



20 anni

dalla scoperta
del gene CFTF
1989-2009

7^a CONVENTION D'AUTUNNO DEI RICERCATORI IN FIBROSI CISTICA

Convention of Investigators in Cystic Fibrosis

Verona, 27-28 Novembre 2009



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

Nella foto di copertina:

Una bimba con Fibrosi Cistica tra le braccia di Lap-Chee Tsui, Francis Collins e Jack Riordan: i tre ricercatori americani che nel 1989 scoprirono il gene CFTR dando un nuovo, vitale impulso alla Ricerca FC.

VII Convention d'Autunno dei Ricercatori in Fibrosi Cistica

VII Italian Convention of Investigators in Cystic Fibrosis

Verona, 27 - 28 Novembre 2009
Centro Culturale "G. Marani", Ospedale Maggiore

Presentazione dello stato di avanzamento dei progetti finanziati dalla
Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica 2007 - 2009
Work progress of projects funded by FFC 2007-2009

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



*fondazione per la ricerca
sulla fibrosi cistica - onlus*

Italian CF Research Foundation

Verona, November 2009

Indice - Index

Introduzione - Introduction pag. 5

Sommari delle presentazioni – Presentation abstracts

1. MICROBIOLOGIA I – Microbiology I

Döring G. *Introduction: Basic and Clinical Microbiology for CF in Italy 2009. Introduzione: Microbiologia di base e clinica nella ricerca italiana CF 2009* pag. 6

1. Bragonzi A

CFaCore: Cystic Fibrosis Animal Core Facility (FFC Project CFaCore/2009) pag. 6

2. Bonomi F, Bertoni G

Dissecting a surface target candidate for the rational design of novel antibacterial drugs against Pseudomonas aeruginosa. (FFC Project#6/2007, concluded) pag. 7

3. Bertoni G, Maiorana S

Design of non-conventional antibiotics against cystic fibrosis-related pathogens (FFC Project #6/2008, in progress) pag. 8

4. 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. (FFC Project#10/2008, in progress) pag. 9

5. Leoni L, Visca P

Development and validation of a novel screening system for the identification of Pseudomonas aeruginosa virulence inhibitor (FFC Project#8/2008, in progress) pag. 9

6. Gennaro R, Di Bonaventura G, Fiscarelli E

Novel strategies for respiratory infection therapy in CF. Use of natural and designed antibacterial peptides (FFC Project#12/2009, new) pag. 10

7. Pini A

In vivo characterization of a novel branched antimicrobial peptide specific for Gram-negative bacteria. Efficacy in P. aeruginosa lung infection and pharmacological profile (FFC Project#14/2009, new) pag. 11

8. Molinaro A, Bernardini ML

Biochemical adaptation by Pseudomonas aeruginosa to the airways of cystic fibrosis patients (FFC Project#8/2007, concluded) pag. 12

9. Visca P, Leoni L

Iron uptake and quorum sensing in Pseudomonas aeruginosa virulence (FFC Project#10/2007, concluded) pag. 12

10. Landini P, Seneci P, Bernardi A, Cutruzzolà F

Prevention of Pseudomonas aeruginosa biofilm formation by inhibition of cyclic-di-GMP (c-di-GMP) metabolism (FFC Project#13/2009, new) pag. 13

2. FISIOPATOLOGIA DELLA PROTEINA CFTR E TERAPIE DEL DIFETTO DI BASE Pathophysiology of CFTR protein and therapy of the basic defect

Cao A. *Introduction: Balance and perspectives in searching for therapy of the basic defect. Introduzione: bilancio e prospettive nella ricerca verso terapie del difetto di base.* pag. 15

11. 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;*

- *Interactome in Cystic Fibrosis: role of NHERF1 in actin cytoskeleton and tight Junction pathophysiology (FFC Project#2/2007, concluded; FFC Project#1/2009, extension)* pag. 16

12. Luini A

Organisation and regulation of the secretory trafficking of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator CFTR and of its pathogenic mutant DF508-CFTR (FFC Project#1/2008, in progress) pag. 17

13. Pinna LA

- *Assessing the implication of protein kinase CK2 in cystic fibrosis pathogenesis (FFC Project#4/2007, concluded)*
- *Signaling potential of the Δ508 CFTR mutation: a new paradigm to explain nonchannelopathy related aspects of cystic fibrosis (FFC Project#4/2009, extension)* pag. 18

14. Mazzei M, Melloni E, Moro S, Galietta JLV

Computational design, biochemical study, synthesis and screening of pharmacological chaperones as correctors of ΔF508-CFTR (FFC Project#3/2007, concluded) pag. 19

15. Vassalli M

Direct visualization of CFTR conformation by atomic force microscopy imaging (FFC Project#6/2009, new) pag. 20

16. Galietta JLV, Millo E, Mazzei M

Development of small molecules to correct the defective chloride transport in cystic fibrosis (FFC Project#2/2009, extension FFC Project#3/2006) pag. 21

17. Moran O, Zegarra O

Functional and structural basis of the molecular mechanism of CFTR potentiators (FFC Project#2/2008, in progress) pag. 21

18. Pedemonte N

Dissection by RNAi-mediated silencing of molecular mechanism leading to F508del-CFTR misprocessing (FFC Project#3/2009, new) pag. 22

19. Zegarra OStrategies for the suppression of Na⁺ and fluid hyperabsorption in cystic fibrosis airway disease (FFC Project#7/2009, new) pag. 23**20. Sorio C, Melotti P, Buffelli MR**

Functional evaluation of CFTR in blood leukocytes in human subjects as a new tool for diagnostic and clinical research applications (FFC Project#5/2009, new) pag. 23

3. MICROBIOLOGIA II – Microbiology II**21. Bragonzi A, Bertoni G**Validation of novel vaccine candidates of *Pseudomonas aeruginosa* (FFC Project#10/2009, new) pag. 24**22. Neri AS, Rossolini G**Longitudinal study of *Pseudomonas aeruginosa* resistance: selection and evolution of resistance mechanisms in relation to antibiotic treatment in cystic fibrosis patients (FFC Project#9/2008, concluded) pag. 25**23. Riccardi G**The role of RND transporters in *Burkholderia cenocepacia* life by microarray analysis (FFC Project#15/2009, new) pag. 25**24. Bevvino A, Ascenzioni F***Burkholderia cenocepacia* pathogenicity: synergistic interactions with *Pseudomonas aeruginosa* and adaptation to CF host (FFC Project#7/2008, in progress) pag. 26**25. Silipo A, De Soya A**In vitro and in vivo studies of novel antimicrobials targeting bacterial cytoskeleton and cell surface virulence markers in the treatment of *Burkholderia cepacia* complex infection (FFC Project#16/2009, new) pag. 27**26. 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 (FFC Project#7/2007, concluded) pag. 28**27. Venturi V***Burkholderia cepacia* complex: closing down on the major virulence factors (FFC Project#9/2007, concluded) pag. 29**4. INFAMMAZIONE I – Inflammation I****Bertoni G.** Introduction: The excessive inflammatory response in CF airways. Introduzione: L'eccessiva risposta infiammatoria nelle vie aeree CF pag. 30**28. Nicolis E, Bezzzerri V, Cabrini G**

QuantiGENE: a core facility for quantification of gene expression in CF research (FFC Project Quantigene/2008) pag. 31

29. Cabrini G, Gambari R, Pucci P- A gene-targeted anti-inflammatory approach based on the Transcription Factor "decoy" strategy (FFC Project#13/2007, concluded)
- Mapping IL-8 gene transcription machinery in bronchial epithelial cells (FFC Project#18/2009, extension) pag. 32**30. 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 (FFC Project#5/2007, concluded) pag. 33

31. De Rose V, Hirsch E, Döring GGenetic and pharmacological validation of PI3K γ as a drug-target for the treatment of airway inflammation in CF (FFC Project#20/2009, new) pag. 34**32. Romano M, Battistini L, Furnari ML**

Mechanisms of inflammation resolution in cystic fibrosis (FFC Project#15/2007, concluded) pag. 34

33. Garlanda C, Bragonzi A

Infections in cystic fibrosis: role of the long pentraxin PTX3 in host resistance and as therapeutic agent (FFC Project#14/2008, in progress) pag. 35

34. Dechechci MC, Gambari R

Anti-inflammatory effect of miglustat: sphingolipid ceramide metabolism as a therapeutic target for CF lung disease (FFC Project#12/2008, in progress) pag. 35

5. INFAMMAZIONE II – Inflammation II**35. Del Porto P, Ascenzioni F, Quattrucci S**- Influence of CFTR mutations in bactericidal activity of human macrophages (FFC Project#14/2007, concluded)
- Mechanisms of bactericidal activity of human macrophages and the influence of CFTR mutations (FFC Project#21/2009, extension) pag. 36**36. Leal T, Mauri P, Sorio C**Effects of azithromycin (AZM) on *Pseudomonas aeruginosa*-induced chronic lung inflammation in cystic fibrosis (FFC Project#15/2008, in progress) pag. 37

- 37. Galli F, Iuliano L, Schock CB, Goracci GF**
Pre-clinical evaluation of new vitamin E-based anti-inflammatory agents in CF (FFC Project#13/2008, in progress) pag. 38
- 38. Battistoni A, Berlotti F**
Effect of glutathione and lactoferrin on redox regulation, metal homeostasis and inflammatory responses of Cystic Fibrosis bronchial cells upon infection with *Burkholderia cenocepacia* (FFC Project#11/2008, in progress) (15') pag. 39
- 39. Pompella A**
Origin of lung fluid gamma-glutamyltransferase and its effects in modulation of antioxidant balance, inflammation and CF respiratory dysfunction (FFC Project#22/2009, new) pag. 40
- 40. Bernardini ML, Molinaro A, Allaoui A**
Immune evasion strategies underlining the adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients (FFC Project#17/2009, new) pag. 40
- 41. Chanson M, Dechechchi MC**
Role of CFTR-Connexin interaction on PGE2 signaling and inflammation: implication for cystic fibrosis (FFC Project#19/2009, new) pag. 41

6. GENETICA – Genetics

- Rosatelli MC.** Introduction: Studies on emerging aspects of CF genetics. Introduzione: studi su aspetti emergenti della genetica CF pag. 43
- 42. Pagani F**
- Evaluation of disease causing mutations in CFTR co-transcriptional splicing units: diagnostic and therapeutic aspects (FFC Project#20/2007, concluded)
- Molecular pathology of the pre-mRNA splicing machinery in cystic fibrosis: mechanistic aspects and therapeutic approaches (FFC Project#9/2009, extension) pag. 44
- 43. Gasparini P, Cabrini G**
- Genetic factors influencing pulmonary disease in Cystic Fibrosis (CF) patients (FFC Project#3/2008, concluded)
- Influence of genetic factors in the progression of lung disease in cystic fibrosis (CF) (FFC Project#8/2009, extension) pag. 45
- 44. Pucci P, Tomaiuolo R, Bombieri C**
Search of novel regulatory elements in the promoter region of CFTR gene (FFC Project#4/2008, in progress) pag. 46
- 45. Castaldo G**
Molecular analysis of genes encoding CFTR interactors of SLC26 family in CF patients (FFC Project#19/2007, concluded) pag. 47
- 46. Rosatelli MC**
Feasibility of a screening program for the preconceptional identification of Cystic Fibrosis carriers in Sardinian population (FFC Project#5/2008, in progress) pag. 47

7. RICERCA CLINICA – Clinical Research

- Buzzetti R.** Introduction: Current context of clinical research in CF. Introduzione: contesto attuale della ricerca clinica CF pag. 49
- 47. Taccetti G, Cariani L**
Early antibiotic treatment in *Pseudomonas aeruginosa* eradication in cystic fibrosis patients: a randomised policentric study on two different protocols (FFC Project#17/2007, in progress) pag. 52
- 48. Campana S**
Impact on clinical status of cystic fibrosis patients of persistent lung infections with community acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) and hospital acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (HA-MRSA): a multicenter longitudinal study (FFC Project#11/2009, new) pag. 52
- 49. Dal Molin A, Braggion C, Furnari ML, Lucidi V, Rizzi E, Cialdella P**
A prospective study about complications of totally implantable central venous access ports in people with CF (FFC Project#16/2008, in progress) pag. 53
- 50. Ranieri VM**
Extracorporeal lung assist as bridge to lung transplantation for patients with cystic fibrosis (FFC Project#17/2008, in progress) pag. 54
- 51. Remuzzi G**
Prevention of reperfusion injury in human lung transplantation for cystic fibrosis by targeting IL-8 activity (FFC Project#24/2009, new) pag. 55
- 52. Guarino A, Braggion C, Pardo F, Morelli L**
Modulation of intestinal and extraintestinal inflammation in infants with cystic fibrosis by early modification of intestinal microflora (FFC Project#23/2009, new) pag. 55

- PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI CONGRESSUALI – Publications and congress communications pag. 57
RETE DI ISTITUTI E LABORATORI - Institute and Laboratory Network pag. 72
REFEREES INTERNAZIONALI – International reviewers pag. 73
PROGETTI 2007-2009 ADOTTATI - Adopted projects (2007-2009) pag. 75



Introduction - Introduzione

In the Autumn of 20 years ago the Berlin's wall felt but also it felt the wall which hid the secrets of the cystic fibrosis gene. It was a moment of great hopes on many fronts. On that of cystic fibrosis (CF), the gene discovery started on the one hand a new modality of facing investigation on the genes disease causing; on the other hand it opened the way to a flood of studies aimed in primis at curing the CF disease at a level very close to the mutated gene. On that way, starting from its establishment (January 1997), the Italian CF Research Foundation got greatly involved. This Foundation, during the first years, directed its attention to the creation of an advanced laboratory which could be a contact place of motivated scientists of various origins and skills, but this idea resulted soon not much realistic and rather risky. After wide reflection, made with the help of several experts, the Foundation convinced itself that it would be more rational and productive to support research groups and labs already existing. Their skills could be steered into the CF research through the funding of projects to be selected on the basis of an annual competition, with the evaluation made by numerous experts of different extractions (peer-review method). During 8 years, since 2002, an Italian research network for CF so grew, with the contribution of some foreign groups: at different level and title, 124 research groups became involved, with about 400 researchers on the whole (96 research contracts included). Among the 315 projects submitted, 140 were selected and funded (44%). Results of that activity were spread through 132 publications on international journals and 222 congress presentations. In this VII Convention, called to weigh up the state of advancement of that activity, 58 projects, carried out between 2007 and 2009, are presented: those just concluded, those in progress or just started. For that activity the Foundation bore the costs which are shown in the table. The resources came from the contributions of thousands of donors, mainly through the initiative "Project Adopting": the list of the adopters is shown at page 75 for the 2007-2009 projects.

Nell'autunno di 20 anni fa cadde il muro di Berlino ma cadde anche il muro che occultava i segreti del gene della fibrosi cistica. Fu un momento di grandi speranze su tutti i fronti. Su quello della fibrosi cistica (CF), la scoperta del gene inaugurò da un lato un nuovo modo di affrontare la ricerca sui geni causa di malattia, dall'altro aprì la strada ad una valanga di studi rivolti in primis a curare la malattia a livelli molto vicini al gene mutato. Su quella strada si impegnò, a partire dalla sua nascita (gennaio 1997), la Fondazione per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica. Questa Fondazione, nei primissimi anni, puntò alla creazione di un laboratorio avanzato che fosse punto di incontro di studiosi motivati di diversa provenienza, ma questa idea si rivelò presto poco realistica e piuttosto a rischio. Seguì, dopo ampie riflessioni, condotte assieme a esperti di varia estrazione, la convinzione che fosse più razionale e produttiva un'azione di supporto a gruppi di ricerca già esistenti, di cui orientare verso la fibrosi cistica le competenze attraverso il finanziamento di progetti, selezionati sulla base di una competizione annuale, con l'intervento valutativo di numerosi esperti, fondato sul metodo del peer-review. In 8 anni, dal 2002, si è andata così aggregando una rete italiana di ricerca CF, con contributi di alcuni gruppi stranieri, che ha visto coinvolti, in varia misura ed a vario titolo, 124 gruppi di ricerca con circa 400 ricercatori complessivamente (tra cui 96 contratti di ricerca o borse di studio). Sono stati sinora 315 i progetti presentati per un finanziamento: 140 sono stati quelli selezionati e finanziati (44%). I risultati di questa attività hanno avuto sinora divulgazione (in base a quanto comunicato e documentato dai ricercatori) attraverso 132 pubblicazioni su riviste internazionali e 222 presentazioni congressuali (quelle sinora comunicateci). In questa VII Convention, dedicata a fare il punto sullo stato di avanzamento di questa attività, vengono presentati 58 progetti, attivi dal 2007 al 2009, quelli appena conclusi, quelli in corso e quelli da poco avviati. Per questa attività la Fondazione ha sostenuto i costi dettagliati nella tabella più sotto. Le risorse relative sono derivate dai contributi di migliaia di donatori, particolarmente attraverso l'iniziativa dell' "Adozione di Progetti", di cui si può vedere a pag. 75 di questa brochure l'elenco degli adottanti dei progetti 2007-2009.

