inner leaflet and lipopolysaccharides (LPS) facing outward. LPS is composed of three elements: lipid A, the core oligosaccharide and the *O*-antigen. The core oligosaccharide can be further divided into the inner and the outer core regions. The structure of the outer region is variable while the inner core is highly conserved and contains at least one residue of 3-deoxy-D-

manno-octulosonate (Kdo). The surface of bacterial pathogens is the first site of interaction with the host and represents a major target for the antibacterial activity of the host. Among microbial components, LPS is a key structure that is sensed by the host and represents a potent stimulant of immune responses. The project focuses on exploiting LPS biogenesis as a target for the development of new therapeutic strategies against infectious diseases. The work focuses on two proteins implicated in different steps of LPS biogenesis in *E. coli*. KdsD (D-arabinose 5-phosphate isomerase; API) has been recently characterized in *E. coli* as the enzyme that catalyzes the first reaction of Kdo synthesis. LptA is a periplasmic protein essential for survival of *E. coli*, and its depletion blocks the transport of *de novo* synthesized LPS, suggesting that the protein is the periplasmic carrier responsible for LPS transport from the IM to the OM of *E. coli*. The objective of the work is to characterize the *P. aeruginosa* homologous proteins, KdsD and LptA as target for development of novel antibacterials. *P. aeruginosa* mutants of *kdsD* and *lptA* will be constructed to confirm the essentiality of the two genes. The two proteins will be expressed in *E. coli* and purified for crystal growth. The resulting crystals will be used for X-ray diffraction data collections. The availability of the 3D structures of the proteins together with NMR binding studies data will lead us to design and synthesize inhibitors (based on in silico design/simulation and/or binding studies of fragment ligands) for the two proteins.

L'involucro cellulare dei batteri gram-negativi è costituito da una membrana interna (IM) e una membrana esterna (OM) separate dallo spazio periplasmatico, contenente uno strato di peptidoglicano. La membrana esterna è un doppio strato asimmetrico, costituito da fosfolipidi nel foglietto interno e lipopolisaccaridi (LPS) all'esterno.
Il LPS è costituito da tre elementi: il lipide A, il core oligosaccaridico e l'antigene O. Il core oligosaccaridico può essere ulteriormente suddiviso in una porzione interna ed una esterna. La struttura della porzione esterna è variabile mentre la porzione interna è altamente conservata e contiene almeno un residuo di 3-deossi ottulosonato (Kdo). La superficie dei batteri patogeni è il primo sito di interazione con l'ospite ed è il principale bersaglio delle attività antibatteriche dell'ospite. Tra i componenti microbici, LPS è una struttura chiave che è riconosciuta dall'ospite e rappresenta un potente attivatore per la risposta immunitaria innata.
Il progetto è focalizzato sull'utilizzo della biogenesi del LPS come bersaglio per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche contro le malattie infettive. Il lavoro si concentra su due proteine implicate in diversi passaggi della biogenesi di LPS in *E. coli*. KdsD (D-arabinosio 5-fosfato isomerasi; API) è stata recentemente caratterizzata in *E. coli* come l'enzima che catalizza la prima reazione della sintesi di Kdo. LptA è una proteina periplasmatica essenziale per la sopravvivenza di *E. coli* e la sua deplezione blocca il trasporto di LPS di nuova sintesi, suggerendo che la proteina è responsabile del trasporto di LPS dalla IM alla OM di *E. coli*. Lo scopo del lavoro è la caratterizzazione delle proteine omologhe KdsD e LptA in *P. aeruginosa* quali bersagli per lo sviluppo di nuovi antibatterici. Saranno costruiti mutanti di *P. aeruginosa* in *kdsD* e *lptA* per confermare il loro ruolo essenziale. Le due proteine saranno espresse in *E. coli* e purificate per la cristallizzazione. I cristalli così ottenuti saranno sottoposti a diffrazione a raggi-X. La disponibilità delle strutture tridimensionali delle proteine, insieme agli studi di legame effettuati per NMR, ci permetteranno di disegnare e sintetizzare inibitori diretti contro le due proteine.

Proteine essenziali per la biogenesi della membrana esterna di *Pseudomonas aeruginosa* come nuovi bersagli per la progettazione e sintesi di farmaci antimicrobici innovativi

Bianca Colonna, *seconda da destra, con il suo gruppo di ricerca.*

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

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 # 7/2007, in progress)*

Stenotrophomonas maltophilia is a multiple antibiotic resistant microorganism widespread in the environment that has gained increasing medical attention as a major nosocomial pathogen. In particular, over the past several years *S. maltophilia* has earned considerable attention as one of the most prominent emerging pathogens of the airways of 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 clinical importance, the basis of the pathogenicity of *S.maltophilia* in CF patients is poorly understood. The aim of the present project (FFC#7/2007) is to decipher the molecular and cellular strategies adopted by *S. maltophila* to induce persistent infections in CF patients eliciting deterioration of the lung epithelium, in order to identify potential antimicrobial targets that may be useful in the search for better therapies. This project (which follows a previous one, FFC# 7/2005) gave us the opportunity to set up the first Italian network in the field of CF-related *S. maltophilia* infections, joining academic and clinical laboratories, in an intensive common research activity towards a better understanding of the molecular mechanisms adopted by *S. maltophilia* inside the host. By a proteomics approach we have identified proteins selectively expressed at the host temperature and we are currently investigating on which among them display antigenic potential. By silencing each of the genes encoding proteins selectively expressed upon entry of the bacterium into the host we plan to identify their role in virulence and to shed light on the *S. maltophilia* - host interaction. Moreover, after having observed the capability of *S. maltophilia* to give rise to biofilms *in vivo*, we plan to identify which proteins are expressed in the biofilm state and how they contribute to biofilm formation. By means of a genomic-related approach we have also characterized a wide collection of *S. maltophilia* strains isolated from CF patients and compared them with strains isolated from the environment. in order to identify genome fragments selectively present in clinical strains responsible of CF infections. The identification of the

S. maltophilia genes expressed in the host habitat and in the biofilm state is extremely important to understand the strategy adopted by this microorganism in establishing chronic colonization and infection of the respiratory tract of CF patients and also constitutes a crucial step for the development of new specific 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, un microrganismo dotato di un 'elevata resistenza a numerosi antibiotici ed ampiamente diffuso nell'ambiente sta assumendo particolare rilievo tra i batteri patogeni isolati in ambiente ospedaliero. In particolare, negli ultimi anni *S.maltophilia* viene considerato uno dei principali patogeni emergenti isolati da infezioni polmonari di pazienti affetti da fibrosi cistica. Le infezioni provocate da *S. maltophilia* sono particolarmente difficili da eradicare a causa dell'ampio spettro di resistenza agli antibiotici tipico di questi microrganismi. Nonostante *S. maltophilia* rivesta una notevole importanza da un punto di vista clinico non si ha ancora una conoscenza accurata del suo meccanismo di patogenicità nei pazienti FC. Nell'ambito dell'identificazione di nuovi bersagli per una più efficace terapia antibatterica lo scopo di questo progetto (FFC#7/2007), è quello di comprendere quali siano le strategie, sia a livello molecolare che cellulare, utilizzate da *S. maltophilia* nel colonizzare gli epiteli polmonari e nell'indurre quelle infezioni croniche che provocano un serio deterioramento delle vie aree nei pazienti FC. Il progetto (che continua il lavoro precedentemente iniziato con FFC#7/2005) ci ha permesso di creare il primo consorzio italiano di studi sulle infezioni indotte da *S.maltophila* in pazienti FC, unendo laboratori universitari ed ospedalieri in un lavoro di ricerca basato su un'ampia collaborazione tra le diverse unità nello sforzo comune di comprendere i meccanismi di patogenicità di *S.maltophilia* nell'ospite. Tramite un approccio proteomico abbiamo identificato le proteine espresse alla temperature dell'ospite e stiamo attualmente cercando di capire quali tra queste siano dotate di potere antigenico. Mediante la costruzione di mutanti silenziati in ciascuno dei geni potenzialmente espressi nell'ospite ci proponiamo di identificarne il ruolo nella virulenza e di chiarire alcuni aspetti delle interazioni tra *S. maltophilia* e l'ospite. Inoltre, dopo aver osservato come *S. maltophilia* sia in grado di formare biofilm anche *in vivo*, ci proponiamo di identificare quali siano le proteine espresse dal batterio nel biofilm e come queste contribuiscano alla formazione dei biofilm stessi. Grazie all'utilizzazione di tecniche molecolari abbiamo caratterizzato un'ampia collezione di ceppi di *S. maltophilia* isolati da pazienti FC sia durante infezioni croniche che sporadiche e abbiamo effettuato un'analisi comparativa del loro genoma con quello di ceppi isolati dall'ambiente per comprendere quali siano i frammenti del genoma selettivamente presenti nei ceppi responsabili di infezioni bei pazienti FC. L'identificazione di geni espressi nell'ospite e allo stato di biofilm non è soltanto importante per la comprensione delle strategie adottate da questo microrganismo per provocare infezioni croniche nel tratto respiratorio di pazienti FC ma riveste anche un ruolo essenziale per lo sviluppo di nuove terapie antimicrobiche altamente specifiche.

23. Multicenter study on molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa*, and prevalence of antimicrobial resistance phenotypes

Graziana Manno, *al centro, con collaboratori di ricerca.*

Manno G
Lab. Microbiologia, Dip. Pediatria, Istituto "G. Gaslini", Genova (Progetto FFC#12/2007, concluded)

To better understand the molecular epidemiology of PA from Italian CF patients (pts) we have typed 529 PA strains from 8 Italian CF Centres (Ancona, Cerignola, Genova, Gualdo Tadino, Milano, Roma- Bambin Gesù, Soverato, Verona) with the aim to address the type of transmission, the possible mechanism of person-to-person spread and/or environmental acquisition and define if an epidemic/highly transmissible strains is circulating in Italy. We have also determined occurrence and antibiotic resistance on plancktonic and biofilm growing of PA with hypermutable phenotype (HMP). The molecular fingerprinting was performed by Box-PCR and the cluster analysis by "Gel Compar II". Detection of HMP strains was performed by reference method (Mutation frequency measurement). The analysis of molecular profiles showed that 243 pts were colonized by a single genotypes while 68 pts harboured two or more genotypes. A total of 180 pts had a genotype not shared by other individuals while 134 pts showed a genotypes shared. Pts carrying the same genotypes form 53 clusters with different pts size: 37 of 2 pts, 8 of 3pts, 5 of 4pts, 2 of 5pts and 1 of 6pts. The comparison among Italian CF strains, European epidemic clones and environmental strains showed that Italian CF strains are not genetically correlated with PA European epidemic strains. The inter-centres comparison showed that: no genetically correlation were found among centres A B D E F G and H while 3 genotypes of centre A were highly related with 3 genotypes of centre C. Then we have typed and compared this clonal group by MLST and the analysis doesn't show any relationships with the major European clones. The molecular profiles of CF strains were also compared with environmental (nosocomial, swimming pools and household) PA isolates.

A total of 40 % of patients was colonized with HMP strains with a mutation frequency of $1.5*10^{-6}$ (mean value). A high percentage of HMP PA showed resistance to beta-lactams and floroquinolones antibiotics; the emerging resistance to tobramicyn and colistin is worrisome for antimicrobial treatment implications. The HMP strains showed also an enhanced ability to form biofilm compared with non-HMP strains tested. The results of this study show: 1) no environmental acquisition of PA in Italian CF pts 2) epidemic strains are not circulating among pts 3) a significant number of clusters were found, and this finding suggest the importance of the person to-person transmission in the CF centres examined. 4) HMP strains are present in PA from Italian CF pts, confirming previous reported rates; these phenotypes showed high antibiotic resistance and an enhanced ability to form biofilm.

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

La fonte iniziale dell'infezione da *Pseudomonas aeruginosa* (PA), e le modalità di trasmissione nei pazienti con FC non sono state ancora del tutto chiarite. Per incrementare le conoscenze sull'epidemiologia molecolare italiana di PA e poterla comparare con quella Europea, è stata allestita prospetticamente una vasta collezione di PA provenienti da pazienti seguiti in 8 centri italiani, (Ancona, Cerignola, Gualdo Tadino,

Genova, Milano, Roma, Soverato, Verona). Il profilo molecolare di questa collezione di ceppi è stato determinato mediante BOX-PCR e la cluster analisi è stata eseguita mediante "Gel compare II". Eventuali gruppi clonali sono stati tipizzati con MLST. I ceppi isolati dai pazienti sono stati anche confrontati con ceppi di PA isolati da ambiente ospedaliero, da piscine e da lavandini domestici. Dall'analisi molecolare si è evidenziato che 243 pazienti erano colonizzati da un singolo genotipo mentre 68 pazienti albergavano 2 o più genotipi. Un totale di 180 pazienti aveva un genotipo non condiviso con altri individui mentre 134 pazienti mostravano un genotipo condiviso, formando dei gruppi (53 clusters) con diversa numerosità (da 2 a 6 pazienti). La comparazione tra i ceppi FC italiani, i ceppi epidemici europei e i ceppi ambientali mostra che tali ceppi non sono geneticamente correlati tra loro. La comparazione fra gli 8 centri FC analizzati ha mostrato la presenza di un solo gruppo clonale condiviso da due centri diversi. Tale clone è stato tipizzato e comparato mediante MLST e l'analisi non ha evidenziato tuttavia correlazione con altri cloni europei. Il nostro studio non ha dimostrato una fonte d'acquisizione ambientale per PA e inoltre che nei centri FC italiani non sono presenti ceppi epidemici. Tuttavia il numero di clusters trovati indica che vi è un significativo tasso di cross-infezioni tra pazienti che frequentano uno stesso centro. Come noto P.aeruginosa è inoltre un microrganismo dotato d'elevata resistenza agli antibiotici e in FC è grado di esprimere un fenotipo dotato di tassi di mutazione accelerati (HMP) rispetto a ceppi isolati in altre infezioni. Nel nostro studio si è visto, infatti, che il 40% dei pazienti era colonizzato da un ceppo HMP, misurando sperimentalmente il loro tasso di mutazione (Oliver et al. 2000); questo dato conferma studi precedenti condotti in pazienti FC in altre nazioni (Spagna). I ceppi HMP hanno mostrato in condizioni sperimentali da noi messe a punto in micropiastre particolari, un'elevata abilità nel formare il biofilm batterico, struttura che caratterizza le modalità di crescita di questo microrganismo nell'epitelio polmonare in FC. Questi ceppi anche molto resistenti agli antibiotici normalmente utilizzati nelle terapie anti-pseudomonas, come i beta lattamici e i fluorochinoloni.

In conclusione possiamo dire che un'attenta osservanza alle misure di controllo e prevenzione dell'infezione da PA nei centri di cura è fondamentale per prevenire le cross-infezioni e in particolare le nuove acquisizioni; le tecniche di laboratorio di tipizzazione molecolare e per lo studio dei tassi di mutazione sono un supporto importante per il controllo dell'osservanza a tali misure di prevenzione e per il monitoraggio della diffusione di ceppi iper-virulenti, come quelli HMP.

Anna Silvia Neri, *terza da sinistra, con il suo gruppo di ricerca.*

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

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*
(Progetti FFC #14/2006 e FFC#9/2008, continuation)

The objective of this project is to investigate the nature and evolution of antibiotic resistance mechanisms of *P. aeruginosa* (*Pa*) and to evaluate the correlation of these data with therapeutic regimens and clinical course. Our previous research efforts have led to establish both the prevalence of horizontally-acquired β-lactam and aminoglycoside resistance genes and of mutation-mediated resistance mechanisms. The analysis were conducted among a cross-selection of 36 isolates, obtained from 30 CF patients, chronically colonized by *Pa* and followed at the CF Center of Florence over a 10-year period, and a longitudinal collection of 80 isolates obtained from 8 patients. Among the collection of 36 *Pa* isolates, the prevalence of the acquired resistance genes was 8% for β-lactamase genes and 25% for aminoglycoside resistance genes encoding drug-inactivating enzymes. Class 1 integrase gene was present in 9 isolates out of 36 (25%) and was always found in association with at least one acquired resistance gene. The prevalence of class 1 integrons and acquired resistance genes was higher than in other studies on *Pa* isolates from CF patients, suggesting that epidemiological differences could exist between resistance mechanisms in *Pa* from different CF settings. Despite the high antibiotic resistance rates and the large amount of antibiotics to which the patients had been exposed for prolonged periods, the contribution of acquired resistance genes and mutation-mediated resistance mechanisms appeared to be rather limited in the evolution of phenotipic resistance by these strains. CF patients with resistant *Pa* showed more severe lung disease, more frequent pulmonary exacerbations and received higher doses of intravenous antibiotics. The future project has the following objectives: 1.To extend the identification of resistance mechanisms to antibiotics in *Pa* isolated from chronically colonized patients and from a small cohort of patients that have received eradication therapy for first colonization but then have developed chronic infection. 2.To study in detail the correlation between antibiotic treatment and selection/evolution of resistance mechanisms to β-lactams, aminoglycosides and fluoroquinolones in *Pa*, and the clinical impact of resistant organisms in CF patients. This project could be relevant for optimization of antibiotic treatment protocols, in order to decrease the emergence and diffusion of resistant Pa 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

In questo progetto è stata analizzata la natura e l'evoluzione dei meccanismi di resistenza di *Pseudomonas aeruginosa* (*Pa*) e valutata la correlazione con i regimi terapeutici e l'andamento clinico. È stata analizzata la prevalenza dei geni di resistenza acquisiti per i β-lattamici e gli aminoglicosidi e dei meccanismi di resistenza mutazionali in ceppi di *Pa* isolati da pazienti cronici seguiti per un periodo di 10 anni presso il Centro FC di Firenze. Sono stati studiati 36 ceppi isolati trasversalmente da 30 pazienti e 80 ceppi isolati longitudinalmente da 8 pazienti. Sui 36 isolati selezionati trasversalmente, la prevalenza dei geni di resistenza acquisiti è 8% per i geni di resistenza acquisiti alle β-lattamasi e 25% per i geni di resistenza agli aminoglicosidi. Il gene dell'integrasi di classe 1 è stato rilevato in 9 su 36 isolati (25%) in associazione con almeno un gene di resistenza acquisito. La prevalenza degli integroni di classe 1 e dei geni di resistenza acquisiti è risultata più alta che in altri studi condotti in ambito FC, suggerendo che differenze epidemiologiche potrebbero esistere nei meccanismi di resistenza di ceppi di *Pa* isolati da pazienti FC provenienti da ambienti diversi. Nonostante le alte percentuali di resistenza e la grande quantità di antibiotici somministrati ai pazienti per lunghi periodi, il contributo dell'acquisizione di geni di resistenza e dei meccanismi di resistenza mutazionali sembra essere limitato nell'evoluzione della resistenza fenotipica di *Pa* agli antibiotici. I pazienti colonizzati da *Pa* resistente presentano maggior compromissione polmonare ed esacerbazioni respiratorie e utilizzano una quantità superiore di antibiotici per via endovenosa. La prosecuzione del progetto ha come obbiettivi: 1. Completare l'analisi dei meccanismi

di resistenza agli antibiotici nei ceppi di *Pa* isolati dai pazienti con colonizzazione cronica e estendere l'analisi agli isolati provenienti da pazienti sottoposti a trattamento eradicante in occasione della prima colonizzazione, che hanno successivamente sviluppato infezione cronica.
2. Approfondire l'analisi sulla correlazione tra trattamento antibiotico e selezione/evoluzione dei meccanismi di resistenza di *Pa* a β-lattamici, aminoglicosidi e fluorochinoloni e valutare l'eventuale influenza di ceppi resistenti sullo stato clinico dei pazienti. I risultati ottenuti potranno essere utili per migliorare le strategie terapeutiche in modo da diminuire l'emergenza e la diffusione di ceppi di *Pa* resistenti.

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

Antonio Molinaro, *al centro in alto, con il suo gruppo di ricerca.*

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, in progress)*

Despite advances in the treatment of infectious diseases, pathogenic microorganisms are the single most important threat to health. Respiratory tract infection with eventual 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.
In the first year of this project the LPSs extracted from three clonal strains of PA were analyzed. The three strains were isolated at different times during infection from a CF suffering patient. The first one (AA2), was isolated after six months of colonization, and the other two strains after 7 years of infection persistence: one was a mucoid strain (AA43), and the other one was a non mucoid strain (AA44). The endotoxic and immunostimulating part of LPSs is the lipid A whose structure has been elucidated for the three strains. Interestingly, the PA persistent strains (especially the non mucoid) showed a high percentage of hexacylated and heptacylated Lipid A, which is the less agonist fraction of the lipid A blend. Actually, *in vitro* immunostimulation assays confirmed this result, since LPSs purified from the strain AA4 had a very low immunostimulating potency with respect to those deriving from the strain isolated at the beginning of infection. Thus, the glycolipid portion of LPS is deeply involved into host-pathogen interactions. Structural changes observed exclusively in Lipid A extracted from the non mucoid strain seem to reveal bacterial necessitate to change its endotoxin part in case in which it is not overlaid by biofilm. In the second year of project this study will be continued on other strains isolated at different stages of infection and will extended to other cell wall elements, such as peptidoglycan, which is pivotal to the full functional structure of the membrane of PA.

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

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 antimicrobica 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. Nel primo anno del progetto di ricerca si sono studiati i lipopolisaccaridi appartenenti a tre diversi ceppi di PA isolati dopo sei mesi e dopo sette anni di colonizzazione, in quest'ultimo caso un ceppo mucoide ed uno non mucoide. La parte endotossica e immunostimolante del lipopolisaccaride è il lipide A. L'analisi chimica della struttura del lipide A derivante dai tre ceppi ha prodotto dei risultati estremamente interessanti. Infatti i tre isolati clinici mostrano notevoli differenze nella struttura del Lipide A .In particolare, il pattern di acilazione che è cruciale per l'attività endotossica di tali molecole, cambia notevolmente nel lipide A del batterio isolato dopo sette anni di colonizzazione e non mucoide e diventa la tipica endotossina non agonista. I risultati ottenuti mediante saggi di immunostimolazione in vitro, effettuati con i lipopolisaccaridi purificati dai tre isolati clinici hanno poi confermato che alle differenze strutturali del lipide A corrispondono differenze funzionali di queste molecole. I lipopolisaccaridi purificati dal ceppo non mucoide isolato dopo 7 anni di infezione, risultano avere un potenziale immunostimolatorio inferiore rispetto all'isolato clinico proveniente dalle fasi iniziali della malattia.
Questi risultati, nel loro insieme, sembrano suggerire che proprio in questo ceppo, che manca di una consistente matrice extracellulare, il lipopolisaccaride potrebbe essersi "modellato" rispondendo all'esigenza di interagire direttamente con le cellule dell'ospite. La sua struttura potrebbe essersi evoluta per ottemperare alla necessità di ridurre la risposta immunitaria dell'ospite, al fine di assicurare la sopravvivenza del batterio nei polmoni dei malati. Questa necessità porterebbe, quindi, a selezionare in vivo quelle varianti batteriche i cui LPS sono meno immunogenici rispetto agli isolati ambientali o ai ceppi primi colonizzatori. Nel secondo anno di progetto verrà condotto un ulteriore studio su questi tre ceppi s su altri analoghi e la loro capacità eventuale di modellare da un punto di vista biochimico il peptidoglicano, un altro elemento strutturale della parete cellulare cruciale per la vita del batterio. Inoltre sia sul lipopolisaccaride che sul peptidoglicano verranno condotti saggi in vivo per confermare la loro attività biologica.

Paolo Visca, *primo da destra, con il suo gruppo di ricerca.*

26. Iron uptake and quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* virulence

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, in progress)*

Pseudomonas aeruginosa is the main cause of lung function decline among cystic fibrosis (CF) patients. 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 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 expression of virulence genes 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. Establishment of the *P. aeruginosa* chronic infection requires the development 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 controlled by the quorum sensing (QS) system that controls the expression of several virulence genes.
The first year of the research project has been aimed at identifying and characterizing key molecular factors involved in iron uptake and QS, in order to identify suitable targets for new-drugs development. We have i characterized the CysB protein, a novel transcription factor involved in the regulation of iron uptake and, likely, virulence genes,. Moreover, by mens of a proteomic approach, we have identified about 200 proteins present in *P. aeruginosa* periplasm, including factors likely involved in iron uptake. Concerning QS regulation, we have showed, by transcriptome analysis, that the RsaL protein is a global regulator controlling hundreds of *P. aeruginosa* genes, including QS genes and genes involved in virulence. Functional studies have showed that RsaL on one hand plays a positive role in biofilm production and on the other hand maintains the production of important virulence factors within profitable limits. These results suggest that RsaL could be important in the chronic CF lung infection, characterized by biofilm formation and low level of virulence factors production. In the second year of the project we will continue the characterization of the above factors and their contribution to the lung infection. In order to identify new putative drug targets, we will also study the interplay between QS and iron uptake circuits.

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 deterioramento della funzionalità polmonare nei malati di fibrosi cistica (FC). Il potere patogeno di *P. aeruginosa* nella FC dipende dalla sua capacità di regolare in modo raffinato l'espressione dei determinanti di virulenza. Il polmone FC è un ambiente generalmente carente in ferro e questa carenza nutrizionale rappresenta per *P. aeruginosa* un importante segnale che stimola la produzione di fattori di virulenza, tra cui sistemi specifici per l'acquisizione del ferro. Il quorum sensing (QS) è un sistema di comunicazione che consente alle singole cellule di una comunità microbica di coordinare la produzione di fattori di virulenza e contribuisce allo sviluppo del biofilm, un aggregato di batteri incapsulati in una matrice polimerica particolarmente resistenti agli antibiotici e al sistema immunitario. L'acquisizione di ferro ed il QS consentono la proliferazione di *P. aeruginosa* nel polmone, l'espressione dei geni di virulenza e la formazione del biofilm. In questo primo anno di ricerca sono stati caratterizzati alcuni geni e prodotti genici coinvolti nella risposta alla carenza di ferro e nel QS, col fine ultimo d'identificati potenziali bersagli terapeutici. Riguardo alla regolazione ferro-dipendente, abbiamo caratterizzato la proteina CysB, un nuovo fattore trascrizionale che controlla positivamente la produzione di sistemi di acquisizione del ferro e, probabilmente, di altri fattori di virulenza,. Inoltre, grazie ad esperimenti di proteomica, abbiamo identificato circa 200 proteine presenti nel periplasma di *P. aeruginosa*, tra cui alcuni fattori potenzialmente coinvolti nell'acquisizione del ferro. Per quanto riguarda la regolazione del QS, abbiamo dimostrato, mediante esperimenti di trascrittomica, che la proteina. RsaL controlla l'espressione di centinaia di geni di *P. aeruginosa*, fra cui geni del QS e di virulenza. RsaL agisce da un lato mantenendo la produzione di fattori di virulenza entro limiti proficui, dall'altro stimolando la formazione del biofilm, svolgendo probabilmente un ruolo importante nell'infezione cronica, caratterizzata appunto da formazione di biofilm e limitata produzione di fattori di virulenza. Nel secondo anno di ricerca intendiamo completare la caratterizzazione dei fattori sopra identificati, definendo il loro contributo all'infezione polmonare, ed al contempo identificare nuovi fattori studiando la relazione esistente tra regolazione ferro-dipendente e QS.

Livia Leoni e Paolo Visca

27. Development and validation of a novel screening system for the identification of *Pseudomonas aeruginosa* virulence inhibitors

Leoni L[1], Visca P[2]
[1]*Lab. Microbiologia Clinica e Virologia, Dipartimento di Biologia, "Univ. Roma Tre", Roma;* [2]*Lab. Microbiologia Molecolare e Biotecnologia dei Microorganismi, Dip. Biologia, "Univ. Roma Tre", Roma (Progetto FFC#8/2008, new)*

The ubiquitous Gram-negative bacterium *Pseudomonas aeruginosa* is the main agent of lung function decline and mortality in Cystic Fibrosis (CF) patients.

Traditional antimicrobial approaches targeting the bacterial viability and growth have proven to be unsuccessful in the treatment of chronic *P. aeruginosa* infection because of the emergence of resistance. A novel and promising approach is screening for molecules that inhibit the traits that are specifically required for *P. aeruginosa* virulence.
Bacteria live in communities within the infected human host, and their group-behaviour has a deep influence on the expression of virulence traits. The quorum sensing and pyoverdine signalling regulatory systems control the group-behaviour of *P. aeruginosa* and the expression of virulence factors, biofilm formation and antibiotic resistance, ultimately enhancing the fitness of *P. aeruginosa* in the host environment.
The underlying rationale of this project is the identification of a new generation of drugs acting against the quorum sensing and pyoverdine signalling systems, and hence against the *P. aeruginosa* ability to cause infection. The use of these novel drugs would provide the host immune system with a better chance of clearing the infection, and could circumvent the problem of the emergence of drug-resistant strains.
The specific goal of the project is to set-up, validate and use novel high-throughput screening systems to detect molecules suppressing *P. aeruginosa* quorum sensing and pyoverdine signalling. The screening systems developed in this project will be used to screen libraries of synthetic and natural compounds. Moreover, these systems will provide the research community with a valuable tool for the discovery of new anti-*P. aeruginosa* compounds.

Sviluppo e validazione di un nuovo sistema di screening per l'identificazione di molecole in grado di inibire la virulenza di *Pseudomonas aeruginosa*

L'infezione cronica causata dal batterio Gram-negativo *Pseudomonas aeruginosa* è la principale causa di perdita della funzionalità polmonare nei malati di Fibrosi Cistica (FC). Le terapie antibiotiche tradizionali che inibiscono la crescita batterica sono spesso inefficaci nell'eradicare l'infezione polmonare del malato FC, soprattutto a causa dell'emergere di ceppi resistenti. Un approccio anti-infettivo di tipo innovativo è quello di inibire l'espressione dei determinanti di virulenza senza necessariamente inibire la crescita batterica. I batteri vivono nell'ospite in comunità ed il loro comportamento sociale ha una grande influenza nell'espressione dei geni di virulenza. Il sistema di "quorum sensing" ed il sistema del "pyoverdine signalling" sono dei meccanismi di regolazione globale dell'espressione genica che controllano la capacità di adattamento di *P. aeruginosa* nel polmone del malato FC. Questi sistemi sono necessari per l'espressione ottimale di fattori di virulenza e per la produzione di biofilm, costituendo pertanto promettenti bersagli per lo sviluppo di nuovi farmaci. Lo scopo di questo progetto è l'identificazione di molecole in grado di inibire i sistemi di "quorum sensing" e "pyoverdine signalling" al fine di ridurre la patogenicità di *P. aeruginosa*. L'uso di questo tipo di farmaci inibitori della virulenza darebbe al sistema immunitario migliori possibilità di risolvere spontaneamente l'infezione rendendo meno probabile l'insorgere di ceppi antibiotico-resistenti. Gli obiettivi specifici del progetto sono la messa a punto, la validazione e l'utilizzo di nuovi sistemi di screening ad alta processività per l'identificazione di molecole in grado di inibire il "quorum sensing" e il "pyoverdine signalling" di *P. aeruginosa.* I sistemi sviluppati in questo progetto saranno usati per lo screening di sostanze naturali e sintetiche. Inoltre, la messa a punto di questi sistemi fornirà alla comunità scientifica un valido strumento per la scoperta di nuovi farmaci anti-*P. aeruginosa.*

Annamaria Bevivino, *prima da sinistra, con le partners di ricerca.*

28. 1. Influence of *Pseudomonas aeruginosa* and CF host on *Burkholderia cenocepacia* pathogenicity. 2. *Burkholderia cenocepacia* pathogenicity: synergistic interactions with *Pseudomonas aeruginosa* and adaption to CF host.