CF research costs borne by FFC Foundation (€)

Research area	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2002-2009
1. CFTR physiopathology & new therapy	263,000 2 proj.	178,000 4 proj.	76,000 4 proj.	180,000 4 proj.	200,000 5 proj.	220,000 5 proj.	195,000 2 proj.	375,000 7 proj.	1,687,000 26 proj.
2. Genetics	- -	90,000 3 proj.	133,000 5 proj.	110,000 2 proj.	80,000 3 proj.	113,000 2 proj.	195,000 3 proj.	130,000 2 proj.	851,000 18 proj.
3. Microbiology	18,078 1 proj.	105,000 3 proj.	95,000 3 proj.	100,000 2 proj.	232,000 9 proj.	291,000 7 proj.	260,000 5 proj.	270,000 7 proj.	1,371,000 30 proj.
4. Inflammation	211,000 1 proj.	55,000 1 proj.	143,000 4 proj.	148,000 5 proj.	113,000 3 proj.	163,000 3 proj.	345,000 5 proj.	295,000 6 proj.	1,529,000 22 proj.
5. Epidemiology & Clinical research	- -	80,000 2 proj.	53,000 3 proj.	76,000 4 proj.	75,000 4 proj.	70,000 3 proj.	85,000 2 proj.	130,000 3 proj.	569,000 18 proj.
Core facilities	-	-	-	-	-	-	200,000 QuantiGENE	400,000 CFaCore	600,000
Tot. 2002-2008 Research projects	492,000 4 proj.	508,000 13 proj.	500,000 19 proj.	614,000 17 proj.	700,000 24 proj.	904,000 20 proj.	1,280,000 18 proj.+1	1,600,000 25 proj.+1	6,607,000 139 proj+2cf

Research admin., Project selection, Convention & meetings 1997-2009:

Research / care support Verona CF centre 1997-2002:

Total research investment 1997-2009:

404,000

777,217

€ 7,788,217

PRESENTATION ABSTRACTS - Sommari delle presentazioni

1. MICROBIOLOGIA I

Microbiology I



Introduction: Basic and Clinical Microbiology for CF in Italy 2009

Gerd Döring

Department General & Environmental Hygiene, Institute of Hygiene, University of Tuebingen, Germany. Editor-in-Chief Journal of Cystic Fibrosis. Member of Scientific Advisory Board Italian CF Research Foundation.

Italian CF research has significantly progressed in the field of CF related microbiology during the past

years due to the sponsorship of the Italian CF Research Foundation (FFC). The inclusion of animal studies in current projects increased the impact of studies in this context. Particularly, the recent establishment of the Cystic Fibrosis Animal Core Facility (CFaCore), headed by **Alessandra Bragonzi** at the Istituto San Raffaele, Milano, facilitates these efforts by assisting Italian and International researchers to carry out targeted research projects. Clearly with the implementation of CFaCore, which closed a gap in translational research, the development of new strategies for the treatment of CF in Italy is expected to be faster than before.

One project supported by the FFC and carried out by **Alessandra Bragonzi** in cooperation with **Giovanni Bertoni**, Milano, consequently includes animal experiments models. The project aims at defining novel vaccine candidates for *Pseudomonas aeruginosa* on the basis of their putative localization on the cell surface by "reverse vaccinology". Also in two other studies, involving antibacterial peptides and c-di-GMP inhibition for the potential treatment of *P. aeruginosa*, animal experiments are included: a team from Trieste, Chieti-Pescara and Rome headed by **Roberto Gennaro**, **Gianni Di Bonaventura** and **Ersilia Fiscarelli** use cathelicidin-derived antimicrobial peptides in *in vitro* and animal studies. Furthermore, Alessandro Pini studies the novel antimicrobial peptide M33 in lung infection models. Finally, the research cooperation group of **Paolo Landini**, **Paolo Seneci** and **Alessandro Bernardi**, Milano, together with **Federico Cutruzzolà** screen c-di-GMP inhibitors for *P. aeruginosa*. Work on *Burkholderia cepacia* complex (BCC) strains is again visible in the group of FFC sponsored projects: **Giovanna Riccardi**, Pavia, investigates the RND transporters in *B. cenocepacia* using transcriptome analysis in cooperation with **Esh Mahenthiralingam**, Cardiff, Wales. Furthermore, she attempts to inactivate different *rnd* genes in *B. cenocepacia* for a potential vaccine against this pathogen. Finally, in a cooperative project of **Alba Silipo**, Naples with **Antony De Soya**, Newcastle, UK, novel antimicrobials targeting bacterial cytoskeleton and cell surface virulence markers are tested *in vitro* and *in vivo* studies with regard to the treatment of BCC infection.

Microbiologia di base e clinica nella ricerca italiana CF 2009

Negli ultimi anni la ricerca italiana ha fatto significativi progressi nel campo della microbiologia correlata alla fibrosi cistica grazie alla sponsorizzazione della Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica (FFC). L'inserimento di studi su modelli animali nei progetti attuali ha accresciuto l'impatto della ricerca in questo contesto. In particolare, la recente costituzione di un servizio dedicato, la "Cystic Fibrosis Animal Core Facility" (CFaCore), diretto da **Alessandra Bragonzi** presso l'Istituto San Raffaele a Milano, faciliterà questi sforzi assistendo i ricercatori italiani e internazionali nel condurre progetti di ricerca mirati. Chiaramente, con l'implementazione di CFaCore, che ha chiuso un gap nella ricerca traslazionale, lo sviluppo di nuove strategie di trattamento della fibrosi cistica in Italia ci si aspetta che sia più veloce di prima.

Un progetto supportato da FFC e portato avanti da **Alessandra Bragonzi**, in collaborazione con **Giovanni Bertoni** a Milano, include esperimenti su modelli animali. Il progetto ha lo scopo di definire nuovi candidati vaccini per *Pseudomonas aeruginosa*, sulla base della loro putativa localizzazione sulla superficie cellulare, attraverso un approccio di "vaccinologia inversa". Anche in due altri studi, che interessano peptidi antibatterici ed inibizione di c-di-GMP per un potenziale trattamento di *P. aeruginosa*, sono inclusi esperimenti su animali: un gruppo di ricercatori di Trieste, Chieti-Pescara e Roma, coordinato da **Roberto Gennaro**, **Gianni Di Bonaventura** ed **Ersilia Fiscarelli** usa peptidi antimicrobici derivati dalla catelicidina con esperimenti sia *in vitro* che su modelli animali. Inoltre **Alessandro Pini** studia il nuovo peptide antimicrobico M33 in modelli di infezione polmonare. Infine, il gruppo collaborativo di **Paolo Landini**, **Paolo Senesi** e **Alessandro Bernardi** in Milano, assieme a **Francesca Cutruzzolà**, attua uno screening di inibitori di c-di-GMP per *P. aeruginosa*. Il lavoro su *Burkholderia cepacia* complex si rende di nuovo visibile nel gruppo di progetti sponsorizzati da FFC: **Giovanna Riccardi**, Pavia, studia i trasportatori RND in *B. cenocepacia* usando l'analisi transcrittonica in collaborazione con **Eshwar Matenthiralingam** di Cardiff nel Galles. Inoltre, essa tenta di inattivare differenti geni *md* in *B. cenocepacia* per realizzare un potenziale vaccino contro questo patogeno. Infine, in un progetto cooperativo di **Alba Silipo** (Napoli) con **Antony De Soya** (Newcastle, UK), vengono testate nuove molecole antimicrobiche dirette contro il citoscheletro batterico, mentre vengono testati, mediante studi *in vitro* e *in vivo*, marcatori di virulenza della superficie cellulare in relazione al trattamento dell'infezione da *B. cepacia* complex.



1. CFaCore: Cystic Fibrosis Animal Core Facility (FFC Project CFaCore/2009)

Bragonzi A, Paroni M

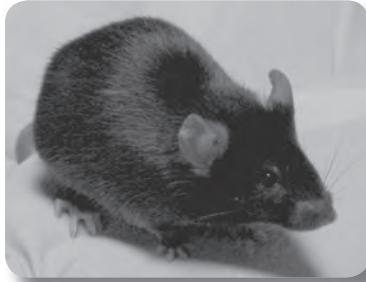
Divisione di Immunologia, Trapianti e Malattie infettive – Istituto San Raffaele, Milano

Reaching a cure for a cystic fibrosis (CF) disease is a long and incremental process that embraces various steps, from basic studies to clinical research. The whole process can be seen as an ideal ladder with distinct steps including: genetic studies, studies on mechanisms both *in vitro* and *in vivo*, therapeutic approaches *in vitro*, therapeutic approaches *in vivo* and clinical trials. Each step represents a phase of research closer to therapy. Taken as a whole, Italian CF research has significantly progressed along the ladder during the last decade. Between 1997-2009, the Italian CF Research Foundation has granted

several research projects dealing with *in vitro* studies and basic research. Today, much of the effort needs to be directed to *in vivo* studies and pre-clinical research. To cover this area of research, animal models and testing are needed.

CF mouse models represent a milestone in CF research and a necessity to test the relevance of new identified mechanisms and the potential of new therapeutic approaches. However, the animal handling in research institutions is complex and multifaceted. The equipment and related services involved in CF animal research require special infrastructures and expertises that are not usually available in individual research centre.

In this context, the Cystic Fibrosis Animal Core Facility (CFaCore) has been established to respond to an emerging need among Italian CF investigators. CFaCore provides researchers with mouse models and special expertise exceeding the capacity of any of the laboratory in the CF researcher institutions. CFaCore provides different levels of services to investigators, including CF mouse models by ensuring genetic quality and health, while guaranteeing that the mice are bred, maintained and used according to the official guidelines for the care and use of animals in biomedical research. Additional services include provision of specialized mice treatments, such as induction of disease states to model the human condition, substance administration, tissue collection and analysis. CFaCore assists researchers in the conduction of targeted research projects and provides guidance for experimental design and potential strategies. The final goal is to support investigations on CF pathogenesis and on candidate therapeutic molecules to favor the translation of basic research projects into pre-clinical applications, thus enabling a faster development of new strategies for the treatment of CF.



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

La ricerca di nuove terapie verso la cura della fibrosi cistica è un processo che si sviluppa attraverso tappe progressive. L'intero percorso di ricerca può essere suddiviso in fasi distinte che comprendono: studi genetici, ricerca dei meccanismi sia *in vitro* che *in vivo*, approcci terapeutici *in vitro*, approcci terapeutici pre-clinici e sperimentazioni cliniche. Ogni passo rappresenta una fase di ricerca più vicina alla terapia. Nel complesso, la ricerca FC italiana ha compiuto progressi significativi durante l'ultimo decennio. Tra il 1997-2009, la Fondazione Italiana per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica ha finanziato vari progetti di ricerca principalmente a favore della ricerca di base. Oggi, molti dei risultati prodotti dai ricercatori italiani hanno la necessità di essere trasferiti in modelli animali di malattia opportunamente validati. Modelli murini FC rappresentano una pietra miliare nella ricerca FC e una necessità per validare nuovi meccanismi patogenetici e testare le potenzialità di nuovi approcci terapeutici. Tuttavia, il processo di trasferimento e gestione dei modelli animali negli istituti di ricerca è particolarmente complesso. La ricerca pre-clinica su animali FC richiede particolari infrastrutture e competenze che non sono solitamente disponibili in centri di ricerca già esistenti.

In questo contesto, per volontà congiunta di Fondazione Ricerca FC e Istituto Sa Raffaele di Milano, è stata istituita una nuova sede centralizzata dedicata all'utilizzo dei modelli animali per la FC, denominata Cystic Fibrosis animal Core Facility (CFaCore). CFaCore risponde ad un bisogno emergente tra gli investigatori italiani FC e mette a disposizione infrastrutture e competenze accreditate per l'utilizzo dei modelli animali. CFaCore prevede diversi livelli di servizi per i ricercatori, inclusi modelli animali FC che vengono allevati, gestiti ed utilizzati secondo le linee guida ufficiali per la cura e l'uso di animali nella ricerca biomedica. Servizi aggiuntivi includono la fornitura di trattamenti specializzati, come ad esempio l'induzione dell'infezione respiratoria per mimare la patologia umana, la somministrazione di terapie, la raccolta dei tessuti e l'analisi dei risultati. CFaCore assiste i ricercatori nell'utilizzo dei modelli animali guidandoli nella messa a punto di protocolli, nel monitoraggio e nella valutazione dei risultati. L'iniziativa ha come scopo finale quello di individuare e selezionare nei modelli animali le terapie più efficaci e promuovere i progetti più promettenti verso la sperimentazione clinica.

2. Dissecting a surface target candidate for the rational design of novel antibacterial drugs against *Pseudomonas aeruginosa* (FFC Project#6/2007, concluded)



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

Bonomi F¹, Iametti S¹, Bertoni G², Milani A², Cisbani G², Ferrara S²

¹Dipartimento di Scienze Molecolari Agroalimentari, Università degli Studi di Milano, ²Dipartimento di Scienze Biomolecolari e Biotecnologie, Università degli Studi di Milano

Pseudomonas aeruginosa is the most relevant bacterial pathogen for cystic fibrosis patients. This project aims at the molecular characterization of a novel membrane protein from *P. aeruginosa* that may represent a novel target for specific antibiotics. This protein has been identified and investigated

– although only from a genetic standpoint – in previous projects (FFC#10/2004 and FFC#6/2006). The protein is localized on the surface of the bacterial cell, and a preliminary bioinformatics analysis suggested that it has distinct transmembrane and catalytic domains. However, bioinformatics tools offered no hint as whether the catalytic domain corresponds to a protease or to a transglutaminase. The putative biologically active domain has been produced as a recombinant protein overexpressed in *E. coli*, and techniques for its purification on a small scale 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 was set up to be used in highthroughput automated screening procedures. The purified domain was found to be devoid of proteolytic activity both on synthetic substrates and on proteins that may easily undergo proteolytic degradation. Preliminary evidence suggests that the protein may indeed be a transglutaminase. However, the difficulties associated with large-scale purification of the protein and its modest specific activity have impeded further development of these approaches. We are currently investigating whether the protein has different substrate specificity or requirements, and whether the observed transglutaminase activity is accessory to other activities of the isolated domain. On the other hand, molecular genetics approaches have confirmed the essential role of this protein in *P. aeruginosa*. Indeed, inactivation of the gene encoding for the protein results in a lethal phenotype. In view of these results,

we are currently developing approaches based on modulating the protein expression, so that the morphological features and the changes in growth patterns ensuing from up/down regulation of the protein may be assessed, along with the effects of altered expression on the biosynthetic pathways of cell wall components.

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

Uno studio molecolare accurato di proteine bersaglio di antibiotici è prerequisito imprescindibile per lo sviluppo razionale di nuove terapie antibatteriche che possano eludere gli attuali meccanismi di resistenza. Le caratteristiche importanti dei bersagli che vanno studiate sono principalmente la loro struttura e funzione. Questo richiede un approccio multidisciplinare che riunisce competenze di microbiologia e genetica molecolare, bioinformatica, biochimica funzionale e strutturale nonché, a lungo termine, di chimica combinatoriale, al fine di disegnare molecole antibiotiche che interagiscono con il bersaglio per inibirne l'attività. Questo progetto si è prefisso di condurre uno studio strutturale e funzionale di una nuova proteina bersaglio del batterio *Pseudomonas aeruginosa*, il patogeno più rilevante per i malati di fibrosi cistica, al fine di preparare un futuro sviluppo razionale di inibitori della sua funzione. Al momento del suo isolamento avevamo predetto che questa proteina svolgesse

una funzione cellulare essenziale localizzandosi sulla superficie della cellula batterica. Nonostante i nostri risultati non permettano ancora di dire quale sia esattamente questa funzione, abbiamo confermato la sua natura essenziale mettendo in evidenza un fenotipo letale in caso di inattivazione del gene corrispondente. Siamo proseguendo i nostri studi sull'attribuzione della funzione cellulare con approcci basati sulla modulazione dell'espressione della proteina, al fine di verificare le conseguenze sulla crescita e sulla morfologia delle cellule, nonché sulle vie biosintetiche di componenti della parete cellulare, di un aumento o una diminuzione della quantità di proteina. Inoltre, i nostri studi bioinformatici indicano fortemente che la proteina possiede vari domini per l'ancoraggio sulla superficie e un dominio, che abbiamo chiamato TG, che sarebbe alla base della sua funzione in quanto potenzialmente in grado di mediare sia la formazione di legami di tipo peptidico tra particolari aminoacidi (attività detta transglutaminasica) sia la reazione inversa (attività proteolitica). Per valutare questa predizione, il dominio TG è stato clonato, espresso come proteina ricombinante, e purificato (al momento solo in piccole quantità, visto l'altro grado di insolubilità). Nel contempo, è stato messo a punto un saggio ad alta sensibilità basato sull'impiego di sonde fluorescenti coniugate a peptidi. Il dominio TG purificato non ha evidenziato attività proteolitica né su substrati sintetici né su proteine facilmente degradabili. Risultati preliminari invece supportano l'ipotesi che la proteina possieda un'attività transglutaminasica. E' tuttora in corso la verifica di altre possibili attività accessorie della proteina su substrati diversi da quelli strettamente proteici. Siamo fiduciosi che la prosecuzione della caratterizzazione di questa proteina porterà alla definizione chiara del suo ruolo cellulare e preparerà al disegno di molecole atte ad inibirne la funzione.



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

Bertoni G¹, Milani A¹, Pavesi G¹, Dehò G¹, Maiorana S², Licandro E², Baldoli C²

¹Dipartimento di Scienze Biomolecolari e Biotecnologie, Università degli Studi di Milano, ²Dipartimento di Chimica Organica e Industriale, Università degli Studi di Milano

*The long-term outlook of this project is the development of novel antibacterial drugs able to elude the extant mechanisms of antibiotics resistance. One innovative branch of antibacterial discovery focus on the so-called antisense antibiotics, which prevents the expression of critical bacterial targets instead of inhibiting their functionality as do the conventional antibiotics. Antisense antibiotics are short (about 10- to 20-base), synthetic analogues of DNA that inhibit gene expression in a sequence-specific manner. There are about a half-dozen structurally distinct types of antisense oligomers, including peptide nucleic acids (PNAs) and phosphorodiamidate morpholinoligomers (PMOs). Each type uses the naturally occurring DNA bases but differs in linkage between the bases. Modified linkages prevent degradation by nucleases while maintaining the architecture required for complementary base pairing. The silencing of gene expression by antisense oligomers usually occurs via translation blockage of the target mRNA to which they anneal. This project aims at the development of PNAs endowed with antibiotic activity against *Pseudomonas aeruginosa*, the most relevant bacterial pathogen for cystic fibrosis patients. We selected as PNA targets three essential genetic functions of *P. aeruginosa**

3. Design of non-conventional antibiotics against cystic fibrosis-related pathogens (FFC Project#6/2008, in progress)

*that we identified in previous FFC projects (FFC#10/2004 and FFC#6/2006) by the screening of antisense RNA libraries. Using the bioinformatics applied to the structural analysis of RNA, we design six PNAs pairing along the mRNA of one selected target. As soon as the six PNAs are synthesized, they will be administered to pure cultures of *P. aeruginosa* to test for their antibiotic activity.*

Disegno di antibiotici non-convenzionali contro i patogeni correlati alla fibrosi cistica

La prospettiva a lungo termine di questo progetto è lo sviluppo di nuovi farmaci antibatterici in grado di eludere gli attuali meccanismi di antibiotico-resistenza. Un settore innovativo della ricerca su nuovi antibatterici si focalizza sui così detti antibiotici antisenso, che sono in grado di prevenire l'espressione di funzioni batteriche essenziali al posto di inibirne la funzionalità, come invece fanno gli antibiotici convenzionali. Gli antibiotici antisenso sono corti oligomeri sintetici analoghi del DNA in grado di inibire l'espressione genica in modo sequenza-specifico. Esistono vari tipi di oligomeri antisenso, circa una mezza dozzina, tra cui i "peptide nucleic acids (PNAs)" e i "phosphorodiamidate morpholinoligomers (PMOs)". Ciascun tipo utilizza le basi azotate che ritroviamo naturalmente nel DNA. Quello che cambia è invece il modo in cui le basi azotate sono unite tra di loro. Questa differenza rende gli oligomeri antiseno più resistenti all'azione di enzimi degradativi ma non compromette la possibilità di appaiarsi al bersaglio in modo specifico. L'inibizione dell'espressione genica ad opera degli oligomeri antiseno avviene normalmente attraverso il blocco della traduzione dell'RNA messaggero del gene bersaglio. Questo progetto si prefigge lo sviluppo di PNA dotati di attività antibiotica contro *Pseudomonas aeruginosa*, il batterio patogeno più rilevante per i malati di fibrosi cistica. Abbiamo scelto come bersaglio dei PNA tre funzioni genetiche essenziali di *P. aeruginosa* che abbiamo identificato in precedenti progetti FFC (FFC#10/2004 and FFC#6/2006) attraverso lo screening di librerie di RNA antiseno. Utilizzando la bioinformatica applicata all'analisi strutturale dell'RNA, abbiamo disegnato sei PNA che si appaiano lungo l'RNA messaggero di uno di questi geni bersaglio. Non appena saranno sintetizzati, questi PNA verranno saggiati per la loro attività antibiotica contro colture pure di *P. aeruginosa*.

4. Essential proteins of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane biogenesis as novel targets for new anti-microbial drugs design and synthesis (FFC Project#10/2008, in progress)



Alessandra Polissi, a sinistra, con il suo gruppo di ricerca.

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

¹Dipartimento Biotecnologie e Bioscienze - Università Bicocca Milano; ²Dipartimento Scienze Biomolecolari e Biotecnologie - Università di Milano; ³Dipartimento di Chimica e Biochimica Organica - Università Federico II - Complesso Universitario Monte Sant'Angelo Napoli

Pseudomonas aeruginosa is a Gram-negative rod that is ubiquitous in nature. *P. aeruginosa* is also the quintessential opportunistic pathogen, causing a wide variety of infections in compromised hosts. In cystic fibrosis (CF) patients, *P. aeruginosa* is the leading cause of death, as intrinsic and acquired resistance of this pathogen to most conventional drugs makes very difficult the treatment of such infections. New and specific antibacterials are thus deeply needed. However, developing novel non-conventional antibacterial drugs requires the identification of new potential targets, a non trivial task considering that all the antibiotics in use so far only target few essential cellular pathways. Lipopolysaccharide (LPS) is an essential component of the outer membrane of Gram-negative bacteria. LPS biogenesis represents an ideal target for the development of novel antimicrobial compounds. Firstly, as it is an essential structural component of the outer layer of the outer membrane, it is required for cell viability. Secondly, LPS is a major virulence factor in Gram-negative bacteria, an initiator of inflammation and a target for effective immunity. Thirdly, recent advances in the enzymatic and genetic mechanisms involved in LPS biosynthesis highlight new potential targets for drug design and synthesis. Finally, this pathway has yet to be fully exploited so far and may thus represent a good source of unscreened new targets. Rational drug design, an approach that uses information revealed by the three dimensional structure of a target protein or of its natural ligands, has proved to be successful in the design of candidate drugs for numerous pathologies. The prerequisite for the success of this approach is the determination of the three dimensional structure of the target protein and the elucidation of its structure-function relationship. In this context, we propose to study two essential proteins KdsD and LptA involved in the LPS biogenetic pathway. KdsD is a key protein implicated in LPS biosynthesis

whereas LptA is involved in its transport to the cell surface. We started a detailed study on KdsD to define the structure-function relationship and to solve its three dimensional structure. Moreover we performed NMR (Nuclear Magnetic Resonance) studies to define structural requirements necessary for KdsD substrate's recognition. Based on the results obtained we designed putative inhibitors that will be synthesized and tested for their antibacterial activity.

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

Le infezioni polmonari causate da *Pseudomonas aeruginosa* sono una delle principali cause che compromettono lo stato di salute e la vita di pazienti affetti da fibrosi cistica. *P. aeruginosa* è un patogeno resistente alla maggior parte dei farmaci convenzionali e ciò rende difficile il trattamento delle infezioni. E' quindi urgente ideare e saggiare nuovi e specifici farmaci antibatterici.

Il lipopolisaccaride (LPS) è un componente essenziale della membrana esterna, la struttura di rivestimento dei batteri Gram-negativi che media diverse interazioni con l'ambiente e l'organismo ospite ed è responsabile dell'elevata resistenza intrinseca agli antibiotici. In questi ultimi anni sono stati fatti molti progressi per comprendere l'enzimologia della biosintesi del LPS, nel capire come questa molecola venga trasportata dal sito in cui avviene la sintesi verso la membrana esterna e sua destinazione finale. Pensiamo quindi che la biogenesi del LPS rappresenti un bersaglio ideale per sviluppare farmaci innovativi tramite progettazione razionale. La cosiddetta progettazione razionale di farmaci è uno degli approcci più utilizzati per ottenere nuove molecole capaci di inibire funzioni biologiche. Conoscendo la struttura molecolare di un possibile bersaglio (per es. una proteina) è possibile, utilizzando sofisticati programmi bioinformatici, identificare molecole che potrebbero interagire specificamente con il bersaglio stesso.

Questo progetto di ricerca si concentra su due proteine essenziali (KdsD e LptA) ed altamente conservate nei batteri Gram-negativi, che controllano due punti chiave della biosintesi e del trasporto del LPS. KdsD è un enzima implicato nella biosintesi del LPS mentre KdsD è il trasportatore che lo veicola alla sua destinazione finale (membrana esterna). Queste proteine sono ottimi bersagli farmacologici dal momento che sono sufficientemente conservate tra diversi e clinicamente rilevanti ceppi batterici, ma non sono presenti nell'uomo. Abbiamo iniziato uno studio dettagliato di KdsD, tramite tecniche biofisiche e di genetica molecolare per analizzare la relazione struttura-funzione, per risolvere la struttura cristallografica e per analizzare via NMR (Risonanza Magnetica Nucleare) i requisiti di legame ai substrati naturali e loro analoghi. In base ai risultati strutturali che abbiamo ottenuto, abbiamo progettato una serie di inibitori potenziali che saranno sintetizzati e quindi saggiate per la loro attività antibatterica verso *Ps aeruginosa*.

5. Development and validation of a novel screening system for the identification of *Pseudomonas aeruginosa* virulence inhibitor (FFC Project#8/2008, in progress)

Leoni L¹, Visca P²

¹Lab. Microbiologia molecolare e Biotecnologie dei microrganismi, Dip. Biologia, Università "Roma 3", ²Lab. Microbiologia clinica e Virologia, Dip. Biologia, Università "Roma Tre" (FFC Project#8/2008 in progress)



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. A novel and promising approach is screening for molecules that inhibit *P. aeruginosa* virulence traits. Within the infected human host, *P. aeruginosa* cells live in community, 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. 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 ability of *P. aeruginosa* 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 first year of the research project was aimed at generating *P. aeruginosa* recombinant strains to be used as biosensors for the detection of anti-virulence compounds. Different *P. aeruginosa* reporter strains in which the promoters of quorum sensing and pyoverdine responsive genes were fused to reporter genes have been constructed. The potential efficacy of these reporter strains in detecting anti-virulence compounds in high-throughput screening systems has been evaluated. These reporter strains could constitute a valuable tool for the discovery of new anti-*P. aeruginosa* compounds.

Sviluppo e validazione di nuovi sistemi di screening per l'identificazione di inibitori della virulenza di *Pseudomonas aeruginosa*

L'infezione cronica ad opera del batterio Gram-negativo *Pseudomonas aeruginosa* è la principale causa di perdita della funzionalità polmonare nei malati di Fibrosi Cistica (FC). Le terapie antibiotiche tradizionali dirette ad inibire la crescita batterica sono spesso inefficaci nell'eradicare l'infezione da *P. aeruginosa* nel malato FC, soprattutto a causa dell'emergere di ceppi resistenti.

Nell'ospite infetto, *P. aeruginosa* persiste in una sorta di consorzio ed il suo comportamento sociale influenza l'espressione della 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. L'uso di farmaci inibitori della virulenza darebbe al sistema immunitario migliori possibilità di risolvere spontaneamente l'infezione rendendo meno probabile l'insorgere di ceppi 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*. In questo primo anno di ricerche abbiamo modificato geneticamente dei ceppi di *P. aeruginosa* al fine di utilizzarli come biosensori in grado di rilevare la presenza di sostanze attive contro l'infezione. L'efficacia dei nuovi ceppi biosensori è stata confrontata e valutata in sistemi di screening ad alta processività. La costruzione di questi sistemi di screening è un prerequisito per la verifica di molecole note o la scoperta di nuove molecole attive contro l'infezione da *P. aeruginosa*.

6. Novel strategies for respiratory infection therapy in cystic fibrosis (CF). Use of natural and designed antibacterial peptides (FFC Project#12/2009, new)



Renato Gennaro, secondo da sx., con partners e collaboratori di ricerca.

Gennaro R¹, Di Bonaventura G², Fiscarelli E³

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

Background. Antimicrobial peptides (AMPs) are important components of innate immunity, produced by microbes, plants and animals, including humans. In eukaryotes they are needed to keep commensal microorganisms under control and to act as a first line of defence against pathogens. They have a potential as lead compounds for the development of novel anti-infective agents. Their nature makes them suitable for topical applications, so that formulations can be envisaged (e.g., aerosols) for the treatment of infections in CF patients, especially those caused by antibiotic-resistant pathogens, against which AMPs are in general active. Objectives. Aim of the project is to define novel strategies

for the treatment of CF lung infection based on the use of natural or designed AMPs that: i) may be active against multi-resistant bacterial strains; ii) can overcome or prevent biofilm formation; iii) are poorly inhibited by bacterial polysaccharides (EPS). Specific objectives are: i) the phenotypic and genotypic characterization of CF clinical strains of *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *H. influenzae*, *B. cepacia* complex (BCC), and *S. maltophilia*; ii) the evaluation of in vitro activities of AMPs against CF clinical strains; iii) the assessment of the activity of AMPs against biofilms formed by CF clinical strains; iv) the definition of genetic relatedness among CF isolates to determine if specific clones are more or less susceptible to AMPs; v) the evaluation of the in vivo potential of AMPs in a CF mouse model of chronic lung infection caused by *P. aeruginosa*; vi) the investigation of the effects of EPS on AMPs' activity.

Preliminary results. In preliminary studies we have shown that cathelicidin-derived AMPs show in vitro a significant bactericidal and anti-biofilm activity against strains of *P. aeruginosa*, *S. aureus*, and *S. maltophilia* isolated from CF patients, thus displaying a potential for the development as therapeutic agents for CF lung disease.

In addition, we have clarified the structure of several exopolysaccharides (EPS) from BCC and *I. limosus* clinical isolates, while the analysis of the structure of the EPS produced by *S. maltophilia* is ongoing. Preliminary data on the interaction of EPS from *P. aeruginosa* and from members of the BCC with AMPs show that there is a formation of molecular complexes and that EPS may influence the conformation and biological activity of AMPs.

Relevance to Italian CF Foundation mission The proposed project is in the framework of an ongoing, systematic study of the molecular mechanisms that determine bacterial killing by AMPs, with the aim of identifying druggable targets. The final goal is to design novel strategies based on AMP-derived molecules for the clinical treatment of CF lung infections.

Nuove strategie per la terapia delle infezioni respiratorie in pazienti con fibrosi cistica (FC). Utilizzo di peptidi antimicrobici naturali e sintetici

Base scientifica: I peptidi antimicrobici (AMPs), prodotti da batteri, piante ed animali, incluso l'uomo, sono componenti importanti del sistema immunitario innato. Negli eucarioti contribuiscono a controllare la flora batterica naturale ed agiscono come prima linea di difesa contro i patogeni. Gli AMPs sono quindi interessanti composti-guida per lo sviluppo di nuovi agenti anti-infettivi da utilizzare per applicazioni topiche in formulazioni (ad es. aerosol) adatte al trattamento di pazienti FC, in particolare, contro infezioni causate da patogeni antibiotico-resistenti, contro i quali gli AMPs sono in genere attivi.

Obiettivi: Scopo del progetto è di definire nuove strategie per il trattamento delle infezioni polmonari FC basate sull'utilizzo di AMPs nativi o artificiali che: a) possano essere attivi contro isolati clinici multiresistenti ai farmaci; b) possano prevenire la formazione di biofilm o consentirne l'eradicazione; c) siano scarsamente inibiti da polisaccaridi batterici (EPS). Obiettivi specifici sono: a) la caratterizzazione fenotipica e genotipica di isolati clinici FC di *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *H. influenzae*, *B. cepacia complex* (*BCC*) e *S. maltophilia*; b) la valutazione *in vitro* dell'attività di AMPs contro isolati clinici da pazienti FC e c) contro biofilm formati da questi isolati; d)

la definizione delle relazioni genetiche tra isolati FC per determinare se specifici cloni siano più o meno suscettibili all'azione degli AMPs; e) la valutazione *in vivo* dell'effetto di AMPs in un modello murino di infezione polmonare cronica causata da *P. aeruginosa*; f) lo studio degli effetti di EPS sull'attività degli AMPs.

Risultati preliminari: Il gruppo di ricerca ha già dimostrato che AMPs derivati da catelicidine mostrano *in vitro* una significativa attività, battericida e anti-biofilm, verso ceppi di *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *S. maltophilia* isolati da pazienti FC. Tali peptidi, o analoghi progettati a partire dalla loro sequenza, possono quindi avere un notevole potenziale terapeutico verso le infezioni polmonari FC. Parallelamente, sono state chiarite le strutture di molti EPS prodotti da ceppi del *BCC* e da isolati di *I. limosus*, mentre la struttura degli EPS prodotti da *S. maltophilia* è in corso di definizione. Dati preliminari sull'interazione degli AMPs con EPS prodotti da *P. aeruginosa* e da membri del *BCC* (*Burkholderia cepacia complex*) evidenziano la formazione di complessi molecolari e l'influenza di questi sulla conformazione dei peptidi.

Rilevanza per la Fondazione CF: Il progetto proposto si inserisce in uno studio sistematico in corso sul meccanismo d'azione molecolare degli AMPs che è alla base della loro attività battericida, allo scopo di identificare bersagli contro i quali disegnare nuovi farmaci. Scopo finale è di individuare nuove strategie per il trattamento di infezioni polmonari FC basate su molecole derivate dagli AMPs.



Alessandro Pini, in piedi al centro, e il suo gruppo di ricerca.

Pini A

Dipart. di Biologia Molecolare, Sezione di Chimica Biologica, Università di Siena

The project FFC#14/2009 aims to study the efficacy of a novel antimicrobial peptide (M33) in lung infection models. The peptide M33 resulted particularly active against Gram-negative bacterial species of clinical interest also in preliminary models of sepsis due to *E. coli* and *P. aeruginosa*, so appearing potentially useful in Cystic Fibrosis (CF). M33 peptide derived from the screening of a combinatorial peptide library, optimization steps for stability and activity improvement and synthesis in a branched form. The proponents discovered that the branched form of peptides provides a strong resistance to proteolysis, consequently increasing peptide persistence in the body and making these kind of molecules particularly suitable for an *in vivo* use.

P. aeruginosa remains the major pathogen of most patients with Cystic Fibrosis. In the present project animals models of lung infection obtained with *P. aeruginosa* will be set up in order to reproduce artificially the severest symptoms suffered by CF patients. A specific collaboration with CFaCore Facility directed by Dr. Bragonzi at the S. Raffaele Institute in Milan, has been initiated. M33 peptide will be tested for its capability to eradicate the infection through two different administration routes: intravenous and intranasal. Work in progress regards the synthesis of the first peptide lot, MIC tests for M33 activity against PAO1 strain of *P. aeruginosa*, that will be used for acute infections at the CFaCore Facility, and preliminary experiments to evaluate possible inhibition of M33 activity due to animal serum.