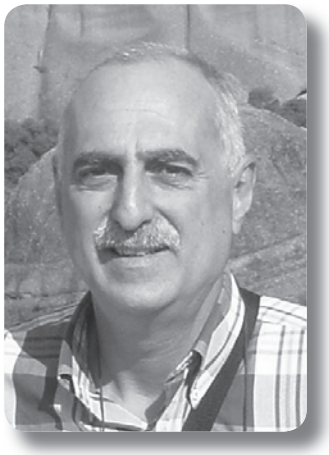
Bevivino A[1], Ascenzioni F[2], Bragonzi A[3]
[1]*ENEA C.R. Casaccia, Dip. Biotecnologie, Roma; Università La Sapienza,* [2]*Dip.to Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Roma;* [3]*Istituto per il Trattamento Sperimentale della Fibrosi Cistica, Osp. San Raffaele, Milano*
(Progetti FFC #7/2006 e FFC# 7/2008, continuation)

Bacterial human infection in cystic fibrosis (CF) lung not only attests to the complex interaction between the pathogen and the host, but is also an outcome of the communication between pathogenic microorganisms and resident microflora. Since *P. aeruginosa* and *B. cenocepacia* inhabit the same environmental niches and can form mixed biofilms in the lungs of CF patients, it appears very likely that the two organisms are capable of interacting with each other, increasing their virulence within the microbial consortium. It has been found that both bacteria utilize the same chemical language to control biofilm formation and expression of virulence factors, and exchanging of genetic material between the two organisms can occur. In order to understand the pathogenesis of the CF infection, it is important to explore the interactions between the different pathogens that may have synergic effects on their respective virulence and how bacterial strains adapt to the CF lung environment. Our main aim is to understand how the pulmonary disease caused by *B. cenocepacia* is influenced by pathogenic factors of *P. aeruginosa* and by chemical-physical characteristics of the host. Defining the conditions under which bacterial interactions increase virulence is an important step toward the comprehension of the infective process. The results obtained in the previous project (FFC #7/2006) indicated that the co-presence of the *B. cenocepacia* and *P. aeruginosa* strains at the moment of infection may have a profound effect on their rate of internalization into epithelial cells of pulmonary origin. Furthermore, the role of the host in the selection of virulent bacteria is suggested from the results of serial passages in mice of an environmental *B. cenocepacia* strain, which revealed an increased capacity of the environmental strain to cause a chronic lung infection. This result suggests that the environmental strain become able to adapt to the "local environmental" conditions of the murine lung tissues. The objectives of this proposal, which is a follow-up of the Project FFC #7/2006, are: (i) to analyse the interactions between *P. aeruginosa* and *B. cenocepacia* within biofilms; ii) to evaluate the pathogenic properties of *B. cenocepacia* in the presence of *P. aeruginosa* in CF-mice models; (iii) to clarify the influence of the host on *B. cenocepacia* adaptation and pathogenicity, by performing molecular characterization of bacterial isolates recovered after serial passages in mice and by testing their virulence in the nematode *Caenorhabditis* elegans.

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

Le infezioni batteriche che colpiscono il polmone dei pazienti affetti da fibrosi cistica (FC) sono influenzate dalle complesse interazioni che si stabiliscono tra il batterio patogeno e l'ospite, come pure tra i microrganismi patogeni e la microflora indigena. Poichè *P. aeruginosa* e *B. cenocepacia* colonizzano le stesse nicchie ambientali e sono in grado di formare biofilm nei polmoni dei pazienti FC, è verosimile che i due microrganismi interagiscano fra loro, aumentando così in modo sinergico la loro virulenza all'interno del consorzio microbico. È stato infatti dimostrato che entrambi i batteri utilizzano lo stesso linguaggio chimico per controllare la formazione di biofilm e l'espressione di alcuni fattori di virulenza; inoltre, sono stati evidenziati scambi di materiale genetico tra questi due batteri. Riteniamo, pertanto, che la comprensione dei meccanismi di patogenesi delle infezioni nella FC non possa prescindere dallo studio delle interazioni che si stabiliscono all'interno dell'ospite FC tra i vari batteri patogeni. Il nostro principale obiettivo è capire come la patologia polmonare causata da *B. cenocepacia* sia influenzata da fattori di patogenicità di *P. aeruginosa* e dalle caratteristiche chimico fisiche dell'ospite. Definire le condizioni in base alle quali le interazioni batteriche incrementano la virulenza rappresenta un importante passo avanti verso la comprensione del processo infettivo. I risultati da noi ottenuti nel precedente progetto FFC#7/2006 hanno indicato che la co-presenza delle due specie batteriche al momento dell'infezione influenza il loro rispettivo grado di internalizzazione nelle cellule epiteliali umane di origine polmonare. Inoltre, il coinvolgimento dell'ospite nella selezione di batteri più virulenti è stato suggerito da un esperimento che ha rivelato un aumento del grado di virulenza di un ceppo ambientale di *B. cenocepacia* in seguito a passaggi seriali in un modello murino di infezione cronica. Questo risultato ha evidenziato la capacità di adattamento di un ceppo ambientale alle condizioni "locali" del tessuto polmonare murino. Gli obiettivi della presente proposta di ricerca, che è la prosecuzione del Progetto FFC #7/2006, sono: (i) analizzare le interazioni tra *P. aeruginosa* and *B. cenocepacia* all'interno dei biofilms che entrambi producono; (ii) valutare la patogenicità di *B. cenocepacia* in presenza di *P. aeruginosa* in modelli murini FC; (iii) chiarire l'influenza dell'ospite sulla capacità di adattamento e di patogenicità di *B. cenocepacia*, mediante la caratterizzazione molecolare degli isolati batterici di *B. cenocepacia* recuperati dopo ripetuti passaggi nei topi e la valutazione della loro virulenza nel nematode *Caenorhabditis* elegans.

29. A structure-function investigation of exopolysaccharides and lipopolysaccharides produced by clinical strains of the *Burkholderia cepacia* complex and of their interaction with antimicrobial peptides of the host innate immune system



Roberto Rizzo

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, concluded)*

The project was developed along four different research lines which are hereafter reported.

1) Determination of the primary structure of lipopolysaccharides produced by clinical isolates of *B. cepacia* and *B. multivorans*

The determination of the primary structure of lipopolysaccharides (LPS) produced by *B. cepacia* and *B. multivorans* was accomplished. The structure of the lipid A components revealed the same general lipid A architecture with multiple species differing in the acylation and in the phosphorylation patterns. The study of the saccharidic (O-chain) component of the LPS from *B. multivorans* revealed the presence of two different forms differing in composition. Concerning the saccharidic portion of the LPS from *B. cepacia*, it turned out to lack of the *O*-antigen part.

2) Definition of the acetylation pattern of the exopolysaccharide (Cepacian) most commonly produced by clinical isolates of *Bcc*.

Due to the complexity of the cepacian structure, the exopolysaccharide (EPS) was degraded with a lyase and the products investigated for the acetyl position. The comparison of the data for the acetylated and de-acetylated products indicated that all acetyl groups are located on cepacian lateral chains and that the acetylation pattern is not regularly reproduced in all the repeating units. All the acetyl substituents are exposed onto the polymer external surface and consequently they are available for intermolecular interactions including the self-association of cepacian chain in biofilm.

3) Definition of the molecular weight and aggregating ability of polymer chains of cepacian EPS.

Molecular weight determination by means of light scattering and viscometry showed the formation of cepacian dimers in water. The morphology of the cepacian aggregates was investigated by means of atomic force microscopy. The images indicated a rather elongated structure in agreement with other data, while images obtained at high polymer concentration showed the ability of cepacian to form large aggregates which can contribute to biofilms formation.

4) Investigation of the gene clusters involved in the biosynthesis of carbohydrate macromolecules.

The genes involved in cepacian biosynthesis were well characterised. A region, probably involved in the regulation of the gene expression, was identified. This region appears variable between isolates which show different ability to produce the EPS. This finding might be related to the appearance of mucoid and non-mucoid *Bcc* strains.

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

Il progetto si è sviluppato su quattro linee di ricerca riportate nel seguito.

1) Determinazione della struttura di lipopolisaccaridi prodotti da isolati clinici di *B. cepacia* e *B. multivorans*

La struttura di lipopolisaccaridi (LPS) prodotti da *B. cepacia* e *B. multivorans* è stata determinata. La struttura della componente detta lipide A risponde alla stessa architettura generale per entrambi i ceppi batterici, ma è caratterizzata da diverse specie differenti nello schema di acilazione e di fosforilazione. Lo studio della componente saccaridica (antigene O) dell'LPS di *B. multivorans* ha rivelato la presenza di due forme che differiscono nella composizione chimica. Al contrario, la porzione saccaridica dell'LPS di *B. cepacia* è risultata mancante dell'antigene-O.

2) Definizione dello schema di acetilazione dell'EPS (Cepaciano) più frequentemente prodotto da isolati clinici del *Bcc*.

Poichè la struttura del cepaciano è piuttosto complessa, l'EPS è stato degradato mediante una enzima e l'analisi dello schema di acetilazione è stato effettuato sui prodotti. Il paragone dei dati ottenuti per l'EPS acetilato e de-acetilato ha indicato che tutti gli acetili sono localizzati sulle catene laterali del cepaciano e che lo schema di acetilazione non è riprodotto regolarmente su tutto il polimero. Tutti i gruppi acetili sono esposti sulla superficie esterna e quindi disponibili a formare interazioni intermolecolari che includono l'autoassociazione delle catene di cepaciano nei biofilm.

3) Definizione del peso molecolare e della capacità del cepaciano di formare aggregati.

Il peso molecolare è stato determinato mediante diffusione della luce e

viscometria mostrando la formazione di dimeri molecolari del cepaciano in acqua. La morfologia degli aggregati è stata studiata mediante microscopia di forza atomica. Le immagini hanno mostrato strutture polimeriche allungate in accordo con i dati precedenti mentre lo studio in soluzioni concentrate ha mostrato la formazione di larghi aggregati molecolari che possono ben spiegare la formazione di biofilm.

Giovanna Riccardi, *al centro senza camice, con il suo gruppo di ricerca.*

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

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

Burkholderia cenocepacia is one of the microorganisms responsible for the worst infections in cystic fibrosis (CF) patients. In particular, the intrinsic drug resistance of this microorganism is one of the principal causes that makes the eradication of these infections hard, thus rendering them mortal. Our group has previously identified 14 genes in *B. cenocepacia* genome coding for transporters belonging to the RND family. These efflux systems are able to extrude different compounds out of the cell, such as drugs used for curing nosocomial infections.
A method to better understand the role of RND in resistance to antibiotics is based on gene inactivation by knock-out experiments and on the analysis of the resistance to the drugs of the deleted strain. After many attempts, we succeeded in knocking-out three genes encoding the components of one of the clinical isolate *B. cenocepacia* J2315 RND transporters (*orf3*), and its regulator. From the resistance profile of the deleted strain, it has been shown that the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of the fluoroquinolone nalidixic acid is 8-fold lower than the wild-typès one. Moreover, by analyzing the lactones transport of the deleted strain, a lower amount of molecules exported of about 40% has been revealed. This would involve a lower capability in performing the "quorum sensing" and, in this way, in forming biofilms, i.e. cells aggregates more resistant to the treatment with antibiotics. In the future, the effect of lactones on gene expression of the deleted operon will be evaluated by Real-Time PCR on J2315 wild-type strain. Moreover, the different level of expression of the genes encoding the RND efflux pumps and of the genes involved in the "quorum sensing" will be studied by microarrays.

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

Burkholderia cenocepacia è uno dei microrganismi responsabili delle più gravi infezioni riscontrate nei pazienti affetti da fibrosi cistica. In particolare, la resistenza intrinseca agli antibiotici di questo microrganismo è una delle principali cause che ostacolano la cura di queste infezioni, che spesso si rivelano mortali. Il nostro gruppo ha individuato nel genoma di *B. cenocepacia* quattordici geni codificanti proteine di trasporto appartenenti alla famiglia RND. Questi sistemi di efflusso sono in grado di espellere dalla cellula diversi composti, tra cui i farmaci utilizzati per la cura delle infezioni nosocomiali. Un metodo per definire meglio il ruolo dei complessi RND nella resistenza agli antibiotici si basa sull'inattivazione genica tramite esperimenti di knock-out e sull'analisi della resistenza ai farmaci del ceppo inattivato. Dopo parecchi tentavi siamo riusciti ad inattivare i tre geni che codificano i componenti di una delle pompe di efflusso RND dell'isolato clinico *B. cenocepacia* J2315 (*orf3*) e il regolatore di questo operone. Dall'analisi del profilo di resistenza del ceppo inattivato è risultato che l'assenza di questo trasportatore comporta la diminuzione della Minima Concentrazione Inibente (MIC) del fluorochinolone acido nalidixico di un valore pari a 8 volte quella del ceppo wild-type. Inoltre, analizzando il trasporto dei lattoni del ceppo inattivato abbiamo rilevato una diminuzione della quantità di molecole esportate di circa il 40% rispetto al ceppo wild-type (in collaborazione col Dr. Vittorio Venturi). Questo comporterebbe una ridotta capacità di effettuare il "quorum sensing" e, di conseguenza, di formare biofilm, ossia aggregati di cellule che risultano ancora più resistenti al trattamento con gli antibiotici. In futuro sarà valutato l'effetto dei lattoni sull'espressione genica dell'operone inattivato mediante esperimenti di Real-Time PCR sul ceppo J2315 wild-type. Inoltre, sarà studiata la variazione del livello di espressione dei geni codificanti le altre pompe di efflusso appartenenti alla famiglia RND e dei geni coinvolti nel "quorum sensing", mediante costruzione di microarrays.

31. *Burkholderia cepacia* complex: closing down on the major virulence factors

Vittorio Venturi, *primo da sinistra, con il suo gruppo di ricerca.*

Venturi V
Human Molecular Genetics, ICGEB, Trieste, Italia
(Progetto FFC #9/2007, in progress)

Our research is focused on the study of the cell-cell regulation system called Quorum Sensing (QS) in
microorganisms belonging to the genera *Pseudomonas* and *Burkholderia*. Members of to these two genera are important opportunistic pathogens in immunocompromised persons, especially in people with cystic fibrosis where it causes chronic colonisations of pulmonary airways. QS is a regulation system based on cell-cell communication where in *Pseudomonas* and *Burkholderia* the N-acyl homoserine lactones (AHLs) are the

major signaling molecules. The AHLs can freely diffuse across cell envelopes and are detected by transcriptional regulators, which affect the expression of target genes. AHL QS in *P. aeruginosa* is probably among the most studied revealing that it is a global regulatory system integrated with several other regulons affecting the expression of a large number of genes. *P. aeruginosa* has two separate but intimately connected quorum sensing systems that are hierarchically organized: the principal system, called LasIR, controls the expression of the second one, called RhlIR, and both regulate multiple virulence factors and up to 5% of the genes in the genome. We follow two principal lines of research: firsly we are studying and identifying the major virulence factors of *Burkholderia*, with particular attention to the ones that under the QS regulation, and secondly we are investigating the mechanism of action of the LasI/R QS system since a possible strategy to control chronic infections of *P. aeruginosa* is to target and inhibit this AHL-QS system. With this purpose we have performed in-depth studies on a *P. aeruginosa* environmental isolate which is very closely related to clinical isolates. We analysed the AHL-QS systems of this strain and we tested whether this environmental isolate of *P. aeruginosa* was pathogenic in other models, and therefore could be a threat as an opportunistic human pathogen. Firstly we established that the strain was very pathogenic in both the *C. elegans* and the *G. mellonella* virulence models, indicating that it may behave as an opportunistic human pathogen and secondly we determined that AHL QS was also important for the motility and colonization of new niches. Interestingly, significant attenuation in pathogenicity and colonization capability was observed only when both AHL QS systems were inactivated in the same strain implicating that both are independently involved in the regulation of virulence associated factors. This could indicate that the virulence associated factors are independently regulated by the two systems and only with both QS systems being non-functional their levels are low enough to result in a significant decrease in pathogenicity.

Burkholderia cepacia complex: accerchiamento dei maggiori fattori di virulenza

Il nostro gruppo di ricerca studia il sistema di regolazione denominato Quorum Sensing (QS) in microorganismi del genere *Burkholderia* e *Pseudomonas*. Specie appartenenti a questi generi sono riconosciute come patogeni opportunisti importanti nelle infezioni nosocomiali che riguardano principalmente i pazienti affetti da fibrosi cistica. Le infezioni da parte di questi batteri risultano essere efficenti e di difficile eradicazione poichè essi sono in grado di coordinare l'espressione di molti fattori, compresi quelli legati alla virulenza e alla produzione di biofilm, una matrice che protegge i batteri dalle terapie messe in atto per eliminarli. Il sistema di regolazione che permette questa coordinazione si chiama QS e si basa sulla comunicazione fra batteri che avviene mediante la produzione di molecole segnale diffusibili e di proteine regolatrici; queste interagendo attivano o reprimono geni importanti per l'adattamento del batterio all'ambiente che lo circonda. Abbiamo due linee di ricerca principali: l'identificazione dei maggiori fattori di virulenza del genere *Burkholderia* e lo studio del sistema QS e della patogenicità di *Pseudomonas aeruginosa* PUPa3 un ceppo di origine ambientale che stabilisce interazioni di tipo benefico nelle radici di diverse piante. Quest' ultimo studio è giustificato dal fatto che si pensa a nuove molecole che interferiscano con il sistema QS per controllare la proliferazione cellulare e la sintesi di fattori di virulenza nelle infezioni croniche; è quindi necessario verificare che gli sforzi che si stanno compiendo in questo senso abbiano significato quando riportati alla maggior parte dei ceppi di *P. aeruginosa*. Abbiamo così verificato la patogenicità e la presenza/assenza di differenze nell'organizzazione del sistema QS in questo ceppo ambientale di *P.aeruginosa* rispetto al più studiato PAO1. Esso ha due sistemi di QS che sono gerarchicamente organizzati con un sistema principale che regola, oltre ad una serie di fattori, anche il secondo sistema; entrambi regolano fattori legati alla patogenicità. Innanzitutto PUPa3 è risultato più patogeno di PAO1 sui modelli di virulenza testati (*C. elegans* e *G. mellonella*). In secondo luogo esso porta gli stessi sistemi QS ma essi risultano indipendenti: il secondo sistema è operativo anche quando il primo viene annullato. Questo dato è importante per chi cerca di interferire e "zittire" il sistema QS. Infatti, mutanti dei due sistemi sono stati testati per la capacità colonizzativa e per la patogenicità. Solo il ceppo privato di entrambi i sistemi QS perde la capacità di colonizzare e muoversi nello spazio oltre a risultare avirulento quando testato su modelli animali. Questo dato è molto importante perchè sottolinea che solo interferendo con entrambi i sistemi QS di *P. aeruginosa* si può ottenere una importante e generale diminuzione della patogenicità. È stato riportato che per certi ceppi di *P. aeruginosa* è sufficiente inattivare uno dei due sistemi; i nostri studi purtroppo dimostrano che esitono dei ceppi di *P. aeruginosa* che richiedono il blocco di entrambi i sistemi per ottenere una atteniazione della virulenza.

Silvia Campana

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

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

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) was first recognized as being acquired from hospitalized patients (HA-MRSA), but the onset of MRSA infection due to community-acquired strains (CA-MRSA) has recently been described with increasing frequency. Epidemic CA-MRSA strains which are highly virulent and pathogenic are now replacing HA-MRSA in hospital settings. This worrisome trend can involve CF patients, although little evidence is yet available about the pathogenic potential of CA-MRSA and HA-MRSA in the CF population. This multicenter study investigated the susceptibility pattern, national and global epidemiology by pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and Multi Locus Sequence typing (MLST), SCC*mec* type, and the presence of genes encoding Panton-Valentine leukocidin (PVL) of MRSA strains isolated from 178 out of 2362 (7.5%) patients attending nine Italian CF centers. We found a high prevalence (31.4%) of SCC*mec* IV, characteristic of CA-MRSA strains, all strains were PVL-negative. Epidemiological analysis showed that 31 MRSA strains, representing CA-MRSA, belong to the same PFGE clone shared among six centers. These unexpected results show that CA-MRSA are now spreading in CF patients, considered at risk for HA-MRSA acquisition due to frequent hospitalizations. MLST analysis delineated 12 different groups or sequence types (STs). The most relevant ST (ST8) is related to an epidemic strain such as USA500, a PVL-negative clone isolated from outbreaks in the USA. Other epidemic HA-MRSA lineages such the Iberian clone, one of the most diffused in European countries, has only a few representatives. Follow-up was conducted on 84 patients with average age of 15.1 years colonized by MRSA. Clinical data showed that colonization persisted for less than 12 months in 51% of patients, for 12 months in 31% and for undetermined time in 18%. No significant differences were observed in mean FEV_1 and BMI values in the year preceding and following colonization nor in antibiotic use (mean number of oral and parenteral antibiotic cycles). These data show a peculiar picture of MRSA epidemiology, indicating that further studies are required to clarify the significance and

pathogenicity of 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.

I ceppi di *Staphylococcus aureus* meticillino-resistenti (MRSA) di acquisizione ospedaliera (HA-MRSA) e comunitaria (CA-MRSA) sono caratterizzati da diversa patogenicità. CA-MRSA epidemici e virulenti sono stati isolati anche da ambienti ospedalieri in cui stanno rimpiazzando i ceppi di HA-MRSA. Tale tendenza può rappresentare un rischio anche per i pazienti FC. Questo progetto multicentrico ha collezionato 178 ceppi da 181 pazienti FC colonizzati da MRSA dei 2362 (7,5%) afferenti ai nove Centri partecipanti. Sono stati valutati: chemiosensibilità, epidemiologia su scala nazionale con elettroforesi a campo pulsato (PFGE) e internazionale con Multi Locus Sequence Typing (MLST). Sono stati indagati specifici determinanti genici quali la cassetta SCC*mec* per determinare l'appartenenza a HA-MRSA o CA-MRSA, e la presenza del gene per la leucocidina di Panton Valentine (PVL). È stata rilevata un'alta prevalenza (31.4%) SCC*mec* di tipo IV caratteristico di CA-MRSA negativo per PVL. Tale evidenza è del tutto inaspettata in pazienti FC che, a causa delle frequenti ospedalizzazioni, sono considerati a rischio per l'acquisizione di HA-MRSA. L'analisi epidemiologica con PFGE ha evidenziato la presenza di un clone di 31 ceppi, rappresentato da CA-MRSA, diffuso in sei dei nove centri. L'analisi con MLST ha evidenziato 12 gruppi o sequence types (ST). Il gruppo maggiormente rappresentato (ST8), è caratteristico di CA-MRSA epidemici quali USA500, un clone PVL negativo responsabile di epidemie ospedaliere in Nord America. Altri ceppi epidemici di HA-MRSA molto frequenti in Europa, quale il clone Iberico, sono invece scarsamente rappresentati. I dati clinici di 84 pazienti con età media di 15 anni colonizzati da MRSA mostrano che la colonizzazione ha avuto durata inferiore ai 12 mesi nel 51% dei casi, pari a 12 mesi nel 31% e indeterminata nel 18% dei casi. Non sono state rilevate differenze significative nella media dei valori di $FEV_{1,}$ BMI e il numero medio di cicli antibiotici per via orale e parenterale, nell'anno precedente e successivo alla colonizzazione. Questi dati mostrano un quadro inaspettato dell'epidemiologia di MRSA, indicando la necessità di studi più approfonditi per chiarirne la reale patogenicità nei pazienti FC.

5. INFIAMMAZIONE

Inflammation

Introduction: new strategies aimed to control CF inflammation

Giorgio Berton
Head Department of Pathology, University of Verona. Member of the Italian Cystic Fibrosis Research Foundation Scientific Advisory Board - Direttore Dipartimento di Patologia dell'Università di Verona. Membro del Comitato Scientifico della Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica

A prolonged inflammatory response in the airways leads to irreversible 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 it may be, at least in part, dissociated from bacterial infections [2-4]. This issue is still controversial and recent results either argued against or confirmed a role of "excessive" inflammation in CF lung pathology. Examination of broncho-alveolar lavage fluids (BALF) did not reveal any major sign of abnormal inflammation in CF infants diagnosed by newborn screening [5]. Additionally, the lung of neonatal CFTR-/- piglets was reported to lack any sign of inflammation both at the cellular level and the accumulation of IL-8 in the BALF [6]. Despite these two reports would suggest that inflammation does not precede infection, they do not exclude that an "excessive" inflammation follows exposure of lung cells to pathogens and microbial-derived products (see [2-4] for recent reviews). In fact, recent *in vitro* studies which include those performed by Dechecchi et al. and Cigana et. al., that were supported by Fondazione Ricerca sulla Fibrosi Cistica (FFC), established the notion that CFTR regulates the generation of pro-inflammatory and chemotactic cytokines by bronchial epithelial cells [7-10]. A vicious circle consisting of infection, inactivation of host defences and excessive inflammation has been recently highlighted by the findings that a proteolytic activity in the airways of patients with CF, and other chronic inflammatory lung diseases, cleaves CXCR1, one of the two receptors for IL-8 present on the surface of neutrophils [11]. Because CXCR1 mediates a few important antibacterial neutrophil functions, its cleavage impairs the capability of neutrophil recruited in response to lung infections to kill pathogens, including *P. aeruginosa*. Additionally, cleavage of CXCR1 generates soluble fragments that react with bronchial epithelial cell TLR2 receptors, triggering cytokine secretion by these cells. Thus an excessive recruitment of neutrophils into the airways is induced, but these cells are then inactivated, die and release protease in the tissue. A step forward in the understanding molecular mechanisms of excessive inflammation in CF lung derived from very recent studies demonstrating that, due to an alkalinization of intracellular vesicles, ceramide accumulates in the lung of CFTR-deficient mice and triggers inflammation, cell death, accumulation of DNA deposits and eventually *P. aeruginosa* infection [12]. On the whole, these last *in vitro* and *in vivo* studies suggest that inflammation *per sè* or more specific pro-inflammatory pathways may represent an important pharmacological target to ameliorate lung function in CF. Indeed, recent studies on the effects of the prolonged use of ibuprofen showed that this anti-inflammatory drug reduces the decline of the lung function in CF patients [13,14]. The search for new targets to control excessive inflammation in CF is an active area of investigation for italian scientists supported by FFC. G. Recent studies by G. Cabrini, R. Gambari and coworkers showed that inhibiting the transcription factor NF-kB with double-stranded oligodeoxynucleotides "decoy" molecules or pyrogallol, an active compound extracted from a medicinal plant, inhibits cytokine generation by CF epithelial cells in response to *P. aeruginosa* [15,16]. The potential of this strategy in the future of CF treatment will be discussed at the Convention. Additionally, new exciting, yet unpublished, data will be presented by M. Dechecchi on the capability of miglustat, an inhibitor of glycolipid biosynthesis and an approved drug for Gaucher disease, to control cytokine generation by CF cells. New potential strategy aimed to control inflammation and host defences, including the use of anti-oxidants, azithromycin and endogenous modulator of host defences such as pentraxin 3 will be addressed at the Convention by other investigators founded by FFC.

Introduzione: nuove strategie di controllo dell'infiammazione CF

Una risposta infiammatoria protratta nelle vie aeree porta a danno polmonare e fibrosi in diverse malattie polmonari, inclusa la fibrosi cistica (CF). Un punto chiave per comprendere la patogenesi della patologia polmonare CF è quello di sapere se un'eccessiva risposta infiammatoria sia il semplice risultato di una infezione cronica - dovuta alla disidratazione di superficie delle vie aeree per il difetto della proteina CFTR[1] – oppure possa essere, almeno in parte, dissociata dalle infezioni batteriche[2-4]. Questa questione è ancora controversa e risultati recenti hanno deposto sia contro che a conferma di un ruolo di "eccessiva" infiammazione nella patologia polmonare CF. L'esame dei liquidi di lavaggio bronco-alveolare (BALF) non ha rivelato alcun segno importante di infiammazione abnorme in lattanti diagnosticati attraverso screening neonatale [5]. Inoltre, è stato recentemente riportato che il polmone di maialini neonati CFTR-/- non presenta alcun segno di infiammazione sia a livello cellulare che a quello di accumulo di IL-8 nel BALF[6]. Benchè questi due reports suggeriscano che l'infiammazione non preceda l'infezione, essi non escludono che una "eccessiva" infiammazione possa far seguito ad una esposizione delle cellule polmonari a patogeni e a prodotti di derivazione batterica (vedere recenti rassegne[2-4]). Infatti, studi *in vitro* recenti, inclusi quelli condotti da Dechecchi et al. e Cigana et al., finanziati dalla Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica (FFC), hanno confermato la nozione che CFTR regola la generazione di citochine pro-infiammatorie da parte delle cellule epiteliali bronchiali[7-10]. Un circolo vizioso basato su infezione, inattivazione delle difese dell'ospite ed eccessiva infiammazione è stato recentemente evidenziato dalla scoperta per cui un'attività proteolitica nelle vie aeree di pazienti con CF, o con altre malattie polmonari infiammatorie croniche, cliva il CXCR1, uno dei due recettori per IL-8 presenti sulla superficie dei neutrofili[11]. Poiché CXCR1 è mediatore di alcune importanti funzioni battericide dei neutrofili, la sua rottura compromette la capacità di uccidere i patogeni da parte dei neutrofili reclutati in risposta alle infezioni polmonari, compresa quella da *P. aeruginosa*. Inoltre, il clivaggio di CXCR1 genera frammenti solubili che reagiscono con i recettori TLR2 delle cellule epiteliali bronchiali, innescando la secrezione di citochine da parte di queste cellule. Così viene indotto un eccessivo reclutamento di neutrofili entro le vie aeree, ma queste cellule sono poi inattivate, muoiono e liberano proteasi nei tessuti. Un passo in avanti nella comprensione dei meccanismi molecolari dell'eccessiva infiammazione nel polmone CF è stato compiuto da studi molto recenti che hanno dimostrato che, a causa di un'alcalinizzazione delle vescicole intracellulari, nel polmone di topi mancanti di CFTR si accumula ceramide, che innesca infiammazione, morte delle cellule, accumulo di depositi di DNA e infine infezione da *P. aeruginosa*[12]. Nell'insieme, questi ultimi

studi *in vitro* e *in vivo* suggerirebbero che l'infiammazione di per sé o più specifiche sequenze metaboliche possano rappresentare un importante bersaglio farmacologico per migliorare la funzione polmonare in CF. In realtà, recenti studi sugli effetti dell'uso prolungato di ibuprofen hanno dimostrato che questo farmaco antinfiammatorio riduce il declino della funzione polmonare in pazienti CF[13,14]. La ricerca di nuovi bersagli per controllare l'eccesso di infiammazione in CF è un'area di ricerca molto attiva per gli scienziati italiani supportati da FFC. Studi recenti condotti da G. Cabrini, R. Gambari e collaboratori hanno dimostrato che, inibendo il fattore di trascrizione NF-kB con molecole "esca" costituite da oligodeossinucleotidi a doppio filamento o con pirogallolo, un composto attivo estratto da una pianta medicinale, si inibisce la generazione di citochine da parte di cellule epiteliali CF in risposta a *P. aeruginosa*[15,16]. Il potenziale di questa strategia nel futuro del trattamento della fibrosi cistica sarà discusso nella Convention. In aggiunta, saranno presentati da M. Dechecchi nuovi stimolanti dati non ancora pubblicati sulla capacità del miglustat, un inibitore della biosintesi dei glicolipidi e farmaco già approvato per la malattia di Gaucher, nel controllare la produzione di citochine da parte di cellule CF. Nuove potenziali strategie orientate a controllare l'infiammazione e le difese dell'ospite, tra cui l'uso di anti-ossidanti, azitromicina e modulatori delle difese dell'ospite quali la pentrassina 3, saranno presentate e discusse alla Convention da altri ricercatori finanziati da FFC.