7. **In vivo characterization of a novel branched antimicrobial peptide specific for Gram-negative bacteria. Efficacy in *P. aeruginosa* lung infection and pharmacological profile (FFC Project#14/2009, new)**

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

Il progetto FFC#14/2009 ha l'obiettivo di studiare l'efficacia in infezioni polmonari di un nuovo peptide antimicrobico già risultato attivo verso specie batteriche Gram-negative di interesse clinico. Questo peptide antimicrobico, chiamato M33, ha già mostrato una buona efficacia in modelli animali di infezione sistemica dovuta a batteri come *E. coli* e *P. aeruginosa*. Il peptide in oggetto è stato scoperto dal gruppo proponente alcuni anni fa, mediante lo screening di una grande libreria di molecole peptidiche, e ha dimostrato di poter essere usato per scopi clinici grazie alla particolare forma di sintesi ramificata con cui viene prodotto dai proponenti. La sintesi in forma ramificata conferisce una forte resistenza alla degradazione proteolitica e quindi una persistenza in circolo notevolmente superiore ai più noti peptidi già usati nella pratica clinica. Il peptide M33 appare quindi un potenziale candidato a diventare un nuovo farmaco antibatterico. In questo progetto il peptide M33 sarà sottoposto ad una sperimentazione di efficacia in modelli di infezioni polmonari simili a quelle generalmente riscontrate in pazienti affetti da Fibrosi Cistica. A questo scopo è stata instaurata una specifica collaborazione con la CFaCore Facility diretta dall'Dott.ssa Bragonzi all'Istituto S. Raffaele di Milano per mettere a punto dei modelli di infezione polmonare da *P. aeruginosa*, uno dei più importanti batteri presenti nelle infezioni di pazienti affetti da Fibrosi Cistica, in modo da riprodurre artificialmente i più gravi sintomi polmonari della malattia. Successivamente il peptide M33 sarà sperimentato per la sua capacità di eradicare l'infezione attraverso due vie di somministrazione: la via endovenosa e la via intranasale. Il lavoro di questo progetto è iniziato lo scorso settembre e i primi risultati riguardano la sintesi di un primo lotto di peptide effettuata nei laboratori di Biologia Molecolare dell'Università di Siena. Parte di questo peptide è stato utilizzato per la messa a punto della massima dose di peptide tollerata dall'animale da esperimento (topi

C57BL/6NCr) sia per via endovenosa che intranasale. Inoltre il ceppo di *P. aeruginosa* PA01 che sarà usato per le infezioni acute al CFaCore facility è stato preliminarmente testato per

verificare la sua sensibilità al peptide M33. Ulteriori esperimenti per valutare eventuali inibizioni dell'attività di M33 da parte del siero animale sono attualmente in corso.

8. Biochemical adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients (FFC Project#8/2007, concluded)



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

Molinari A¹, Bernardini ML²

¹Dip. Biochimica e Chimica Organica – Univ. Federico II, NA, ²Dip. Biol. Cellulare e dello Sviluppo – Univ. La Sapienza, Roma

Pseudomonas aeruginosa can establish life-long airways chronic infection in patients with cystic fibrosis (CF) with pathogenic variants distinguished from initially acquired strain. Within the frame of the project, we have analysed chemical and biological activity of *P. aeruginosa* Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs) in clonal strains, including mucoid and non-mucoid phenotypes, isolated during a period of up to 7.5 years from a CF patient. PAMPs as Lipopolysaccharides (LPS) and Peptidoglycan (PGN) fragments are recognised virulence factors and involved in pathways controlling inflammation and host defences. Changing of these bacterial structures may influence host reactions and improve bacterial survival in infected tissues as those of patients with CF. The knowledge of the chemical structure of PGN and LPS at early stage and during chronic colonization combined with the demonstration of their different ability to promote cytokines production is a pivotal step toward the comprehension of the phenomenon of persistence of PA in the airways of CF patients. Chemical structure by MS spectrometry defined lipopolysaccharide (LPS) lipid A and peptidoglycan (PGN) muropeptides with specific structural modifications temporally associated with CF lung infection. Gene sequence analysis revealed novel mutation in pagL which revealed genetical basis of adaptation for lipid A chemical changes. Both LPS and PGN had different potencies when activating host innate immunity via binding TLR4 and Nod1. Significantly higher NF-κB activation, IL-8 expression and production were detected in HEK293hTLR4/MD2-CD14 and HEK293hNod1 after stimulation with LPS and PGN respectively, purified from early *P. aeruginosa* strain as compared to late strains. Similar results were obtained in

IB3-1 cells of CF origin and their isogenic corrected cells (C38). In murine model, altered LPS structure of *P. aeruginosa* late strains induces lower leukocyte recruitment in broncho-alveolar lavage and MIP-2, KC and IL-1 β cytokine levels in lung homogenates when compared with early strain. Histopathological analysis of lung tissue sections confirmed differences between early and late LPS. Finally, in this study for the first time we unveil how *P. aeruginosa* has evolved the capacity to evade immune system detection thus promoting survival and establishing favourable conditions for chronic persistence. Our findings provide relevant information with respect to chronic infections in CF.

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

Nonostante i progressi nel trattamento delle malattie infettive, i microrganismi patogeni rimangono i principali e più importanti agenti pericolosi per la salute umana. Le infezioni del tratto respiratorio con malfunzionamento polmonare sono la causa maggiore di insufficienza respiratoria in fibrosi cistica (FC). La suscettibilità dei pazienti all'infezione è associata ad una attività antimicrobica naturale molto bassa nelle vie aeree, accompagnata a disidratazione ed ipersecrezione di muco. In queste condizioni di patogenicità attecchisce *Pseudomonas aeruginosa*, batterio opportunitista, problema clinico molto rilevante per i pazienti FC. Normalmente, dopo l'infezione il batterio *Pseudomonas aeruginosa* può persistere per decenni e non può essere sradicato da alcuna terapia. La cronicizzazione di *Pseudomonas aeruginosa* 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 bersagli per nuove terapie antibiotiche. La comprensione a livello molecolare di tali meccanismi ha come passo basilare la delucidazione strutturale dei componenti della parete cellulare del batterio, quali lipopolisaccardi e peptidoglicano, con i suoi frammenti che sono fattori di virulenza acclarati ed immediatamente riconosciuti dal sistema immunitario dell'ospite e che provocano infiammazione. Il passaggio da infezione acuta a cronica comporta proprio il camuffamento da parte del microrganismo di questi fattori che provocano l'infiammazione. Infatti, il successo di una infezione cronica è strettamente dipendente dalla soppressione di tutti i meccanismi di rivelazione di tali molecole da parte del sistema immunitario dell'ospite. La soppressione di tale segnalazione è ovviamente dovuta ad un cambio della struttura di queste stesse molecole, essendo la loro biosintesi da parte del batterio ineluttabile. Lo scopo di questo progetto scientifico è stato studiare a livello molecolare, cellulare ed immunologico i cambiamenti chimici della parete cellulare di *Pseudomonas aeruginosa* che gli permettono un passaggio da infezione acuta a cronica. Tale studio, che ha conseguito tutti gli obiettivi posti nella proposta iniziale, rappresenta un primo e importante passo verso la comprensione a livello molecolare dei meccanismi di adattamento del batterio alle vie aeree e quindi un pre-requisito indispensabile per il progetto di qualsiasi terapia farmacologica.

9. Iron uptake and quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* virulence (FFC Project#10/2007, concluded)

Visca P¹, Leoni L²

¹Lab. Microbiologia clinica e Virologia, Dip. Biologia, Università "Roma Tre", ²Lab. Microbiologia molecolare e Biotecnologie dei microrganismi, Dip. Biologia, Università "Roma 3"

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



Pseudomonas aeruginosa is the main cause of lung function decline among patients suffering from cystic fibrosis (CF). The pyoverdine (PWD)-dependent iron uptake and the quorum sensing (QS) cell-cell communication processes represent primary signaling systems controlling the pathogenic potential of this bacterium. Both PWD and QS tune the expression of many *P. aeruginosa* virulence factors and influence biofilm formation, which is essential to the establishment of *P. aeruginosa* chronic infections in the CF lung. The general aim of this project was to gain insights into the molecular mechanisms underlying the *P. aeruginosa* PWD and QS systems, with the final goal of tentatively identify new suitable targets for anti *Pseudomonas*-drug development. First, novel potential transcriptional regulators of PWD production were identified. One of them, the transcriptional factor CysB, was confirmed as a positive regulator of PWD production. Since CysB regulates production of alginate, an important biofilm matrix constituent, this result highlights a possible new link between iron and biofilm. In addition, we investigated the mechanisms of PWD trafficking through the cell envelope. We characterized an efflux system which recycles exogenously acquired PWD from the periplasm to the outside, theoretically allowing *P. aeruginosa* cells to maintain PWD levels at biologically meaningful concentrations with minor energetic costs. 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 demonstrated that RsaL on one hand plays a positive role in biofilm production and antibiotic resistance, 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. Finally, we found that iron starvation increases the expression of the LasR signal receptor, which in turn positively controls PWD production. This result highlights the existence of a link between QS, PWD and iron-dependent gene regulation which deserves future investigations.

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

L'infezione cronica causata da *Pseudomonas aeruginosa* è la principale causa di perdita della funzionalità polmonare nei pazienti affetti da Fibrosi Cistica (FC). L'acquisizione del ferro da parte di questo battero, mediata dalla pioverdina (PWD), e il "quorum sensing" (QS) giocano un ruolo importante nell'infezione cronica, caratterizzata dalla formazione di biofilm. Il biofilm consiste in batteri aggregati ed incapsulati in una matrice polimerica, estremamente resistenti agli antibiotici ed al sistema immunitario dell'ospite. Il presente progetto si è prefisso di studiare in modo approfondito i sistemi PWD e QS, con lo scopo di identificare nuovi possibili bersagli molecolari per lo sviluppo di farmaci anti-*Pseudomonas*.

Il sideroforo PWD, prodotto da *P. aeruginosa* nel polmone FC, è una molecola "navetta" che recapita alla cellula batterica il ferro necessario alla formazione del biofilm. Abbiamo caratterizzato il sistema PvdRT-OpmQ, che serve a riciclare la PWD e riutilizzarla per molti cicli di trasferimento del ferro. Questo meccanismo consente a *P. aeruginosa* di risparmiare l'energia necessaria alla sintesi continua di nuova PWD e indirizzarla verso altri processi importanti per l'infezione. Inoltre, abbiamo scoperto e caratterizzato un regolatore positivo della sintesi di PWD, la proteina CysB, che è anche coinvolta nella produzione di alginate, un importante componente del biofilm. CysB costituisce dunque un ulteriore elemento di connessione tra la risposta alla carenza di ferro e la formazione di biofilm.

Il QS è un sistema di regolazione che si basa sulla secrezione e percezione, da parte di *P. aeruginosa*, di molecole segnale. Tali molecole vengono prodotte nel polmone FC da parte del batterio e regolano la produzione di fattori di virulenza e di biofilm. Abbiamo scoperto che la proteina RsaL controlla l'espressione di centinaia di geni di *P. aeruginosa*, fra cui geni del QS e di virulenza. RsaL, da un lato, permette di mantenere la produzione di fattori di virulenza entro limiti funzionalmente utili e, dall'altro, stimola la formazione del biofilm e aumenta la resistenza agli antibiotici. Questi risultati indicano che RsaL potrebbe svolgere un ruolo importante nell'infezione cronica, che si distingue dall'infezione acuta per la formazione di biofilm e per la limitata produzione di fattori di virulenza. Infine, alcuni risultati preliminari hanno evidenziato una relazione tra QS, PWD e carenza di ferro, apendo la strada a nuovi campi di studio.

10. Prevention of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation by inhibition of cyclic-di-GMP (c-di-GMP) metabolism (FFC Project#13/2009, new)



Paolo Landini, terzo da destra, assieme al suo gruppo di ricerca.

Landini P¹, Seneci P², Bernardi A², Cutruzzolà F³

¹Dipart. Scienze Biomolecolari e biotecnologiche - Università di Milano, ²Dipart. Chimica Industriale e Organica – Univ. Milano,

²Dipart. Chimica Industriale e Organica – Univ. Milano, ³Dipart. Scienze biochimiche – Univ. "La Sapienza", Roma

In CF patients, bacterial colonization of upper respiratory tracts by multispecies biofilms, in which *Pseudomonas aeruginosa* is

the dominant species, can lead to fatal pneumonia. Eradication of bacterial biofilms through conventional antimicrobial therapies is often ineffective, due to their lower sensitivity to antibiotics. High intracellular levels of the c-di-GMP signal molecule stimulate production of extracellular polysaccharides (EPS) and biofilm formation. c-di-GMP is conserved in Bacteria, but not in animal cells, thus making enzymes involved in c-di-GMP metabolism an interesting target for chemical inhibitors. An anti-biofilm molecule could be an important tool in the therapy of lung infections in CF patients either alone or in combination with conventional antibiotics. In a previous project (FFC#9/2006) we have set up a screening assay for inhibitors of c-di-GMP-dependent biofilm formation, and identified two inhibitors of c-di-GMP biosynthesis. Unfortunately, neither inhibitor showed activity on *P. aeruginosa*. We plan to continue our screenings on larger chemical libraries in order to select more inhibitors of c-di-GMP metabolism. These inhibitors will be tested, either alone or in combination with antibiotics currently used in therapy, on a panel of *P. aeruginosa* clinical isolates, in order to test their antimicrobial and anti-biofilm activity and their ability to synergize with conventional antimicrobials. Our goal is to identify a set of biofilm inhibitors, possibly belonging to different chemical classes; these chemical compounds will be tested in inhibition assays of c-di-GMP metabolic enzymes using purified *P. aeruginosa* proteins, namely WspR (able to synthesize c-di-GMP) and Arr (a c-di-GMP-degrading enzyme). Molecular modelling studies will be carried out on

enzyme inhibitors in order to improve their affinity for the target through chemical modifications. We are confident that this approach can lead to the identification of at least 1-2 bona fide inhibitors of either diguanylate cyclases or c-di-GMP phosphodiesterases. We hope that these novel inhibitors could be used in antimicrobial therapy and lead to a significant increase in life expectancy and life quality of CF patients.

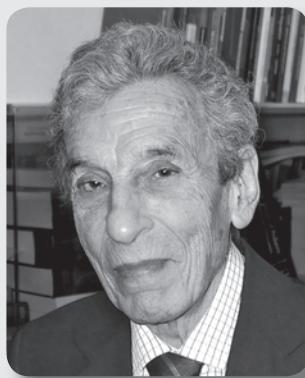
Prevenzione della formazione di biofilm di *Pseudomonas aeruginosa* tramite inibizione del metabolismo della molecola segnale GMP-di-ciclico (c-di-GMP)

Nei pazienti con fibrosi cistica (pazienti CF), l'infezione batterica delle vie respiratorie provoca frequentemente forme molto gravi, e spesso letali, di polmonite. Queste infezioni sono causate in genere da biofilm batterici, in cui il patogeno opportunista *Pseudomonas aeruginosa* svolge un ruolo dominante. Le proprietà fisiologiche dei biofilm batterici li rendono resistenti al trattamento con antibiotici, così da renderne difficile l'eliminazione anche dopo trattamenti

prolungati nel tempo. Un processo legato alla resistenza agli antibiotici e anche al sistema immunitario dell'ospite è la produzione di una massiccia quantità di matrice extracellulare, costituita prevalentemente da polisaccaridi, che avvolge le cellule microbiche nel biofilm. La produzione di questa matrice è fortemente influenzata da una molecola segnale, il di-GMP ciclico (c-di-GMP). Mentre il c-di-GMP è altamente conservato tra i batteri, è totalmente assente nelle cellule animali e quindi nell'uomo. Questo rende le proteine batteriche coinvolte nel metabolismo del c-di-GMP dei bersagli interessanti per il controllo dello sviluppo dei biofilm batterici. In una precedente proposta di ricerca (FFC#9/2006) abbiamo delineato una strategia per la ricerca di inibitori di queste proteine che potesse bloccare la formazione di biofilm, che ci ha portato all'individuazione di due molecole attive ed in grado di inibire la sintesi del c-di-GMP. Purtroppo, nessuna delle due molecole ha mostrato attività su *P. aeruginosa*. A partire dai risultati ottenuti, in questo progetto proponiamo una "filiera" indirizzata alla scoperta di ulteriori molecole in grado di inibire proteine coinvolte nel metabolismo del c-di-GMP e di prevenire la formazione del biofilm in *P. aeruginosa*. Bloccando la formazione del biofilm, queste molecole inibitrici dovrebbero aumentare drammaticamente l'effetto degli antibiotici attualmente usati in terapia.

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

CFTR pathophysiology and therapy of the basic defect



Introduction: balance and perspectives in searching for therapy of the CF basic defect.

Cao A.

Director CNR Institute of Neurogenetics and Neuropharmacology. President Scientific Advisory board of Italian CF Research Foundation.

In the field of pathophysiology and therapy of the basic defect the most important topics, which in part will be presented

and discussed in this session, are the following: regulation of traffic and function of CFTR by its interacting macromolecular complex, elucidation of the mutation-specific molecular mechanism leading to the clinical CF phenotypes, especially for the most common Phe508del mutation, drug-induced functional improvement of mutated CFTR, prospective of gene therapy with viral and non-viral vectors, repopulation of airway epithelium by bone-marrow derived epithelial-like stem cells or genetically self derived stem cells obtained by the induced pluripotent stem cell technology (iPS). Drugs object of intensive investigation are agents that correct the most common Phe508del from the E.R. to the cell membrane (correctors), drugs that increase the function (gating) of mutated CFTR correctly located at the cell membrane (potentiators) and agents that suppress the premature translation termination resulting from in frame stop-codon (approx 10% of the CF mutations). The mechanism of faulty processing of nascent Phe508del CFTR will be presented and discussed by several investigators. **Casavola and Conese** will present interesting results on the interaction of CFTR wild-type and mutated with Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor isoform1 (NHERF1), actin cytoskeleton, tight junctions, ezrin, Rho A and IL-3 in CFBE that illustrate the complexity of the multimolecular network to which CFTR participates. **Luini** in *Saccharomyces cerevisiae* shows that a reduction of CFTR obtained with RNA interference reduces the retention of Phe508del CFTR in E.R. **Vassalli** is going to investigate the structure of CFTR by high resolution atomic force microscopy. The **Pedemonte**'s proposal aims to identify proteins involved in Phe508del CFTR traffic by silencing then with RNA interference. These researches may lead in the future to identify new pathway and targets for pharmacological intervention.

A new field of investigation is proposed by **Pinna** (who published several papers on this topic) who showed that CFTR fragments reproducing the sequence surrounding Phe508del inhibits CK2 (a pleiotropic protein kinase) catalytic activity. However the CFTR fragments investigated have not yet been identified in CF cells. The development of correctors and potentiators is actively pursued by several investigators. Concerning correctors, **Galietta** group are investigating potential inhibitors of HPS70 chaperone identified by computational design and calpain inhibitors that preserves CFTR from digestion thereby favouring CFTR recycling. A phase 2 trial is ongoing with a corrector designated VX809. Regarding potentiators, **Moran and Zegarra** (who published several papers on this topic) have improved their study model especially on the interaction between CFTR and potentiators, **Galietta** group are investigating the potentiators 1,4-dihydropyridines (DHP) and the dual-acting (gating and trafficking) aminoarylthiazoles (AATs) and are setting up studies on stimulation of chloride transport by TMEM16A (a Ca⁺⁺-regulated secretory channel recently discovered).

These investigations especially the exploration of TMEM16A stimulation may lead to develop new useful therapy. A drug belonging to the class of potentiators, denominated VX770, gave promising result in a phase III trial in patients in whom one allele is the Gly551Asp mutation.

A promising targeted therapy for patients with non-sense mutation (10% of CF mutations) by using a drug named PC 124 (Atalase) which suppresses premature translation termination is now in a phase III trial in USA, Canada and Europe. The **Gambari** group (1) published recently a paper on a system for screening correctors of stop-codon mutations.

A different approach is followed by **Zegarra** who is exploring the possibility of using RNAi for reducing the increased activity of ENaC (Sodium-channel), thereby decreasing Na absorption and improving airway hydration. The main problem of RNAi-based approaches is the delivery of this molecule into epithelial cells. Recent studies have investigated antisense oligonucleotides and an antagonist (G5941) for inhibiting ENaC channel with uncertain results.

Finally **Sorio** found difference in membrane depolarization by single cell fluorescence imaging in monocytes from CF homozygotes versus normal with intermediate values in heterozygotes. This research, if confirmed, may lead to develop a new diagnostic procedure.

Regarding gene therapy, the **Cabrini-Conese** group developed a promising new lentiviral vector whereas in UK a clinical trial on a non-viral lipid vector is starting. It seems that the prospective for a gene therapy remain a hope but not a reality.

Recently Wong et al (2) have identified a population of bone-marrow derived epithelial-like cells capable of repopulating injured mouse airway epithelium. This finding as well the development of genetically self identical airway epithelial cells from iPS open the way for cell therapy. Finally a pig model of CF, which will be useful for testing new therapies, has been recently created (3).

In conclusion it seems that the most promising researches with an impact on the clinical management are those related to potential development of correctors, potentiators and suppressor of premature translation.

References

1. Salvatori F, Cantale V, Breveglieri G, Zuccato C, Finotti A, Bianchi N, Borgatti M, Ferriotti G, Destro F, Canella A, Breda L, Rivella S, Gambari R. "Development of K562 cell clones expressing beta-globin mRNA carrying the beta039 thalassaemia mutation for the screening of correctors of stop-codon mutations." Biotechnol Appl Biochem 2009 Jul 9;54(1):41-42
2. Wong AP, Keating A, Lu Wy, Duchesneau P, Wang X, Sacher A, Hu J, Waddell TK. "Identification of a bone marrow-derived epithelial-like population capable of repopulating injured mouse airway epithelium". J Clin Invest 2009 Feb; 119(2):336-48
3. Rogers CS, Stoltz DA, Meyerholz DK, Ostergaard LS, Rokhilna T, Taft PJ, Rogan MP, Pezzullo AA, Karp PH, Itani OA, Kabel AC, Wohlford-Lename CL, Davis GJ, Hanfland RA, Smith TL, Samuel M, Wax D, Murphy CN, Rieke A, Whitworth K, Uc A, Staner TD, Brodgen KA, Shilyansky J, McCray PB, Jr zabner J, Prather RS, Welsh MJ. "Disruption of CFTR gene produces a model of cystic fibrosis in newborn pigs" Science 2008 Sep 26;321(5897):1837-41

Introduzione: Bilancio e prospettive nella ricerca verso terapie del difetto di base CF

Nel campo della fisiopatologia e della terapia del difetto genetico della Fibrosi Cistica, le tematiche più rilevanti, che verranno in parte discusse in questa sessione, riguardano: la regolazione del traffico e della attività del CFTR ad opera di quel complesso multiproteico di cui CFTR fa parte, il meccanismo con cui mutazioni specifiche del CFTR ed in specie la mutazione Phe-506-del determinano il fenotipo clinico, la capacità ed il meccanismo di azione di molecole/farmaci capaci di migliorare il quadro clinico, specie polmonare, della CF, le prospettive di terapia genica con vettori virali e non virali e le possibilità di ripopolare l'epitelio delle vie aeree con cellule staminali epiteliali di derivazione dal midollo osseo o ottenute via induzione con fattori di trascrizione (iPS). I farmaci maggiormente oggetto di indagine agiscono (a) inducendo la proteina Phe-508-del a migrare dal R.E. alla sua sede naturale: la membrana plasmatica anziché venire metabolizzata via digestione proteasomica (correttori); (b) attivando il canale del cloro contenente mutazioni specifiche (potenziatori) (c) sopprimendo i codoni nonsenso, causa del 10% dei casi di CF, e così consentendo la produzione di una proteina completa.

Il meccanismo del difettoso processamento di Phe-508-del CFTR verrà discusso da diversi gruppi. Il gruppo **Casavola-Conese** riporta i risultati della loro indagine su cellule CFBE sui rapporti tra CFTR normale mutato e NHERF1, e il citoscheletro actinico, le giunzioni cellula-cellula, l'ezrina, RhoA e IL-13, che dimostrano la complessità del rapporto tra CFTR ed altre proteine dell'epitelio. **Luini** osserva in *Saccaromices Cerevisiae* che la riduzione di Sar1 (una GTPase coinvolta nel processamento di CFTR) via RNA interferenza riduce la ritenzione di CFTR nel R.E. **Vassalli** infine con microscopio atomico ad alta risoluzione si propone di indagare la struttura in vivo di CFTR. **Pedemonte** vorrebbe identificare le proteine coinvolte nel processamento di Phe-508-del CFTR con RNA interferenza. Queste ricerche potrebbero a lungo termine definire nuovi bersagli terapeutici.

Un campo relativamente nuovo viene aperto dal gruppo di **Pinna** (che ha pubblicato diversi lavori sull'argomento) secondo cui peptidi contenenti le sequenze Phe-508-del interferiscono inibendo l'attività catalitica di CK2 (una proteina-chinasi pleiotropica). Un problema critico è che non conosciamo se questi peptidi vengano prodotti in vivo.

Un altro settore riguarda lo sviluppo di correttori e potenziatori applicabili in clinica. Nel campo dei correttori, vengono riportati interessanti risultati dal gruppo di **Galletta** relativi a inibitori potenziali dello chaperone HSP70 identificati in silico, ed inibitori della calpaina che preservano il CFTR

dalla digestione. Per un correttore denominato VX809 è in corso una sperimentazione di FASE 2.

Per quanto riguarda i potenziatori, **Moran e Zegarra** (che hanno pubblicato diversi lavori sul tema) hanno migliorato il loro modello di studio specie per quanto riguarda l'interazione tra potenziatori e proteina CFTR mutata, mentre **Galletta** sta studiando i potenziatori del gruppo 1, 4-diidropiridinilico (DHP) ed i farmaci con doppia azione (traffico e potenziamento di funzione del canale) del gruppo degli aminoarilitiazoli (AATs) e si propone di studiare vie di stimolazione del trasporto del sodio da parte di TMEM16A (un canale del Cloro Calcio-regolato) di recente identificato. In proposito, occorre menzionare che per un potenziatore, denominato VX770, è in corso una sperimentazione di Fase 3 in pazienti in cui uno degli alleli CF è Gly551Asp. Un campo promettente riguarda la possibilità di correggere il difetto di mutazioni non-senso (che sono causa del 10% circa delle mutazioni CF) con farmaci che sopprimono la terminazione prematura della traduzione. Un farmaco denominato PC 124 (Atalase) è attualmente entrato in Fase III di sperimentazione in USA, Canada ed Europa. Va sottolineato in proposito che il gruppo di **Gambari** (2009) ha pubblicato un lavoro di metodologia per l'identificazione di farmaci correttori degli stop-codon (1).

Un approccio differente è perseguito da **Zegarra**, che esplora il potenziale dell'RNA interferenza per ridurre l'attività di ENaC (canale del Sodio) e così di diminuire il suo assorbimento e migliorare l'idratazione delle vie aeree. Un problema critico è l'introduzione di RNA nell'epitelio polmonare. Ricerche recenti hanno indagato oligonucleotidi antisenso e antagonisti (il G5941) per inibire ENaC con risultati incerti.

Sorio, con studi in fluorescenza in monociti che esprimono CFTR, sarebbe riuscito a differenziare le cellule normali da quelle omozigoti o eterozigoti per il difetto CFTR aprendo interessanti prospettive di diagnosi.

Nel campo della terapia genica il gruppo **Conese-Cabriani** ha sviluppato un nuovo vettore lentivirale promettente, mentre in Inghilterra è stata avviata una sperimentazione con vettore non virale lipidico. Al momento attuale le prospettive di terapia genica rimangono solo una speranza ma non una realtà.

Di recente Wang e coll (2) hanno identificato una popolazione di cellule epitelio-simili di derivazione dal midollo osseo capaci di ripopolare nel topo l'epitelio polmonare danneggiato aprendo interessanti prospettive di terapia cellulare. La produzione di epitelio polmonare geneticamente identico ad uno specifico malato è una via percorribile con l'uso delle cellule staminali indotte (iPS). Finalmente un modello suino di CF (3), che risulterà molto utile per saggiare nuove terapie, è stato di recente creato.

In conclusione le ricerche più promettenti, con impatto possibile sul trattamento clinico, sembra siano oggi quelle relative allo sviluppo di potenziatori, correttori o soppressori della terminazione prematura della traduzione.

11. - Cellular and molecular mechanisms of the actin cytoskeleton involvement in the NHERF1-dependent rescue of deltaF508 CFTR in human airway cells (FFC Project#2/2007, concluded) - Interactome in Cystic Fibrosis: role of NHERF1 in actin cytoskeleton and tight Junction pathophysiology (FFC Project#/2009, extension)



Valeria Casavola, seconda da destra, con il suo gruppo di ricerca.

Casavola V¹, Conese M²

¹Department of General and Environmental Physiology, University of Bari; ²Department of Biomedical Science, University of Foggia

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 (i.e. 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 second year we will evaluate if IL-13 is involved in the mechanism that regulates cytoskeletal and tight junctional organization by NHERF1.

- **Meccanismi cellulari e molecolari di coinvolgimento del citoscheletro di actina nel ripristino di DF508 CFTR da parte di NHERF1 in cellule delle vie aeree umane.**
- **Ripristino della proteina CFTR mutata sulla membrana cellulare: nuovi bersagli terapeutici**

Lo scopo del progetto è quello di identificare i meccanismi cellulari mediante i quali è possibile aumentare la stabilità della proteina mutata F508del CFTR sulla membrana apicale di cellule bronchiolari derivanti da soggetti affetti da Fibrosi Cistica (FC), in modo da aumentarne la funzione secretoria di cloro. È noto dalla letteratura che la proteina mutata F508del

CFTR, “ripristinata” sulla membrana delle cellule bronchiolari mediante il trattamento con “correttori”, ha spesso una vita media molto breve a causa della sua instabilità sulla membrana stessa, dovuta ad una aumentata e rapida internalizzazione, con conseguente diminuzione della secrezione del cloro.

I risultati da noi ottenuti dimostrano che l'aumentata espressione della proteina NHERF1 induce la formazione di un complesso proteico NHERF1-ezrina-actina che aumenta la stabilità della proteina F508del CFTR sulla membrana e, nello stesso tempo, incrementa l'organizzazione dei filamenti di actina al di sotto della membrana plasmatica. Perchè questo accada è importante che NHERF1 possa interagire con la proteina ezrina e che ezrina, a sua volta, interagisca con actina. L'uso, infatti, di proteine mutate che non possono più interagire tra di loro inibisce sia il ripristino della funzione secretoria di cloro che la riorganizzazione dei filamenti di actina. Mediante microscopia confocale abbiamo inoltre osservato che la sovraespressione di NHERF1 nelle cellule bronchiolari induce un aumento dell'organizzazione delle giunzioni strette e in particolare della localizzazione della proteina ZO-1 ad esse associata. Anche in questo caso la mutazione della proteina NHERF1, che la rende incapace di interagire con ezrina, inibisce la riorganizzazione di ZO-1 nelle cellule FC. Analisi biochimiche e morfologiche hanno evidenziato che ezrina, che nelle cellule bronchiolari FC è presente nella forma inattiva (chiusa) nel citoplasma, in seguito a sovraespressione di NHERF1 e alla stimolazione di una piccola proteina RhoA, viene attivata (aperta) e traslocata a livello della membrana. I dati ottenuti nel corso del precedente progetto hanno evidenziato che, nelle cellule da noi utilizzate, la stimolazione di RhoA ripristina la secrezione di cloro. RhoA è anche coinvolta nella riorganizzazione delle giunzioni strette, in quanto bloccando RhoA si ha una loro disorganizzazione e una perdita di funzione. Questi dati permetteranno di verificare in futuro se la proteina RhoA, o dei peptidi coinvolti nella sua attivazione, possano essere usati come “correttori”, in modo da indurre, non solo un incremento del traffico della proteina mutata verso la membrana, ma anche un prolungamento della sua emivita sulla membrana stessa, e contemporaneamente modificare in senso positivo la funzione di barriera delle giunzioni strette nei confronti dei patogeni opportunisti.



Alberto Luini, secondo da destra, con il suo gruppo di ricerca.

Luini A

Department of Cell Biology and Oncology – Consorzio Mario Negri sud (Chieti) (Ora presso Lab.Tigem Telethon, Napoli)

Cystic Fibrosis (CF), an autosomal recessive disorder, is caused by mutations in the chloride transporter called Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator (CFTR) that operates at the cell surface. Most patients carry an allele of CFTR called DF508 (a deletion in the phenylalanine in position 508) that is misfolded and retained in the Endoplasmic Reticulum (ER). Designing of therapeutic measures to allow CFTR to reach the surface requires a thorough knowledge of the retention and transport mechanisms of this protein. Here we have taken a two-pronged approach to study both the mechanisms that retain the protein in the ER and the machineries involved in its transport to the plasma membrane. In the first, to study the machinery involved in the transport of the protein along the secretory pathway we have chosen the wildtype (WT) protein, presuming that the mutant protein once relieved from the retention in the ER would by default follow the pathway taken by the WT protein. To this end we have synchronized the transport

12. Organisation and regulation of the secretory trafficking of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator CFTR and of its pathogenic mutant DF508-CFTR (FFC Project#1/2008, in progress)

of the GFP tagged CFTR in the MDCK cells at a pre-Golgi stage using temperature block and followed its transport to the plasma membrane. Our kinetic studies have shown that the CFTR unlike the classical cargo VSVG (G-protein of the vesicular stomatitis virus) exits the pre-Golgi compartment without any detectable lag characteristic of transport through the Golgi, suggesting that it might follow an unconventional transport through the secretory pathway. Further these experiments also have shown the unlike VSVG, which moves out of the Golgi in visible long range carriers, the transport of CFTR is probably mediated by carriers that have very short range i.e they fuse with the plasma membrane immediately after originating from the Golgi. Further studies at the electron microscopic level are needed to chart out the exact pathway followed by the CFTR.

In the second approach, we have attempted to manipulate the molecular machineries involved in the exit from the ER and the transport of CFTR to the plasma membrane. We started by concentrating on the ER exit machinery, and in particular on Sar1 since this GTPase is involved in both ER exit and the degradation of CFTR in *S.cerevisiae*. Our initial studies with microinjection of dominant negative Sar1 in cells expressing DF508 CFTR revealed that the localization of the mutant CFTR is changed from ER to a post-ER compartment. To further characterize the phenotype we resorted to siRNA mediated knockdown of Sar1 isoforms, which have shown that reduction in the level of Sar1 levels leads to the escape of mutant CFTR from the ER quality control machinery. Now we are in the process of further characterizing this phenotype to identify the molecular machinery that mediates the retention of

the mutated protein in the ER and develop a therapeutic procedure based on this understanding.