References

1. *Boucher RC. Evidence for airway surface dehydration as the initiating event in CF airway disease. J Intern Med. 2007;261:5-16.*
2. *Rao S, Grigg J. New insights into pulmonary inflammation in cystic fibrosis. Arch Dis Child. 2006;91:786-788.*
3. *Rubin BK. CFTR is a modulator of airway inflammation. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2007;292:L381-382.*
4. *Elizur A, Cannon CL, Ferkol TW. Airway inflammation in cystic fibrosis. Chest. 2008;133:489-495.*
5. *Linnane BM, Hall GL, Nolan G, Brennan S, Stick SM, Sly PD, Robertson CF, Robinson PJ, Franklin PJ, Turner SW, Ranganathan SC. Lung Function in Infants with Cystic Fibrosis Diagnosed by Newborn Screening. Am J Respir Crit Care Med. 2008.*
6. *Rogers CS, Stoltz DA, Meyerholz DK, Ostedgaard LS, Rokhlina T, Taft PJ, Rogan MP, Pezzulo AA, Karp PH, Itani OA, Kabel AC, Wohlford-Lenane CL, Davis GJ, Hanfland RA, Smith TL, Samuel M, Wax D, Murphy CN, Rieke A, Whitworth K, Uc A, Starner TD, Brogden KA, Shilyansky J, McCray PB, Jr., Zabner J, Prather RS, Welsh MJ. Disruption of the CFTR gene produces a model of cystic fibrosis in newborn pigs. Science. 2008;321:1837-1841.*
7. *Cigana C, Nicolis E, Pasetto M, Assael BM, Melotti P. Anti-inflammatory effects of azithromycin in cystic fibrosis airway epithelial cells. Biochem Biophys Res Commun. 2006;350:977-982.*
8. *Dechecchi MC, Nicolis E, Bezzerri V, Vella A, Colombatti M, Assael BM, Mettey Y, Borgatti M, Mancini I, Gambari R, Becq F, Cabrini G. MPB-07 reduces the inflammatory response to Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis bronchial cells. Am J Respir Cell Mol Biol. 2007;36:615-624.*
9. *Perez A, Issler AC, Cotton CU, Kelley TJ, Verkman AS, Davis PB. CFTR inhibition mimics the cystic fibrosis inflammatory profile. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2007;292: L383-395.*
10. *Cigana C, Assael BM, Melotti P. Azithromycin selectively reduces tumor necrosis factor alpha levels in cystic fibrosis airway epithelial cells. Antimicrob Agents Chemother. 2007;51:975-981.*
11. *Hartl D, Latzin P, Hordijk P, Marcos V, Rudolph C, Woischnik M, Krauss-Etschmann S, Koller B, Reinhardt D, Roscher AA, Roos D, Griese M. Cleavage of CXCR1 on neutrophils disables bacterial killing in cystic fibrosis lung disease. Nat Med. 2007;13:1423-1430.*
12. *Teichgraber V, Ulrich M, Endlich N, Riethmuller J, Wilker B, De Oliveira-Munding CC, van Heeckeren AM, Barr ML, von Kurthy G, Schmid KW, Weller M, Tummler B, Lang F, Grassme H, Doring G, Gulbins E. Ceramide accumulation mediates inflammation, cell death and infection susceptibility in cystic fibrosis. Nat Med. 2008;14:382-391.*
13. *Konstan MW, Schluchter MD, Xue W, Davis PB. Clinical use of Ibuprofen is associated with slower FEV1 decline in children with cystic fibrosis. Am J Respir Crit Care Med. 2007;176:1084-1089.*
14. *Lands LC, Milner R, Cantin AM, Manson D, Corey M. High-dose ibuprofen in cystic fibrosis: Canadian safety and effectiveness trial. J Pediatr. 2007;151:249-254.*
15. *Bezzerri V, Borgatti M, Nicolis E, Lampronti I, Dechecchi MC, Mancini I, Rizzotti P, Gambari R, Cabrini G. Transcription factor oligodeoxynucleotides to NF-kappaB inhibit transcription of IL-8 in bronchial cells. Am J Respir Cell Mol Biol. 2008;39:86-96.*
16. *Nicolis E, Lampronti I, Dechecchi MC, Borgatti M, Tamanini A, Bianchi N, Bezzerri V, Mancini I, Grazia Giri M, Rizzotti P, Gambari R, Cabrini G. Pyrogallol, an active compound from the medicinal plant Emblica officinalis, regulates expression of pro-inflammatory genes in bronchial epithelial cells. Int Immunopharmacol. 2008;8:1672-1680.*

33. Mechanisms of inflammation resolution in cystic fibrosis

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

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 Fibrosi Cistica – 2° U.O. di Pediatria, Ospedale dei Bambini "G. Di Cristina", Palermo (Progetto FFC #15/2007, in progress)*

It is becoming evident that cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) may modulate functions of cells involved in the immune-inflammatory response and its resolution. In preliminary experiments, we have obtained evidence that CFTR is expressed in specific subsets of circulating mononuclear cells. We have also documented CFTR protein expression in human platelets. Since platelets, in addition to their well known haemostatic functions, may play a key role in inflammation, we examined the impact of CFTR on platelet activities that may be relevant for inflammation and its resolution. To this end, we combined in vitro experiments with $CFTR_{inh}$-172, a selective CFTR inhibitor, and in vivo measurements in patients with cystic fibrosis (CF). Our results indicate that:

1. Platelet CFTR is functional. Upon stimulation with thrombin, normal platelets exposed to $CFTR_{inh}$-172 and platelets from CF patients displayed a comparable pattern of intracellular chloride changes, characterized by the absence of the rapid phase of chloride efflux, which was instead detected in normal platelets not treated with $CFTR_{inh}$-172.
2. CFTR activity regulates the resting condition of platelets since $CFTR_{inh}$-172 induced formation of protrusions of the platelets membrane and F-actin formation, with a pattern reconcilable to initial stages of platelet activation.
3. CFTR controls key aspects of platelet physiology, namely: a) Expression of membrane glycoproteins involved in haemostasis (glycoprotein Ib), as well as interactions with leukocytes and vascular endothelium (P-selectin); b) Biosynthesis of lipoxins, main stop signals of inflammation; c) Platelet-regulated survival of neutrophils; d) Biosynthesis of nitric oxide.

In conclusion, our findings depict a novel scenario of CF inflammation. Platelets appear to play multiple relevant roles within this scenario. Hopefully, these results may trace a new avenue for a better understanding of CF inflammation and, as a consequence, for the improvement of strategies to combat it.

Mecanismi di risoluzione dell'infiammazione in fibrosi cistica

Appare sempre più evidente come il cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) sia in grado di modulare funzioni di cellule coinvolte nella risposta immuno-infiammatoria e nella sua risoluzione. In esperimenti preliminari abbiamo ottenuto evidenza della espressione del CFTR in specifici sottogruppi di cellule mononucleate circolanti. Abbiamo anche documentato l'espressione della proteina CFTR nelle piastrine umane. Poichè le piastrine, oltre alle loro ben note funzioni emostatiche,

svolgono un ruolo chiave nell'infiammazione, abbiamo esaminato l'impatto del CFTR su attività piastriniche rilevanti ai fini della risposta infiammatoria e della sua risoluzione. Per tale scopo, abbiamo associato esperimenti in vitro utilizzando il $CFTR_{inh}$-172, un inibitore selettivo del CFTR, e misurazioni in vivo in pazienti con fibrosi cistica (FC). I nostri risultati indicano che:

4. Il CFTR piastrinico è funzionale. A seguito di stimolazione con trombina, piastrine normali esposte al $CFTR_{inh}$-172 e piastrine da pazienti FC hanno mostrato un pattern comparabile di variazioni dei livelli di cloro intracellulare, caratterizzato dall'assenza della fase rapida di efflusso, osservabile nelle piastrine normali non esposte al $CFTR_{inh}$-172.
5. L'attivita del CFTR regola la condizione di riposo delle piastrine poichè il $CFTR_{inh}$-172 ha indotto la formazione di protrusioni della membrane piastrinica e la formazione di F-actina con un pattern compatibile con uno stato iniziale di attivazione piastrinica.
6. Il CFTR controlla aspetti chiave della fisiologia piastrinica, tra i quali: a) espressione di glicoproteine di membrana coinvolte nella emostasi (glicoproteina Ib) o in interazioni con leucociti e endotelio vascolare (P-selettina); b) biosintesi di lipossine, principali segnali di stop dell'infiammazione; c) sopravvivenza dei leucociti neutrofili piastrino-dipendente; d) biosintesi di ossido nitrico.

In conclusione, i nostri risultati illustrano un nuovo scenario della riposta infiammatoria nella FC all'interno del quale le piastrine sembrano giocare molteplici e significativi ruoli. Auspichiamo che queste osservazioni possano tracciare la via per una migliore comprensione dell'infiammazione nella FC e, come conseguenza, per la messa a punto di più efficaci strategie per combatterla.

Cristina Dechecchi, *in alto al centro, con il suo gruppo di ricerca.*

Dechecchi MC[1], Becq F[2], Gambari R[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, Università de Poitiers; [3]Dipartimento di Biochimica e Biologia Molecolare,Università di Ferrara.
(Progetto FFC #16/2006, concluded)

The role of CFTR deficiency in promoting inflammation remains unclear. Perez et al. (Perez, 2007) recently demonstrated that the inhibition of function of w/t CFTR produces an inflammatory profile that resembles that observed in CF patients, whereas, thanks to the contribution of the Italian Cystic Fibrosis Research Foundation (14/2004), we found that correction of F508del-CFTR function with MPB-07 down modulates the inflammatory response to *P.aeruginosa* in CF bronchial cells (Dechecchi, 2007). Since both evidence support a link between CFTR function and inflammation, we extended our investigation to other F508del-CFTR correctors, such as miglustat (Norez, 2006), an approved drug for Gaucher disease, in comparison with the galactose analogue NB-DGJ. We report here that miglustat but not NB-DGJ restores F508del-CFTR function in CF bronchial epithelial IB3-1 and CuFi-1 cells. Miglustat and NB-DGJ reduce the inflammatory response to *P.aeruginosa* in both CF and non-CF bronchial cells, indicating that the anti-inflammatory effect is independent of the correction of F508del-CFTR function. Miglustat also inhibits the inflammatory response induced by the supernatant of mucopurulent material obtained from the lower airway tract of cystic fibrosis patients with chronic bacterial colonization (Ribeiro, 2005). Both compounds do not interfere with the adherence of *P.aeruginosa* to the cells and reduce the expression of IL-8 not only after challenge with *P.aeruginosa* but also after exposure to TNF alpha or IL-1 beta, suggesting an effect on transduction proteins downstream and in common with different receptors for pathogens. Finally, miglustat has no major effects on overall binding activity of transcription factors NF-*k*B and AP-1.
From the practical point of view, the results obtained from this research project show that miglustat has two therapeutically relevant effects in CF cells: it rescues the F508del CFTR function and reduces the inflammatory response to *P.aeruginosa*. Interestingly, both correction of the cystic fibrosis defect and inhibition of anti-inflammatory responses are of great importance in the therapy of CF patients. Accordingly, a drug displaying these two effects deserves great attention. Furthermore, the effects of miglustat on human subjects are well known, being an orally bioavailable drug approved in Europe and USA for the treatment of Gaucher disease and other glycosphingolipid storage diseases. Moreover, clinical trials with oral miglustat as a CFTR corrector in CF patients are in progress (http://clinicaltrials.gov/). All this considered, miglustat may represent a promising candidate for the pharmacotherapy of CF and an interesting research tool to investigate the immune response of airway cells.

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

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

Uno studio recente (Perez, 2007) riporta che l'inibizione della funzione della proteina CFTR in cellule bronchiali normali, riproduce il fenotipo iper-infiammatorio dei pazienti FC. D'altra parte, grazie al contributo della FFC (Prog. #14/2004), avevamo dimostrato che la correzione funzionale della CFTR in cellule bronchiali FC, riduce la risposta infiammatoria all'infezione con *P.aeruginosa* (Dechecchi, 2007). Questi due studi complementari sono a favore di una relazione tra la funzione della proteina CFTR e la risposta infiammatoria. Pertanto abbiamo esteso la ricerca analizzando altri correttori di CFTR quali ad esempio il miglustat (Norez, 2006), un farmaco usato nella malattia di Gaucher.
Abbiamo osservato che il miglustat ma non l'analogo NB-DGJ corregge la funzione di CFTR F508del in cellule epiteliali bronchiali FC IB3-1 e CuFi-1. Entrambi i composti riducono la risposta infiammatoria all'infezione da *P.aeruginosa* sia in cellule FC che non FC, ad indicare che l'effetto anti-infiammatorio del miglustat è, almeno in parte, indipendente dalla correzione funzionale di CFTR. Il miglustat, inoltre inibisce la risposta a stimoli infiammatori rilevanti in FC come quelli presenti nel materiale mucopurulento ottenuto dalle basse vie aeree di pazienti FC con colonizzazione batterica cronica (Ribeiro, 2005). Dai nostri risultati, il miglustat sembra interferire con il segnale pro-infiammatorio a valle e in comune con i recettori per i patogeni e per le citochine pro-infiammatorie.
Dal punto di vista pratico, questa ricerca ha dimostrato che il miglustat ha due effetti terapeutici nelle cellule FC: corregge la funzione di CFTR F508del e riduce la risposta infiammatoria all'infezione da *P.aeruginosa*. Il trattamento combinato con sostanze in grado di correggere il difetto di base e farmaci anti-infiammatori viene indicato come strategia terapeutica utile per la patologia polmonare FC. Va inoltre sottolineato che gli effetti del miglustat sull'uomo sono già noti, dal momento che si tratta di un farmaco in uso, somministrato per via orale ai pazienti con sindrome di Gaucher in Europa e USA ed è in corso un trial clinico (http://clinicaltrials.gov/) per valutarne l'efficacia come correttore nei pazienti FC. Tutto ciò considerato, il miglustat appare un candidato promettente per la farmaco-terapia della FC ed uno strumento utile ai fini della ricerca sui meccanismi che regolano la risposta immune delle vie respiratorie in FC.

35. Anti-inflammatory effect of miglustat: sphingolipid ceramide metabolism as a therapeutic target for CF lung disease

Dechecchi MC[1], Gambari R[2]
[1]Laboratorio di Patologia Molecolare e Lab. di Chimica Clinica ed Ematologia, Azienda Ospedaliera-Universitaria di Verona; [2]Dipartimento di Biochimica e Biologia Molecolare,Università di Ferrara. (Progetto FFC #12/2008, new)

CF lung disease is characterized by chronic neutrophilic inflammation and infection, prevalently by *P. aeruginosa*. Because neutrophilic inflammation is a major determinant in the progression of CF airway disease, this process must be targeted aggressively and effectively. Complementary to molecules correcting the basic CFTR defect, anti-inflammatory drugs have been proposed as an important strategy to ameliorate CF lung pathology. However, limitations emerging from traditional drugs, such as corticosteroids and ibuprofen, suggest to explore new candidate molecules, tailored to CF lung inflammation.
Sphingolipids (SLs) and glycosphingolipids (GSLs) are emerging players in keeping the inflammatory response under control. The second messenger ceramide is central to the host defense against *P. aeruginosa*, being required for internalizing the bacteria, inducing apoptosis in infected cells and regulating the cytokine response in the lungs. The association between abnormalities in ceramide SLs metabolism and inflammation in CF is an important and intriguing area (Teichgraber 2008). Miglustat, an inhibitor of GSLs biosynthesis already used for treating type I Gaucher disease, has been indicated as a corrector of F508del CFTR. We preliminarly observed that miglustat strongly reduces the *P.aeruginosa*-dependent transcription of key genes involved in the intrabronchial chemotaxis of neutrophils, such as IL-8 and ICAM-1, in human bronchial epithelial cells and monocyte-derived macrophages, most likely interfering with the pro-inflammatory signalling downstream and in common with different receptors for pathogens and pro-inflammatory cytokines. The general purpose of this research project is to extend the analysis of the anti-inflammatory effect of miglustat *in vitro* and in murine lungs *in vivo* and evaluate whether miglustat affects the host response to *P. aeruginosa* through changes in cellular ceramide levels, to the aim of suggesting novel therapeutic target for CF lung inflammation. Main lines of investigations are: *i*) explore host-pathogen interactions in cells exposed to *P.aeruginosa* by the analysis of pro-inflammatory and bactericidal gene expression and by the study of apoptosis after treatment with miglustat; *ii*) extend the investigation of miglustat to murine models of lungs inflammation *in vivo*; *iii*) investigate the effect of miglustat on shingolipids metabolism in relation to the inflammatory, bactericidal and apoptotic responses. Very importantly, since miglustat is an orally bioavailable drug, approved in Europe and USA for the treatment of Gaucher disease and other GSL storage diseases, its effects on human subjects are well known. Therefore obtaining deeper insights on the effect of miglustat on the host immune response could open the door to clinical trials to ameliorate lung disease in CF patients.

Effetto anti-infiammatorio del miglustat: il metabolismo dello sfingolipide ceramide come bersaglio terapeutico per la malattia polmonare in fibrosi cistica

Nei pazienti FC, l'infiammazione polmonare è un' processo indispensabile nella difesa contro i microorganismi, ma è dannoso per il polmone, pertanto occorre indirizzare specificamente le cure in modo da ridurre i danni senza compromettere le difese. Il trattamento combinato con farmaci anti-infiammatori e sostanze in grado di correggere il difetto di base viene indicato come strategia terapeutica utile per la patologia polmonare FC. Tuttavia, le limitazioni emerse dall'uso di tradizionali anti-infiammatori, quali corticosteroidi e ibuprofen, spingono la ricerca verso nuovi farmaci specifici per modulare l' infiammazione pomonare FC.
Gli sfingolipidi (SLs) e i glicosfingolipidi (GSLs) sono molecole biologicamente attive sulle quali sta crescendo l'interesse, essendo coinvolte in numerosi processi, compreso il controllo dell'infiammazione. Tra queste molecole, la ceramide svolge un ruolo centrale nella difesa contro *P.aeruginosa* in quanto serve per internalizzare il batterio, indurre apoptosi nella cellula infettata e regolare la risposta infiammatoria. Studi recenti (Teichgraber 2008) indicano una possibile relazione tra anomalie nel metabolismo della ceramide e infiammazione polmonare in FC. Il miglustat, un inibitore della sintesi degli GSLs usato per il trattamento della sindrome di Gaucher, corregge il trasporto del cloro-CFTR dipendente. I risultati di una nostra ricerca condotta grazie ad un finanziamento della FFC (16/2006), mostrano che il miglustat riduce l'espressione dei geni coinvolti nella chemiotassi dei granulociti neutrofili: IL-8 e ICAM-1, in cellule epiteliali bronchiali e in macrofagi infettati con *P.aeruginosa*. Obiettivo di questo progetto è quello di allargare lo studio dell' effetto anti-infiammatorio del miglustat sia *in vitro* che nel polmone murino *in vivo* e di valutare se il miglustat modula la risposta a *P. aeruginosa* intervenendo sul metabolismo della ceramide, allo scopo di suggerire nuovi bersagli terapeutici per l'infiammazione polmonare FC. La ricerca verrà cosi' articolata: *i*) estensione delle interazioni tra batterio e ospite attraverso l'analisi dell'espressione dei geni coinvolti nella risposta infiammatoria e anti-microbica e lo studio dell'apoptosi in cellule trattate con miglustat; *ii*) analisi *in vivo* dell'effetto del miglustat in modelli murini di infiammazione polmonare; *iii*) studio dell'effetto del miglustat sul metabolismo degli SLs in relazione alla risposta infiammatoria, anti-microbica e apoptotica. È importante sottolineare che essendo il miglustat un farmaco somministrato per via orale per la cura della sindrome di Gaucher in Europa e USA, i suoi effetti sui pazienti sono già noti. Pertanto i risultati di questa ricerca sulla possibile azione anti-infiammatoria all'infezione da *P.aeruginosa* potrebbero motivare sperimentazioni cliniche con il miglustat nei malati FC.

Paola Melotti

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

Melotti P[1], Mauri P[2], Sorio C[3]
[1]Centro Fibrosi Cistica, Azienda Ospedaliera, Verona; [2]Ist. Tecnologie Biomediche CNR, Segrate Milano; [3]Dip. Patologia, Patologia Generale, Università di Verona (Progetto FFC #17/2006, concluded)

This multicenter project is focusing on the mechanisms of action of Azithromycin (AZM) a drug very often utilized in patients affected by cystic fibrosis (CF). The relevant targets of this drug are still unknown. Such advances would allow optimizing the use of this drug. We have obtained stronger evidences of anti-inflammatory effects of AZM demonstrating its inhibitory effects on two pro-inflammatory molecules (Glutathione-S-Transferases, GST-T1, GST-M1). We have previously found that these molecules are expressed at higher levels in CF cells than in non-CF and that AZM restores in CF cells the normal

activities of both molecules. Recently with the collaboration of the Belgian research group coordinated by dr. Teresinha Leal we have confirmed these effects of AZM in CF mice. In the same model also our previous data about anti-inflammatory effects of AZM on human airway epithelial CF cells were confirmed. We demonstrated that AZM is able to reduce the inflammation induced by bacterial molecules or by potent pro-inflammatory agents expressed at higher levels in CF than in non-CF cells. The effects of the bacterium, which particularly colonizes many CF patients, Pseudomonas aeruginosa (Pa), in epithelial cells derived from CF or non-CF patients and in mice is under investigation. We are studying proteins released by bacteria and by epithelial cells in conditions very similar to those present in CF airways. In particular we are focusing on molecules involved in epithelial damage and inflammation. The effects of AZM on the released cellular and bacterial proteins are under investigation. Better understanding 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. This study could also contribute to better understand the pathogenesis of CF.

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

Si è proseguito lo studio multicentrico mirato ad individuare i meccanismi d'azione dell'azitromicina (AZM), farmaco sempre più utilizzato dai pazienti affetti da fibrosi cistica (FC) di cui restano ancora da stabilire le modalità con cui esercita effetti terapeutici. Tali conoscenze permetterebbero l'ottimizzazione dell'uso di questo antibiotico. Si sono rafforzate le evidenze di effetti anti-infiammatori dell'AZM in quanto questo farmaco è risultato in grado di inibire due molecole (glutatione-S-trasferasi, GST-T1 e GST-M1) coinvolte nell'infiammazione. In precedenza era stato da noi riscontrato che in cellule FC l'attività delle due proteine in esame è maggiore rispetto a cellule non FC, e che relativamente a queste due molecole, l'AZM ripristina in cellule epiteliali FC le condizioni normali. Abbiamo recentemente indagato lo stesso fenomeno avendo a disposizione topi FC grazie alla collaborazione di un gruppo belga diretto dalla dr.ssa Teresinha Leal. Negli stessi animali erano stati già in precedenza indipendentemente confermati dati da noi acquisiti in cellule FC relativi agli effetti anti-infiammatori dell'AZM. Anche gli effetti dell'AZM su GST-T1 e GST-M1 sono stati confermati. AZM è risultata in grado di ridurre l'infiammazione resa particolarmente intensa dalla presenza di componenti batteriche o di potenti molecole infiammatorie che sono presenti a più alti livelli nell'epitelio FC rispetto al normale come Tumor Necrosis Factor alpha (TNF❑). Prosegue lo studio degli effetti su cellule (epitelio delle vie aeree normale o di pazienti FC) o animali (topi) del microorganismo che colonizza in maniera caratteristica molti pazienti FC, Pseudomonas aeruginosa (Pa). Mediante un metodo sofisticato ed originale (analisi proteomica) vengono studiate le proteine rilasciate dai batteri e dalle cellule epiteliali in condizioni rese il più possibile analoghe a quelle presenti nelle vie aeree con FC. Si stanno analizzando gli effetti dell'AZM sulla secrezione di proteine da parte delle cellule epiteliali e di batteri considerando in particolare quelle coinvolte nel danno epiteliale e nella risposta infiammatoria. L'individuazione di meccanismi d'azione dell'AZM porrebbe le basi per l'eventuale proposta terapeutica di altre molecole con effetti simili e possibilmente superiori a quelli del farmaco in esame. Questi studi possono permettere infine una miglior comprensione dei processi che stanno alla base delle manifestazioni della malattia.

Teresinha Leal

37. Effects of azithromycin (AZM) on *Pseudomonas aeruginosa*-induced chronic lung inflammation in cystic fibrosis

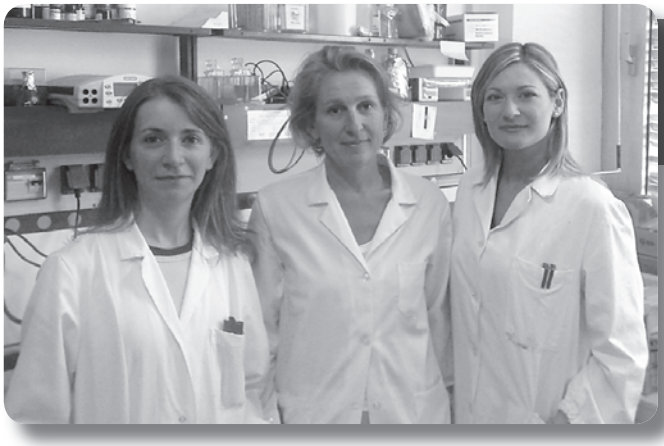
Leal T[1], Mauri P[2], Sorio C[3]
[1] Dep. Clinical Chemistry, St. Luc Univ. Hospital, Univ. Catholique de Louvaine, Brussels; [2]Ist. Tecnologie Biomediche CNR, Segrate Milano; [3]Dip. Patologia, Patologia Generale, Università di Verona (Progetto FFC #15/2008, new)

Chronic inflammation, in particular affecting lungs, is the leading cause of morbidity and mortality among CF patients. Any approach aimed to reduce the exaggerated inflammatory response is expected to significantly improve the prognosis in these patients. Clinically significant, although variable, response to the macrolide AZM among CF patients has been reported. The mechanism behind these positive effects is still largely unknown even if evidence from us and others is accumulating that anti-inflammatory effects represent the leading mechanism. Still, unknown factors (both from patient and colonizing bacteria side) might account for different effects among patients.
Lung colonization by *Pseudomonas aeruginosa* (PA) is followed by bacterial-host interaction that is mediated not only by the direct contact of the microorganism, mostly hampered by the clonization by mucoid strains, but also by its released factors. We plan to culture PA laboratory and clinical strains in protein-free medium under standardized aerobic and anaerobic conditions we already set, either in the presence or in the absence of AZM. We plan to collect the conditioned medium, centrifuge and test its capability to induce an inflammatory response in vitro and in vivo. The same sample will be subjected to proteomic analysis directly or after chromatographic fractionation in order to identify candidate pro-inflammatory factors.
Because of the large variety of possible roles suggested for AZM, as well as evidences of regulation of activity of several transcription factors by this drug, it seems very likely that this macrolide could regulate the expression of different cellular pathways. Effects of AZM can also target Pseudomonas aeruginosa strains, known to specifically colonize the lungs of CF patients. The precise identification of the biochemical pathways and targets affected by AZM could have strong impact on the management of CF disease helping to improve the therapeutic strategies as well as to a better understanding of the pathogenesis of CF disease.

Effetti dell'azitromicina sull'infiammazione cronica polmonare in fibrosi cistica indotta da *Pseudomonas aeruginosa.*

L'infiammazione cronica, in particolare a livello polmonare, è la principale causa di malattia e di morte nei pazienti affetti da fibrosi cistica (FC). Ogni tentativo di ridurre l'esagerata infiammazione mira a migliorare la prospettiva dell'andamento clinico nel tempo in questi pazienti.
La risposta clinica di pazienti affetti da fibrosi cistica alla terapia con azitromicina (AZM) è risultata significativamente migliorativa, anche se variabile. I meccanismi che determinano questi effetti sono ancora molto oscuri anche se si stanno accumulando evidenze da parte nostra e di altri gruppi che proprietà anti-infiammatorie possano essere le maggiori responsabili. Inoltre, fattori ancora da definire (sia nei pazienti che nei batteri) possono essere rilevanti per ottenere effetti diversi tra i pazienti trattati.
In seguito a colonizzazione polmonare avviene l'interazione tra ospite e

batteri che è mediata non solo dal contatto diretto con i microrganismi, solitamente più rilevante nell'infezione da batteri mucoidi, ma anche da molecole rilasciate dai batteri. Intendiamo studiare il microrganismo caratteristico in FC, Pseudomonas aeruginosa, utilizzando batteri isolati da pazienti oppure adattati alla crescita in laboratorio, cresciuti in particolari condizioni in precedenza messe a punto in presenza o assenza di ossigeno ed esposti o meno all'AZM. Raccoglieremo i prodotti di questi batteri che si accumulano nel terreno di coltura per analizzarne la capacità di indurre infiammazione in cellule di epitelio respiratorio in vivo ed in vitro. In questi campioni verranno analizzate le proteine con tecniche sofisticate che includono l'analisi proteomica, puntando in particolare ad identificare molecole coinvolte nell'infiammazione. Risulterebbero soggette agli effetti dell'azitromicina diverse funzioni cellulari, visti i diversi ruoli che vengono ormai attribuiti al farmaco. Questo antibiotico può avere effetti anche sui batteri, in particolare su diversi campioni isolati di Pseudomonas aeruginosa. La comprensione dei meccanismi d'azione dell'AZM potrebbe avere importanti ripercussioni sul trattamento della fibrosi cistica aiutando a migliorare l'utilizzo del farmaco per la terapia dei diversi pazienti e contribuendo a chiarire quali sono i difetti determinanti per lo sviluppo delle anomalie tipiche di questa malattia.



Paola Del Porto, *al centro, con due collaboratrici del suo laboratorio.*

38. Influence of CFTR mutations in bactericidal activity of human macrophages

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, Istituto Clinica Pediatrica, Policlinico Umberto I, Roma*
(Progetto FFC #14/2007, in progress)

Recent data suggest that defects in the bactericidal activity of phagocytes may contribute to the establishment or the exacerbation of chronic lung inflammation in cystic fibrosis. In particular in the murine model, the absence of CFTR has been associated with a reduced capability of alveolar macrophages to kill *P. aeruginosa*. Moreover, although controversial, this defect has been linked to abnormal acidification of lysosomal pH. To verify whether defective macrophage function is relevant to cystic fibrosis, the aim of this project was to evaluate the capacity of monocyte derived macrophages and alveolar macrophages from cystic fibrosis patients to kill *P. aeruginosa*.
First we have evaluated CFTR expression on *in vitro* differentiated macrophages from healthy donors. To this aim CFTR mRNA levels were determined by real time PCR in monocytes and *in vitro* differentiated macrophages from twelve healthy donors. Results from this analysis demonstrated that CFTR mRNA was up-regulated in macrophages with respect to parental monocytes in eight out of twelve individuals, with the majority of samples showing a four-fold increase of CFTR mRNA.
We next compared the capacity of monocyte-derived macrophages from cystic fibrosis patients and healthy donors to kill *P. aeruginosa* in *in vitro* infection assays. Thus we infected CF and control macrophages with the non mucoid clinical isolate P.aeruginosa strain PA27853 at a multiplicity of infection of 1:30 (cell/bact) for one hour and the survival of intracellular bacteria was evaluated at different time points after infection. Overall we observed that CF and control macrophages did not differ in the ability to internalyze bacteria and to kill *P.aeruginosa* at the earliest time point (2 hr post infection). However, an increase in the survival of intracellular bacteria four hours after infection was detected in CF macrophages suggesting that the absence of functional CFTR may partially impair bacteria killing. Since several phenotypic and functional features distinguish *in vivo* from *in vitro* differentiated macrophages, we are currently evaluating the expression of CFTR mRNA as well as the bactericidal activity of pulmonary macrophages isolated from chirurgic lung specimens from cystic fibrosis and control individuals.

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

Dati recenti suggeriscono che difetti nella capacità battericida delle cellule fagocitiche possano partecipare all'induzione e all'amplificazione del processo infiammatorio polmonare nella fibrosi cistica. In particolare nel modello murino l'assenza di CFTR è stata associata ad una ridotta capacità dei macrofagi alveolari di eliminare *P. aeruginosa*. Inoltre anche se controverso tale difetto è stato correlato ad una alterata acidificazione del pH dei lisosomi.
Quindi il nostro obiettivo è stato di verificare la capacità sia dei macrofagi derivati dai monociti che dei macrofagi alveolari isolati da pazienti affetti da fibrosi cistica di eliminare *P. aeruginosa*.
Nella prima fase della ricerca sui macrofagi differenziati *in vitro* abbiamo valutato l'espressione di CFTR nei macrofagi derivati dai monociti e nei monociti di dodici individui sani. L'analisi attraverso Real-time PCR ha dimostrato un aumento dell'RNA messaggero di CFTR nei macrofagi rispetto ai monociti parentali in otto dei dodici individui analizzati. Successivamente abbiamo comparato la capacità dei macrofagi derivati dai monociti di pazienti CF e da individui sani di uccidere *P. aeruginosa* attraverso saggi di infezione *in vitro*. In particolare i macrofagi CF e di controllo sono stati infettati con il ceppo clinico non mucoide *di P. aeruginosa* PA27853 ad una molteplicità di infezione di 1:30 (cell/batt) per un'ora e successivamente la sopravvivenza dei batteri intracellulari è stata valutata a tempi diversi. I risultati ottenuti hanno dimostrato che i macrofagi CF e di controllo non differivano nella capacità di internalizzare i batteri o di eliminarli due ore dopo l'infezione. Tuttavia un aumento della sopravvivenza dei batteri intracellulari dopo quattro ore dall'infezione era evidenziabile nei macrofagi CF suggerendo che l'assenza di CFTR possa interferire con l'attività battericida di queste cellule. Poichè differenze sia funzionali che fenotipiche distinguono i macrofagi differenziati *in vitro* dalle stesse cellule *in vivo*, stiamo valutando, utilizzando gli approcci sopradescritti, l'espressione dell' RNA messaggero di CFTR e l'attività battericida dei macrofagi polmonari isolati da campioni chirurgici di pazienti CF e di individui di controllo.