Il trasporto di CFTR attraverso la via secretoria

La Fibrosi Cistica (FC) è una malattia autosomica recessiva causata da mutazioni nel gene che codifica per la proteina CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator*), un canale situato nella membrana plasmatica cellulare, che regola il flusso di ioni cloruro. La maggior parte dei pazienti è portatore di una mutazione nel gene CFTR conosciuta come DF508, perché a livello della proteina corrisponde alla delezione della fenilalanina in posizione aminoacidica 508. Questa delezione compromette il corretto ripiegamento della proteina, la quale viene trattenuta nel reticolo endoplasmatico (RE). Il disegno di strategie terapeutiche mirate a favorire l'arrivo di CFTR in membrana plasmatica richiede l'approfondimento della conoscenza, da una parte, dei meccanismi di ritenzione di questa proteina nel reticolo endoplasmatico, e dall'altra, di quelli responsabili del suo trasporto nell'arco della secrezione. Pertanto, il nostro studio è stato indirizzato su queste due vie. In primo luogo, la proteina CFTR priva di mutazioni (wild-type, WT) è stata usata come modello per studiare i meccanismi che sono coinvolti nel suo trasporto, assumendo che la proteina mutata potrebbe adoperare gli stessi meccanismi una volta liberata dal blocco nel reticolo endoplasmatico. Per questo, il trasporto verso la membrana plasmatica della proteina di fusione CFTR-GFP è stato sincronizzato in cellule MDCK mediante un blocco di temperatura che favorisce l'accumulo di CFTR-GFP nel compartimento intermedio (pre-Golgi). Questo approccio ha permesso lo studio della cinetica di trasporto della proteina CFTR wild-type. A differenza di un cargo modello come VSV-G (proteina G del virus della stomatite vescicolare), la proteina CFTR abbandona la sua posizione pre-Golgi senza il classico intervallo di tempo tipico delle proteine che attraversano l'apparato di Golgi lungo la loro via secretoria. Questo fatto

suggerisce che la proteina CFTR non attraversa l'apparato di Golgi ma segue una via non convenzionale di trasporto che coinvolgerebbe, però, la parte terminale del medesimo, dal reticolo endoplasmatico alla membrana plasmatica. Inoltre, questi esperimenti mostrano che la proteina VSV-G esce dall'apparato di Golgi in vettori di lungo raggio, mentre il trasporto della proteina CFTR è probabilmente mediato da trasportatori che hanno un raggio più breve. Una possibile spiegazione potrebbe essere che questi trasportatori originatisi dalla parte terminale dell'apparato di Golgi si fondano immediatamente alla membrana plasmatica. Per chiarire questo punto avremmo bisogno di condurre uno studio a livello ultrastrutturale (microscopia elettronica).

Come secondo indirizzo di questo progetto, abbiamo pensato di esplorare la possibilità di modulare i macchinari cellulari coinvolti a livello della uscita della proteina CFTR dal reticolo endoplasmatico e/o di quelli che ne regolano la localizzazione a livello della membrana plasmatica. In primo luogo, ci siamo concentrati sugli elementi che sono coinvolti nell'uscita generale di proteine dal reticolo endoplasmatico. Una delle proteine chiave per questo processo è Sar1, appartenente alla famiglia delle GTPasi, che regola la uscita ed anche la degradazione della proteina CFTR, almeno nelle cellule di un lievito (*S. cerevisiae*). In esperimenti preliminari, abbiamo visto che l'espressione di una forma mutata di Sar1 (dominante negativo), fa sì che la proteina DF508 raggiunga un compartimento post-reticolo endoplasmatico. Per cercare di capire questo fenotipo, abbiamo deciso di inibire la sintesi delle due isoforme di Sar1. In questi esperimenti, la riduzione dei livelli proteici di Sar1 ha consentito alla forma mutata della proteina CFTR di eludere il controllo di qualità a livello del reticolo endoplasmatico, favorendone l'arrivo alla membrana plasmatica. In questo ultimo periodo stiamo caratterizzando questo fenotipo con l'obiettivo d'identificare il macchinario molecolare mediante cui Sar1 regola l'uscita della proteina CFTR mutata dal reticolo endoplasmatico, e di sviluppare una procedura basata su queste conoscenze per favorire l'arrivo in membrana plasmatica di questa proteina.

13. - Assessing the implication of protein kinase CK2 in cystic fibrosis pathogenesis

(FFC Project#4/2007, concluded)

- Signaling potential of the Δ508 CFTR mutation: a new paradigm to explain nonchannelopathy related aspects of cystic fibrosis (FFC Project#4/2009, extension)



Lorenzo Pinna, primo piano, con il suo gruppo di ricerca.

Pinna LA

Department of Biological Chemistry – University of Padova

- We have found that the functional NBD1 domain of the Cystic Fibrosis Trans-membrane Regulator (CFTR) interacts with the catalytic subunit of a master enzyme committed to the “phosphorylation”, a particular kind of chemical modification 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” (= absence) of the aminoacid F508. Since CFTR with this deletion is rapidly degraded to small fragments, we wanted to check if CFTR fragments reproducing the 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%). On the other hand the same peptides drastically inhibited the catalytic subunit of CK2 whose activity regulates several cellular functions and is exploited by infectious agents for their invasive strategy. The molecular mechanisms by which CFTR-ΔF fragments subvert CK2 activity have been investigated at molecular level. Data suggest that some aspects of CF pathology not related to the loss of CFTR functionality are mediated by CK2. They also provide a novel argument to explain the remarkable frequency of the F508 deletion, found in about 4% of healthy people of European origin, as it might afford the “advantage” to heterozygous of being less susceptible to infectious diseases.

- The by far commonest cause of cystic fibrosis (CF) is a genetic mutation giving rise to the absence (“deletion”) of just one aminoacid, whose code is F508, out of 1480 aminoacids composing altogether the protein termed CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator protein*). This individual deletion is sufficient to destabilize the protein which fails to adopt its correct conformation and is chopped into small pieces (“peptides”) before it can reach the cell membrane where it should play its role as an ion transporter, channelling negatively charged ions across the membrane itself. Some aspects of the CF pathology however are hardly explainable by just the “loss of function” of CFTR as an ion channel, suggesting that the F508 deletion also causes a “gain of functions” reflecting in alterations of some regulatory mechanisms in the cell. Given the implication

of an individual class of enzymes, called "protein kinases", in nearly all signalling pathways we have hypothesized that the activity of some protein kinases might be perturbed by CFTR fragments bearing the F508 deletion. Our preliminary data show that peptides with this feature (at variance with those derived from "normal" CFTR) are able to alter the functional properties of the most abundant and pleiotropic protein kinase, denoted by the acronym CK2. In particular the catalytic activity of this enzyme is either drastically inhibited or, conversely, stimulated by peptides bearing this deletion, depending on the substrate used and on other experimental conditions. Our present aims are the following: i) To unravel the mechanism by which these peptides are generated in CF cells; ii) to investigate how they affect the properties of CK2 and possibly of other similar enzymes committed to cell regulation; iii) To dissect signal transduction pathways which are perturbed owing to the interaction of these peptides with a special class of signalling proteins ("kinases"); iv) To disclose links between the perturbed pathways and some CF manifestations (e.g. inflammation) hardly accounted for just by lack of functional CFTR. Shedding light on these issues will allow to detect new druggable targets and to design novel therapeutic strategies.

- Ruolo della protein chinasi CK2 nella patogenesi della FC

- La mutazione dellF508 di CFTR come sorgente di segnali cellulari: un nuovo concetto per spiegare alcuni aspetti della Fibrosi Cistica

- Abbiamo osservato che il dominio funzionale NBD1 di CFTR ("cystic fibrosis transmembrane regulator") interagisce con la subunità catalitica di un enzima fondamentale deputato alla "fosforilazione" (una particolare modifica chimica) 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 è un'instabilità che ne causa una prematura degradazione, abbiamo esaminato se frammenti di CFTR attorno all'aminoacido critico (F508) influenzano l'attività di CK2. E' risultato che i peptidi con la delezione patologica 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 consentendo una riduzione della quota di CFTR con delezione di F508 che viene distrutta dalla cellula (normalmente circa il 99%). D'altra parte gli stessi peptidi inibiscono drasticamente le

sub-unità catalitiche di CK2, la cui attività controlla numerose funzioni cellulari ed è utilizzata da agenti patogeni per le loro strategie invasive. I meccanismi mediante i quali frammenti di CFTR patologica alterano l'attività di CK2 sono stati indagati a livello molecolare. I risultati suggeriscono che alcuni aspetti della patologia CF non correlabili alla carente funzionalità di CFTR possano essere causati da alterazioni di attività di CK2. Le nostre osservazioni inoltre potrebbero contribuire a spiegare la sorprendente diffusione della delezione di F508, trovata in circa il 4% delle popolazioni di origine europea, in quanto tale delezione conferirebbe il "vantaggio" (nei portatori eterozigoti) di una minore suscettibilità a certe epidemie infettive dovuta ad una ridotta disponibilità di CK2 attivo.

- La causa di gran lunga più frequente di Fibrosi cistica (FC) è una mutazione genica che provoca la mancanza ("delezione") di un singolo aminoacido, la cui sigla è F508, su un totale di 1480 aminoacidi complessivi che costituiscono una proteina denominata CFTR ("Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator protein"). Questa singola delezione è sufficiente a far sì che CFTR sia incapace di assumere una conformazione funzionale e venga quindi demolita in piccoli frammenti ("peptidi") nella cellula invece di essere trasportata alla membrana dove dovrebbe svolgere il suo ruolo di trasportatore ("canale") di certi ioni attraverso la membrana stessa. Alcuni aspetti della FC tuttavia non sono facilmente spiegabili con la sola mancanza di funzionalità di CFTR quale canale ionico e suggeriscono che la delezione di F508 comporti anche la comparsa di nuove funzioni che alterano il decorso di alcuni meccanismi di regolazione cellulare. Dato il ruolo fondamentale di una categoria di enzimi chiamati "protein chinasi" (PK) in tutti i processi di trasmissione di segnali biologici, abbiamo considerato l'ipotesi che l'attività di alcuni di questi enzimi possa venire perturbata da frammenti di CFTR con la delezione di F508. I nostri dati preliminari mostrano che peptidi con queste caratteristiche (a differenza di quelli che derivano da CFTR "normale") sono in grado di modificare profondamente alcune proprietà funzionali del più diffuso ed importante enzima di questa categoria, noto con la sigla CK2. In particolare l'attività catalitica di questo enzima nei confronti dei suoi numerosi substrati viene drasticamente inibita o viceversa stimolata dai peptidi con questa delezione, a seconda del substrato considerato e di altre condizioni sperimentali. Ci proponiamo ora: i) di capire se e con quale meccanismo questi "peptidi" vengono generati nelle cellule dove CFTR ha la mutazione patologica; ii) di chiarire in quale modo essi alterano l'attività e le proprietà di CK2 e forse anche di altri analoghi enzimi regolatori della cellula; iii) Di identificare quali vie di trasduzione del segnale sono perturbate in seguito all'interazione di questi peptidi con la/le chinasi; iv) Di individuare possibili collegamenti tra l'alterata funzionalità degli enzimi esaminati ed alcune manifestazioni della FC (per es. l'inflammazione) difficilmente spiegabili con la semplice mancanza del canale ionico CFTR funzionante. Il chiarimento di questi aspetti consentirà di scoprire nuovi bersagli utili per un intervento farmacologico e di escogitare nuove modalità di trattamento della malattia.



Mauro Mazzei, seduto al centro, e il suo gruppo di ricerca.

Mazzei M¹, Melloni E², Moro S³, Galietta LJV⁴

¹Dipartimento Scienze Farmaceutiche, Università di Genova;

²Dipartimento Medicina Sperimentale, Università di Genova;

³Dipartimento Scienze Farmaceutiche, Università di Padova;

⁴Lab. Genetica Molecolare, Istituto Giannina Gaslini, Genova

14. Computational design, biochemical study, synthesis and screening of pharmacological chaperones as correctors of ΔF508-CFTR (FFC Project#3/2007, concluded)

The correctors of ΔF508-CFTR are organic molecules with low molecular weight able to improve the trafficking of ΔF508-CFTR from endoplasmic reticulum to plasma membrane. Until now, few substances able to correct the basic defect of ΔF508-CFTR have been found. Moreover, the use of such correctors to treat Cystic Fibrosis is hampered by their toxicity. In the present study, we try to find new correctors by the following research lines:

1) Recognition of pharmacophores present in already known correctors: our attention was pointed at some correctors (in particular NS004, VRT-532 and 4a) as they have in analogous positions of their structure, some molecular moieties very similar each other (p-chlorophenol, p-cresol and p-chloroanisole). Great attention was paid to p-chloroanisole derivatives as such group is also present in the drug Glibenclamide (GL), well known CFTR blocker. Since 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 changing the moiety responsible for the acidity that, by binding to basic aminoacids of CFTR, determines the blockade of the channel. The pharmacological assays done using the synthesized substances do not show a clear sign of correction.

2) Synthesis of heterocycles structurally related to known correctors: as correctors VRT-532 and 4a hold, respectively, a pyrazole group and two thiazole groups, some new derivatives containing such heterocycles have been prepared. Pyrazole derivatives were found inactive, whereas until now, we do not have biological results for thiazole derivatives.

3) Computational design: this part is dealing with the study of inhibitors of the HSP70 chaperone starting from a set of molecule already synthesized in our laboratory. Therefore, 544 virtual molecules were docked in a hydrophobic binding pocket of HSP70 and a new class of compounds (namely, 7-hydroxycoumarin derivatives) merged as potential inhibitors of HSP70. On such compounds the research must go on with the chemical synthesis.

4) Biochemical study: at first, HSP90 chaperone was studied in FRT cells transfected with wt- and ΔF508-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 ΔF508-CFTR. Calpain (CA) is a protease activated when the levels of Ca⁺⁺ are high. We noted that CA hydrolyzes both wt- and ΔF508-CFTR. Remarkably, preliminary data with CA inhibitors seem preserve CFTR from digestion, favouring the CFTR recycling.

Disegno computazionale, studio biochimico, sintesi e screening di chaperoni farmacologici quali correttori della ΔF508-CFTR

I correttori della DF508-CFTR sono molecole organiche a basso peso molecolare che hanno la capacità di far maturare la DF508-CFTR e

farla arrivare in membrana. Fino ad oggi abbiamo poche sostanze in grado di correggere il difetto di base della DF508-CFTR ed inoltre il loro utilizzo nella cura della Fibrosi Cistica risulta ostacolato dalla loro tossicità. Nella presente ricerca ci proponiamo di trovare nuovi correttori della DF508-CFTR seguendo le seguenti linee:

1) Individuazione di farmacofori (trasportatori di farmaci) presenti nei correttori già conosciuti: abbiamo rivolto la nostra attenzione ad alcuni correttori (in particolare NS004, VRT-532 e 4a) in quanto presentano, in posizioni analoghe nella molecola, delle strutture tra loro simili (p-clorofenolo, p-cresolo e p-cloroanisolo). Particolare attenzione è stata data ai derivati del p-cloroanisolo, in quanto tale gruppo è 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 è il responsabile del blocco della CFTR. I saggi farmacologici sulle sostanze sintetizzate non hanno evidenziato segni di correzione.

2) Sintesi di eterocicli strutturalmente correlati ai citati correttori: poiché i correttori VRT-532 e 4a contengono rispettivamente un gruppo pirazolico e due gruppi tiazolici, sono stati preparati dei nuovi derivati contenenti detti eterocicli. I derivati pirazolici si sono dimostrati inattivi mentre non si hanno ancora risultati per i derivati tiazolici.

3) Disegno computazionale: questa parte ha riguardato lo studio di inibitori di HSP70 (molecola centrale alla maturazione della CFTR mutata nel reticolo endoplasmico della cellula) utilizzando un set di otto molecole da noi sintetizzate in precedenza. Da questo gruppo iniziale sono state ottenute 544 molecole virtuali che sono state sottoposte a docking in un sito idrofobico di HSP70. Abbiamo così individuato una classe di derivati della 7-idrossicumarina quali potenziali inibitori di HSP70. Su tale classe la ricerca proseguirà con la sintesi chimica.

4) Studio biochimico: dapprima è stato studiato il chaperone HSP90 (chaperoni sono gli "accompagnatori" della proteina CFTR nel suo processo di maturazione) in cellule FRT trasfettate con wt (CFTR normale)- e DF508-CFTR. Come inibitore è stata usata la Geldanamicina. Non sono state notate differenze tra le cellule trattate ed i controlli. Più interessante si è rivelato l'approccio enzimatico. E' noto che 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. Gli inibitori della CA preservano la CFTR dalla digestione e quindi ne favoriscono il riciclo.

15. Direct visualization of CFTR conformation by atomic force microscopy imaging (FFC Project#6/2009, new)



Massimo Vassalli, primo da destra, e il suo gruppo di ricerca.

Vassalli M¹, Marasini C¹, Zegarra O², Moran O¹

¹Istituto Biofisica, CNR – Genova, ²Laboratorio di Genetica Molecolare, Istituto Giannina Gaslini, Genova

Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) is a protein constituting a chloride ion channel present in epithelial cell membranes. Mutations of the CFTR gene are responsible for the lack in functionality of the chloride ion channel leading to cystic fibrosis.

The project proposes the application of high resolution atomic force microscopy (AFM) imaging to study CFTR channels in

cellular membranes. This tool will permit to address two different problems at structural level. First is the interest in finding more detailed information about the CFTR structure itself, in particular on the relative positioning of the functional domains. In addition we will include attempting to directly determine the stoichiometry of the protein, evaluating if the channel is formed by a single protein or it has a multimer (dimer) nature. Thus, we will investigate the possibility to reveal structural differences in the channel between functional states. This step will open for future, deeper, studies on functional aspects.