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

Cabrini G[1], Gambari R[2]
[1] *Laboratorio di Patologia Molecolare, Laboratorio Chimica Clinica ed Ematologia, Azienda Ospedaliera Universitaria di Verona;* [2] *Dip. Biochimica e Biologia Molecolare, Sezione Biologia Molecolare, Univ. Ferrara (Project # 13/2007, in progress)*

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, by means of TF "decoy" molecules, both derived from oligodeoxynucleotides and organic molecules obtained after screening of medicinal plants. 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. During the first year, oligodeoxynucleotides have been designed and tested in order to interfere with TF NF-kB and Sp1, which have been shown to inhibit the *P.aeruginosa*-dependent induction of of the chemokine IL-8 and the pro-inflammatory cytokines IL-6, respectively, by studying their efficacy and selectivity in human respiratory epithelial cells *in vitro*. In parallel, a first screening of the anti-inflammatory effect of molecules separated and identified in medicinal plant extracts previously shown to inhibit the NF-kB/DNA interaction has been pursued.

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 resiratorie 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, mediante molecole esca ("decoy"), derivate da oligonucleotidi di sintesi o molecole organiche derivate da screening di piante medicinali. 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. Nel corso del primo anno di svolgimento del progetto sono stati disegnate e verificate molecole oligonucleotidiche esca per i fattori di trascrizione NF-kB ed Sp1, in grado di inibire la espressione stimolata da *P.aeruginosa* rispettivamente della chemochina IL-8 e della citochina pro-infiammatoria IL-6, studiandone l'efficacia e la selettività di azione in modelli di cellule epiteliali respiratorie in vitro. In parallelo, è stata effettuata una prima caratterizzazione dell'azione anti-infiammatoria di molecole separate ed identificate da estratti di piante medicinali, precedentemente studiate per la loro capacità di interferire sulla interazione NF-kB/DNA.

Andrea Battistoni

40. 1. 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. 2. Effect of glutathione and lactoferrin on redox regulation, metal homeostasis and inflammatory responses of Cystic Fibrosis bronchial cells upon infection with *Burkholderia cenocepacia*.

Battistoni A[1], Berlutti F[2]
[1]Dipartimento di Biologia, Università di Roma Tor Vergata, [2]Dipartimento di Sanità Pubblica, Facoltà di Medicina, Università di Roma La Sapienza (Progetti FFC #15/2006 e FFC#11/2008, continuation)

Cystic Fibrosis is characterized by chronic lung inflammation, stimulated by opportunistic bacterial pathogens, caused by the persistent and massive recruitment of neutrophils in the airway lumen. Such an exaggerated neutrophils activation, which may be initiated also in the absence of bacterial infections, cause damage to the lung by the release of harmful molecules, including reactive oxygen species and proteolytic enzymes. Therefore, a current challenge for CF research is to identify factors substantially contributing to inflammation and infection which could be neutralized by innovative therapeutic approaches. To this aim, we are investigating the possible involvement in lung disease of two well documented chemical modifications characterizing the airway surface liquid of CF patients, i.e. increased iron concentrations (sometimes associated to a general alteration of transition metals homeostasis) and low extracellular glutathione levels. In fact, we have shown that iron availability promotes biofilm formation by *B. cenocepacia*

and its ability to invade cultured cells. Moreover, we have found that *B. cenocepacia* invasion ability is significantly decreased by treatments with lactoferrin, an iron-binding glycoprotein endowed with a strong antibacterial activity. Interestingly, while studying glutathione deficiency in CF cells, we have recently observed that CFTR mutant cells are characterized by a reduction in their content of exofacial thiols. As exofacial thiols are likely involved in redox signaling processes, this could cause dysregulation of intracellular redox-responsive metabolic pathways and contribute to inflammation.
To deepen our knowledge about the role of metal and glutathione homeostasis in CF, we shall study the consequences of alterations in exofacial thiols and glutathione metabolism in CF cells, as well as the possible role of extracellular glutathione in cell response to infections. Moreover, we shall investigate the inflammatory response of CF and wild type bronchial cell lines to invasion by *B. cenocepacia* and to exposure to its purified exopolysaccharide. Finally, we shall analyze the anti-inflammatory activity of lactoferrin and glutathione in cells invaded by *B. cenocepacia*. These studies will be of help to evaluate the possible efficacy of antibacterial and anti-inflammatory therapies based on the exogenous supply lactoferrin and glutathione.

1. 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.
2. Effetto del glutatione e della lattoferrina sulla regolazione ossido-riduttiva, sull'omeostasi dei metalli e sulla risposta infiammatoria delle cellule bronchiali CF e seguito di infezione con *Burkholderia cenocepacia.*

La Fibrosi Cistica (FC) è caratterizzata da un'infiammazione polmonare cronica, stimolata da batteri patogeni opportunistici, causata dal massiccio reclutamento di neutrofili nel lume delle vie respiratorie. L'esagerata attivazione dei neutrofili, che può essere iniziata anche in assenza di infezione batterica, causa danni ai polmoni attraverso il rilascio di molecole nocive, tra cui specie reattive dell'ossigeno ed enzimi proteolitici. Quindi, una sfida per la ricerca sulla FC è quella di identificare quei fattori che contribuiscono in modo sostanziale all'infiammazione che possano essere neutralizzati attraverso nuovi approcci terapeutici. A questo scopo, stiamo studiando il coinvolgimento nella malattia polmonare di due documentate alterazioni nella composizione chimica dei liquidi che rivestono le superfici degli epiteli polmonari, cioè l'aumento nella concentrazione del ferro (spesso associata ad una generale alterazione dell'omeostasi dei metalli) ed il basso livello di glutatione extracellulare. Abbiamo dimostrato che la disponibilità di ferro favorisce la formazione di biofilm e la capacità di invadere cellule in coltura da parte di *B. cenocepacia.* Abbiamo anche osservato che l'invasività di questo batterio è significativamente diminuita da trattamenti con lattoferrina, una glicoproteina legante ferro dotata di elevata attività antibatterica. Inoltre, abbiamo osservato che la superficie delle cellule mutate nel gene CFTR mostra un basso contenuto di tioli. Poiché i tioli di superficie sono probabilmente coinvolti in processi di segnalazione redox, questo potrebbe causare alterazioni nella regolazione di vie metaboliche intracellulari che rispondono allo stress ossidativo e contribuire al processo infiammatorio. Per comprendere il ruolo delle modificazioni nei metalli e nel glutatione nella FC, studieremo le conseguenze delle alterazioni nei tioli di superficie, nel metabolismo del glutatione e dei metalli in cellule FC ed il ruolo del glutatione nella risposta cellulare all'infezione. Inoltre, studieremo la risposta infiammatoria di linee cellulari bronchiali selvatiche ed FC all'infezione da *B. cenocepacia* e all'esposizione al suo esopolisaccaride purificato. Infine, analizzeremo l'attività antiinfiammatoria della lattoferrina e del glutatione in cellule invase da *B. cenocepacia*. Questi studi consentiranno di valutare la possibile efficacia di terapie antibatteriche e antiinfiammatorie basate sulla somministrazione di lattoferrina e glutatione.

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

Fabiana Quaglia, *seconda in piedi da destra, con il suo gruppo di ricerca.*

Quaglia F[1], Carnuccio R[2]
[1]Dip.to di Chimica Farmaceutica e Tossicologica; [2] Dip.to di Farmacologia Sperimentale, Università di Napoli Federico II
(Progetto FFC#5/2007, in progress)

Decoy oligonucleotides able to interfere with Nuclear Factor-kB (NF-kB) pathway may be of great help in reducing NF-kB mediated pulmonary chronic inflammation, which is the primary cause of bronchioectasis, respiratory failure and consequent death in patients affected by cystic fibrosis (CF). Our recent findings suggest that oligonucleotide therapeutic efficacy may be substantially improved by poly(lactide-co-glycolide) (PLGA)-based microparticles, which, adequately formulated, are able to release bioactive macromolecules to the lungs. In this case, the aerodynamic properties of the developed dry powders play a crucial role in determining the deposition site along the respiratory apparatus and, thus, their potential to spread over upper airways to exert a local effect.
Along these lines, the aim of this project is to develop respirable powders made of biodegradable and biocompatible polymers (PLGA) able to deliver a decoy oligonucleotide against NF-kB (dec-ODN) directly to the lung inflammation site. During the first year of this study, we have developed large porous particles (LPP) with suitable mass mean aerodynamic diameters and aerosolization properties for deposition in the upper airways (i.e. along pulmonary bronchi/bronchioles). The adopted formulation conditions allow the encapsulation of dec-ODN with high efficiency as well as dec-ODN controlled release in the bioactive form. This has been achieved adding to microparticle composition polymeric or lipidic aid excipients, whose effect upon powder technological properties has been investigated in depth. On the basis of the very encouraging technological data, some formulations have been selected for in vitro/in vivo activity studies to be carried out during the second year of research. Preliminary biodistribution data of the developed LPP in rat lungs confirm the good aerodynamic properties of the powders and their potential for the controlled release of dec-ODN to the lungs in CF patients.

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

Oligonucleotidi decoy in grado di interferire con il fattore di trascrizione

nucleare NF-kB possono svolgere un ruolo attivo nel trattamento dell'infiammazione cronica polmonare, principale causa di bronchiectasia, perdita della funzionalità polmonare e successiva morte dei pazienti affetti da fibrosi cistica (FC). Recenti studi dimostrano che microparticelle a base di acido poli(lattico-co-glicolico) (PLGA) consentono di migliorare l'attività farmacologica di oligonucleotidi con diversa struttura chimica e, se opportunamente formulate, permettono un rilascio controllato di macromolecole biologicamente attive direttamente nel polmone. In tal senso, particolare rilievo assumono le proprietà aerodinamiche delle polveri da progettare che, dopo somministrazione via aerosol, devono depositarsi nelle vie aeree superiori per sortire un effetto locale.
L'obiettivo di questo progetto è, pertanto, lo sviluppo di polveri respirabili a base di particelle polimeriche biodegradabili e biocompatibili (PLGA) in grado di veicolare localmente un oligonucleotide decoy che interferisce con il fattore di trascrizione NF-kB (dec-ODN) e di consentirne un rilascio progressivo nel tempo direttamente nel sito sede dell'infiammazione. In questo primo anno di studi, sono state progettate e sviluppate particelle porose di grandi dimensioni (*large porous particles*) che presentano un diametro aerodinamico medio e proprietà aerosolizzanti ottimali per la deposizione a livello di bronchi/bronchioli. Le particelle sono state formulate in modo da consentire l'efficace incapsulazione ed il rilascio controllato nel tempo del dec-ODN in forma bioattiva. Tali obiettivi sono stati perseguiti introducendo nella formulazione delle microparticelle "aid excipients" di natura polimerica o lipidica e valutando di volta in volta l'effetto dell'eccipiente sulle proprietà tecnologiche della polvere. I risultati dello studio, particolarmente incoraggianti, hanno condotto alla selezione di formulazioni da testare per la loro attività, che sarà valutata, durante il secondo anno di attività, *in vitro* su linee cellulari e *in vivo* su modelli animali di FC. Dati preliminari di biodistribuzione delle particelle messe a punto nel polmone di ratto confermano che le polveri si distribuiscono efficacemente lungo l'albero respiratorio e, in prospettiva, rappresentano un potenziale *carrier* per il rilascio modificato al polmone del dec-ODN in pazienti con FC.

Francesco Galli, *primo a destra, con il suo gruppo di ricerca.*

42. Pre-clinical evaluation of new vitamin E-based anti-inflammatory agents in CF

Galli F[1], Iuliano L[2], Schock CB[3], Goracci GF[4]
[1]Dipart. Med. Interna - Sez. Bioch. Appl. e Scienze Nutrizionali - Univ. Perugia, [2]Dipart. Med. Interna e vascolare - Univ. La Sapienza Roma, [3]U. O. Medicina respiratoria - Reale Univ. Belfast, [4]Dipart. Med. Interna - Sez. Biochimica - Univ. Perugia
(Progetto FFC#13/2008, new)

The micronutrient vitamin E is increasingly investigated as homeostatic factor with regulatory effects in immune function, inflammation and oxidative stress. This vitamin is normally included in nutritional supplements for cystic fibrosis (CF) patients since they show defective absorption of fat soluble micronutrients and a severe inflammatory syndrome of the respiratory tract. However, the real therapeutic potential of vitamin E in CF is poorly understood since metabolism and transformation remain largely unexplored in these patients. Moreover, recent evidence suggest that specific functionalization of vitamin E structure, along with new administration protocols, might further increase its therapeutic potential providing more effective pharmacokinetics and molecular targeting toward inflammatory and oxidative stress pathways. Based on this rationale and according with the aim of this Foundation, the four research units (RU) with both clinical and laboratory competence, proposed a 2-year research plan to determine at preclinical level the therapeutic potential of a series of natural and synthetic analogues of vitamin E in the inflammatory comorbidity of CF (main end-point). Secondary end-points in this study are:
- to characterize levels and metabolic fate of vitamin E compounds in CF patients, and the relationship with clinical markers of inflammation and oxidative stress in blood, urine and airways fluids (AWF) including sputum and breath condensate,
- to investigate therapeutic mechanisms of such vitamin E compounds *in vitro* and *ex vivo,* (with particular attention to identifying molecular targets of vitamin E in the inflammatory and degenerative symptoms of CF),
- to assess in vitro pharmacokinetics, metabolic transformation, bioactivity and toxicity parameters for each test compound following different administration routes (oral vs. respiratory). This part will have an extension with a pilot study on nasal epithelial cells from CF patients.
Therefore, in addition to a drug screening phase for the identification of vitamin E compounds that may enter further steps of clinical evaluation in the symptomatic therapy of CF, this project is expected to provide a better understanding of vitamin E metabolism and inflammatory mechanisms that lie behind to the respiratory syndrome and the general comorbidity of CF.

Valutazione pre-clinica di analoghi ad azione anti-infiammatoria della vitamina E nella FC.

La supplementazione con vitamina E è una pratica comune nei pazienti affetti da Fibrosi Cistica (CF), basata sul difetto di assorbimento di micronutrienti lipofili e sulla comorbilità infiammatoria che li caratterizza. Comunque, il potenziale terapeutico di questa vitamina nel paziente CF rimane da stabilire, vista la scarsa conoscenza del suo metabolismo e dei processi di trasformazione a cui essa va incontro. Questa vitamina, con funzione antiossidante, viene sempre più considerata essere un fattore di regolazione della funzione immunitaria e dei processi infiammatori. Inoltre, negli ultimi anni studi di funzionalizzazione molecolare hanno chiaramente mostrato la possibilità di migliorare farmacocinetica e specificità d'azione di questa vitamina verso target di infiammazione e di stress ossidativo. Sulla base di questi presupposti ed in accordo con gli intenti di questa Fondazione, le 4 unità di ricerca (RU) con competenze cliniche e di laboratorio che compongono questo gruppo propongono un piano di ricerca biennale finalizzato a determinare a livello pre-clinico il potenziale terapeutico di una serie di analoghi della vitamina E di origine naturale o di sintesi verso la comorbidità infiammatoria del paziente CF (end-point primario). Ulteriori derivabili di questa ricerca includono:
- la caratterizzazione dei livelli e del destino metabolico della vitamina E nei pazienti CF, e della relazione che questi hanno con marcatori di infiammazione e stress ossidativo ematici, urinari e dei fluidi respiratori (che includono espettorato e condensato respiratorio),
- lo studio in vitro ed ex vivo dei meccanismi terapeutici dei composti afferenti alla famiglia della vitamina, con particolare attenzione all'identificazione dei loro target molecolari negli eventi infiammatori e degenerativi che caratterizzano la sintomatologia CF,
- la determinazione in vitro dei parametri di farmacocinetica e metabolismo, bioattività e tossicità relativa dei composti derivanti dalla vitamina E oggetto della fase di drug-screening proposta in questo studio. In questo ambito saranno considerati anche la possibilità di usare diverse vie di somministrazione (orale vs. inalatoria) e la specificità di applicazione al modello clinico in oggetto, mediante uno studio su cellule di epitelio nasale di pazienti CF.
Quindi, oltre alla ricerca di nuovi principi farmacologici che potranno essere ammessi ad ulteriori fasi di valutazione clinica per la terapia sintomatica infiammatoria della CF, questo progetto si propone di fornire nuove conoscenze sul metabolismo della vitamina E e sui meccanismi infiammatori e di stress ossidativo associati alla sindrome respiratoria ed alla comorbilità generale dei pazienti CF.

Federica Moalli

Cecilia Garlanda

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

Garlanda C[1], Bragonzi A[2], Moalli F[1]
[1]Fondazione Humanitas per la Ricerca, [2]European Institute for Cystic Fibrosis Research, Institute for experimental treatment of Cystic Fibrosis, H.S.Raffaele Scientific Institute, Milano (Progetto FFC#14/2008, new)

The prototypic long pentraxin PTX3, a member of the pentraxin family discovered by the applicant group, is a soluble receptor of the innate immune response with several biological properties involved in regulating inflammation and immune defence. In particular, PTX3 is a non−redundant component of innate immunity against selected pathogens, including *Pseudomonas aeruginosa*, a bacterium which plays a key role in the pathology of patients with cystic fibrosis. Studies conducted by the applicant have defined the role of this molecule in immunological mechanisms and have generated unique tools to investigate its function. The purpose of this project will be to translate the knowledge on PTX3 in the clinical context of genetic diseases. Recent results indicate that PTX3 can activate and modulate inflammatory and immune reactions towards microbial moieties. In vitro studies will be conducted in order to understand the mechanism of action of PTX3 in recognizing *P. aeruginosa* and in the innate defence towards this micro-organism. Moreover, preclinical studies will be conducted to define the potential of PTX3 as a prophylactic/therapeutic agent against *P. aeruginosa*, a formidable therapeutic challenge in cystic fibrosis. These studies could provide a basis to assess PTX3 administration as a prophylactic and/or therapeutic agent against *P. aeruginosa*, in particular in patients with cystic fibrosis.

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

La pentrassina lunga PTX3 è un membro della famiglia delle pentrassine identificata dal gruppo proponente. PTX3 è un recettore solubile della risposta immunitaria innata con diverse proprietà biologiche coinvolte nella difesa immunitaria e nell'infiammazione. In particolare, PTX3 è un componente essenziale nei meccanismi di difesa immunologica nei confronti di alcuni microbi, quali *Pseudomonas aeruginosa*, un batterio che gioca un ruolo cruciale nella patologia polmonare dei pazienti con fibrosi cistica. Studi di base condotti in questi anni, oltre a definire il ruolo fondamentale di questa molecola nei meccanismi immunologici, hanno generato strumenti molecolari unici per studiarne la funzione.
Scopo di questo progetto sarà di trasferire le conoscenze acquisite su PTX3 dal gruppo proponente nel contesto delle infezioni opportuniste polmonari dei pazienti con fibrosi cistica. Dati recenti indicano che PTX3 può attivate e modulare le risposte infiammatorie e immunitarie innate verso componenti microbiche. Verranno quindi condotti studi in vitro con il fine di comprendere il meccanismo di azione di questa proteina nel riconoscimento e nella difesa innata verso *P. aeruginosa*. Verranno inoltre condotti studi preclinici allo scopo di definire il potenziale di PTX3 come agente profilattico o terapeutico capace di contrastare l'infezione di agenti quali *P. aeruginosa*, un patogeno per il controllo del quale vi sono armi insoddisfacenti. Questi studi potrebbero costituire la base per valutare l'utilità della somministrazione di PTX3 come agente profilattico e/o terapeutico nei confronti dell'infezione da *P. aeruginosa*, in particolare nei pazienti con fibrosi cistica.

6. RICERCA CLINICA

Clinical research

Introduction: something is moving

Roberto Buzzetti
Epidemiologist and medical statistician. Member of the Italian Cystic Fibrosis Research Foundation Scientific Advisory Board - Epidemiologo e statistico medico. Membro del Comitato Scientifico della Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica

No more than a year ago, during the previous FFC Convention, I remember I defined clinical research as the "Cinderella" of scientific research, at least in the CF field. Maybe it is already time to be a little bit more optimistic. The past July, about 20 researchers met in Milan in order to understand the principal obstacles to clinical research in Italy, and to bring suggestions and proposals. They highlighted several areas of interest, such as invasive nutrition, prognostic model validation and state of health of patients diagnosed by neonatal screening and their needs.

Looking at the international panorama, apart from the 44 reviews in the Cochrane Library and the several phase I and II trials registered (www.clinicaltrials.gov), we have to point out the great interest on the discovery of new small molecules potentially active on the basic defect, like Sildenafil (Robert) or the inflammatory processes, such as Fenretinide (Guibault) or Miglustat (Dechecchi). However, only a few of them have come to clinical study level, being promising those on Denufosol (Kellerman) and Moli1901 (Steiner) as activators of alternative chloride channels; VX-770 (Vertex) as potentiator of some mutated CFTR proteins, and PTC124 as suppressor of non-sense mutations (Kerem). A phase II study of Aztreonam-lysine for aerosol (Retsch-Bogart) shows appreciable but not definitive results. An interesting study, although not randomized (Gottlieb), shows a moderate effect of the long-term therapy with azithromycin in bronchiolitis obliterans after lung transplant. In a phase III study (Jacques) the mannitol inhalation during 2 weeks has significantly improved the pulmonary function of CF patients. A double blind placebo-controlled study (Abdulhamid) investigated the effect of 30 mg per day of elementary Zinc for 1 year on the respiratory exacerbation occurrence in 26 CF children, suggesting the utility of new studies on regard. A long interval (more than 6 hours) between dornase alpha and physiotherapy is more effective than a shorter interval (Wilson). Treatment with growth hormone (Grasemann) in CF children decreases breathed nitric oxide. In a multi-centre prospective study, it was found that the iv administration of meropenem (120 mg/kg/die) or ceftazidime (200-400 mg/kg/die) together with tobramycin iv (9-12 mg / kg / die) have a similar efficacy on pulmonary functionality, microbiology and systemic inflammatory reaction (Lazin). A study by Grover produced promising results of glargine insulin in CF related diabetes. Six weeks of nocturne non-invasive ventilation improves the respiratory distress symptoms, nocturne hypoventilation and capacity of physical exercise in adult patients with stable CF and hypercapnia (Young).

In regard to non-pharmacological interventions: the use of telemedicine can improve the support that a CF centre is able to offer to the patient and his family, and can reduce the necessity of assistance on an outpatient basis (Wilkinson), while Watson presents preliminary data of a controlled randomized study of 10 weeks on a home behavioral intervention "eating well with CF", showing how nutritional education that incorporates behavior strategies can be an effective way to support CF adults by improving self-management on diet and substitutive therapy with enzymes.

I summarize here the scientific contributions presented in this session.

Taccetti - Primary objective of the study, multicentric and randomized, is to compare the efficacy of two schemes of eradication treatments (colistin inhaled and ciprofloxacin given orally versus tobramycin inhaled and oral ciprofloxacin) administered for the same period (28 days) in the initial phases of *Pseudomonas aeruginosa* infection.

Minicucci - The multicentric, randomized and controlled study has evaluated the tolerability and efficacy (in relation to the improvement of the glyco-metabolic and nutritional conditions) of glargine insuline in patients affected by glucose intolerance and clinical decay.

Bernasconi - This study aims to verify: a) presence of insuline-resistance in CF b) possible role of different cytokines in this resistance c) influence of genotype and clinical conditions on sensibility to insulin and its secretion.

Guarino – Double blind randomized controlled study to evaluate the effect of probiotic administration on occurrence of respiratory exacerbations in CF children.

Festini - This randomized open-controlled study aims to demonstrate that increasing the antibiotic dilution in saline for iv administration, it is possible to reduce vein irritations, phlebitis risks, and to prolong the duration of the peripheral venous catheter, therefore reducing the number of venipunctures in an antibiotic cycle.

Braggion - The study aims to evaluate which distance can be reached by *Ps aeruginosa* through drops issued by the respiratory tree, and to verify the efficacy of the 1 meter distance in preventing PA transmission from a patient to another.

Catastini - The study aims to evaluate and quantify the prevalence of depressive and anxious symptoms in CF patients and their families. It aims also to study the correlation of these symptoms with other variables such as age, height, weight, bacteria and lung function.

Dal Molin (new study) - For one year the study will observe a population of CF patients with central venous accesses completely implantable (like Port). The aim is to determine

the impact of late complications (infective, thrombotic and obstructive).

Ranieri (new study) - The study aims to evaluate the clinical efficacy of extracorporeal ventilation techniques like the "Bridge technique" for lung transplantation in CF patients who are in the transplant waiting list and develop an acute hypercapnic respiratory insufficiency.

Introduzione: Ricerca clinica, qualcosa si muove

Non più tardi di un anno fa, alla precedente Convention della Fondazione, ricordo di aver nominato la ricerca clinica come "cenerentola" della ricerca, almeno in ambito FC. Forse è già ora di concedersi un poco di moderato ottimismo. Nel luglio scorso una ventina di ricercatori italiani si è riunita a Milano, per tentare di comprendere i principali ostacoli alla ricerca clinica, ma anche per portare suggerimenti e proposte. Sono emerse numerose aree di interesse, tra cui la nutrizione invasiva, la validazione di modelli prognostici, lo stato di salute dei pazienti diagnosticati per screening e le loro esigenze.
Nel panorama internazionale, oltre alle 44 revisioni presenti nella Cochrane Library e alle parecchie decine di trials di fase I e II (rari di fase III) registrati (www.clinicaltrials.gov), va segnalato il grande interesse per la scoperta di nuove piccole molecole potenzialmente attive sul difetto di base, come il sildenafil (Robert), o sui processi infiammatori, come fenretinide (Guibault) o miglustat (Dechecchi). Tuttavia, solo poche sono arrivate agli studi clinici, tra cui appaiono promettenti quelli sul denufosol (Kellerman) e sul Moli1901 (Steiner) come attivatori di canali alternativi del cloro; VX-770 (Vertex) come potenziatore di CFTR mutata, e PTC124 come soppressore di mutazioni non senso (Kerem). Uno studio di fase II con aztreonam-lisina per aerosol (Retsch-Bogart) ha mostrato risultati apprezzabili ma non ancora definitivi. Uno studio interessante, sia pur non randomizzato (Gottlieb), mostra un discreto effetto della terapia a lungo termine con azitromicina nella bronchiolite obliterante dopo trapianto di polmone. In uno studio di fase III (Jaques) l'inalazione di mannitolo per 2 settimane ha significativamente migliorato la funzione polmonare nei pazienti CF. Uno studio pilota in doppio cieco controllato con placebo (Abdulhamid) ha indagato l'effetto di 30 mg al giorno di Zinco elementare per 1 anno sul tasso di infezioni del tratto respiratorio in 26 bambini con fibrosi cistica suggerendo l'utilità di nuovi studi in proposito. Un lungo intervallo di tempo (oltre 6 ore) tra dornase alfa e fisioterapia è più efficace rispetto a un intervallo più breve (Wilson). Il trattamento con l'ormone della crescita (Grasemann) nei bambini CF diminuisce l'ossido nitrico espirato (effetto antinfiammatorio?). Latzin in uno studio multicentrico prospettico ha trovato che la somministrazione iv di meropenem (120 mg / kg / die) o di ceftazidime (200-400 mg / kg / die), insieme con tobramicina iv (9-12 mg / kg / die), hanno simile efficacia per quanto riguarda la funzionalità polmonare, la microbiologia e la risposta infiammatoria sistemica. Uno studio di Grover attribuisce all'insulina glargine promettenti effetti nella terapia del diabete CF. 6 settimane di Ventilazione non invasiva notturna migliorano i sintomi, come la dispnea da sforzo, l'ipoventilazione notturna e la capacità di esercizio fisico, in pazienti adulti con FC stabile con ipercapnia (Young).
Per quanto riguarda gli interventi non farmacologici: l'uso della telemedicina può migliorare il sostegno che il centro specialistico è in grado di fornire al paziente e alla sua famiglia, e può ridurre la necessità di visite ambulatoriali (Wilkinson); Watson infine presenta i dati preliminari di uno studio controllato randomizzato di 10 settimane che ha contemplato un intervento comportamentale domiciliare "mangiare bene con la FC", mostrando come l'educazione nutrizionale che incorpori strategie comportamentali possa essere un modo efficace per sostenere gli adulti con FC, consentendo il miglioramento dell'auto-gestione sulla dieta e sulla terapia sostitutiva con enzimi.

Riassumo ora il contenuto dei contributi scientifici che saranno presentati in questa convention.

Taccetti - Obiettivo primario dello studio, multicentrico randomizzato, è comparare l'efficacia di due schemi di trattamento eradicante (colistina per via inalatoria e ciprofloxacin per os versus tobramicina per via inalatoria e ciprofloxacin per os) somministrati per lo stesso periodo (28 giorni) nelle fasi iniziali dell'infezione da *Pseudomonas Aeruginosa*.

Minicucci – Lo studio multicentrico, randomizzato e controllato ha valutato tollerabilità ed efficacia (nel migliorare le condizioni nutrizionale e glico-metabolica, e la funzionalità respiratoria) dell'insulina glargine nei pazienti affetti da intolleranza glucidica.

Bernasconi - Questo studio si è proposto di verificare: a) la presenza di insulino-resistenza nella FC; b) un possibile ruolo delle varie citochine su tale resistenza c) l'influenza del genotipo e delle condizioni cliniche sulla sensibilità all'insulina e sulla sua sulla secrezione.

Guarino - Studio randomizzato controllato in doppio cieco, che valuta l'effetto della somministrazione di un probiotico sull'incidenza delle infezioni respiratorie nel bambino con FC.

Festini - Questo studio randomizzato controllato in aperto si propone di mostrare che aumentando la diluizione degli antibiotici nella soluzione fisiologica usata per infonderli, è possibile ridurre l'irritazione della vena utilizzata, ridurre il rischio di flebite, prolungare la durata del catetere venoso periferico e quindi ridurre il numero di venipunture necessarie per un ciclo antibiotico.

Braggion - Lo studio si pone gli obiettivi di valutare quale distanza possa essere raggiunta da PA attraverso l'emissione di goccioline dall'albero respiratorio e di verificare l'efficacia della distanza di un metro nel prevenire la trasmissione di PA da un paziente FC all'altro.

Catastini - Intende valutare e quantificare la prevalenza di sintomi depressivi e ansiosi nei pazienti e nei loro familiari; nonchè correlazioni tra tali sintomi e alcune variabili come l'età, l'altezza, il peso, i germi, la funzione polmonare.

Dal Molin (nuovo studio) - Si osserverà per un anno una popolazione di pazienti con fibrosi cistica con accessi venosi centrali totalmente impiantabili, tipo Port, al fine di determinare l'incidenza di complicanze tardive (infettive, trombotiche e ostruttive).

Ranieri (nuovo studio) – Ha l'obiettivo di valutare l'efficacia clinica delle tecniche di ventilazione extracorporea come "strategia ponte" al trapianto di polmone in pazienti con fibrosi cistica (CF) in lista d'attesa di trapianto che sviluppano insufficienza respiratoria acuta grave con ipercapnia.

References

- *Kellerman Dm, et al. Pulm Pharmacol Ther 2008;21:600-7*
- *Steiner I, et al. Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol 2008;378:323-33*
- *Dechecchi MC, et al. J Cyst Fibros 2008, Sept 1 (Epub)*
- *Vertex Co. Vertex's Press Release, Oct 2008 (www.vrtx.com)*
- *Robert R, et al. Mol Pharmacol. 2008 Feb;73(2):478-89. Epub 2007 Nov 1.*
- *Guilbault C, et al. Am J Respir Cell Mol Biol. 2008 Jan;38(1):47-56. Epub 2007 Jul 26.*
- *Kerem E, et al. Lancet. 2008 Aug 30;372(9640):719-27. Epub 2008 Aug 20.*
- *Retsch-Bogart GZ, et al. Pediatr Pulmonol. 2008 Jan;43(1):47-58.*
- *Gottlieb J, et al. Transplantation. 2008 Jan 15;85(1):36-41.*
- *Jaques A, et al. Chest. 2008 Jun;133(6):1388-96. Epub 2008 Mar 13.*
- *Abdulhamid I, et al. Pediatr Pulmonol. 2008 Mar;43(3):281-7.*
- *Wilson CJ, et al. Pediatr Pulmonol. 2007 Dec;42(12):1110-6.*
- *Grasemann C, et al. Eur Respir J. 2008 Apr;31(4):815-21. Epub 2007 Dec 19.*
- *Latzin P, et al. J Cyst Fibros. 2008 Mar;7(2):142-6. Epub 2007 Sep 4.*
- *Grover P, et al. J Cyst Fibros. 2008 Mar;7(2):134-6. Epub 2007 Aug 9.*
- *Young AC, et al. Thorax. 2008 Jan;63(1):72-7. Epub 2007 Aug 3.*
- *Wilkinson OM, et al. J Telemed Telecare. 2008;14(4):182-5.*
- *Watson H, et al. J Am Diet Assoc. 2008 May;108(5):847-52.*

Giovanni Taccetti

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

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 (Progetto FFC#17/2007, in progress)*

Chronic *P.aeruginosa* (Pa) infection is considered an unfavorable event for the prognosis of cystic fibrosis (CF) patients. In the absence of a definitive cure of this disease, preventive therapy by eradication of Pa at the time of first isolation is a simple and efficacious way to improve long-term prognosis. Since penetration of antibiotics in secretions of CF patients can be scarce, combining an oral antibiotic with one administered by inhalation can improve results. A limited number of studies have analyzed the possibility of early eradication of Pa with encouraging results but there are still no publications on large numbers of patients in order to compare the efficacy of the various treatments available, which vary in cost. The main objective of this randomized multicenter trial was to statistically analyze the efficacy of two early Pa infection-eradicating treatment protocols (inhalatory colistin/oral ciprofloxacin versus inhalatory tobramycin/oral ciprofloxacin) in a sizeable group of CF patients for 28 days. The treatment was considered efficacious if patients were infection-free with at least three cultures negative for Pa over 6 months, in agreement with the literature. The enrolled patients will undergo immunological monitoring (anti-Pa IgA and IgG), plus microbiological analysis using molecular techniques in case of successive Pa colonization. The study is ongoing.
83 patients (41 F and 42 M, mean age 9.4±7.8 yrs, median age 7, range 1-36) from 12 centers have been enrolled. 49% of patients had previous *P. aeruginosa* colonization treated pharmacologically. 48/83 (57%) patients received inhalatory tobramycin/oral ciprofloxacin and 35/83 (43%) inhalatory colistin/oral ciprofloxacin. At present 32/83 patients have completed the follow-up of six months (drop out 6%). Microbiological studies conducted on 36 strains showed sensitivity to colistin, tobramycin and ciprofloxacin. The presence of anti-Pa antibodies over the cut-off prior to bacterial isolation was observed in 34% of patients.

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

L'infezione cronica da *P. aeruginosa* (Pa) è un evento sfavorevole per la prognosi dei pazienti FC. L'eradicazione del germe nelle fasi precoci dell'infezione appare come un metodo per migliorare la prognosi a lungo termine. Un limitato numero di studi ha finora analizzato la possibilità di eradicazione precoce di Pa, con risultati incoraggianti. Non esistono tuttavia attualmente studi pubblicati su ampia casistica per comparare l'efficacia dei vari trattamenti utilizzabili.
L'obiettivo primario del presente studio multicentrico randomizzato è comparare, con metodi statistici, l'efficacia di due schemi di trattamento eradicante (colistina per via inalatoria/ciprofloxacin per os versus tobramicina per via inalatoria/ciprofloxacin per os) somministrati per lo stesso periodo (28 giorni) nelle fasi iniziali dell'infezione da Pa in un campione adeguatamente dimensionato di pazienti affetti da FC. Il trattamento è giudicato efficace e i pazienti sono ritenuto liberi da infezione da Pa nel caso che 3 successive colture in un periodo di 6 mesi risultino negative. I pazienti arruolati saranno sottoposti a monitoraggio immunologico (IgA e IgG anti-Pa). Verranno eseguiti studi microbiologici con tecniche molecolari in caso di successiva colonizzazione da parte di Pa. Sono stati attualmente randomizzati 83 pazienti (41F e 42M, età media 9.4 ±7.8 anni, mediana 7 range 1-36) in 12 Centri. Il 49% dei pazienti riferiva all'anamnesi pregressa colonizzazione da Pa ma era libero dal germe dopo essere stato trattato con antibiotici. Non abbiamo rilevato differenze statisticamente significative fra femmine e maschi nell'età al momento della colonizzazione. 48/83 (57%) pazienti hanno ricevuto tobramicina per via inalatoria/ciprofloxacin per os e 35/83 (43%) pazienti colistina per via inalatoria/ciprofloxacin per os). Attualmente 32/83 pazienti (drop out 6%) hanno completato il follow-up semestrale.
Studi microbiologici su 36 ceppi hanno mostrato sensibilità nei confronti di colistina, tobramina e ciprofloxacin.
La presenza di anticorpi anti-Pa oltre il cut-off prima dell'isolamento del germe è stata osservata nel siero del 34 % dei pazienti.

45. Efficacy of slow release insulin in patients with cystic fibrosis and glucose intolerance with clinical decay

Laura Minicucci, *a sinistra, con la collaboratrice Marianna Caso.*

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

In this multicentric, randomized, controlled study, tolerability and efficacy of insulin glargine to improve nutritional and glicometabolic condition and respiratory function was evaluated in CF patients with Glucide Intolerance.
Patients have been randomizated into two groups and only patients in one group have received a daily insulin dose for 18 months. Unfortunately, at the end of the two FFC sponsored years, the expected number (at leas 74) of enrolled patients has not been achived. To date 43 patients have been entered in the study: 23 Glargine YES e 22 Glargine NO; mean follow-up time14 months (range 3-18).
They were enrolled by Genova Center (18 pts), Roma Bambino Gesù Center (13 pts), Napoli Federico II Center (5 pts), Palermo Center (3 pts), Cerignola Center (3 pts), Roma La Sapienza Center (2 pts), Milano Adults Center (1 pt). 11 patients interrupted the study: 6 patients didn't accept the randomization result, 1 patient developed overt CFRD after 9 months, 1 patient voluntarily interrupted the drug after 15 months, 1 started enteral nutrition after 15 months, 1 underwent lung transplantation after 6

months, 1 died after 3 months. Friedman's test was performed for statistical elaboration of the collected data, that have been considered, for all the paramethers, at time T+9.
Glargine YES group has showed nutritional status and lung function improvement, whereas Glargine NO group has showed a worsening in the same paramethers. All the patients improved their glicometabolic condition, even if improvement in patients of Glargine YES group was higher. However, because of no difference reached statistical significance, these data have to be confirmed. As a matter of fact, to date, glargine, at the studied dosage, showed to be safe and well-accepted by all the patients, but one, who voluntary interrupted the drug, because of its excessive burden. Finally it is important to affirm that this study proved a poor feasibility in partecipating Italian CF Center, both because of bureaucracy (Local Ethic Commitee and insurance difficulties) and because of management problems in diagnosing and following up.

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

Questo studio multicentrico, randomizzato e controllato ha valutato se insulina glargine, nei pazienti affetti da intolleranza glucidica in Fibrosi Cistica, è ben tollerata ed efficace nel migliorare le condizioni nutrizionale e glicometabolica e la funzionalità respiratoria. I pazienti sono stati divisi, random, in due gruppi e, in uno dei gruppi, è stata somministrata glargine per via sottocutanea una volta al giorno. Al termine dei due anni finanziati, purtroppo, non è stato ancora raggiunto il numero di pazienti arruolati previsto (minimo 74 pazienti). Sono entrati in follow up 45 pazienti (23 Glargine SI e 22 Glargine NO; tempo medio di osservazione 14 mesi, range 3-18). I pazienti nello studio sono stati arruolati nei Centri FC di Genova (18 pz), Roma Bambino Gesù (13 pz), Napoli Federico II (5 pz), Palermo (3 pz), Cerignola (3 pz), Roma La Sapienza (2 pz), Milano Adulti (1 pz). 11 pazienti sono usciti dallo studio: 6 non hanno accettato il risultato della randomizzazione; 1 ha sviluppato CFRD dopo 9 mesi; 1 ha volontariamente interrotto la terapia con glargine dopo 15 mesi; 1ha posizionato PEG dopo 15 mesi, 1 è deceduto dopo 3 mesi, 1 è stato sottoposto a trapianto bipolmonare dopo 6 mesi. I dati, relativi ai pazienti che hanno completato almeno nove mesi di follow up, sono stati elaborati con il test di Friedman. I risultati ottenuti hanno dimostrato la tendenza ad un miglioramento dello stato nutrizionale e della funzionalità respiratoria nei pazienti del gruppo trattato con glargine, a fronte di un peggioramento degli stessi parametri nel gruppo non trattato. I parametri glicometabolici sono migliorati in entrambe i gruppi, anche se maggiormente nel gruppo trattato. Tuttavia, poiché nessuno dei risultati esposti, forse a causa del campione ridotto, ha raggiunto la significatività statistica, questi risultati vanno interpretati con estrema cautela. Glargine si è a tutt'oggi dimostrato un provvedimento terapeutico sicuro (nessun effetto collaterale segnalato) e ben accetto (un solo paziente ha voluto interrompere spontaneamente la somministrazione). La fattibilità di questo studio, però, si è rivelata, nella realtà scientifica italiana, molto scarsa, sia per problematiche burocratiche legate all'approvazione del progetto da parte dei Comitati Etici Locali e alla copertura assicurativa, sia per problematiche organizzative da parte dei Centri FC partecipanti, che hanno avuto difficoltà nella diagnosi, nell'arruolamento e nel follow up dei pazienti.

Sergio Bernasconi, *terzo da sx. in primo piano, con il suo gruppo di ricerca.*

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

Bernasconi S, Street ME
Dipartimento di Pediatria, Università di Parma
(Progetto FFC #18/2006, concluded)

Cystic Fibrosis (CF) is characterised by chronic inflammation that may lead to insulin resistance (IR) and subsequently to diabetes (CFRD). This study aimed to verify: a) the presence of IR in CF; b) a possibile role of adiponectin, resistin, IL-6, TNF-α and IGF-I and c) the influence of genotype and clinical conditions on insulin sensitivity and secretion. We enrolled 115 patients (pts) of which 95 were analysed (5-43 years), subdivided in prepubertal, pubertal and adults and 94 controls of comparable sex and age (4-36 years) subdivided in 3 age-groups as the pts. Based on the Schwachman score the pts were subdivided in group 1 (N=56, score 71-100) and group 2 (N=39, score 55-70). Based on the genotype, they were subdivided in homozygous for the ΔF508 mutation (N=41), heterozygous for the ΔF508 mutation (N=33) and other mutations (N=21).
In all prepubertal CF a standard OGTT was performed , and in all other patients both and OGTT and an IVGTT. HOMA, QUICKI, glucose/insulin ratio and insulinogenic index were calculated as indexes of insulin sensitivity. Based on the IVGTT the first phase insulin response (FPIR) and the acute insulin response (AIR) were calculated. Only 3 pts were insulin-resistant based on the HOMA and the glucose/insulin ratio was abnormal in 5/95 only. Based on the OGTT, 40 pts were normal, 41 had impaired glucose tolerance (IGT), 104 had CFRD. Based on the FPIR, 8 pts were normal, and 49 had insulin deficiency. Cross-tabulation analysis based on age and clinical score did not show significant differences in the frequency of diabetes and IGT among the groups. The homozygous pts had a significant higher chance of developing IGT. Resistin, IL-6 and TNF-α were significantly increased in the pts compared with controls. Insulin, IGF-I and TNF-α changed only depending on puberty both in pts and controls. Insulin basal concentrations were lower in the homozygous compared with the others. IL-6 was significantly increased in the homozygous pts and in the pts with the lowest score. In all pts HOMA was correlated positively with FPIR and IGF-I. IGF-I was correlated positively with the insulinogenic index and FPIR. IL-6 showed positive correlations with the AIR, adiponectin, TNF- α, and resistin. FEV1 was negatively correlated with resistin and IL-6.
In conclusion, insulin deficiency has an early onset in CF and seems to depend on the CFTR defect and not on the clinical stage and inflammatory status of the disease. Indexes of insulin sensitivity showed relationships with IGF-I, resistin, IL-6 and TNF-α. Resistin, IL-6 and TNF-α were the most increased cytokines. Adiponectin and resistin play a minor role in regulating insulin sensitivity. Finally, these data suggest an important effect of the functional CFTR class on insulin secretion and/or sensitivity.

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

La FC è caratterizzata da infiammazione cronica che può determinare insulino-resistenza (IR) e potrebbe precedere il diabete (CFRD). Questo studio si è preposto di verificare: a) la presenza di IR nella FC; b)un possibile ruolo di adiponectina, resistina, IL-6, TNF-α ed IGF-I e c) l'influenza del genotipo e delle condizioni cliniche sulla sensibilità e secrezione insulinica. Sono stati arruolati 115 pazienti (pz) di cui 95 analizzati (5-43 anni), suddivisi in prepuberi, puberi e adulti e 94 controlli confrontabili per sesso ed età (4-36 anni) suddivisi analogamente in 3 gruppi. In base allo Schwachman score i pz sono stati suddivisi in gruppo 1 (N=56, score 71-100) e gruppo 2 (N=39, score 55-70). In base al genotipo, sono stati

suddivisi in omozigoti per la mutazione ΔF508 (N=41), eterozigoti per la mutazione ΔF508 (N=33) ed altre mutazioni (N=21). In tutti i prepuberi FC è stato eseguito un OGTT ed in tutti gli altri sia un OGTT che un IVGTT. HOMA, QUICKI, rapporto glicemia/insulina e indice insulinogenico sono stati calcolati quali indici di sensibilità insulinica. In base all'IVGTT è stata calcolata la first phase insulin response (FPIR) e l'acute insulin response (AIR). Solo 3 pz erano insulino-resistenti in base all'HOMA ed il rapporto glicemia/insulina è risultato anormale in 5/95. In base all'OGTT, 40 pz erano normali, 41 avevano una ridotta tolleranza glucidica (IGT), 104 avevano il CFRD. In base alla FPIR, 8 pz erano normali, e 49 avevano un deficit di insulina. L'analisi di cross-tabulazione in base all'età ed allo score non ha mostrato modificazioni significative nella frequenza del diabete e dell' IGT tra i gruppi. Gli omozigoti avevano una probabilità significativamente più alta di sviluppare IGT. Resistina, IL-6 e TNF-α erano significativamente più elevati nei pz rispetto ai controlli. Insulina, IGF-I e TNF-α variavano solo in funzione della pubertà sia nei pz che nei controlli. Le concentrazioni basali di insulina erano più basse negli omozigoti rispetto agli altri. L' IL-6 era più elevata nei pz omozigoti e nei pz con lo score più basso. Nei pz in toto l'HOMA è risultato correlato positivamente con FPIR e IGF-I. L'IGF-I è risultata correlata positivamente con l' indice insulinogenico e FPIR. L' IL-6 ha mostrato correlazioni positive con AIR, adiponectina, TNF- α e resistina. Il FEV1 è risultato correlato negativamente con resistina ed IL-6. In conclusione, il deficit di insulina ha un esordio precoce nella FC e sembra dipendere dal difetto del CFTR e non dallo stadio della malattia e dallo stato infiammatorio. Gli indici di sensibilità insulinica mostrano rapporti con IGF-I, resistina, IL-6 e TNF-α. Resistina, IL-6 e TNF-α sono le citochine maggiormente alterate. Adiponectina e resistina giocano un ruolo minore nel regolare la sensibilità all'insulina. Le analisi effettuate suggeriscono un effetto importante della classe funzionale del CFTR sulla secrezione e/o sensibilità all'insulina.

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

Alfredo Guarino

Guarino A[1], Colombo C[2], Morelli L[3]
[1]*Clinica Pediatrica, Università Federico II, Napoli;* [2]*Dip. 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, concluded)*

Probiotics are defined as "live microbial feed supplement that beneficially affects the host by improving the intestinal microbial balance". Children with CF represent a potential ideal target for the administration of probiotics, because of their extensive use of antibiotics with consequent high risk of alterations of intestinal microflora, perturbations of the microenvironment principally related to CFTR dysfunction and because of their intestinal problems including abdominal pain and disruption of intestinal barrier function.

Objectives and methods:

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 inflammation locally and outside the gut, such as in lung

Enrolled children have been randomly assigned in a double blind fashion at two groups.
Group A started with a preparation (code 400) and group B received the other preparation (code 401) for 6 months. At the end the first 6 months period (period 1) the two groups shifted to the other preparation (period 2) for further 6 months. A washout period of 4 weeks was introduced between the two different preparations.
Results: 19 children have been enrolled (11 in group A and 8 in group B). 4 children were lost during the follow up (3 in group A and 1 in group B). No significant differences were observed between the two groups of patients at the time of enrolment in term of demographic, clinical, pulmonary and intestinal parameters with exception of severity of pancreatic insufficiency assessed by steatorrhea. During the first 6 months of follow up a total of 12 episodes of pulmonary exacerbations was registered: 5 in the group A and 7 in the group B. Six hospital admissions for pulmonary exacerbations were recorded during the first 6 months of follow up : 3 in the group A and 3 in the group B. Patients in group B at the end of the first six months showed an increase of mean value of FEV1 (76% vs 84%). In this group 8/9 patients showed an increase of FEV1 during the treatment while in group A only 2 out 11 patients showed an increase of FEV1.
No significant difference in mean value of both markers of intestinal inflammation (fecal calprotectin and rectal nitric oxide) in the two groups of patients was observed after the first six months of follow although a lower number of patient in the group B compared to group A presented a decrease in rectal nitric oxide at the end of the treatment (66% vs 54%).
No difference in mean value of steatorrhea was observed in the group A and B after six months of treatment. Fecal samples of patient enrolled in this study were analysed by DGGE techniques. One or more bands become visible in the gel after treatment while in some cases bands present at the enrolment disappeared after probiotic/placebo administration. In the group B the sequence analysis of the DGGE bands showed a disappearance *E.coli* while in the group A *Ruminococcus* spp was the genera which appeared after treatment.
Conclusion: These preliminary data show a difference between the two groups in respiratory function and probably in intestinal inflammation at the end of the first six months of treatment . In the two groups a difference in the DGGE profile was observed after the treatment.
At moment it is not possible to establish the correlation between intestinal flora modifications and clinical findings.

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

La flora intestinale, costituita da più di 500 specie batteriche, è il risultato di una complessa interazione tra l'ambiente esterno e quello interno all'ospite. Negli ultimi anni appare sempre più chiaro che la microflora intestinale influenza in maniera attiva la risposta immune mucosale intestinale giocando un ruolo di fondamentale importanza nella difesa dalle infezioni e nello sviluppo della tolleranza verso gli alimenti.
Oggi è possibile modificare la microflora intestinale somministrando microrganismi in grado di colonizzare l'intestino (probiotici) o in alternativa sostanze in grado di stimolare la crescita di specifiche specie batteriche nel colon (prebiotici). Pertanto si è deciso di valutare l'effetto della somministrazione di un probiotico sull'incidenza delle infezioni respiratorie nel bambino con fibrosi cistica.
Lo studio è uno studio randomizzato controllato in doppio cieco il che significa che nessuno sa che tipo di sostanza stia assumendo il paziente (se il Lactobacillus GG o il placebo). 19 pazienti sono stati arruolati e suddivisi al momento dell'arruolamento in due gruppi (gruppo A e gruppo B); ciascun paziente per 6 mesi ha assunto una delle due sostanze e

dopo un'interruzione di 1 mese ha iniziato l'assunzione dell'altro tipo di sostanza. 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). Nessuna differenza è stata osservata per l'infiammazione intestinale (valutata attraverso la misurazione della calprotectina fecale e dell'ossido nitrico rettale), mentre una differenza significativa tra i due gruppi era osservata per il grado di compromissione pancreatica (misurata con lo steatocrito) pur se per entrambi i gruppi sia la steatorrea che l'infiammazione intestinale risultavano patologiche. I dati attualmente disponibili dimostrano che i pazienti del gruppo B dopo i primi 6 mesi presentano un significativo aumento del FEV1 medio (da 76% a 84%) con un miglioramento osservato in 8/9 pazienti mentre nel gruppo A solo in 2 /11 pazienti si evidenzia un incremento del il FEV1 medio.
Un risultato simile si è osservato per l'infiammazione intestinale infatti un numero maggiore di pazienti presenta una riduzione dei markers di infiammazione intestinale (calprotectina e ossido nitrico) nel gruppo B rispetto al gruppo A.
I campioni fecali dei pazienti che rientrano in questo studio sono stati analizzati mediante una tecnica (DGGE) che consente di ottenere profili di bande che rappresentano la sua microflora intestinale. Dopo il trattamento si sono evidenziate modifiche dei profili riconducibili a una o più bande. Le bande che consentivano di discriminare i pazienti in due gruppi sono state ritagliate e sequenziate al fine di identificare il genere e la specie batterica corrispondente. Dopo il trattamento nel gruppo A si è osservato un aumento di *Ruminococcus* spp. mentre nel gruppo B una riduzione di *E.coli*.
Si tratta di dati preliminari che andranno confermati sull'intera popolazione di pazienti arruolati anche utilizzando metodiche quantitative e non solo qualitative.
In conclusione i dati ottenuti mostrano una differenza sia in termini di funzione respiratoria che probabilmente di infiammazione intestinale tra i due gruppi. I gruppi presentano inoltre alcune differenze riguardo la composizione della microflora intestinale. È ipotizzabile quindi che i risultati ottenuti siano la conseguenza di una modifica della microflora secondaria alla somministrazione del probiotico.

Filippo Festini

48. 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)

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

Patients with CF frequently have to undergo intravenous antibiotic courses. Peripherally inserted catheters (PVC) are used to reduce the number of venipunctures. The irritating action of antibiotics often interrupts the vein's patency, leading to numerous venipunctures for completing a course of antibiotic treatment -which usually lasts 2 weeks. This causes further suffering, pain and anxiety to the patient. 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. 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 aimed 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 venepunctures needed to complete an antibiotic course. Randomised controlled open study, carried out from March 2007 to August 2008 at the CF Center of Tuscany. Eligible subjects were adult people with CF undergoing an IV course with ceftazidime and tobramycin. Recruited subjects were randomised to two groups: regular antibiotic dilution (control) and higher antibiotic dilution (experimental). The research plan determined the need of 60 subjects to be included along two years. Unfortunately, the restrictive inclusion criteria allowed us to recruit only 9 subjects. Results show that in the experimental group both the mean CVP duration (102.7 vs. 60.2 hours) and the mean number of administrations (12.5 vs 7.6) were higher compared to the control group but differences were not statistically significant.
Also, mean values of scores of pain (0.09 vs 0.15), inflammation (0.09 vs 0.15) and infiltration (0 vs 0.7) were lower in the experimental group but in this case too differences were not statistically significant. 96 hours after insertion, 75% of PVCs in the experimental group were still in use versus none in the control group (Fisher p=0,04). Although these data are in line with the research hypothesis, considering the small number of subjects included, the study does not allow us to draw any conclusion.

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 endovenosa. 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. 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 è proposto quindi di dimostrare che aumentando la diluizione degli antibiotici nella soluzione 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. Si tratta di uno studio randomizzato, controllato, in aperto, svolto da marzo 2007 ad agosto 2008 presso il reparto di degenza del Centro FC della Toscana. I soggetti eleggibili erano persone maggiorenni con diagnosi di FC e prescrizione di terapia antibiotica ev con ceftazidime e tobramicina. I soggetti reclutati sono stati assegnati con randomizzazione a due gruppi di trattamento: normale diluizione dell'antibiotico (gruppo di controllo) e maggiore diluizione (gruppo sperimentale). Lo studio prevedeva il reclutamento in due anni di 60 soggetti. Purtroppo i criteri di inclusione molto stringenti hanno inaspettatamente consentito di arruolare solo 9 soggetti. I risultati mostrano che nel gruppo sperimentale sia la durata media dei CVP (102,7 vs.60,2 ore) che il numero medio di somministrazioni (12,5 vs 7.6) sono state molto maggiori rispetto al gruppo di controllo ma le differenze non sono statisticamente significative. Anche i valori medi dei punteggi di dolore (0,09 vs 0,15), infiammazione (0,09 vs 0,15) e infiltrazione (0 vs 0,7), sono risultati molto minori nel gruppo sperimentale ma anche in questo caso in modo non statisticamente significativo. A 96 ore dall'inserimento il 75% dei CVP del gruppo sperimentale era ancora in funzione contro zero del gruppo di controllo (Fisher p=0,04). Benché i dati raccolti tendano a confermare l'ipotesi di ricerca, dato l'esiguo numero di soggetti studiati, lo studio non consente di trarre alcuna conclusione.

Alberto Dal Molin

49. Prospective study about complications of totally implantable central venous access ports in people with CF

Dal Molin A[1], Braggion C[2], Furnari ML[3], Lucidi V[4], Rizzi E[5], Cialdella P[6]
[1]Dipartimento di Pediatria, Univ. Firenze, [2]Centro Fibrosi Cistica, Ospedale Meyer, Firenze; [3]Centro Regionale FC, 2° Unità Pediatria, Osp. dei Bambini "G. Di Cristina", Palermo; [4]Serv. Supporto FC, Osp. Bambin Gesù, Roma; [5]Centro Fibrosi Cistica, Azienda Osped. Verona, [6]Serv. Supporto Fibrosi Cistica, Osped. Cerignola, Foggia
(Prog. FFC #16/2008, new)

Pulmonary infections are the major cause of mortality and morbidity in cystic fibrosis (CF); patients frequently have to take antibiotics which often cannot be given orally or by aerosol but have to be administered intravenously. Increasing problems with peripheral venous access may require the implantation of a central venous access.
Totally Implantable Vascular Access Devices (TIVADS), or ports, are an important alternative to external central venous catheters (CVCs). The use of ports started in the early 1980s in cancer patients and it was later extended to patients with CF. Compared to external CVCs, ports allow almost unlimited movement and physical activity (e.g.: swimming) and reduce the alteration of patient's body image. However, there are important complications associated with TIVADs which can be early (pneumothorax, arterial puncture, severe bruising) or late (infections, thromboembolic complications and occlusion).
Although the use of TIVADs in CF is increasing, there is little CF-specific literature available on the epidemiology and risk of TIVAD complications. Also, literature is scarce about clinical criteria for deciding to insert a TIVAD. Therefore, so far clinical decisions were based mainly on experiences of TIVAD use in other diseases, such as cancer.
With this study we will observe a population of CF with TIVAD along a period of one year, to determine the incidence of late complications (infectious, thrombotic and obstructive). If the number of patient is suitable we will investigate possible associations between the onset of complications and several variables regarding in particular the different ways of delivering nursing care and of managing the port access. A secondary purpose is to collect epidemiological data about the clinical conditions of CF patients at the moment of the insertion of a TIVAD, as well as about the reasons for the decision of positioning the TIVAD itself. Based on previous results, we estimate that in Italy 2.5% of CF patients currently have a TIVAD, that is, about 110 people. We foresee that we will be able to recruit about 80% of them.

Studio osservazionale sulle complicanze degli accessi venosi centrali totalmente impiantabili, tipo Port, nelle persone affette da fibrosi cistica.

Le infezioni polmonari sono la principale causa di mortalità e morbilità nei pazienti con la fibrosi cistica (FC); frequentemente i pazienti devono assumere antibiotici, che spesso non possono essere somministrati per via orale o per aerosol, ma devono essere somministrato per via endovenosa. Quando l'accesso venoso periferico diventa problematico, può essere necessario il posizionamento di un accesso venoso centrale.
Il Dispositivo Vascolare Totalmente Impianto (port) è un'importante alternativa ai cateteri venosi esterni (CVCs) e il suo utilizzo è iniziato nei primi anni '80 nei pazienti oncologici e successivamente anche nei pazienti con fibrosi cistica. Rispetto al CVCs esterno, i port consentono di svolgere attività fisica (ad esempio: nuoto) e di ridurre l'alterazione dell'immagine corporea del paziente. Tuttavia, vi sono importanti complicazioni associate con TIVADs che possono manifestarsi precocemente (pneumotorace, puntura arteriosa, ematoma) o successivamente al posizionamento (infezioni, complicanze tromboemboliche e occlusive). Sebbene l'uso di TIVADs nei pazienti con FC sia in aumento, c'è poca letteratura specifica disponibile sia sulla epidemiologia sia sul rischio di complicazioni. Inoltre, la letteratura è scarsa nel indicare i criteri clinici per decidere quando inserire un TIVAD. Pertanto, finora le decisioni cliniche si sono basate principalmente sulle esperienze avute in altre malattie, come il cancro. Con questo studio si osserverà una popolazione di pazienti con fibrosi cistica con TIVAD per un anno, al fine di determinare l'incidenza di complicanze tardive (infettive, trombotici e ostruttive). Inoltre se la numerosità campionaria sarà sufficiente si cercherà di indagare eventuali associazioni tra l'insorgenza di complicanze e i diversi modi di fornire assistenza infermieristica e di gestire l'accesso al port.
Un obiettivo secondario sarà quello di raccogliere dati epidemiologici sulle condizioni cliniche dei pazienti affetti da fibrosi cistica, al momento della inserimento di un TIVAD, e i motivi della decisione di posizionare il TIVAD stesso. Basandoci su risultati di studi precedenti, cha hanno stimano che in Italia il 2,5% dei pazienti affetti da Fibrosi Cistica abbiano un TIVAD, cioè 110 persone. Prevediamo che saremo in grado di arruolare circa l'80% di essi.

50. 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.

Cesare Braggion

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

One of the most important way of transmission of *Pseudomonas aeruginosa* (PA) is known to be the emission of droplets during conversation and coughing. International Guidelines about infection prevention suggest that CF patients should maintain a distance of at least 1 meter from other CF individuals. However, specific studies and scientific evidence on the safety of the distance to be kept between CF people are scarce, and the 1-meter distance might be inadequate.
The goals of our study were to evaluate what distance can be reached by PA through emission of droplets from the respiratory

tract and to verify the effectiveness of the 1-meter distance to prevent transmission of respiratory pathogens in CF. Patients of the CF centre of Tuscany aged 14 years or older who resulted positive for *Pseudomonas aeruginosa* (PA) in the previous sputum culture were included in the study. The study method consisted in placing the patient in front of a single-use, water-proof, sterile drape, The drape was positioned horizontally, perpendicularly to the patient standing up, at the level of patient's chin. Patients were first invited to read a standard text, in order to reproduce a normal conversation. Four specimens were taken in the first, 2nd, 3rd and 4th half meter area of the drape by directly touching the sterile cloth with a culture ground plate. Afterwards the drape was changed and patients were asked to have 2 forced coughs. Four more specimens were collected, as described above. Bacteriological tests were performed on the 8 samples taken to identify PA. We included 42 patients (18 females and 24 males, mean age 297 months, mean BMI 20.8 kg/m2, mean FEV1 63.2%). The prevalence of cultures positive for PA after conversation was 0.59% (CI 95% 0.1-3.2%). The prevalence of cultures positive for PA after forced cough was 1.7% (CI 95% 0.6-5.1). The prevalence in the 4th half meter was 1.19 % (CI 95% 0.3-4.2). Our study shows that transmission of PA beyond one meter of distance is possible both during talking and during cough, although its probability is low. The 1-meter distance between CF people should not be considered an effective infection prevention measure.