The homology molecular model of the CFTR protein allows to predict the dimensions of the intracellular domains of the channel being about 10nm to 30nm width, that is within the resolution of AFM. Previously AFM studies show that this instrument permits to obtain information about the CFTR molecular structure using high resolution imaging techniques.

High resolution AFM imaging is expected to provide direct detailed information on the channel structure, also refining some previous results obtained in literature with a similar approach and it could be used to understand the possible mechanism of action of putative drugs interacting with CFTR.

Visualizzazione della struttura della CFTR con tecniche di microscopia a forza atomica

La CFTR (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) è una proteina che costituisce un canale ionico per il cloro, presente nella

membrana di cellule epiteliali. Mutazioni del gene della CFTR sono responsabili delle perdite di funzionalità del canale ionico per il cloro, che conducono alla fibrosi cistica. Il progetto, avviato a settembre 2009, propone l'applicazione di tecniche di microscopia a forza atomica (AFM) ad alta risoluzione allo studio dei canali CFTR in membrana. Questa tecnica sperimentale può contribuire in maniera significativa alla determinazione della struttura stessa della CFTR, permettendo

di avere maggiori informazioni in merito alla posizione relativa dei domini funzionali e, al tempo stesso, estrarre informazioni di carattere stechiometrico, ovvero valutare se la proteina funzionale in membrana sia costituita da un monomero o abbia invece un'organizzazione multimerica (dimero). Infine, in via sperimentale, verrà indagata la possibilità di rivelare differenze strutturali nel canale in differenti stadi funzionali.



Luis Galietta, primo da sinistra, e il suo gruppo di ricerca.

Galietta JLV¹, Millo E², Mazzei M³

¹Lab. Genetica Molecolare - Istituto G. Gaslini - Genova,

²Dipart. Medicina Sperimentale - Lab. Biochimica - Università degli Studi di Genova, ³Dipart. di Scienze Farmaceutiche - Università degli Studi di Genova

The correction of chloride transport defect is considered one of the most important goals for the therapy of cystic fibrosis (CF). In our project, we are considering two different targets: the mutant CFTR protein and the novel protein TMEM16A. The basic defect caused by CF mutations belonging to class 2 (essentially F508del) and to class 3 (for example G551D) can be corrected by drug-like molecules that restore the maturation and function of the mutant CFTR protein. These molecules are called correctors and potentiators, respectively. We are focusing our research on two families of chemical compounds: 1,4-dihydropyridines (DHPs), as potentiators, and aminoarylthiazoles (AATs), as "dual-acting" compounds. In particular, the development of compounds with dual activity, acting as correctors and potentiators, is a new concept in CF. AATs are able to ameliorate the gating and trafficking defect caused by the F508del mutation. The final goal is to develop DHPs and AATs with high efficacy and selectivity for

16. Development of small molecules to correct the defective chloride transport in cystic fibrosis (FFC Project#2/2009, extension FFC Project#3/2006)

preclinical evaluation in animal models and subsequent clinical studies. We are also considering TMEM16A as an alternative pharmacological target. The TMEM16A protein is involved in chloride transport but, differently from CFTR, it is not mutated in CF patients. Therefore, pharmacological stimulation of TMEM16A may represent an interesting strategy to correct the basing defect in CF.

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

La correzione del difetto di trasporto di cloruro è considerato un obiettivo molto importante per la terapia della fibrosi cistica (FC). Per il nostro progetto abbiamo preso in considerazione due diversi bersagli: la proteina CFTR mutata e la nuova proteina TMEM16A. Il difetto di base causato dalle mutazioni FC appartenenti alla classe 2 (in pratica la mutazione F508del) e alla classe 3 (per esempio G551D) può essere corretto da molecole con proprietà farmacologiche in grado di ripristinare la maturazione e la funzione della proteina CFTR mutata. Queste due classi di molecole sono state chiamate rispettivamente correttori e potenziatori. La nostra ricerca si sta concentrando su due famiglie di composti chimici: le 1,4-dihidropiridine (DHP) come potenziatori e gli aminoarilthiazoli (AAT) come sostanze con duplice azione, correttori e potenziatori. In particolare lo sviluppo di composti con azione duplice, in grado cioè di funzionare sia da correttori che da potenziatori, è un concetto nuovo per il trattamento del difetto di base nella FC. Gli AAT sono in grado di migliorare sia il difetto di attività sia quello di maturazione della proteina CFTR causati dalla mutazione F508del. L'obiettivo finale è quello di generare DHP e AAT con elevata efficacia e selettività per valutazioni precliniche su modelli animali e per successivi studi clinici. Stiamo considerando anche TMEM16A come bersaglio farmacologico alternativo. La proteina TMEM16A è anch'essa coinvolta nel trasporto di cloruro ma, a differenza di CFTR, non è mutata nei pazienti FC. Pertanto la stimolazione farmacologica rappresenta una strategia interessante per correggere il difetto di base nella FC.

17. Functional and structural basis of the molecular mechanism of CFTR potentiators (FFC Project#2/2008, in progress)



Oscar Moran, secondo da destra, e il suo gruppo di ricerca.

Moran O¹, Zegarra O², Galfré E¹, Galeno L¹, Ferrera L², Melani R²

¹Istituto di Biofisica - CNR, Genova, ²Laboratorio di Genetica Molecolare, Istituto Giannina Gaslini, Genova

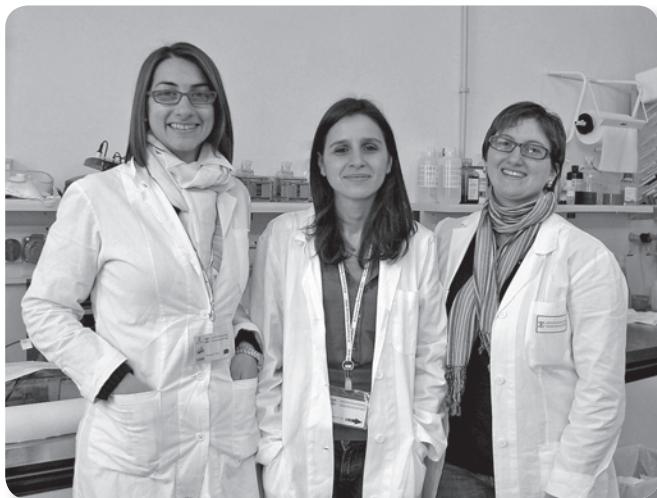
In recent years, it has been proposed the idea of developing drug therapies for cystic fibrosis to correct many of the dysfunctions produced by CFTR mutations. The aim is recovering of CFTR protein function by the use of chemical compounds called potentiators, that act directly on the protein. The understanding of molecular mechanisms of potentiators has a key role in rational design and optimization of suitable drugs. In this project, using theoretical and computational methods we have proposed molecular models of drug binding to CFTR and hypotheses of the mechanism of action of these substances. These proposals have been evaluated experimentally using different methods, including functional electrophysiological measurements and structural biology experiments using recombinant proteins, successively characterized by biochemical and biophysical techniques.

This approach allowed us to formulate a model of interaction between potentiators and CFTR that provides a quantitative description for the study of the action of these drugs. This model is constantly evolving as new data are available. In the last year we have focused our efforts in studying functional CFTR site-specific mutations, not only to confirm the binding site of potentiators hypothesis, but also to analyse in detail the nature of the interaction (electrostatic or hydrophobic) between the drug and the protein. The analysis of single channel kinetics, and its modification by potentiators, help to improve the model of the mechanisms of action of drugs on the single molecule. On the other hand, we have optimised the preparation of some CFTR domains, which are used for biochemical and spectroscopic studies, and are going to be utilized for small angle X-rays scattering experiments with synchrotron light, to determine conformational changes of the protein induced by potentiators. The improvements to the proposed molecular models are useful not only to have a better framework for the development of drugs to treat cystic fibrosis, but also for a better understanding of the pathophysiology of the disease.

Basi funzionali e strutturali del meccanismo molecolare dei potenziatori della CFTR

Negli ultimi anni è maturata l'idea di sviluppare terapie farmacologiche per la fibrosi cistica che correggano molte delle disfunzioni prodotte dalle mutazioni della CFTR. L'obiettivo è il recupero della funzionalità della proteina CFTR mediante l'uso di composti chimici che agiscano

direttamente sulla proteina, chiamati potenziatori. La comprensione del meccanismo molecolare dei potenziatori ha un ruolo fondamentale nel disegno razionale e nella ottimizzazione di farmaci adeguati all'uso terapeutico. Nell'ambito di questo progetto, mediante metodi teorici e computazionali, si propongono modelli molecolari del legame dei farmaci alla CFTR ed ipotesi del meccanismo d'azione di queste sostanze. Queste proposte sono successivamente valutate sperimentalmente con metodi diversi, che comprendono misure funzionali mediante tecniche elettrofisiologiche ed esperimenti di biologia strutturale, utilizzando proteine ricombinanti che vengono caratterizzate con metodi biochimici e biofisici. Questo approccio ci ha permesso di formulare un modello di interazione tra i potenziatori e la CFTR, che fornisce una descrizione quantitativa per lo studio dell'azione dei potenziatori. Questo modello è in continua evoluzione man mano che nuovi dati sono disponibili. Nell'ultimo anno abbiamo concentrato i nostri sforzi nello studio funzionale di mutazioni sito-specifiche introdotte nella CFTR in modo non solo di confermare l'ipotesi del sito di legame dei potenziatori, ma anche di analizzare in dettaglio la natura dell'interazione (elettrostatica o idrofobica) tra il farmaco e la proteina. Esperimenti di analisi della cinetica di singolo canale, e la sua alterazione da parte dei potenziatori, ci permette di migliorare il modello d'azione del farmaco sulla singola molecola. D'altra parte, abbiamo messo a punto la preparazione di alcuni domini della CFTR che sono utilizzati per studi biochimici e spettroscopici e saranno impiegati nell'analisi strutturale per dispersione di raggi-X con luce di sincrotrone, in modo da determinare i cambiamenti conformazionali della proteina indotti dai potenziatori. I miglioramenti del modello molecolare proposto serviranno non solo ad avere un quadro di riferimento ottimizzato per lo sviluppo di farmaci per la terapia della fibrosi cistica, ma anche per una miglior comprensione della fisiopatologia della malattia.



Nicoletta Pedemonte, a destra, con collaboratrici.

Pedemonte N

Lab. Fisiopatologia Molecolare dei Canali Ionici - Centro Biotecnologie Avanzate, Genova

Cystic fibrosis (CF) is a severe hereditary disease caused by mutations that abolish the function of a membrane protein (named CFTR) needed to transport chloride ions. CF is a relatively frequent and highly invalidating disease that requires a multidisciplinary and intensive approach. Nevertheless, the current treatments, that have prolonged patient life, are not designed to correct the basic defect, but focused on preventing and treating its consequences: the airway bacterial colonization (antibiotic therapy), the mucociliary clearance deficit (daily physiotherapy), the intestinal malabsorption (nutritional therapy). The development of novel therapeutic strategies, focused on the basic defect, represents a priority for the improvement of life conditions of CF patients, as they would consent to stop the progression of the disease. Several studies have revealed the existence of chemical compounds able to restore, at least partially, the function of mutant CFTR. However, the development of new drugs requires a better understanding of the cellular

18. Dissection by RNAi-mediated silencing of molecular mechanisms leading to F508del-CFTR (FFC Project#3/2009, new)

processes responsible for the fate of the mutant protein and its possible rescue. The primary objective of our project is to study F508del, the most frequent mutation among CF patients. We will investigate the mechanisms through which F508del stops the synthesis and maturation of CFTR protein. To this aim we will make use of a new, potent technology, called RNA interference. Using this tool we will be able to selectively silence one-by-one each gene (and the relative protein), and to evaluate the effect on the maturation of mutant CFTR protein. This will allow us to identify new proteins that will constitute the target of treatments with improved efficacy and selectivity.

Dissezione mediante silenziamento genico mediato da RNA dei meccanismi molecolari che determinano il difetto di maturazione di F508del-CFTR

La fibrosi cistica (FC) è una grave malattia ereditaria causata da mutazioni che provocano la perdita di funzione di una proteina di membrana (chiamata CFTR) che serve per il trasporto di ioni cloruro. La FC è una malattia relativamente frequente ed altamente invalidante che richiede un approccio multidisciplinare ed intensivo. I trattamenti attuali, che hanno allungato la vita media dei pazienti, non consentono tuttavia di correggere il difetto di base, ma cercano di prevenirne e combatterne le conseguenze: la colonizzazione batterica delle vie aeree (terapia antibiotica), il deficit di clearance mucociliare (fisioterapia giornaliera), il malassorbimento intestinale (terapia nutrizionale). La messa a punto di nuove strategie terapeutiche, mirate a correggere il difetto di base, rappresenta una priorità assoluta per il miglioramento delle condizioni di vita dei pazienti FC, in quanto consentirebbero di fermare la progressione della malattia. Diversi studi hanno dimostrato che esistono composti chimici in grado di ripristinare, seppur parzialmente, la funzione della proteina CFTR mutata. Tuttavia, prima di poter sviluppare nuovi farmaci occorre una migliore comprensione dei processi cellulari che determinano il destino della proteina mutata ed il suo eventuale recupero. Il nostro

progetto ha come obiettivo primario lo studio di F508del, la mutazione più frequente tra i pazienti FC. Ci proponiamo di studiare i meccanismi con i quali questa mutazione arresta la sintesi e maturazione della proteina CFTR. A questo scopo ci avvarremo di una nuova tecnologia, molto potente, chiamata "interferenza genica mediata da RNA". Con questo strumento ci

sarà possibile spegnere selettivamente un gene (e la relativa proteina) per volta, valutandone gli effetti sulla maturazione della proteina CFTR mutata. Questo ci consentirà di identificare nuove proteine coinvolte in questi processi che costituiranno il bersaglio per trattamenti più efficaci e selettivi.

19. Strategies for the suppression of Na⁺ and fluid hyperabsorption in cystic fibrosis airway disease (FFC Project#7/2009, new)



Olga Zegarra, al centro, con due collaboratrici.

Zegarra O

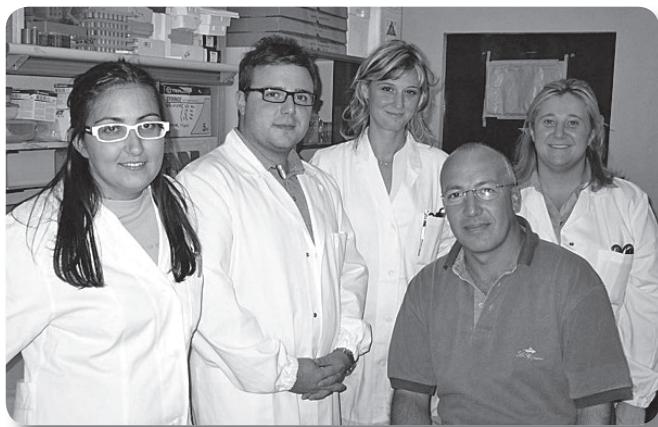
Lab. Genetica Molecolare – Ist. G. Gaslini – Genova

The most serious problem experienced by CF patients is the airway disease, characterised by increased viscosity of mucus with subsequent infection and colonization of the lungs. These conditions are all consequences of airway dehydration. Mutated CFTR caused not only a reduction of chloride and water secretion, but also an increase in sodium and water absorption that resulted mostly from an increased activity of the epithelial sodium channel ENaC. In consequence, ENaC hyperactivity importantly contributes to airways dehydration. To ameliorate this situation it is necessary either to increase Cl⁻ secretion or to reduce sodium absorption. Aiming at reducing the excessive water absorption, we have recently used small molecules called short interference RNA (siRNA) that enter the cell and cause a reduction in the expression of ENaC subunits. We found that this approach caused a partial reduction of sodium absorption *in vitro*, demonstrating that it is possible to increase the hydration of the airways by using siRNA. The present project aims to achieve a better inhibition of ENaC by combining siRNA against ENaC with siRNA against the enzymes (proteases) that activate ENaC. In addition, we will extend the study to CF cells complementing siRNA for ENaC with potentiators of that class of CFTR mutations (clas III) that allow the protein to reach the membrane. We expect that potentiators will help to hydrate the

airways not only by permitting secretion through the mutated CFTR, but also inhibiting ENaC as wild type CFTR does. We will also study which other proteins are involved in water absorption (the amiloride-insensitive absorption is calculated to be about 30%) because they can be also therapeutical targets. Finally, we will try to find the conditions to succeed in transferring siRNAs into the epithelium, a difficult aspect that needs to be solved before a siRNA approach could be applied to patients.

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

Il maggiore problema che presentano i pazienti colpiti da fibrosi cistica (FC) riguarda la compromissione delle vie aeree, dove un'aumentata viscosità del muco promuove le infezioni e la colonizzazione batterica del polmone. Questa condizione è conseguente sia al difetto di funzionamento del canale del cloro CFTR sia all'iperfunzionamento del canale del sodio epiteliale ENaC, che portano quindi all'eccessivo assorbimento di sodio e acqua, e quindi ad una idratazione insufficiente delle vie aeree. Infatti, le mutazioni della CFTR causano non solo una ridotta secrezione di cloruro ma, rompendo l'equilibrio idrico dell'epitelio, anche un aumentato assorbimento di sodio ed acqua. Per risolvere questo problema è necessario quindi aumentare la secrezione di cloruro o ridurre l'assorbimento di sodio. Noi abbiamo usato recentemente delle piccole molecole chiamate "RNA d'interferenza" (siRNA), le quali, penetrando nella cellula portano ad una diminuzione nell'espressione dell'ENaC. Il risultato di questo trattamento è stato una parziale riduzione dell'assorbimento d'acqua nell'epitelio *in vitro*, dimostrando come sia possibile migliorare l'idratazione delle vie aeree tramite l'uso dei siRNA. Questo progetto si propone di accentuare l'inibizione dell'ENaC aggiungendo al trattamento diretto contro l'ENaC, altri siRNA per diminuire anche l'espressione di enzimi (proteasi) che attivano ENaC. Estenderemo lo studio a cellule FC con mutazioni che permettano alla CFTR di arrivare in membrana, usando, assieme ai siRNA per l'ENaC, anche dei potenziatori. Pensiamo che i potenziatori della CFTR possano contribuire all'idratazione delle vie aeree attraverso due meccanismi, aumentando la secrezione attraverso la proteina mutata e anche inibendo l'attività dell'ENaC, come fa di norma la CFTR nativa. Ci proponiamo anche di studiare quali siano le proteine insensibili all'amiloride, che assieme all'ENaC sono coinvolte nell'assorbimento dell'acqua nell'epitelio e che si calcola possano essere responsabili del 30% dell'assorbimento di fluido. Queste proteine potrebbero essere altrettanti bersagli terapeutici per migliorare la malattia respiratoria nella FC. Come ultimo punto, cercheremo le condizioni per poter trasferire i siRNA nell'epitelio polarizzato, impresa difficile ma che deve essere risolta per potere trasferire la tecnica sui pazienti.