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 respiratorie in FC raccomandano di mantenere la distanza precauzionale di almeno un metro tra i soggetti con FC. Infatti una delle principali modalità di trasmissione di *Pseudomonas aeruginosa* (PA) è attraverso l'emissione di goccioline di saliva con la conversazione e la tosse, sintomo abituale nei pazienti con FC. Tuttavia sono pochissimi gli studi specifici svolti nell'ambito della FC e scarse le prove scientifiche in merito alla distanza precauzionale da mantenere tra persone FC, Essa pertanto potrebbe essere inadeguata.
Il nostro studio si è posto pertanto gli obiettivi di: valutare quale distanza possa essere raggiunta da PA attraverso l'emissione di goccioline dall'albero respiratorio; verificare l'efficacia della distanza di un metro nel prevenire la trasmissione di PA da un paziente FC all'altro.
Sono stati inclusi nello studio i soggetti con FC seguiti dal Centro Regionale Toscano per la Fibrosi Cistica di età superiore o uguale a 14 anni risultati positivi per PA nel precedente espettorato. Il metodo di studio è consistito nel porre il soggetto in piedi davanti ad un telo sterile impermeabile monouso teso orizzontalmente all'altezza del mento. Si è chiesto, quindi, al paziente di leggere un brano con l'intento di ricreare le condizioni di una conversazione. Successivamente si sono raccolti quattro campioni per contatto diretto di terreni di coltura con il telo nelle seguenti aree dinanzi al paziente: 0-0,5m; 0,5-1m;1-1,5m;1,5-2m. Cambiato il telo sterile, si è chiesto al soggetto di effettuare manovre di espirazione forzata a glottide aperta. Poi si è ripetuto il prelievo di altri quattro campioni. Sono stati infine eseguiti esami batteriologici sugli 8 campioni prelevati per verificare la presenza dello PA.
Risultati: sono stati inclusi 42 soggetti con FC (18 femmine e 24 maschi, età media 297 mesi, BMI medio 20.8 kg/m2, FEV1 media 63.2%). La prevalenza di colture positive per PA dopo conversazione è risultata 0.59% (CI 95% 0.1-3.2%). La prevalenza di colture positive per PA dopo tosse è stata 1.7% (CI 95% 0.6-5.1). La prevalenza nell'area 1,5-2 metri è stata 1.19 % (CI 95% 0.3-4.2). I nostri risultati dimostrano che la trasmissione di PA è possibile anche oltre 1 metro di distanza sia durante la conversazione che durante la tosse, anche se la probabilità è bassa. Conseguentemente la "distanza minima di un metro" non può essere considerata una misura di prevenzione delle infezioni efficace.

Vito Marco Ranieri

51. Extracorporeal lung assist as bridge to lung transplantation for patients with cystic fibrosis

Ranieri VM
Dip. Discipline Medico Chirurgiche, Sez. Anestesia e Rianimazione, Università di Torino
(Prog. FFC #17/2008, new)

Objectives. To evaluate the clinical efficacy of extracorporeal ventilation strategies as a bridge to lung trans–plantation in patients with cystic fibrosis (CF) on the waiting list who develop severe respiratory failure and hypercapnia.
Background/Rationale. The mortality rate on the transplant waiting list of patients with cystic fibrosis is high. Worsening of lung failure in these patients might lead to ventilation-refractory hypercapnia and eventually death. Supporting the respiratory function with mechanical ventilation is often necessary. However, mechanically ventilated patients with cystic fibrosis have an exceptionally low likelihood of prolonged survival. Moreover, invasive mechanical ventilation is considered a relative contraindication to transplantation.
In the last few years new technologies of extracorporeal ventilation have became available. In particular, the pumpless interventional lung assist has been shown to be effective in the management of patients with severe ventilation-refractory hypercapnia.
We aim to assess the efficacy of extracorporeal carbon dioxide removal in preventing the need for endotracheal intubation of patients with end-stage lung disease secondary to cystic fibrosis listed for lung transplantation.
Preliminary results. Over the past two years we have conducted a preliminary trial using the pumpless interventional lung assist examining the feasibility and safety of this technique in the treatment of patients with end-stage lung disease awaiting lung transplantation in our intensive care unit. Overall, this technique is feasible and safe for the targeted patient population. Furthermore it shows that we have previous experience using this device in various diseases including cystic fibrosis.
Project description. We intend to perform an observational prospective case-control study. CF patients on the waiting list developing severe hypercapnic respiratory failure treated with the pumpless interventional lung assist will be matched with historical controls. We expect to enroll a total of 30 patients over a period of 2 years due to the rate of patient admission in our ICU with cystic fibrosis and hypercapnic respiratory failure.
Anticipated output. The efficacy of the pumpless interventional lung assist in extracorporeal carbon dioxide removal should be able to prevent the need for endotracheal intubation of patients with end-stage lung disease secondary to CF listed for lung transplantation. Consequently, the number of CF patients with end-stage lung disease undergoing lung transplantation should increase, thereby decreasing the mortality rate on the waiting list.
Relevance to Italian CF Research Foundation. New technological advancements have been developed to support patients with end stage respiratory failure including those with cystic fibrosis. The optimization of the clinical use of these new devices can potentially have a tremendous therapeutic impact on the life expectancy of CF patients.

Rimozione extracorporea di anidride carbonica come strategia "ponte" al trapianto di polmone nei pazienti con fibrosi cistica

Obiettivo. Valutare l'efficacia clinica delle tecniche di ventilazione extracorporea come strategia ponte al trapianto di polmone in pazienti con fibrosi cistica (CF) in lista d'attesa di trapianto che sviluppano insufficienza respiratoria acuta grave con ipercapnia.
Razionale. La mortalità dei pazienti con CF in lista d'attesa di trapianto di polmone continua ad essere elevata. Il peggioramento dell'insufficienza respiratoria in questi pazienti può determinare l'insorgenza di ipercapnia refrattaria ad ogni trattamento convenzionale con conseguente inevitabile exitus. Pertanto, il supporto della funzione respiratoria con la ventilazione meccanica artificiale diventa spesso necessaria.
Tuttavia, i pazienti con CF ventilati meccanicamente hanno un aumentato rischio di sviluppare complicanze fatali, riducendo le probabilitá di ricevere il trapianto. Inoltre, la ventilazione meccanica invasiva è considerata una controindicazione relativa al trapianto di polmone.
Recentemente, sono state messe a punto nuove tecnologie che permettono di rimuovere l'anidride carbonica con sistemi di circolazione extracoprorea. In particolare, la tecnica di assistenza ventilatoria denominata "pumpless interventional lung assist" ha fornito promettenti risultati nella gestione di pazienti con grave ipercapnia refrattaria.
Lo scopo del presente progetto è di verificare l'efficacia delle tecniche extracorporee di rimozione di anidride carbonica nel prevenire la necessitá di intubazione orotracheale in pazienti con insufficienza respiratoria terminale secondaria a CF in lista per trapianto di polmone.
Risultati preliminari. Nei precedenti due anni nella nostra terapia intensiva è stata più volte utilizzata la tecnica "pumpless interventional lung assist" verificandone la sicurezza e l'efficacia nel trattamento di pazienti con insufficienza respiratoria terminale in lista d'attesa per trapianto di polmone, includendo alcuni pazienti affetti da CF.
Descrizione del progetto. Intendiamo svolgere uno studio prospettico osservazionale caso-controllo multicentrico. Tutti i pazienti con CF in lista d'attesa per trapianto di polmone, che sviluppano insufficienza respiratoria acuta con ipercapnia refrattaria, saranno trattati con tecniche di circolazione extracorporea (pumpless interventional lung assist) per la rimozione di anidride carbonica e paragonati a controlli storici. Prevediamo di arruolare nello studio 30 pazienti in un periodo di 2 anni.
Risultati previsti. L'efficacia del trattamento con la tecnica "pumpless interventional lung assist" nel correggere l'ipercapnia dovrebbe prevenire la necessitá di intubazione orotracheale in pazienti con CF ed insufficienza respiratoria terminale in lista d'attesa per trapianto di polmone. Pertanto, il numero di pazienti con CF sottoposti a trapianto di polmone dovrebbe aumentare, diminuendo di conseguenza la mortalitá della lista d'attesa.
Rilevanza per la Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica. L'ottimizzazione dell'utilizzo clinico delle nuove tecnologie per il supporto delle funzioni vitali in pazienti con insufficienza respiratoria terminale, inclusi quelli con CF, ha un altissimo potenziale impatto terapeutico e sulle aspettative di vita di questi pazienti.

Paola Catastini

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

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, concluded)

Our study is currently in progress. Many Centers have waited a long time for EC approval. We hope to present final results in June. The 70% of patients population will be recruited for the sample in three different age groups (0-11;12-17;>18),following International Study guidelines.
The purpose of the current study is to estimate the national prevalence of depressive and anxious symptoms in children and adult with CF and parent caregivers.
In addition, we will examine associations between depressive and anxious symptoms and demographic variables such as age, gender, pulmonary function, height, weight to be able to identify a treatment for psychological distress in order to improve health outcomes for patients with CF.
Furthermore, the last stage of our study will be indicate a possible way of psychological intervention to improve a patient's and family's quality of life.
15 Centers have adhered to the study some of them couldn't begin in September- October 2007 due to awaiting EC approval.
Today 13 Centers have started administration tests.
Two meetings with Italian partners were held in November 2007 and May 2008 to discuss the problems and doubts regarding study organization.
The preliminary results from Florence Center indicate that the Italian population present a higher anxiety level and depression in mothers than in fathers; the adolescent patients show less depression and anxiety than adult patients.

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

Il nostro studio è attualmente ancora in corso. Molti centri hanno dovuto attendere tempi considerevolmente lunghi prima di ottenere l'approvazione del C.E. La nostra speranza è quella di presentare i risultati definitivi in giugno.
Secondo quanto dettato dalle linee guida dello studio internazionale il campione clinico che sarà reclutato corrisponderà al 70% della popolazione totale dei pazienti di ogni centro aderente per singole fascia di età (0-11, 12-17, >18).
Lo studio si propone di valutare e quantificare la prevalenza di sintomi depressivi e ansiosi nei pazienti e nei loro familiari. Unitamente a questa valutazione saranno analizzate le correlazioni esistenti tra tali sintomi ed alcune variabili come l'età, l'altezza, il peso, i germi, la funzione polmonare, al fine di identificare interventi volti ad una progressione dello stato di salute.
Oltre a ciò lo studio si propone l'obiettivo di individuare possibilità di percorsi psicologici, nell'ottica di una migliore qualità della vita del paziente e della sua famiglia. Allo studio hanno aderito 15 centri, alcuni di essi non hanno potuto iniziare secondo l'iniziale programmazione, in settembre-ottobre 2007, in quanto sono stati bloccati dalla attesa della approvazione del C.E. Attualmente hanno iniziato la somministrazione 13 Centri.
Tra i partecipanti allo studio sono stati organizzati due incontri, uno a Novembre 2007 ed uno a maggio 2008 per discutere della organizzazione e per l'opportunità di un confronto. I dati preliminari del centro di Firenze mostrano che le madri hanno maggiori livelli di ansia e depressione dei padri, evidenziano inoltre che gli adolescenti presentano minori livelli di ansia e depressione degli adulti.

PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI CONGRESSUALI DI STUDI FINANZIATI DALLA FONDAZIONE FFC DAL 2002 al 2008

Publications and congress communications of the studies funded by the Italian CF Research Foundation from 2002 to 2008

1. FISIOPATOLOGIA CFTR E TERAPIE DEL DIFETTO DI BASE

CFTR Pathophysiology and therapy of the basic defect

- Progetto FFC#1/2002 **"Mini-chromosomes: a new approach for cystic fibrosis gene therapy"**
  Fiorentina Ascenzioni (Dipart. Biologia cellulare e dello sviluppo - Univ. La Sapienza Roma), Massimo Conese (Ist. per il Trattamento speriment. della FC - Osp. San Raffaele – Milano), Olga Zegarra (Lab. Gen. Molec. - Ist. Gaslini – Genova)

Publications

- Auriche C. et al. "Functional human CFTR produced by a stable minichromosome" EMBO Reports 2002; vol. 3, no. 9, pp. 862-868

- 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"**
  Massimo Conese (Ist. per il Trattamento sperimentale della FC - Osp. San Raffaele – Milano)

Publications

- Copreni E. et al. "Lentivirus-mediated gene transfer to the respiratory epithelium: a promising approach to gene therapy of cystic fibrosis" Gene Therapy (2004) 11, S67-S75.
- Carrabino S. et al. "Serum albumin enhances polyethylenimine-mediated gene delivery to human respiratory epithelial cells" The Journal of Gene Medicine 2005; 7: 1555-1564

Abstracts

- Copreni E. et al. "Pseudomonas aeruginosa infection of airway epithelium in a human fetal respiratory xenograft model in view of lentiviral gene therapy of CF lung disease" Journal of Cystic Fibrosis 2 (2003) S19-S23 – 26th Congress European Cystic Fibrosis Society, Belfast 4-7 June 2003.
- Copreni E. et al. "Biosafety of a third generation lentiviral vector for gene transfer to the airway epithelium" NACFC, 2005
- Copreni E. et al. "Gene transfer to the airway epithelium mediated by a third generation HIV-1 based vector: efficiency and role of heparin sulphate" American Society of Gene Therapy, 8th Annual Meeting June 1-5 2005.
- Copreni E. et al. "Study of clearance and internalization of pseudomonas Aeruginosa in a human fetal respiratory xenograft model" Pediatric Pulmonology Suppl. 25, 2003. 17th Annual North American Cystic Fibrosis Conference – Anaheim, 16 – 19 October 2003
- Copreni E. et al. "Lentivirus-mediated gene transfer to the respiratory epithelium in vitro and in vivo in the absence of preconditioning of the airways" 2nd European Conference & Practical Course, February 1-14th, 2004 – Bellaterra, Spain
- Copreni E. et al. "Gene transfer to the airway epithelium by HIV-based vectors" ECFS Conference, Tomar, Portugal 30 April – 3 May 2004;
- Copreni E. et al. "Optimisation of gene transfer to the respiratory epithelium in vitro and in vivo by a last generation lentiviral vector" 3rd European Conference & Practical Course 14 – 26 June 2004, Genopole-Evry, France;
- Copreni E. et al. "Gene transfer to the airway epithelium mediated by last generation lentiviral vectors does not require preconditioning of the epithelial tight junctions" Pediatric Pulmonology Suppl. 27 – The 18th Annual North American CF Conference; Americàs 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"**
  Valeria Casavola (Dipart. Fisiologia Gen. ed Amb. - Univ. Bari), Manuela Zaccolo (Ist. Veneto Med. Molecolare, Padova)

Publications

- Abrahamsen H. et al. "TCR – and CD28 Mediated Recruitment of Phosphodiesterase 4 to Lipid Rafts Potentiates T Cell Receptor Signaling" J Immunol. 2004 Oct 15;173(8):4847-58
- Zaccolo M. et al "Use of Chimeric Fluorescent Proteins and Fluorescence Resonance Energy Transfer to Monitor Cellular Responses" Circulation Research 2004;94:866-873
- Mongillo M. et al. "Fluorescence Resonance Energy Transfer-Based Analysis of cAMP Dynamics in Live Neonatal Rat Cardiac Myocytes Reveals Distinct Functions of Compartmentalized Phosphodiesterases" Circulation Research 2004; 95:67-75
- Guerra L. et al. "Stimulation of Xenopus P2Y1 receptor activates CFTR in A6 cells" Eur J. Physiol. (2004) 449: 66-75;
- Cardone R. A. et al. "Protein kinase A gating of a pseudopodial-located rhoA/ROCK/p38/NHE1 signal module regulates invasion in breast cancer cell lines" Molecular Biology of the Cell Vol. 16, 3117-3127, July 2005;

Abstracts

- Fanelli T. et al. "CFTR regulation of ion transporters by protein – protein interactions" Gordon Conference Le Diablerets 3 – 8 ottobre 2004;
- Guerra L. et al. "Ruolo dei domini PDZ di entrambe le isoforme di NHERF nella regolazione del CFTR" X Congresso Nazionale di Fibrosi Cistica della Società Italiana di Pediatria Palermo, 27-30 ottobre 2004;
- Favia M. et al. "CFTR regulation of ion transporters by protein – protein interactions" The American Society fro Cell Biology, 44th Annual Meeting – Washington 4-8 December 2004
- Riccardi S. M. et al. "Role of NHERF1 in rescuing of F508del-CFTR activity". 2005 – European CF Conference - Evora, Portugal 14-17 April 2005;

- Progetto FFC# 2/2003 **"Activators of the CFTR ionic transport: identification and molecular modelling of the binding sites"**
  Oscar Moran, (Ist. Biofisica – CNR – Genova), Olga Zegarra, (Lab. Gen. Molec. - Ist. Gaslini – Genova), Vincenzo Martorana, (Ist. Biofisica – CNR – Palermo)

Publications

- Galietta L. et al. "Identification of CFTR activators and inhibitors: chance or design?" Current opinion in Pharmacology, vol. 4 issue 5, October 2004, 497-503

- Moran O. et al. "Binding site of activators of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in the nucleotide binding domains" CMLS Cellular and Molecular Life Sciences 62 (2005) 446-460;
- Moran O. et al. "A quantitative description of the activation and inhibition of CFTR by potentiators: Genistein" FEBS Letters 579 (2005) 3979-3983;

Abstracts

- Moran O. et al. "Molecular model of the nucleotide binding domains of the CFTR: cystic fibrosis correlated mutations" Paediatric Pulmonology, The 17th Annual North American CF Conference, Anaheim, California 16-19 October 2003;
- Moran O. et al. "Searching for the CFTR- Openers binding site" 2004 – ECFS Conference New Frontiers in Basic Science of Cystic Fibrosis 30 April – 3 May 2004 Tomar Portugal;
- Moran O. et al. "Identification of the CFTR – openers binding site" S.I.B.P.A. 2004 XVII Congresso Nazionale della Società di Biofisica Pura ed Applicata Pisa 23 – 25 settembre 2004;
- Zegarra O. et al. "Identification of New Drugs for the Modulation of Chloride Transport in CF. Advance in the HTS Programme" 2004 – ECFS Conference New Frontiers in Basic Science of Cystic Fibrosis 30 April – 3 May 2004 Tomar Portugal;

- Progetto FFC# 3/2003 **"Screening of drugs approved for human use to identify novel pharmacological tools for Cystic Fibrosis"**
  Luis JV Galietta (Lab. Gen. Molec. - Ist. Gaslini – Genova), Mauro Mazzei (Dipart. Scienze Farmaceutiche - Univ. Genova), Massimo Conese (Ist. per il Trattamento speriment. della FC - Osp. San Raffaele – Milano)

Publications

- Pedemonte N. et al. "Anti-hypertensive 1,4 dihydropyridines as correctors of the CFTR channel gating defect caused by cystic fibrosis mutations" Molecular Pharmacology, Vol. 68, No. 6 (2005) pp. 1736-1746
- Pedemonte N. et al. " Small-molecule correctors of defective ΔF508-CFTR cellular processing identified by high-throughput screening" The Journal of Clinical Investigation, Vol. 115, No. 9, Sept. 2005, pp. 2564-2571

Abstracts

- Pedemonte N. et al. "Screening of a chemical library containing approved drugs and natural compounds to identify small molecules for the functional correction of CFTR mutants" 2004 North American Cystic Fibrosis Conference Poster;

- Progetto FFC# 11/2003 **"Pathogenesis and treatment of Cystic Fibrosis-related liver disease"**
  Mario Strazzabosco (Dipart. Med. Spec. e dei trapianti - U.O. Gastroenterologia - Osp. Riuniti – BG)

Publications

- 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. Vol. 39, suppl. 2, April, 2005;
- Fiorotto R. et al. "Ursodeoxycholic Acid Stimulates Cholangiocyte Fluid Secretion in Mice via CFTR-Dependent ATP Secretion" Gastroenterology (2007); 133: 1603-1613

Abstracts

- Fiorotto R, et al. "Ursodeoxycholic acid stimulates fluid secretion in mice bile ducts trough a CFTR and PKCα/PKCε-dependent mechanism" Hepatology Vol. 40, No. 4, Suppl. 1, 2004

- 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"**
  Lisa Bambara (Medicina Interna B, Policlinico, Università di Verona)

Publications

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

- Progetto FFC# 2/2004 **"Chemoreceptor mechanism in CFTR expressing cells: molecular bases and role in control of secretion"**
  Francesco Osculati (Dipart. Scienze Morfologico Biomediche - Univ. Verona)

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"**
  Dr.ssa B. M. Rotoli (Plesso Biotec. Integrato - Sez. Pat. Gen. e Clinica - Univ. Parma)

Abstracts

- Rotoli B. M. et al. "Effects of taurine and other amino acids on the phenotype of ΔF508-CFTR cells" Experimental Biology 2006, April 1-5 – San Francisco, California;

- 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"**
  Anna Tamanini (Lab. Patologia Molecol. – Centro Fibrosi Cistica – Verona)

Publications

- Tamanini A. et al. "Interaction of Adenovirus type 5 fiber with the Coxsackie Adenovirus receptor activates inflammatory response in human respiratory cells" Journal of Virology, 2006 Nov. Vol 80, No 22 p. 11241-11254;

Abstracts

- Tamanini A. et al. "Adenovirus Vector Receptor Interactions and Early Pro-Inflammatory Signalling" 2005 – European Cystic Fibrosis Conference – New Frontiers in Basic Science of Cystic Fibrosis – 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"**
  Valeria Casavola (Dipart. Fisiologia Gen. ed Amb. - Univ. Bari)

Publications

- Guerra L. et al. "Na+/H+ Exchanger regulatory factor isoform 1 over expression modulates cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) expression and activity in human airway 16HBE14o – cells and rescues ΔF508 CFTR functional expression in Cystic Fibrosis cells" The Journal of Biological Chemistry vol. 280, No. 49, pp. 40925-40933, December 9, 2005.
- Favia M. et al. "NHE3 inhibits PKA-dependent functional expression of CFTR by NHERF2 PDZ interactions" Biochemical and Biophysical Research Communications 2006 Aug 25;347(2):452-9.
- Pantano S. et al. "Molecular basis of the allosteric mechanism of cAMP in the regulatory PKA subunit" FEBS Letters 579 (2005) 2679-2685;

Abstracts

- Fanelli T. et al. "β-estradiol rescues ΔF508-CFTR functional expression in CFBE41o-cells via NHERF1 up-regulation" Workshop Transporters 2006, Parma 6-9 September 2006.
- Guerra L et al. "Rescue of deltaF508 CFTR in CFBE41O-cells is dependent on actin cytoskeleton interaction with ezrin and NHERF1" European CF Conference, Belek, Turkey, 13-16 June 2007; J. of Cystic Fibrosis June 2007, vol. 6, suppl. 1: S7
- Riccardi S.M. et al. "Rescue of deltaF508 CFTR in CFBE41O-cells is dependent on actin cytoskeleton interaction with ezrin and NHERF1" 58th National Congress of the Italian Physiological Society, Lecce 19-21 Sept. 2007; Acta Physiologica, vol. 191, suppl. 657

- Progetto FFC#2/2005 **"Macrolides and ion transport across CFTR"**
  Emanuele Giordano (Ist. Naz. Ricerca Cardiovascolare (INRC) - Dipart. Biochimica)

Abstracts
- Furini S. et al. "Macrolides antibiotics and ion transport across plasma membrane" XIII Congresso Nazionale della Società Italiana di Ricerche Cardiovascolari, Imola 21-23 settembre 2006

- Progetto FFC#4/2005 **"Novel generation lentiviral vectors: evaluation of inflammatory potential in human respiratory cells"**
  Giulio Cabrini (Lab. Patologia Molecol. – Centro FC - OCM Verona)

Abstracts
- Copreni E. et al. " Novel generation lentiviral vectors: evaluation of inflammatory potential in human respiratory epithelial cells" North American CF Conference 2006. Denver co, USA
- 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
- Lampronti I. et al. "Medicinal plant extracts inhibit the induction of pro-inflammatory genes in bronchial epithelial cells" The 21st Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Anaheim Convention Center, Anaheim, California, October 3-6 2007
- Bezzerri V. et al. "Modulation of expression of genes involved in leukocyte chemotaxis by interfering with nuclear transcription factors" The 21st Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Anaheim Convention Center, Anaheim, California, October 3-6 2007

- Progetto FFC#5/2005 **"CFTR gene correction in human embryonic stem cells mediated by Small Fragment Homologous Replacement (SFHR)"**
  Federica Sangiuolo (Dipart. Biopatologia e Diagnostica per imm. - Univ. Tor Vergata RM), Massimo De Felici (Dipart. Salute pubblica e Biologia cellulare - Univ. Tor Vergata RM), Lorenzo Guerra (Dipart. Fisiologia Gen. ed Amb. - Univ. Bari), Marco Lucarelli (Dipart. Biotecn. Cell. ed ematologia - Univ. La Sapienza Roma)

Publications
- Sangiuolo F. et al. "CFTR gene targeting in mouse embryonic stem cells mediated by small fragment homologous replacement (SFHR)" FBS, 2008, 13:2989-99

Abstracts
- Filareto A. et al. "DNA methylation enhances repair efficiency of small fragment homologous replacement (SFHR) gene targeting" 13th Italian Cystic Fibrosis Conference, Milan, 30 Nov. – 2 Dec. 2007, J. Cyst Fibrosis 2008; 7, suppl. 3: S15

- Progetto FFC#1/2006 "**Novel methods of intracellular delivery of ΔF508-CFTR correctors**"
  Marco Colombatti (Dipart. Patologia - Sez. Immunologia – Università di Verona), Giulio Cabrini (Lab. Patologia Molecol. – Centro FC - OCM Verona), Franco Dosio (Dipart. Scienza e Tecnologia del Farmaco - Univ. Torino)

Publications
- Norez C. et al. "Chemical conjugation of ΔF508-CFTR corrector deoxyspergualin to transporter human serum albumin enhances its ability to rescue C1-channel functions" Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2008 Aug, vol. 295, pp. L336-L347.

Abstracts
- Norez C, et al. "Chemical conjugation of DF508 CFTR corrector deoxyspergualin to transporter human serum albumin enhances its ability to rescue Cl- channel functions". The 22th North American CF Conference. Orlando 23-25 October 2008. Pediatric Pullmonology, Suppl 31,2008; p 313

- Progetto FFC#2/2006 "**Homing of bone marrow-derived stem cells to the respiratory epithelium in a cystic fibrosis mouse model: Role of bioenergetic metabolism"**
  Massimo Conese (Ist. per il Trattamento speriment. della FC - Osp. San Raffaele – Milano), Nazareno Capitanio (Dipart. Scienze Biomediche - Univ. Foggia), Valeria Casavola (Dipart. Fisiologia Gen. ed Ambientale - Univ. Bari)

Abstracts
- Conese M. et al. "Homing to the lung, mitocondrial content and CFTR expression in hematopoietic stem cells" 13th Italian Cystic Fibrosis Conference, Milan, 30 Nov. – 2 Dec. 2007, J. Cyst Fibrosis 2008; 7, suppl. 3: S16

- Progetto FFC#3/2006 "**Identification, optimization, and validation of potentiators and correctors for the pharmacotherapy of cystic fibrosis"**
  Luis JV Galietta (Lab. Gen. Molec. - Ist. Gaslini – Genova), Mauro Mazzei (Dipart. Scienze Farmaceutiche - Univ. Genova), Oscar Moran, (Istituto di Biofisica CNR – Genova)

Publications
- Pedemonte N. et al. "Structure-Activity relationship of 1,4-Dihydropyridines as potentiators of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel" Molecular Pharmacology, Vol. 72, N. 1, pp. 197-207
- Caputo A. et al. "TMEM16A, A Membrane Protein Associated with Calcium-Dependent Chloride Channel Activity" Science Express, DOI: 10.1126/science.1163518, 4 Sept. 2008.

Abstracts
- Pedemonte N, et al. "Dual activity of aminoarylthiazoles on trafficking and gating defects caused by CF mutations". The 22th North American CF Conference. Orlando 23-25 October 2008. Pediatric Pullmonology, Suppl 31,2008; p 311.

- Progetto FFC#4/2006 "Functional and structural basis of the molecular mechanism of CFTR potentiators: towards therapeutic feasible molecules"
  Oscar Moran, (Istituto di Biofisica CNR – Genova), Olga Zegarra, Nazareno Dimasi (Lab. Gen. Molec. - Ist. Gaslini – Genova)

Publications
- 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 Vol. 282, No. 12 pp. 9098-9104, 2007
- Ferrera L. et al. "Characterization of a 7,8-Benzoflavone Double Effect on CFTR Cl^- Channel Activity" J. Membrane Biol. DOI 10.1007/s00232-007-9066-4
- Moran O. et al. "On the mesasurement of the functional properties of the CFTR" Journal of Cystic Fibrosis, 2008, - In press

- Progetto FFC#2/2007 "Cellular and molecular mechanisms of the actin cytoskeleton involvement in the NHERF1-dependent rescue of deltaF508 CFTR in human airway cells"
  Valeria Casavola (Dipart. Fisiologia Gen. ed Ambientale - Univ. Bari), Massimo Conese (Ist. per il Trattamento speriment. della FC - Osp. San Raffaele – Milano)

Publications

- Fanelli T. et al. "β-estradiol rescues ΔF508CFTR functional expression in human cystic fibrosis airway CFBE41o-cells through the up-regulation of NHERF1" Biol Cell. 2008 Jul;100(7):399-412

2. GENETICA
Genetics

- Progetto FFC# 4/2003 **"Identification of CF modifier genes by family studies and microarray analysis**
  Giuseppe Novelli (Dipart. Biopatologia e Diagnostica per imm. - Univ. Tor Vergata RM), Pierfranco Pignatti (Ist. Biol. Genetica – Dip. Materno Infantile - Univ. Verona), Francesco Salvatore (Dipart. Bioch. e Biotec. Mediche – Univ. Federico II – Napoli)

Publications

- Groman J. D. et al. "Variation in a Repeat Sequence Determines Whether a Common Variant of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene is Pathogenic of Benign" Am. J. Hum. Genet. 74:176-179, 2004
- Sangiuolo F. et al. "Toward the pharmacogenomics of Cystic Fibrosis – an update" Future Medicine – Pharmacogenomics, 2004 Oct., 5 (7), pp. 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"**
  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. 74:1322-1325, 2004
- Amaral M. D. et al. "Quantitative methods for the analysis of CFTR transcripts/splicing variants" Journal of Cystic Fibrosis 3 (2004) 17-23;
- 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 – Vol 279, No. 17, Issue of April 23, pp. 16980-16988, 2004

- Progetto FFC# 6/2003 **"Assessing the possible utilization of CFTR-M470V genotyping for CF risk determination"**
  Pierfranco Pignatti (Ist. Biol. Genetica – Dip. Materno Infantile - Univ. Verona), Carlo Castellani (Centro FC – Ospedale Civile Maggiore - Verona), Guido Modiano (Dipart. Biologia "E. Calef" Università di Roma -Tor Vergata)

Publications

- Pompei F. et al. "Haplotype block structure study of the CFTR gene. Most variants are associated with the M470 allele in several European populations" European Journal of Human Genetics 2006 Jan;14(1):85-93.
- Ciminelli B.M. et al. "Highly preferential association of NonF508del Cf mutations with the M470 allele" Journal of Cystic Fibrosis 6 (2007) 15 – 22.

Abstracts

- Pignatti P. F. et al "Assessing the possible utilization of CFTR-M470V genotyping for CF risk determination" Congresso ASHG 26 – 30 ottobre 2004;
- Pompei F. et al. "Determinazione del possibile utilizzo del polimorfismo CFTR-M470V per la determinazione del rischio di Fibrosi Cistica" Congresso SIGU 13 – 16 ottobre 2004;

- Progetto FFC# 5/2004 **"Screening of CFTR gene rearrangements in Italian CF patients"**
  Giuseppe Castaldo (CEINGE - Biotec. Avanzate s.c.a.r.l. - Univ. Federico II Napoli), Carlo Castellani (Centro FC – Ospedale Civile Maggiore – Verona), Cristina Bombieri (Ist. Biol. Genetica – Dip. Materno Infantile - Univ. Verona), Federica Sangiuolo (Dipart. Biopatologia e Diagnostica per Immagini - Univ. Tor Vergata Roma)

Publications

- Bombieri C. et al. "Frequency of large CFTR gene rearrangements in Italian CF patients" European Journal of Human Genetics (2005) 13, 687 – 689;
- Salvatore D. et al. "Cystic fibrosis presenting as metabolic alkalosis in a boy with the rare D579G mutation" Journal of Cystic Fibrosis 3 (2004) 135-136
- Tomaiuolo R. et al. "Epidemiology and a novel procedure for large scale analysis of CFTR rearrangements in classic and atypical CF patients: a multicentric Italian study" in press

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"**
  Alberto Piazza (Dipart. Genetica e Biochimica - Univ. Torino)

Publications
- Viviani L. et al. "Cystic Fibrosis mutations spectra in Italy: a regional distribution" Journal of Cystic Fibrosis 4 (2005) S3-S10

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.

- Progetto FFC# 8/2004 **"CF: characterization of the unknown mutations in Italian patients and assessment of their pathogenic role"**
  Maria Cristina Rosatelli, (Dipart. Scienze Biom. e Biotecn. Lab. Genetica Molecolare - Univ. Cagliari), Franca Dagna Bricarelli (Lab. Genetica Umana - Osp. Galliera Genova), Alberto Bonizzato (Centro FC – Ospedale Civile Maggiore – Verona), Manuela Seia (Lab. Genetica Molecolare ICP – Milano), Antonio Amoroso (Scuola di Genetica Medica - Univ. Trieste)

Publications
- Faa V. et al. "A new insertion / deletion of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene account for 3.4% of cystic fibrosis mutations in Sardinia: implications for population screening" J. Mol Diagn. 2006 Sep; 8(4):499-503

- Progetto FFC# 9/2004 **"Selection and functional characterization of CFTR intronic sequence variations potentially causing atypical forms of CF: modulation of CFTR alternative splicing?"**
  Roberto Strom (Dipart. Biotecnologie cellulari ed Ematologia - Univ. La Sapienza Roma), Serena Quattrucci (Centro FC Regione Lazio, Dipart. Pediatria - Univ. La Sapienza Roma), Fernando Mazzilli (Dipart. Fisiopatologia Medica - Univ. La Sapienza Roma)

Publications
- Lucarelli M. et al. " A 96- well formatted method for exon and exon/intron boundary full sequencing of the CFTR gene" Anal. Biochem. 2006 Jun 15; 353(2): 226-35
- Narzi L. et al. "Does cystic fibrosis neonatal screening detect atypical CF forms? Extended genetic characterization and 4-year clinical follow-up" Clin Genet. 2007: 39-46

- Progetto FFC#15/2005 **"Splicing Affecting Genomic Variants in *CFTR*: Diagnostic and Therapeutic Aspects"**
  Franco Pagani, (ICGEB Trieste)

Publications
- Youhna M. A. et al. " TDP43 depletion rescues aberrant CFTR exon 9 skipping" FEBS Letters 580 (2006) 1339-1344.
- Raponi M. et al. "Reduced splicing efficiency induced by synonymous substitutions may generate a substrate for natural selection of new splicing isoforms: the case of CFTR exon 12" Nucleic Acids Research, 2007, Vol. 35, No. 2, pp. 606-613

- Progetto FFC# 19/2007 **"Molecular analysis of genes encoding CFTR interactors of SLC26 family in CF patients"**
  Giuseppe Castaldo (CEINGE - Biotec. Avanzate s.c.a.r.l. - Univ. Federico II Napoli)

Abstracts
- Elce A. et al. "Direct sequencing of CSTs in Cystic Fibrosis patients bearing undefinite genotype" 13th Italian Cystic Fibrosis Conference, Milan, 30 Nov. – 2 Dec. 2007, J. Cyst Fibrosis 2008; 7, suppl. 3: pp. S12
- Tomaiuolo R. et al. "Molecular analysis of genes encoding CFTR interactors of SLC26 family in CF patients: preliminary results" 13th Italian Cystic Fibrosis Conference, Milan, 30 Nov. – 2 Dec. 2007, J. Cyst Fibrosis 2008; 7, suppl. 3: pp. S12-S13

3. MICROBIOLOGIA
Microbiology

- Progetto FFC# 4/2002 **"Taxonomy and virulence markers of B. cepacia strains associated with respiratory infections in patients with cystic fibrosis"**
  Roberta Fontana, (Lab. Microbiol e Virologia, Ospedale Civile Maggiore – Verona)

Publications
- Golini G. et al. "Molecular epidemiology and antibiotic susceptibility of Burkholderia cepacia-complex isolates from an Italian cystic fibrosis centre." Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2006 Mar;25(3):175-80.

Abstracts
- G. Golini et al. " Distribution of Burkholderia Cepacia complex isolates from patients with cystic fibrosis" 12th ECCMID, Milan, 24-27 April 2002. Clinical Microbiology and Infection 2002; 8 Supp. 1:114
- G. Golini et al. "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"**
  Alessandra Bragonzi (Istituto per il trattamento sperimentale della fibrosi cistica, Osp. S. Raffaele, Milano),
  Gerd Doering (Institute for Gen. and Environ. Hygien - Univ. Tuebingen – Germany)

Publications
- Bragonzi A. et al. "Sequence diversity of the mucABD locus in Pseudomonas aeruginosa isolates from patients with cystic fibrosis" Microbiology (2006), 152, 3261-3269
- Bragonzi A. et al. " Nonmucoid Pseudomonas aeruginosa expresses alginate in the lungs of patients with cystic fibrosis and in a mouse model" J. Infect Dis. 2005; 192(3): 410-419

Abstracts
- Montanari S. et al. "Evaluation of the biological cost of *Pseudomonas aeruginosa* hypermutation in a murine model of chronic pulmonary infection" Paediatric 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"**
  Renato Fani (Dipart. Biologia Animale e Genetica - Univ. Firenze), Giovanni Taccetti (Dipart. Pediatria – Centro Fibrosi Cistica - Ospedale Meyer - Firenze), Graziana Manno (Dipart. Pediatria - Osp. G. Gaslini - Genova), Silvia Tabacchioni (Dipart. Biotec. Prot. della Salute e degli Ecosistemi - Sez. Gen. e Genomica veg. - ENEA - CRE –
CASACCIA -UTS –- Roma)

Publications
- Tabacchioni S. et al. "Use of the gyrB gene to discriminate among species of the Burkholderia cepacia complex" FEMS Microbiol. Lett (2008) 1-8

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"**
  Vittorio Venturi (ICGEB – Trieste)

Publications
- Venturi V. et al. "Quorum sensing in B. cepacia complex". Research in Microbiology 155 (2004) 238-244
- Bertani I. et al. "Regulation of the N-Acyl Homoserine Lactone-Dependent Quorum-Sensing in Rhizosphere Pseudomonas putida WCS358 and Cross-Talk with the Stationary-Phase RpoS Sigma Factor and the Global Regulator GacA" Applied and Environmental Microbiology, Sept. 2004, p. 5496-5502

Abstracts
- Bertani I. et al. "Negative regulation of N-acyl homoserine lactone quorum sensing in Pseudomonas putida" Pseudomonas 2005, 10th International Congress, Marsiglia, 27-31 Aug. 2005

- Progetto FFC# 10/2004 **"Genome–wide identification of target genes for the design of non–conventional antibiotics against CF related pathogens"**
  Giovanni Bertoni (Dipart. Scienze Biomolecolari e Biotecnologie - Univ. Milano)

Abstracts
- Vidal Aroca F. et al. "Functional genomics of the opportunistic pathogen Pseudomonas Aeruginosa by interfering antisense RNA" 25° Congresso Nazionale della SIMGBM, Orvieto 8- 10 giugno 2006;
- Vidal Aroca F. et al. "Functional genomics of the opportunistic pathogen Pseudomonas Aeruginosa by interfering antisense RNA" Summer School – International Univ. Bremen, 28 luglio – 4 agosto 2006;
- Milani A. et al. "Functional genomics of the opportunistic pathogen Pseudomonas aeruginosa by 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"**
  Annamaria Bevivino (Dipart. Biotecnologie Agroindustr. e protezione della salute - ENEA - Casaccia – Roma), Fiorentina Ascenzioni (Dipart. Biologia cellulare e dello sviluppo - Univ. La Sapienza Roma), Alessandra Bragonzi (Ist. per il Trattamento speriment. della FC - Osp. San Raffaele – Milano)

Publications
- Chiarini L. et al. "Burkholderia Cepacia complex species: health hazards and biotechnological potential" Trends in Microbiology Vol. 14 No. 6 June 2006; 277-286
- Pirone L. et al. "Burkholderia cenocepacia strains isolated from cystic fibrosis patients are apparently more invasive and more virulent than rhizosphere strains" Environmental Microbiology (2008) in press

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"**
  Giovanna Riccardi (Dipart. Genetica e Microbiologia - Univ. Pavia), Graziana Manno (Dipart. Pediatria - Osp. G. Gaslini - Genova)

Publications
- Guglierame P. et al. " Efflux pump genes of the resistance-nodulation division family in Burkholderia cenocepacia genome" BMC Microbiol. 2006 Jul 20; 6:66

- Progetto FFC#6/2005, FFC#12/2006 e FFC#11/2007 **"Community-acquired MRSA and hospital- acquired MRSA in cystic fibrosis patients : a multicentre study regarding antibiotic susceptibility, epidemiology, natural history and clinical relevance"**
  Silvia Campana (Dipart. Pediatria – Centro Fibrosi Cistica - Ospedale Meyer - Firenze)

Publications
- Campana S, et al. "Emergence of an epidemic clone of community-associated methicillin-resistant Panton-Valentine leukocidin negative *Staphylococcus aureus* in Cystic Fibrosis patients populations" – Journal of Clinical Microbiology, Sept. 2007; vol. 45, No 9:3146-47

Abstracts
- Piluso A. et al. " A national overview of MRSA epidemiology: emergence of an epidemic clone" NACFC 2006.
- Cocchi P. et al. "Epidemiology of Community acquired MRSA and hospital acquired MRSA in cystic fibrosis patients: a national overview" North American CF Conference, Anaheim, California, Oct. 3-6, 2007
- Cocchi P. et al. "Emergence of an epidemic clone of community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus (CA-MRSA) Panton-Valentine leukocidin (PVL) negative in Cystic Fibrosis patients" 30th European CF Conference, Belek, turkey, 13-16 June 2007

- Cocchi P. et al. "Epidemiologia italiana di staphylococcus aureus meticillino-resistente: risultati di uno studio multicentrico" XII Congresso Italiano Fibrosi Cistica, Firenze, 23-25 Nov. 2006

- 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"**
  Bianca Colonna (Dipart. Biologia Cellulare e dello Sviluppo - Lab. Microbiologia Molecolare - Univ. La Sapienza – Roma), Maurizio Sanguinetti (Ist. Microbiologia - Univ. Sacro Cuore – Roma), Mauro Nicoletti (Dipart. Scienze Sanità Pubbl. - Sez. Microbiologia - Univ. La Sapienza – Roma), Mariassunta Casalino (Dipart. Microbiologia – Univ. Roma 3), Ersilia Fiscarelli (Dipart. Medicina Pediatrica - Osped. Pediatrico "Bambin Gesù" – Roma)

Publications

- Di Bonaventura G, et al. "Molecular characterization of virulence determinants of *Stenotrophomonas maltophilia* strains isolated from patients affected by cystic fibrosis". Internat J Immunopath Pharmacol 2007;Vol. 20:529-37
- Rossetto E., F. Rocco, M. S. Carlomagno, M. Casalino, B. Colonna, R. Zarrilli, P. P. Di Nocera (2008). PCR-based rapid genotyping of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates. *BMC Microbiol* in press

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."**
  Graziana Manno (Dipart. Pediatria - Osp. "G. Gaslini" - Genova), Roberto Biassoni (Lab. Medicina Molecolare – Ist. Gaslini – Genova), Eugenio Agenore Debbia (DISCAT - Sez. Microbiologia "C.A. Romanzi" – Genova), Angela Sangiuolo (ARPAL - Dipart. Prov. di Genova)

Abstracts

- Morelli P. et al. "Pseudomonas aeruginosa in CF patients: acquisition sources, means of transmission and hypermutable phenotype occurrence" 1st European CF Young Investigator Meeting, Lille – France; 29-31 Aug. 2007
- Manno G. et al. "Occurrence of P.aeruginosa (PA) with hypermutable phenotype (HMP) in Italian CF patients" 30th European CF Conference, Belek (Turkey), 6-9 June 2007
- Manno G. et al. "Genetic fingerprinting of Pseudomonas aeruginosa from Italian CF patients: comparison with isolates from environment and other clinical origins in Europe" 30th European CF Conference. Belek (Turkey), 6-9 June 2007

- Progetto FFC#9/2005 **"Studies of the Quorum Sensing Systems of Pseudomonas and Burkholderia"**
  Vittorio Venturi, (ICGEB Trieste)

Publications

- Rampioni G. et al. "The Quorum sensing negative regulator RsaL of Pseudomonas Aeruginosa binds to the *las*I Promoter" Journal of Bacteriology (2006), vol. 188, No. 2, pp. 815-819.
- Solis R. et al. "Involvement of quorum sensing and RpoS in rice seedling blight caused by Burkholderia plantarii" FEMS Microbiol Lett 259 (2006) 106-112
- Bertani I. et al. "The Pseudomonas putida Lon protease is involved in N-acyl homoserine lactone quorum sensing regulation" In press, BMC Microbiology, 2007
- Devescovi G. et al. "Involvement of a Quorum-Sensing-Regulated Lipase Secreted by a Clinical Isolate of Burkholderia glumae in Severe Disease Symptoms in Rice" Applied and Environmental Microbiology, (2007); 73 (15): 4950-8
- Licciardello G. et al. "Pseudomonas corrugata contains a conserved N-acyl homoserine lactone quorum sensing system; its role in tomato pathogenicity and tobacco hypersensitivity response" FEMS Microbiol. Ecol. (2007); 61 (2): 222-34
- Rampioni G. et al. "The Pseudomonas quorum sensing regulator RsaL belongs to the tetrahelical superclass of H-T-H proteins" Journal of Bacteriology, 2007, Vol. 189, No. 5, pp. 1922-1930
- Massa C. et al. "Isolation, heterologous and characterization of an endo-polygalacturonase produced by the phytopathogen Burkholderia cepacia". Protein Expression and Purification 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-

- Progetto FFC#6/2006 "**Genome-wide identification of target genes for the design of non-conventional antibiotics against cystic fibrosis-related pathogens**"
  Giovanni Bertoni (Dipart. Scienze Biomolecolari e Biotecnologie - Univ. Milano), Alessandra Bragonzi (Istituto per il trattamento sperimentale della fibrosi cistica, Osp. S. Raffaele, Milano)

Abstracts

- Milani A., et al. "Functional genomics of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* by interfering antisense RNA" 1st European CF Young Investigator Meeting, Lille, August 29-31 2007

- Progetto FFC# 7/2006 **"Influence of *Pseudomonas aeruginosa* and CF host on *Burkholderia cenocepacia* pathogenicity"**
  Annamaria Bevivino (Dipart. Biotecnologie Agroindustr. e protezione della salute - ENEA - Casaccia – Roma), Fiorentina Ascenzioni (Dipart. Biologia cellulare e dello sviluppo - Univ. La Sapienza Roma), Alessandra Bragonzi (Ist. per il Trattamento speriment. della FC - Osp. San Raffaele – Milano)

Publications

- Pirone L. et al. "Burkholderia cenocepacia strains isolated from cystic fibrosis patients are apparently more invasive and more virulent than rhizosphere strains" Environmental Microbiology (2008) in press

Abstracts

- Pirone L. et al. "Influence of *Pseudomonas aeruginosa* on the growth rate and internalization of *Burkholderia cenocepacia*" 9° Convegno Nazionale FISV, Riva del Garda (TN), 26- 29 Sett. 2007
- Bevivino A. et al. "Influence of *Pseudomonas aeruginosa* on the growth rate and internalization of *Burkholderia cenocepacia*" 13th Italian Cystic Fibrosis Conference, Milan, 30 Nov. – 2 Dec. 2007, J. Cyst Fibrosis 2008; 7, suppl. 3: S16

- Progetto FFC# 8/2006 **"A genome-wide approach to the identification of novel targets for immuno-antibacterials in *Pseudomonas aeruginosa*"**
  Alessandra Bragonzi (Istituto per il trattamento sperimentale della fibrosi cistica, Osp. S. Raffaele, Milano) Giovanni Bertoni (Dipart. Scienze Biomolecolari e Biotecnologie - Univ. Milano), Maria Scarselli (Centro Ricerche Chiron - Unità Bioinformatica – Siena)

Abstracts
- Bragonzi A. et al. " *Pseudomonas aeruginosa* pathogenecity within clonal strains from patients with cystic fibrosis" 13th Italian Cystic Fibrosis Conference, Milan, 30 Nov. – 2 Dec. 2007, J. Cyst Fibrosis 2008; 7, suppl. 3: S17
- Bragonzi A, et al. "Genetic adaptation of *P. aeruginosa* for the commitment to chronic lung infection". The 22th North American CF Conference. Orlando 23-25 October 2008. Pediatric Pullmonology, Suppl 31,2008; p 342

- 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"**
  Roberto Rizzo (Dipart. Biochimica, Biofisica e Chimica Macrocellulare - Univ. Trieste), Antonio Molinaro (Dipart. Chimica Organica e Biochimica - Univ. Napoli), Enrico Tonin (Dipart. Scienze Biomediche - Univ. Trieste)

Publications
- Herasimenka Y. et al. "Exopolysaccharides produced by Inquilinous limosus, a new pathogen of cystic fibrosis patients: novel structures with usual components" Carbohydrate. Res. (2007); 342: 2404:2415
- De Soyza A. et al. "Chemical and biological features of Burkholderia cepacia complex lipopolysaccharides" Innate Immunity (2008); 14(3); 127-144

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"** Anna Silvia Neri (Dipart. Pediatria - Centro FC - Ospedale Meyer – Firenze), Gianmaria Rossolini (Dipart. Biologia Molecolare – Policlinico "Le Scotte" - Siena)

Abstracts
- Campana S. et al. "Pseudomonas aeruginosa e metallo beta-lattamasi in pazienti affetti da fibrosi cistica: prevalenza e persistenza nel tempo" XII Congresso Italiano della Fibrosi Cistica, Firenze 23-25 Nov. 2006
- Campana S. et al. "Persistence of metalloβ-lactamase producing Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis patients" 30th European CF Conference, Belek, Turkey; 13-16 June 2007
- Pollini S. et al. "Pseudomonas aeruginosa e metallo-β-lattamasi in pazienti con fibrosi cistica: prevalenza e persistenza" XXXVI Congresso Nazionale – Associazione Microbiologi Clinici Italiani, Rimini; 2-5 Ottobre 2007.
- Mugnaioli C. et al. "Meccanismi di resistenza acquisita in *Pseudomonas Aeruginosa* da pazienti con fibrosi cistica cronicamente colonizzati" XXXVII AMCLI, 2008, Stresa (VB), 5-8 Ottobre; NACFC, 2008, Orlando (Florida, USA), 23-25 October
- Mugnaioli C. et al. "Evolution of acquired resistance mechanism in *Pseudomonas Aeruginosa* isolated from chronically-infected cystic fibrosis patients" XXXVII AMCLI, 2008, Stresa (VB), 5-8 Ottobre; NACFC, 2008, Orlando (Florida, USA), 23-25 October

- Progetto FFC#7/2007 **"*Stenotrophomonas maltophilia*, a multidrug resistant emergent pathogen associated to cystic fibrosis: a post-genomic approach to identify new immunological and therapeutical targets"**
  Bianca Colonna (Dipart. Biologia Cellulare e dello Sviluppo - Lab. Microbiologia Molecolare - Univ. La Sapienza – Roma), Maurizio Sanguinetti (Ist. Microbiologia - Univ. Sacro Cuore – Roma), Mauro Nicoletti (Dipart. Scienze Sanità Pubbl. - Sez. Microbiologia - Univ. La Sapienza – Roma), Mariassunta Casalino (Dipart. Microbiologia – Univ. Roma 3)

Abstracts
- Di Bonaventura G. et al. "Adhesion to and biofilm formation on IB3-1 bronchial cells by Stenotrophomonas maltophilia: implications in cystic fibrosis" 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Barcelona, 19-22 April 2008

- Progetto FFC #8/2007 "**Biochemical adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients.** Molinaro A (*Dip. Chimica Organica e Biochimica, Università "Federico II", Napoli);*, Bernardini ML (*Dip. Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Università "La Sapienza", Roma)*

Abstracts
- Leone M, et al. "Chemical and biological characaterization of lipopolysaccharide and peptoglycan of *P. aeruginosa* isolated from a patient at different stages of cystic fibrosis. The 22th North American CF Conference. Orlando 23-25 October 2008. Pediatric Pullmonology, Suppl 31,2008; p 265

- Progetto FFC#09/2007 **"Burkholderia cepacia complex: closing down on the major virulence factors"** Dott. Vittorio Venturi, (ICGEB - Trieste).

Publications
- Rampioni G. et al. "RsaL provides quorum sensing homeostasis and functions as a global regulator of gene expression in Pseudomonas aeruginosa" Molec. Microbil. (2007) 66 (6), 1557-1565
- Steindler L. et al. "The presence, type and role of N-acyl homoserine lactone quorum sensing in fluorescent *Pseudomonas* originally isolated from rice rhizospheres are unpredictable" FEMS Microbiol. Lett. 2008 Sep 8

- Progetto FFC#10/2007 **"Iron uptake and quorum sensing in Pseudomonas aeruginosa virulence"**
  Paolo Visca (Dip. Biologia – Lab. Microbiologia Clinica e Virologia – Univ. Roma 3), Livia Leoni (Dip. Biologia – Lab. Microbiologia Molecolare e Biotecnologie dei Microorganismi – Univ. Roma 3.

Publications
- Gaines J. M. et al. "Regulation of the Pseudomonas aeruginosa toxA, regA and ptxR genes by the iron-starvation sigma factor PvdS under reduced levels of oxygen" Microbiology (2007) Vol 153: 4219-33
- Tiburzi F. et al. "Intracellular levels and activity of PvdS, the major iron starvation sigma factor of Pseudomonas aeruginosa" Mol. Microbiol. (2008) Vol. 67: 213-227
- Rampioni G. et al. "RsaL provides quorum sensing homeostasis and functions as a global regulator of gene expression in Pseudomonas aeruginosa" Mol. Microbiol. (2007) Vol. 66: 1557-1565
- Imperi F. et al. " Membrane-association determinants of the ω-amino acid monooxygenase PvdA, a pyoverdine biosynthetic enzyme from *Pseudomonas aeruginosa"* Microbiology, 2008 Sept., 154(Pt 9):2804-13
- Tiburzi F. et al. "Is the host heme incorporated in microbial heme-proteins?" IUBMB Life. 2008 Aug 13

Abstracts
- Rampioni G. et al. "RsaL is a global regulator controlling quorum sensing homeostasis and virulence in *Pseudomonas aeruginosa"* ASM Conference Pseudomonas 2007, Seattle, Washington, 26-30 August 2007, pp. 15-16.
- Rampioni G. et al. "RsaL, a quorum sensing homeostatic effector controlling virulence and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa"* 9° Convegno Nazionale FISV, Riva del Garda (TN), 26- 29 Sett. 2007
- Rampioni G. et al. "RsaL is a global regulator controlling quorum sensing homeostasis and virulence in *Pseudomonas aeruginosa"* ASM Conference Cell-Cell Communication in Bacteria, Austin, Texas, 7-10 October 2007, p. 41.

- Progetto FFC #12/2006 e #11/2007 **Community-acquired MRSA and hospital-acquired MRSA in cystic fibrosis patients: a multicenter study**

regarding antibiotic susceptibility, epidemiology, natural history and clinical relevance Campana S (Centro Fibrosi Cistica – Osp. Meyer, FI)

Abstracts

- Taccetti G, et al. "Methicillin-resistant *St aureus* (MRSA) in cystic fibrosis patients: prevalence and clinical findings". The 22th North American CF Conference. Orlando 23-25 October 2008. Pediatric Pullmonology, Suppl 31,2008; p 343
- Cocchi P, et al. "MLST analysis of an epidemic clone of community-associated methicillin-resistant *St. aureus* (CA-MRSA) Panton-Valentine leukocidin (PVL) negative in CF patients". The 22th North American CF Conference. Orlando 23-25 October 2008. Pediatric Pullmonology, Suppl 31,2008; p 348

4. INFIAMMAZIONE

Inflammation

- Progetti FFC#3/2002, FFC#10/2005 e FFC#17/2006 **"Roles of azithromycin other than bactericidal: relevance for therapy of cystic fibrosis"**
  Paola Melotti (Lab. Patologia Molecolare - Centro FC – Ospedale Civile Maggiore – Verona).

Publications

- Cigana C. et al. "Azithromycin selectively reduces tumour necrosis factor alpha levels in Cystic Fibrosis airway epithelial cells" Antimicrobial agents and chemotherapy, Mar. 2007, vol. 51, No. 3, p. 975-981
- Cigana C. et al. "Anti-inflammatory effects of azithromycin in cystic fibrosis airway epithelial cells" Elsevier, Biochemical and Biophysical Research Communications 350 (2006) 977-982
- Nicolis E. et al. "The GCC repeat length in the 5'UTR of MRP1 gene is polymorphic: a functional characterization of its relevance for cystic fibrosis" BMC Med Genet. 2006 Feb 7;7:7.
- Cigana C. et al. "Effects of Azithromycin on the Expression of ATP Binding Cassette Transporters in Epithelial Cells from the Airways of Cystic Fibrosis Patients" J. of Chemotherapy (2007) 19; 643:649

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 – Americàs 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
- Melotti P. "Detection of bacterial secretion variations among Pseudomonas aeruginosa strains by multidimensional protein identification technology" Rediscovering Biomarkers, San Diego, July 23-24 2007
- Bergamini G. et al. " Azithromycin (AZM) decreases Glutathione-S-Transferase (GST)-T1 and M1 (GSTM1) expression and activity in CF airway epithelial cells" North American Cystic Fibrosis Conference, Anaheim, California, 3-6 Oct. 2007
- Cigana C. et al. "Relevance of oxygen limitation on Pseudomonas aeruginosa strains: effects on released proteins expression" North American Cystic Fibrosis Conference, Anaheim, California, 3-6 Oct. 2007
- Cigana C. et al. "Mudpit analysis of *Pseudomonas aeruginosa* secretome: consequences of oxygen limitation in clinical and laboratory strains" 13th Italian Cystic Fibrosis Conference, Milan, 30 Nov. – 2 Dec. 2007, J. Cyst Fibrosis 2008; 7, suppl. 3: S16
- Cigana C. et al. "Proteins released from Pseudomonas aeruginosa (PA) referent and clinical strains under microaerobiosis and their effects on cystic fibrosis airways" 31st European CF Conference, Prague, June 11-14 2008

- Progetto FFC# 7/2003 **"Proteomics of the airway surface liquid: implications for cystic fibrosis"**
  Olga Zegarra Moran (Lab. Gen. Molec. - Ist. Gaslini – Genova), Giovanni Candiano (Lab. Nefrologia - Ist. "G. Gaslini" – Genova), Luca Bini (Dipart. Biologia Molecolare - Univ. Siena)

Publications

- Candiano G. et al. "Gelsolin secretion in interleukin 4 treated bronchial epithelia and in asthmatic airways" Am J Respir Crit Care Med. 2005; Vol 172 pp 1-7,
- Candiano G. et al. "Proteomic Analysis of the Airway Surface Liquid: Modulation by Proinflammatory Cytokines" 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)"**
  Maria Cristina Dechecchi (Lab. Patologia Molecolare - Centro FC – Ospedale Civile Maggiore – Verona)

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"**
  Roberto Gambari (Dipart. di Biochimica e Biologia Molecolare - Università di Ferrara)

<u>Publications</u>
- Bezzerri V. et al. "Transcription Factor Oligodeoxynucleotides to NF-kB Inhinit Transcription of IL-8 in Bronchial Cells" American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology (2008) – In press
- Borgatti M. et al. "Induction of IL-6 gene expression in a CF bronchial epithelial cell line by *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on transcription factors belonging to the Sp1 superfamily" BBRC 357 (2007) pp. 977-983.
- Piccagli L. et al. " Doking of molecules identified in bioactive medicinal plants extract into the p50 NF-kappaB transcription factor: correlation with inhibition of NF-kappaB/DNA interactions and inhibitory effects on IL-8 gene expression" BMC Structural Biology 2008 – in press.

<u>Abstracts</u>
- 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

- 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**"
  Valeria Raia (Dipart. Pediatria - Univ. Federico II Napoli), Giuseppe Castaldo (CEINGE - Biotec. Avanzate s.c.a.r.l. - Univ. Federico II Napoli)

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

- Progetto FFC# 11/2005 "**Chronic oxidative lung injury during cystic fibrosis – protective roles of gamma-glutamyltransferase and ascorbic acid**"
Alfonso Pompella (Dipart. Patologia Sperimentale, Biotec. Mediche, Infettivologia ed Epidemiologia - Univ. Pisa)

<u>Publications</u>
- Corti A. et al. "Vitamin C supply to bronchial epithelial cells linked to glutathione availability in elf – A role for secreted γ-glutamyltransferase?" Journal of Cystic Fibrosis, 7 (2008) pp. 174-178.

- 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"**
  Andrea Battistoni (Dipart. Biologia - Univ. Tor Vergata – Roma)

<u>Publications</u>
- 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" Int J Immunopathol Pharmacol., 2008 Jan-Mar;21(1):51-9

- Progetto FFC# 16/2006 **"Effect of correctors of defective CFTR on the *Pseudomonas aeruginosa*-dependent inflammatory response in respiratory epithelial cells"**
  Maria Cristina Dechecchi (Lab. Patologia Molecolare - Centro FC – Ospedale Civile Maggiore – Verona), Frederic Becq (Inst. De Physiologieet Biologie Cellulaires - Poitiers (France)), Roberto Gambari (Dipart. di Biochimica e Biologia Molecolare - Università di Ferrara)

<u>Publications</u>
- 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. May 2007, Vol. 36 PP. 615-624,
- Dechecchi M. C. et al. "Anti-inflammatory effect of miglustat in bronchial epitalial cells" Journal of Cystic Fibrosis (2008) – in press.

<u>Abstracts</u>
- 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 2007, Tavira, Algarve (Portugal), April 25-29
- Dechecchi M. C. et al. "Miglustat, an inhibitor of the synthesis of glycosphingolipids, has an anti-inflammatory effetc *in vitro* and *in vivo*" NACFC, 2008, Orlando, Florida, October 23-25.
- 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, 2006, Firenze, November 23-25.
- Dechecchi M. C. et al. "Anti-inflammatory effect of miglustat in bronchial cells" 13th Italian Cystic Fibrosis Conference, Milan, 30 Nov. – 2 Dec. 2007, J. Cyst Fibrosis 2008; 7, suppl. 3: p. S18
- Nicolis E. et al. "Inhibition of pro-inflammatory genes in CF bronchial epithelial cells by medicinal plant extracts" 13th Italian Cystic Fibrosis Conference, Milan, 30 Nov. – 2 Dec. 2007, J. Cyst Fibrosis 2008; 7, suppl. 3: p. S18

- Progetto FFC# 13/2007 **"A gene-targeted anti-inflammatory approach based on the Transcription Factor "decoy" strategy"**
  Giulio Cabrini (Lab. Patologia Molecolare - Centro FC – Ospedale Civile Maggiore – Verona), Roberto Gambari
  (Dipart. di Biochimica e Biologia Molecolare - Università di Ferrara)

<u>Publications</u>
- Bezzerri V. et al. "Transcription Factor Oligodeoxynucleotides to NF-kB Inhinit Transcription of IL-8 in Bronchial Cells" American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology (2008) – In press
- Nicolis E. et al. "Pyrogallol, an active compound from the medicinal plant Emblica officinalis, regulates expression of pro-inflammatory genes in bronchial epithelial cells" Elsevier Editorial System for International Immunopharmacology, INTIMP-D-08-00200R1 – In press
- Piccagli L. et al. " Doking of molecules identified in bioactive medicinal plants extract into the p50 NF-kappaB transcription factor: correlation with inhibition of NF-kappaB/DNA interactions and inhibitory effects on IL-8 gene expression" BMC Structural Biology 2008 – in press.

<u>Abstracts</u>
- Bezzerri V. et al. "Transcription factor (TF) decoy strategy to silence expression of pro-inflammatory genes in cystic fibrosis (CF) bronchial epithelial cell line" 2nd European CF Young Investigator Meeting, 2008, Lille, France
- Cabrini G. et al. " "Decoy" molecules for nuclear transcription factors and regulation of expression of proinflammatory genes" 13th Italian Cystic Fibrosis Conference, Milan, 30 Nov. – 2 Dec. 2007, J. Cyst Fibrosis 2008; 7, suppl. 3: pp. S18.

- Nicolis E, et al. “Isolation of active anti-inflammatory compounds from medicinal plant extracts”. The 22th North American CF Conference. Orlando 23-25 October 2008. Pediatric Pullmonology, Suppl 31,2008; p 259
- Tamanini A, et al. “ Effect of furocumarin derivatives on P. aeruginosa-dpendent pro-inflammatory response in bronchial epithelial cells. The 22th North American CF Conference. Orlando 23-25 October 2008. Pediatric Pullmonology, Suppl 31,2008; p 260
- Nicolis E, et al. “Does anti-inflammatory treatment have any effect on PAO1 dependent induction of the antimicrobial genes?”. The 22th North American CF Conference. Orlando 23-25 October 2008. Pediatric Pullmonology, Suppl 31,2008; p 261.

5. RICERCA CLINICA ED EPIDEMIOLOGICA
Epidemiology & Clinical Research

- Progetto FFC “**Infection Control”.** (Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica, Verona)
  Roberto Buzzetti Fondazione per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica e gruppo “Infection control”

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” Edit. Fondazione per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica. Verona, 2005
- Festini F. et al. “Isolation measures for prevention of infection with respiratory pathogens in cystic fibrosis: a systematic review” Journal of Hospital Infection (2006) 64, 1-6

- Progetto FFC **“The CAIRO Project”: Analysis and review of the international scientific literature from the CF registries**. Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica, Verona.
  Roberto Buzzetti Fondazione per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica), Donatello Salvatore (U. O. Pediatria, Azienda Ospedaliera San Carlo – Potenza) e Gruppo “Cairo”

Publications
- Buzzetti R, et al (Gruppo “CAIRO”). “Una rassegna della letteratura originata dai registri di pazienti con fibrosi cistica”. Edit. Fondazione Ricerca FC. Verona, 2007

Abstracts
- Buzzetti R. et al. “Analysis and review of the international scientific literature from the CF registries” NACF, Anaheim, California, October 3-6, 2007
- Salvatore D. et al. “The CAIRO Project (Comparative analysis of international CF registries overviewed): analysis and review of the scientific literature from CF registries”,13th Italian Cystic Fibrosis Conference, Milan, 30 Nov. – 2 Dec. 2007, J. Cyst Fibrosis 2008; 7, suppl. 3: pp. S8-S9

- Progetto FFC “**Screening neonatale della fibrosi cistica: analisi della letteratura”** (Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica, Verona)

Publications
- Buzzetti R, et al (Gruppo FFC screening). “Screening neonatale della fibrosi cistica. Una rassegna della letteratura” Edit. Italian CF Research Foundation, Verona, 2008

- Progetto FFC# 18/2004 “Early eradication of ***P. eruginosa*** and subsequent colonization in cystic fibrosis patients”
  Giovanni Taccetti (Dipart. Pediatria – Centro Fibrosi Cistica - Ospedale Meyer – Firenze)

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” Anna Bossi (Ist. Statistica e Biometria - Univ. Milano)

Abstracts
- Bossi A. et al. “Cystic Fibrosis in adulthood: data from the Italian registry” 28th European CF Conference, Crete, Greece 22-25 June 2005;
- Piccinini P. et al. “Previsione a 5 anni del numero di pazienti adulti affetti da fibrosi cistica” III Congresso Nazionale SISMEC, Abano Terme: 28 settembre – 1 ottobre 2005;

- Progetto FFC#16/2005 **“Diabetes, glucose intolerance and hypoglycemia in Cystic Fibrosis”**
  Carla Colombo (Dipart. Pediatria - Centro FC - Fond. IRCCS Osp. Maggiore Polic. Mangiagalli e Regina Elena – Milano), Alberto Battezzati (Fond. Centro San Raffaele del Monte Tabor – Milano)

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

Abstracts
- Battezzati A. et al. “Cystic fibrosis related diabetes in anticipated by reduced insulin secretion during OGTT” 13th Italian Cystic Fibrosis Conference, Milan, 30 Nov. – 2 Dec. 2007, J. Cyst Fibrosis 2008; 7, suppl. 3: pp. S22-S23.
- Battezzati A et al. Insulin secretory defects identified from OGTT modelling are related to subsequent diabetes and worse pulmonary function in CF patients. The 22th North American CF Conference. Orlando 23-25 October 2008. Pediatric Pulmonology, Suppl 31,2008; p 444

- Progetto FFC#19/2006 **“Prolonging the duration on site of short peripheral venous catheters used to administer intravenous antibiotic courses in adult subjects with cystic fibrosis. A randomized controlled trial to evaluate the effect of different concentrations of antibiotic in normal saline solution”**
  Filippo Festini (Dipart. Pediatria - Centro FC Ospedale Meyer- Firenze)

Abstracts
- Festini F. et al. “Prolonging the duration of peripheral venous catheters in cystic fibrosis patients. Randomized controlled study on the effect of different concentrations of antibiotics in normal saline solution” 13th Italian Cystic Fibrosis Conference, Milan, 30 Nov. – 2 Dec. 2007, J. Cyst Fibrosis 2008; 7, suppl. 3: p. S8.

- Progetto FFC#20/2006 “**Prevention of pulmonary exacerbations in children with Cystic Fibrosis, through the modification of intestinal microflora”**
  Alfredo Guarino (Dipart. Pediatria - Univ. Federico II Napoli), Carla Colombo (Dipart. Pediatria - Centro FC - Fond. IRCCS Osp. Maggiore Polic. Mangiagalli e Regina Elena – Milano), L. Morelli (Tecnologie analitiche ed avanzate - Univ. Piacenza)

Publications
- Bruzzese E. et al. “ Effect of Lactobacillus GG supplementation on pulmonary exacerbations in patients with cystic fibrosis: a pilot study” Clin Nutr. 2007 Jun;26(3):322-8

Abstracts
- Guarino A and Giannattasio A. Probiotics in cystic fibrosis: help from old friends. The 22th North American CF Conference. Orlando 23-25 October 2008. Pediatric Pullmonology, Suppl 31,2008; pp 130-131

ISTITUTI E LABORATORI COINVOLTI NEI 114 PROGETTI DI RICERCA FINANZIATI DALLA FONDAZIONE RICERCA FC DAL 2002 AL 2008

Institutes and Laboratories involved in the 114 projects funded by Italian CF Research Foundation: 2002 - 2008

ABRUZZO
- Dip. Scienze Biomediche - Università "G. D'Annunzio", Chieti
- Dip. Medicina Sperimentale - Università dell'Aquila, L'Aquila
- Dip. Biologia Cellulare ed Oncologia – Consorzio Mario Negri Sud, S. Maria Imbaro (Chieti)

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

CAMPANIA
- CEINGE, Biotecnologie Avanzate s.c.a.r.l. - Università Federico II, Napoli
- Dip. di Pediatria - Università Federico II, Napoli
- Lab. Microbiologia Funzionale - Università Federico II, Napoli
- Dip. Chimica Organica e Biochimica - Università Federico II, Napoli
- Dip. Chimica Tossicologica e Farmaceutica - Univ. Federico II, Napoli
- Dip. Farcologia Sperimentale - Univ. Federico II, Napoli
- Dip. Chimica e Biochimica Organica - Univ. Federico II, Napoli
- Dip. Pediatria - Centro Fibrosi Cistica - Univ. Federico II, Napoli

EMILIA ROMAGNA
- Plesso Bio-tecnologico Integrato - Università di Parma
- Dip. Pediatria - Università di Parma
- Dip. Biochimica e Biologia Molecolare - Università di Ferrara
- Dip. Biochimica - Istituto Nazionale Ricerca Cardiovascolare Università di Bologna e Cesena
- Dip. Tecnologie Analitiche Avanzate - Univ. Piacenza

FRIULI VENEZIA GIULIA
- International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB), Padriciano,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 - Univ.Trieste
- Dip. Scienze Biomediche - Univ. 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 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 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 – Univ La Sapienza, Roma
- Dip. Neuroscienze Sperimentali - Fondazione S. Lucia, Roma
- Dip. Scienze di Salute Pubblica – Univ. "La Sapienza", Roma
- Dip. di Medicina Interna e Vascolare – Univ. "La Sapienza", Roma

LIGURIA
- Istituto Biofisica – CNR, Genova
- Dip. Scienze Farmaceutiche - Università di 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. Genetica Molecolare – Ist. 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 Epidemiologia e Biostatistica - Istituto G. Gaslini, Genova
- Dip. Scienze Sperimentali - Istituto G. Gaslini, Genova

LOMBARDIA
- Istituto Statistica e Biometria - Università di 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 di Milano
- Dip. Genetica e Microbiologia - Università di Pavia
- Dip. Pediatria - Centro Fibrosi Cistica - Fondazione IRCCS Policlinico Mangiagalli e Regina Elena, Milano
- Lab. Microbiologia - Centro Fibrosi Cistica, Milano
- Unità Genomica per Diagnosi di Patologie Umane Fondazione Centro San Raffaele, Milano
- Istituto Tecnologie Biomediche - CNR, Segrate (MI)
- Lab. Ricerca Clinica -Istituto Ricerca Farmacologica "M. Negri", Milano
- Dip. Chimica Organica ed Industriale, Università di Milano
- Dip. Scienze Molecolari Agroalimentari, Università di Milano
- Dip. Biotecnologie e Bioscienze – Università di Milano Bicocca, Milano
- Fondazione Humanitas per la Ricerca, Rozzano (Milano)

MARCHE
- Centro Fibrosi Cistica - Ospedale dei Bambini G. Salesi, 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
- Dip. Patologia Clinica - S.S. Diagnostica Molecolare e Test Genetici Integrati, Torino
- Dip. Discipline Medico Chirurgiche, Sez. Anestesia e Rianimazione, Università di Torino

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

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

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

TOSCANA
- Dip. Biologia Animale e Genetica - Università di Firenze
- Lab. Proteomica Funzionale - Dip. Biologia Molecolare - Università di Pisa
- Dip. Pediatria - Centro Fibrosi Cistica - Ospedale Meyer, Firenze
- Servizio Supporto Fibrosi Cistica - Ospedale di Livorno
- Dip. Patologia Sperimentale, Biotecnologie Mediche, Infettivologia ed Epidemiologia - Università di Pisa
- Unità Bioinformatica, Centro Ricerche Chiron, Siena
- Dip. Biologia Molecolare – Università di Siena

UMBRIA
- Dip. Medicina Interna - Sez. Biochimica Applicata e Scienze Naturali, Università di Perugia

VENETO
- Dip. Medicina Interna – Policlinico GB Rossi - Università di Verona
- Istituto Veneto Medicina Molecolare, Padova
- Servizio Clinico Genetica e Screening Neonatale - Centro Fibrosi Cistica, VR
- Dip. Patologia - Sezione Immunologia - Università di Verona
- Sezione Anatomia ed Istologia, Dip. Scienze Morfologico-Biomediche - Università di Verona
- Lab. Patologia Molecolare – Azienda Ospedaliera, Verona
- Dip. Materno Infantile, Biologia Genetica - Università di Verona
- Dip. Scienze Biomediche e Chirurgiche, Divisione Nefrologia - Università di VR
- Dip. Patologia – Patologia Generale - Università di Verona
- Lab. Microbiologia - Azienda Ospedaliera di Verona
- Facoltà Scienze della Formazione - Università di Verona
- Dip. Scienza e Tecnologia del Farmaco – Università di Verona
- Dip. Scienze Farmaceutiche – Università di Padova
- Dip. Chimica Biologica – Università di Padova

BELGIUM
Department Clinical Chemistry - St. Luc University Hospital – Université Catholique de Louvaine, Bruxelles

CANADA
Department Microbiology and Immunology - University of Western Ontario

FRANCE
Institute Physiologie Biologie Cellulaire, Université de Poitiers

GERMANY
Institute of Medical Microbiology and Hygiene – University of Tübingen

IRELAND
Department Respiratory Medicine – Royal University of Belfast

REFEREES INTERNAZIONALI CHE HANNO COLLABORATO CON FFC PER LA VALUTAZIONE DEI PROGETTI DI RICERCA

International Reviewers who collaborated with the Italian CF Research Foundation for the evaluation of the research projects

Attraverso bandi annuali di concorso pubblico, sono pervenuti alla Fondazione, dal 2002 al 2008, 256 progetti di ricerca CF, tra i quali 114 sono stati selezionati per un finanziamento.
165 scienziati di varie nazioni hanno collaborato con il Comitato Scientifico della Fondazione nel valutare i progetti pervenuti: ciascun progetto ha avuto l'intervento critico di almeno due esperti ed alcuni esperti hanno valutato più progetti.
Agli scienziati che hanno svolto questo prezioso servizio la Fondazione porge un particolare sentito ringraziamento.

Here the list of the 165 international experts that cooperated with FFC to review and to evaluate the grant proposals. Through annual public announcements issued between 2002 and 2008, the Italian CF Research Foundation received 256 grant proposals. Among those 114 have been selected for funding.
One hundred and sixty five scientists, coming from several countries, cooperated with the Scientific Committee of the FFC Foundation to review the projects submitted: each project was evaluated by at least two experts and some experts evaluated more than one project.
To those scientists, who carried out such a precious job, the Foundation expresses its warmest thank.

ASIA

Hong Kong
Dennis Lo Yuk Ming

India
Amit Misra

Israel
Batsheva Kerem

AUSTRALIA
Scott Bell
Tim Kidd
Manohar Garg
John Mattick
Cynthia Withchurch

CANADA
André Cantin
Tom Clandinin
Peter Durie
Yeger Herman
Sheila Innis
Roger Levesque
Paul Linsdell
Liu Mingyao
Paul Pencharz
Aaron Shawn
Pamela Sokol
David Speert
Julian Zielensky
Herman Yeger

EUROPE

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

Denmark
Niels Hojby
Christian Koch
Marie Johannesson

France
Frederic Becq
Isabelle Durieu
Alexander Edelman
Brigitte Fauroux
Claude Ferec
Alain Filloux
Emanuelle Girodon
Vincent Goffin
Jean Paul Latgé
Christine Linard
Marie Catherine Romey
Juliet Royet

Germany
Robert Bals
Gerd Doering
Stephan Fischer
Christoph Freiberg
Hartmut Grasemann
Matthias Griese
Erick Gulbins
Dieter Jahn
Karl Kunzelmann
Felix Ratjen
Stefan Stamm
Gratiana Steinkamp
Burkhard Tuemmler

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

Portugal
Margarida Amaral
Jorge Leitão

Spain
Raquel Barrio
Jaume Bertranpetit
Xavier Estivill

Sweden
Ute Romling
Birgitta Strandvik

Switzerland
Leo Eberl
Hans Peter Fisher

The Netherlands
Touw Daan
Peter Klijn
Lidewji Henneman
Bernt Van Der Blink

U.K.
James Birchall
Marina Botto
Andrew Bush
Philip Calder
Steven Conway
Jane Davies
Robert Dormer
Alistair Duff
Glenda Esmond
Claire Glasscoe
John Govan
Michael Gray
Andrew Greening
Uta Griesenbach
Maurice Hallett
Anna Harris
Andrew Jones
Gary Mansfield
Robert Newton
Tyrone Pitt
Martin Savage
David Sheppard
Maurice Super
John Widdicombe

SUD AMERICA

Costa Rica
Arturo Solis

U.S.A.

Alabama
Raymond Frizzell
Lisa Schwiebert

California
Carroll Cross
Ron Kopito
Terry Machen
Richard Moss
Andrew Sandford
Molly Schmid
Alan Verkman
Jeffrey Wine

Colorado
Frank Accurso
Brian Doctor
Jerry A. Nick
Malla Reddy
Herbert Schweizer

Connecticut
Dominik Hartl
Diane Krause

Florida
Alexander Cole
Alexandra Quittner

Illinois
Lee Shulman
Jerrold Turner
Indiana
Roman Dziarski
Won Kyoo Cho

Iowa
Dwight C. Look
Joseph Zabner
Kansas
John Gatti

Kentucky
Jay Zwischenberger

Louisiana
Guoshun Wang

Maine
Robert Owens

Maryland
Gary Cutting
William Guggino
Jonathan Orens
Harvey Pollard
Pamela Zeitlin

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

Minnesota
Antoinette Moran

Missouri
Carolyn Cannon

New York
Alice Prince
Lisa Saiman
Stefan Worgall

North Carolina
Andrew Ghio
Michael Knowles
John Riordan

Ohio
Melvin Berger
James Chmiel
Mitchell Drumm
Daniel Hassett
Scott Herness
Lloyd Horrocks
Valerie Hudson
Christopher Karp
Michael Konstan

Pennsylvania
Douglas Wilson

Tennessee
John Christman

Texas
Philip Thomas

Virginia
Joanna Goldberg
David Goldfarb

Washington
Moira Aitken
Jane Burns
Matt Parsek
Margaret Rosenfeld

Wisconsin
Philip Farrel

PROGETTI FFC 2006 - 2008 ADOTTATI
FFC Projects 2006 - 2008 adopted by donors

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 totalmente 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 totalmente 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. e **Montblanc Italia**

FFC #6/2006
Identificazione genomica di target batterici per disegnare nuovi antibiotici contro i batteri patogeni correlati alla fibrosi cistica.
Responsabile: Giovanni Bretoni (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 (€ 18.000) e Sig. **Martinelli Giovanni** Pietro Almè - Bergamo (€ 8.000), **Braccialini** (€ 10.200)

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 totalmente 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 totalmente 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 Verona"** (€ 12.000)

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 totalmente da: **GVS Spa** Zola Predosa - Bo (€ 10.000), **Delegazione FFC di Avellino** (€ 20.000)

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 #1/2007
Purine a base guaninica e Fibrosi Cistica: meccanismi molecolari per un nuovo, potenaziale approccio farmacologico
Responsabile: Patrizia Ballerini (Università di Chieti, Dip. to Scienze Biomediche)
Costo: € 18.000
Adottato totalmente da: **Delegazione FFC del Lago di Garda**

FFC #2/2007
Meccanismi cellulari e molecolari del coinvolgimento del citoscheletro actina nel ripristino di DF508 CFTR da parte di NHERF1 in cellule delle vie aeree umane
Responsabile: Valeria Casavola (Università di Bari Dip.to Fisiologia Gen. ed Ambientale)
Costo: € 77.000
Adottato totalmente da: **Christopher Ricardo Cystic Fibrosis Foundation** (Pa, USA) (€ 20.000), **Loifur srl** – Mason Vicentino (€10.000), **Associazione Sergio Valente** – Cento Alberi d'Autore (€ 47.000)

FFC #3/2007
Disegno Computazionale,
Studio Biochimico, Sintesi e Screening di Chaperoni Farmacologici quali Correttori della ΔF508-CFTR
Responsabile: Mauro Mazzei (Università di Genova, Dip. Scienze Farmaceutiche)
Costo: € 45.000
Adottato totalmente da: **Associazione Siciliana FC**

FFC #4/2007
Ruolo della proteinchinasi CK2 nella patogenesi della fi brosi cistica
Responsabile: Lorenzo Pinna (Università Padova Dip. Chimica Biologica)

Costo: € 35.000
Adottato totalmente da:
Banco Popolare di Verona e Novara (€ 20.000), **Fondazione Giorgio Zanotto** (€ 15.000)

FFC #5/2007
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
Responsabile: Fabiana Quaglia (Università di Napoli Federico II – Dip.to Chimica Tossicologica e Farmaceutica)
Costo: € 45.000
Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Torino**

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 totalmente da: **Vicenzi Biscotti** Spa S. Giovanni Lupatoto (€ 8.000), **Ferretti Yatchts** (€15.000), **Man Nutzfahrzeuge Vertrieb Sud** Ag (€7.000), **Associazione Volontari Contro la FC Messina** (€ 8.000), **Delegazione FFC di Rovigo** (€ 6.000)

FFC #8/2007
Adattamento biochimico di Pseudomonas aeruginosa alle vie aeree di pazienti con fibrosi cistica
Responsabile: Antonio Molinaro (dip. Biochimica e Chimica Organica – Univ. Federico II, Napoli)
Costo: € 43.000
Adottato totalmente da: **Furla Spa** Bologna (€ 10.000), **GVS Spa** Zola Predosa - Bologna (€ 10.000), **Delegazione FFC di Bologna** (€ 23.000)

FFC #9/2007
Burkholderia cepacia complex: sopprimere i suoi maggiori fattori di virulenza
Responsabile: Vittorio Venturi (I.C.G.E.B. – Trieste)
Costo: € 34.000
Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Belluno**

FFC #10/2007
Importanza del quorum sensing e dell' acquisizione di ferro nella virulenza di Pseudomonas aeruginosa
Responsabile: Paolo Visca (Università di Roma 3 – Dip. Biologia)
Costo: € 34.000
Adottato totalmente da: Gruppo **Aziende Ferraresi e Bolognesi***, **Delegazione FFC di Ferrara** e **Gruppo di Sostegno FFC Comacchio**

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 totalmente da: **Delegazione FFC di Rovigo** (€ 10.000), **BNP Paribas Corporate e Investment Banking** (€ 24.000)

FFC#13/2007
Nuovi approcci sperimentali di terapia anti-infiammatoria per la patologia polmonare basati sulla strategia "decoy" del Fattore di Trascrizione
Responsabile: Giulio Cabrini (Ospedale di Verona – Lab. Patologia Molecolare)
Costo: € 60.000
Adottato totalmente da:
Lega Italiana FC - Associazione Veneta

FFC#14/2007
Influenza delle mutazioni del gene CFTR nell' attività battericida dei macrofagi umani
Responsabile: Paola Del Porto (Dip. Biologia Cellulare e dello Sviluppo – Univ. La Sapienza - Roma)
Costo: € 58.000
Adottato totalmente da: Presidente FFC **Vittoriano Faganelli** e **Compagnia Italiana Lubrificanti** a ricordo dell'amico Fabio Gagnatelli

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. Pediatria, FI)
Costo: € 10.000
Adottato totalmente da: Gruppo di Sostegno FFC "**Associazione Trentina FC**" in ricordo di Rosy Serafini

FFC #17/2007
Trattamento antibiotico precoce per l'eradicazione di Pseudomonsa aeruginosa in pazienti affetti da fibrosi cistica: uno studio randomizzato policentrico su due differenti tipi di trattamento.
Responsabile: Giovanni Taccetti (Università di Firenze; Ospedale Meyer; Dip.to Pediatria, Centro Fibrosi Cistica)
Costo: € 53.000
Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Vicenza**

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

FFC #19/2007
Analisi molecolare di geni che codificano per interattori di CFTR nell'ambito della famiglia SLC26 in pazienti CF..
Responsabile: Giuseppe Castaldo (Università di Napoli – CEINGE, Biotecnologie Avanzate s.c.a.r.l.)
Costo: € 35.000
Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Latina**

FFC #1/2008
Organizzazione e regolazione del traffico intracellulare della forma normale e mutata della proteina CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) coinvolta nella patogenesi della fibrosi cistica.
Responsabile: Alberto Luini (Dip. Biologia Cellulare ed Oncologica - Consorzio Mario Negri Sud - S. Maria Imbaro - CH)
Costo: € 100.000
Adottato totalmente dai **Donatori SMS solidale 2007** con il supporto di **Vodafone, Tim, Telecom Italia, Wind, Italia "3"**

FFC #2/2008
Basi funzionali e strutturali del meccanismo molecolare dei potenziatori della CFTR
Responsabile: Oscar Moran (CNR - Istituto di Biofisica - Genova) Costo: €95.000
Adottato totalmente da: **Mille Bambini di Via Margutta** – Onlus (€ 20.000), **Blunotte** (€ 25.000), **Lega Italiana FC - Associazione Toscana** onlus, con **Kiwanis Club** Prato (€ 50.000)

FFC #3/2008
Influenza dei fattori genetici nella malattia polmonare in pazienti affetti da Fibrosi Cistica
Responsabile: Paolo Gasparini (Dip. Scienze dello Sviluppo e Riproduttive Università di Trieste)
Costo: € 50.000
Adottato totalmente da:
Mille Bambini di Via Margutta – Onlus

FFC #4/2008
Ricerca di nuovi elementi regolatori nella regione del promotore del gene CFTR
Responsabile: Pietro Pucci (CEINGE - Biotecnologie Avanzate s.c.a r.l. - Napoli)
Costo: € 85.000
Adottato totalmente da: **Andrea Concato Orologeria** (€ 30.000), **Audemars Piguet Italia** Spa (€ 30.000) e **Lega Italiana FC-Associazione Lucana** Onlus (€ 25.000)

FFC #6/2008
Disegno di antibiotici non-convenzionali contro i patogeni correlati alla fibrosi cistica
Responsabile: Giovanni Bertoni (Univ. di Milano - Dip.to Scienze Biomolecolari Biotecnologie)
Costo: € 55.000
Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Belluno** con **Rallysti d'Italia e Rocciatori di Belluno** in ricordo di Giorgio Moritsch

FFC #7/2008
Patogenicità di Burkholderia cenocepacia: interazioni sinergiche con Pseudomonas aeruginosa ed adattamento all'ospite FC.
Responsabile: Annamaria Bevivino (ENEA C.R. Casaccia - Biotecn. Agroindustriale e Protezione della Salute)
Costo: € 65.000
Adottato totalmente da: **Associazione Siciliana FC**

FFC #8/2008
Sviluppo e validazione di nuovi sistemi di screening per l' identificazione di inibitori della virulenza di Pseudomonas aeruginosa
Responsabile: Livia Leoni (Lab. Microbiologia Molecolare e Biotecnol. dei Microorganismi, Dip. Biologia - Università "Roma 3" - Roma)
Costo: € 40.000
Adottato parzialmente da: **Delegazione FFC di Vittoria-Ragusa, Delegazione FFC di Catania e Gruppo di Sostegno di Paternò,** CT (€ 20.000)

FFC #9/2008
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 (Centro Reg. FC - Dip. Pediatria- Osp. Meyer - Firenze)
Costo: € 40.000
Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Novara** in ricordo di Andrea e Annalisa (€ 15.000), **Lega Italiana FC - Associazione Toscana** Onlus con **Famiglia Papini** di Prato (€ 25.000)

FFC #10/2008
Proteine essenziali per la biogenesi della membrana esterna di Pseudomonas aeruginosa come nuovi bersagli per la progettazione e sintesi di farmaci antimicrobici innovativi
Responsabile: Alessandra Polissi (Dip. Biotecnologie e Bioscienze - Università Bicocca - Milano)
Costo: € 60.000
Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Ferrara** con **Aziende di Ferrara e Bologna***, **Gruppo di Sostegno di Comacchio** e **Delegazione FFC di Bologna**, con contributo **Associazione Trentina FC** in ricordo di Enzo Moser

FFC#11/2008
Effetto del glutatione e della lattoferrina sulla regolazione redox, sull'omeostasi dei metalli e sulla risposta infiammatoria di cellule bronchiali da Fibrosi Cistica invase da Burkholderia cenocepacia.
Responsabile: Andrea Battistoni (Dip. Biologia - Università Tor Vergata - Roma)
Costo: € 65.000
Adottato totalmente da: **Studio Palladio 2000** Sandrigo VI

FFC#12/2008
Effetto anti-infiammatorio del miglustat: il metabolismo dello spfingolipide ceramide come bersaglio terapeutico per la malattia polmonare in fibrosi cistica

Responsabile: Maria Cristina Dechecchi (Lab. Patologia Molecolare – Azienda Ospedaliero-Universitaria - Verona)
Costo: € 75.000
Adottato totalmente da: **Associazione "Amici di Don Lucio"** (€ 9.000), **Associazione Sergio Valente** (€ 26.000) e **Delegazione FFC di Vicenza** con le **Scuole Vicentine**** (€ 40.000)

FFC#13/2008
Valutazione pre-clinica di analoghi ad azione anti-infiammatoria della vitamina E nella Fibrosi Cistica
Responsabile: Francesco Galli (Dip. Medicina Interna - Sez. Biochimica Appl. e Scienze Nutrizionali Università Perugia)
Costo: € 75.000
Adottato totalmente da: **Jump Italia** 2008

FFC#14/2008
La pentrassina lunga PTX3 nella resistenza alle infezioni e come candidato agente terapeutico nella fibrosi cistica
Responsabile: Cecilia Garlanda (Fondazione Humanitas per la Ricerca - Rozzano (MI))
Costo: € 75.000
Adottato totalmente con: Festa per l'80° compleanno del **Presidente Faganelli**

FFC #16/2008
Studio osservazionale sulle complicanze degli accessi venosi centrali totalmente impiatabili, tipo Port, nelle persone affette da fibrosi cistica.
Responsabile: Alberto Dal Molin (Ospedale Meyer - Dip. to Pediatria, Firenze)
Costo: € 20.000
Adottato totalmente da: **Associazione Trentina FC** in ricordo di Marika Tomasi

FFC #17/2008
Rimozione extracorporea di anidride carbonica come strategia "ponte" al trapianto di polmone nei pazienti con fibrosi cistica.
Responsabile: Vito Marco Ranieri (Dip. Discipline Medico Chirurgiche – Università degli Studi di Torino – sez. Anestesia e Rianimazione)
Costo: € 65.000
Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Belluno** con lascito della Sig.ra **Pia Antonia de Martin Fabbro** in memoria del nipote Franco Zandorella

Progetto FFC QUANTIGENE/2008
Allestimento del Servizio di quantificazione dell'espressione dei geni (QUANTIGENE) a supporto della rete di ricerca italiana impegnata in studi innovativi per la Fibrosi Cistica.
Responsabile: Dr Giulio Cabrini – Laboratorio di Patologia Molecolare – Azienda Ospedaliera-Universitaria di Verona
Costo: € 200.000
Adottato parzialmente da: **Delegazione FFC "La Bottega delle Donne"** Montebelluna TV (€ 40.000)

(*) **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

(**) **Scuole Superiori Vicentine**
- Istituto Silvio Ceccato - **Alte Montecchio**
- Liceo Da Vinci - **Arzignano**
- Istituto Galileo Galilei - **Arzignano**
- Istituto Rosselli - **Lonigo**
- Istituto Masotto - **Noventa Vicentina**
- Istituto Marzotto - **Valdagno**
- Istituto Da Schio - **Vicenza**
- Istituto Fusinieri - **Vicenza**
- Istituto Lampertico - **Vicenza**
- Istituto Pigafetta - **Vicenza**
- Istituto Rossi - **Vicenz**a
- Liceo Quadri - **Vicenza**

Grafica:
Paolo Tosi

Stampato il 04 novembre 2008
Tipolitografia Artigiana
San Giovanni Lupatoto (VR)

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: Luigi Bozzini
Donato Bragantini
Sandro Caffi
Paolo Del Debbio
Giuseppe Ferrari
Anna Maria Giunta
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
Consulenti: Giorgio Berton
Roberto Buzzetti
Gerd Doering
Lucio Luzzatto

Per donazioni:
- Conto corrente postale n. 18841379
- Bonifico Unicredit Banca
  IT 03 N 02008 11718 000009465517
- Bonifico Banco Popolare Verona
  IT 60 V 05188 11708 000000048829
- On-line sul sito: www.fibrosicisticaricerca.it

www.fibrosicisticaricerca.it