20. Functional evaluation of CFTR in blood leukocytes in human subjects as a new tool for diagnostic and clinical research applications (FFC Project#5/2009, new)

Sorio C¹, Melotti P², Buffelli MR³

¹Dip. Patologia - Sez. Patologia generale - Università di

20. Claudio Sorio, in primo piano, con il suo gruppo di ricerca.

Verona, ²Centro Reg. FC – AO Verona, ³Dipartimento di Scienze Neurologiche e della Visione- Università di Verona

Background: The evaluation of functional CFTR to assess new therapies and define diagnosis of atypical cases in cystic fibrosis (CF) is cumbersome and practicable only for selected subjects in few centers. It is known that leucocytes express detectable levels of CFTR. We investigated the possibility to assess CFTR activity in leucocytes obtained from healthy subjects or patients with cystic fibrosis ex vivo.

Preliminary results: We detected CFTR expression in leukocytes by immune-chemical techniques. We measured CFTR functional activity measuring cell membrane depolarization by single-cell fluorescence imaging using the potential-sensitive probe bis-(1,3-diethylthiobarbituric acid) trimethine oxonol (DiSBAC₂) in monocytes isolated from non-CF donors (non-CF), heterozygous subjects (HTZ) and CF patients. We found that, upon stimulation, only non-CF and, to a lesser extent, HTZ monocytes showed an increase in fluorescence signal while monocytes from CF patients failed to respond. In comparison, we measured Nasal Potential Difference (NPD) in selected subjects obtaining overlapping results.

The project: Our project aims to evaluate the potential of this approach as a tool capable to overcome current limitations of NPD, a method utilized in few specialized centers, to assess CFTR activity for application in basic/translational research, drug development and diagnostic applications.

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

La valutazione dell'attività del canale difettoso (CFTR) in fibrosi cistica (FC) per valutare l'efficacia di nuove terapie e per definire la diagnosi dei casi atipici di FC è complessa ed attualmente praticabile in pochi centri e solo in particolari soggetti. E' noto che alcune cellule del sangue (leucociti) esprimono livelli misurabili di CFTR. Abbiamo identificato la presenza di CFTR nei monociti mediante tecniche immunochimiche. Per determinare l'attività di CFTR in monociti di donatori sani, soggetti portatori sani FC e pazienti FC abbiamo misurato, avvalendoci di microscopia a fluorescenza su singola cellula, la differenza di potenziale della membrana mediante una sonda chimica sensibile ai cambiamenti di potenziale. Abbiamo ottenuto risultati sovrappponibili confrontando, negli stessi soggetti, queste misurazioni con la misura della differenza dei potenziali nasali (NPD), valutata con un test già riconosciuto come valido aiuto a fini diagnostici e per sperimentazione di nuovi farmaci. Ci proponiamo quindi di valutare la potenzialità di questo nuovo approccio allo studio funzionale di CFTR nei pazienti. Lo studio dei leucociti potrebbe permettere di superare alcune importanti limitazioni delle sofisticate metodiche attualmente impiegate allo stesso scopo (misurazioni di correnti in biopsie rettali, NPD). Queste metodiche risultano infatti disponibili solo in pochi centri molto specializzati e per pazienti adeguatamente selezionati, richiedendo in alcuni casi procedure invasive. Una volta validata, la metodica da noi proposta (FFC Project#7/2009, new) potrebbe essere utilizzata, oltre che per scopi diagnostici, per ricerca di base e per lo studio dell'efficacia clinica di nuovi farmaci.

3. MICROBIOLOGIA II

Microbiology II



Alessandra Bragonzi, al centro, con il suo gruppo di ricerca.

Bragonzi A¹, Bertoni G², Bianconi I¹

¹Divisione di Immunologia, Trapianti e Malattie infettive – Istituto San Raffaele, Milano, ²Dipartimento di Scienze Biomolecolari e Biotecnologie, Università degli studi di Milano

High incidence, severity and increasing antibiotic resistance characterize *P. aeruginosa* chronic lung infections in CF patients, highlighting the need of new therapeutic options. Vaccination strategies to prevent or limit *P. aeruginosa* infection represent a rational approach to positively impact the clinical status of CF patients. The rationale of this project is to validate novel vaccine candidates of *P. aeruginosa*, selected by integrated genomic approaches for their immunogenic potential as it was done previously in other relevant bacterial pathogens. Under previous grants (FFC#8/2003; FFC#8/2006), we have defined phenotypic traits of *P. aeruginosa* and identified novel vaccine candidates on the basis of their putative localization on the cell surface by "reverse vaccinology". To this aim, we have applied a combination of advanced genomic approaches such as i) transcriptomics through DNA micro-array, ii) functional genomics through antisense technology (FFC#6/2006), iii) functional genomics through insertion mutagenesis, iv) bioinformatics. On the whole, these

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

(FFC Project#10/2009, extension FFC Projects#8/2003 and FFC#8/2006)

genome-wide screenings have generated gene functions involved in host/pathogen interactions and identified a database of potential vaccine candidates. In this project, we will validate the novel vaccine candidates for their conservation in *P. aeruginosa* strains of various origin by multiple genome sequence and comparative analysis. This will provide clinical validation of selected targets and considered a critical step in terms to provide solid rationale to proceed with the project towards pre-clinical evaluation. Next, the vaccination efficacy of conserved vaccine candidates will be tested in pre-clinical animal model of *P. aeruginosa* infection. The results of the project will contribute to settle the basis of a novel immunotherapy to contrast *P. aeruginosa* lung infections in CF patients.

Validazione di nuovi candidati vaccini di *Pseudomonas aeruginosa*

L'elevata incidenza, la prevalenza ed una crescente resistenza ai trattamenti antibiotici fanno delle infezioni croniche respiratorie da *P. aeruginosa* la principale causa di malattia in pazienti con fibrosi cistica (FC). Questi dati evidenziano la necessità assoluta di nuove opzioni terapeutiche. Le strategie di vaccinazione rappresentano un approccio razionale per prevenire o limitare l'infezione da *P. aeruginosa* e migliorare lo stato clinico dei pazienti con FC. Questo progetto segue una strategia ("vaccinologia inversa") già validata in altri patogeni e propone di testare il potenziale immunogenico di nuovi candidati vaccini di *P. aeruginosa*, selezionati attraverso approcci integrati di genomica. In progetti precedentemente finanziati (FFC #8/2003; FFC #8/2006), abbiamo definito le caratteristiche fenotipiche di *P. aeruginosa* ed individuato nuovi candidati vaccini sulla base della loro presunta localizzazione sulla

superficie cellulare. Per questo obiettivo, abbiamo applicato diversi approcci genomici: i) trascrittomico attraverso DNA micro-array, ii) genomica funzionale attraverso la tecnologia antisenso (FFC #6/2006), iii) genomica funzionale attraverso la mutagenesi da inserimento, iv) bioinformatica. Nel complesso, queste proiezioni a livello del genoma hanno identificato funzioni di geni coinvolti nell'interazione tra ospite e patogeno ed hanno generato una banca-dati di potenziali candidati vaccini. In questo progetto,



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

Neri AS¹, Rossolini G²

¹Dip. Pediatria – Univ. Fl, Centro FC, Osp. Meyer, ²Dip. Biologia Molecolare – Univ. Siena

The project aims at investigating the presence and evolution of antibiotic resistance mechanisms in *P. aeruginosa* (*Pa*) isolates from chronically colonized CF patients and the potential correlation of these mechanisms with therapeutic regimens and clinical course. 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 prevalence was 25%. The prevalence was almost the same in cross-sectional (36 isolates from 30 patients) and longitudinal analysis (108 isolates from 10 patients). Longitudinal analysis seems to show a trend toward the loss of acquired resistance genes during the period of chronic colonization, sometimes without a significant change of the resistance phenotype. Cross-sectional analysis of mutation-mediated resistance mechanisms showed: 1) loss of OprD porin, affecting susceptibility to carbapenems: reduced level in 95% of analysed isolates; 2) mutations in at least one of type II topoisomerases, conferring fluoroquinolones resistance, in 76% of analysed isolates. CF patients chronically infected by *Pa* with resistance mechanisms showed higher lung function decline, more pulmonary exacerbations and received higher doses of intravenous antibiotics. In the last year we performed the identification of resistance mechanisms to antibiotics in 55 *Pa* isolates obtained from 19 CF patients that had received eradication therapy for the first colonization and for the subsequent episodes. Regarding the acquired resistance mechanisms no β -lactamase genes were detected, while aminoglycoside resistance (*aadA1* and *aadB*) genes were only found in 2 isolates (4%) from the same patient. Analysis of the mutational resistance mechanisms to fluoroquinolones revealed mutations in type II topoisomerases in 5 isolates and overexpression of MexAB efflux pump in 3 isolates. Despite the high antibiotic resistance rates and the large amount of antibiotics used by chronically colonized CF patients and therapeutic failure in patients at first colonizations,

proponiamo di validare i nuovi candidati vaccini per la loro conservazione in ceppi di *P. aeruginosa* di diversa origine attraverso sequenziamento genico ed analisi comparativa. In una fase successiva, l'efficacia dei candidati vaccini conservati verrà valutata in un modello animale pre-clinico di infezione da *P. aeruginosa*. I risultati del progetto contribuiranno a disegnare nuove strategie di intervento e trattamenti terapeutici per contrastare le infezioni polmonari *P. aeruginosa* in pazienti con FC.

22. Longitudinal study of *Pseudomonas aeruginosa* resistance: selection and evolution of resistance mechanisms in relation to antibiotic treatment in cystic fibrosis patients (FFC Project#9/2008, concluded)

a clear correlation between the presence of acquired resistance mechanisms and evolution of phenotypic resistance couldn't be often detected.

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

E' stata analizzata la natura e l'evoluzione dei meccanismi di resistenza acquisita da *Pseudomonas aeruginosa* (*Pa*) verso gli antibiotici più comunemente usati in FC e valutata la correlazione con la terapia e l'andamento clinico. La prevalenza dei geni di resistenza a β -lattamici (8%) e aminoglicosidi (25%) e degli elementi genetici che li portano è risultata superiore a quanto osservato in letteratura, in una selezione di 36 isolati ottenuti da 30 pazienti colonizzati cronicamente. Sono stati osservati nella maggior parte degli isolati meccanismi di resistenza di tipo mutazionale: sono risultati prevalenti i meccanismi che conferiscono resistenza ai carbapenemi (95% degli isolati) e ai fluorochinoloni (76%). Analizzando più isolati di *Pa* provenienti dallo stesso paziente (108 isolati da 10 pazienti), è stata complessivamente rilevata una tendenza alla perdita di geni di resistenza nel corso della colonizzazione cronica, in alcuni casi nonostante la persistenza del profilo di chemioresistenza. In generale i pazienti con infezione cronica da *Pa* portatrice di meccanismi di resistenza sembrano presentare nel tempo maggior compromissione polmonare ed hanno un maggior consumo di antibiotici per via endovenosa. E' difficile tuttavia stabilire correlazioni con i regimi terapeutici e lo stato clinico data l'eterogeneità e la variabilità dei meccanismi di resistenza. L'analisi dei meccanismi di resistenza è stata condotta anche su una collezione di 55 isolati provenienti da 19 pazienti sottoposti a trattamento eradicante in occasione della prima colonizzazione da *Pa* e delle successive infezioni. Geni di resistenza acquisita non sono stati evidenziati per i β -lattamici, mentre per gli aminoglicosidi sono stati ritrovati solo in 2 isolati provenienti da un unico paziente. Meccanismi di resistenza mutazionale per i fluorochinoloni sono stati rilevati in una bassa percentuale di isolati. Non è stata osservata chiara correlazione tra emergenza di meccanismi di resistenza, tipo di trattamento e risposta alla terapia antibiotica. Ripetuti trattamenti eradicanti non sembrano portare ad un incremento delle resistenze. In conclusione, nonostante le alte percentuali di chemoresistenza presentata da *Pseudomonas aeruginosa* nei soggetti con infezione cronica e la grande quantità di antibiotici assunta dai pazienti FC per lunghi periodi, il contributo dei meccanismi di resistenza sembra essere limitato nell'evoluzione della resistenza fenotipica di *P. aeruginosa* in fibrosi cistica.

23. The role of RND transporters in *Burkholderia cenocepacia* life by microarray analysis (FFC Project#15/2009, extension)

Bazzini S, Buroni S, Riccardi G

Dipart. Genetica e microbiologia – Università degli Studi di Pavia

Burkholderia cenocepacia is an opportunistic pathogen that infects the airways of patients with cystic fibrosis (CF) and infection often leads to a rapid decline of the lung function and

Giovanna Riccardi



in some cases necrotizing pneumonia and sepsis. A peculiarity of *B. cepacia* infections is the high-level of multiple intrinsic antibiotic resistance, which makes difficult their treatment. Resistance nodulation cell division (RND) transporters are tripartite membrane-located proteins. They are one of the principal causes of the multi-drug resistance found in Gram-negative bacteria. Moreover, some of these efflux pumps have been shown to have a role in the colonization and persistence of bacteria in the host as well as in pathogenicity.

We have previously inactivated three operons encoding RND efflux pumps in *B. cenocepacia* J2315 strain. Interestingly, we found a significant reduced accumulation of lactones in the growth medium of one mutant, suggesting that impaired quorum-sensing mechanism could be present in this strain. For two mutants a higher sensitivity to different compounds could be seen, indicating the involvement of these proteins in drug resistance. In this project we will pursue two different aims: transcriptome analysis of the *B. cenocepacia* RND deleted strains and construction of a *B. cenocepacia* strain containing multiple *rnd* inactivated genes. Transcriptome analysis of *B. cenocepacia* inactivated strains will be carried out by microarray analysis, in collaboration with Dr. Mahenthiralingam of the University of Cardiff. This analysis should give information about the role of *RND* encoding genes not only in drug resistance but also in other important metabolic network (e.g. quorum sensing). Moreover, the definition of important regulons by the use of appropriate mutants will provide the framework for a better understanding of complex cellular responses. These regulons could be the target of new therapeutic drugs. Microarray analyses will also produce data that may clarify some of the complex regulatory networks controlling expression of multi-drug resistance transporter genes. Our second aim will be the inactivation of different *rnd* genes in the same *B. cenocepacia* strain. This could lead to obtain an attenuated strain, useful for the design of a vaccine.

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

Burkholderia cenocepacia è un patogeno opportunista che infetta l'epitelio respiratorio dei pazienti affetti da fibrosi cistica (FC) e l'infezione porta spesso ad un rapido declino della funzione polmonare e, in alcuni casi, a polmonite necrotizzante e sepsi. Una peculiarità delle infezioni provocate da *B. cenocepacia* è l'elevato livello di resistenza agli antibiotici, che ne rende difficile il trattamento. I trasportatori appartenenti alla famiglia RND sono composti da tre proteine collocate a livello della membrana citoplasmatica e sono una delle cause principali della multi-resistenza ai farmaci nei batteri Gram-negativi. Inoltre, è stato dimostrato che alcune di queste pompe di efflusso hanno un ruolo nella colonizzazione e nella persistenza dei batteri nell'ospite, come pure nella patogenicità. Il nostro gruppo ha inattivato tre operoni codificanti pompe di efflusso RND nel ceppo clinico *B. cenocepacia* J2315. In uno di questi mutanti è stata riscontrata una significativa riduzione nell'accumulo di lattoni nel terreno di crescita, suggerendo un difetto nel meccanismo di "quorum-sensing". Per altri due mutanti è stata rilevata una maggior sensibilità a diversi composti che indica il coinvolgimento di queste proteine nella resistenza ai farmaci.

In questo progetto seguiremo due obiettivi: l'analisi trascrittometrica dei ceppi di *B. cenocepacia* inattivati nelle pompe di efflusso e la costruzione di un ceppo inattivato in diversi geni RND. L'analisi trascrittometrica dei ceppi inattivati sarà condotta mediante la costruzione di microarrays, in collaborazione con il Dott. Mahenthiralingam dell'Università di Cardiff. Questa analisi fornirà diverse informazioni circa il ruolo dei geni RND, non solo nella resistenza, ma anche in altri network metabolici importanti (ad esempio il quorum sensing). Inoltre, la definizione di importanti reguloni con l'utilizzo di mutanti appropriati fornirà la chiave di lettura per una miglior comprensione di complesse risposte cellulari. Questi reguloni potrebbero diventare il bersaglio di nuovi farmaci. L'analisi mediante microarrays produrrà dati in grado di chiarire i complessi network che regolano l'espressione dei geni codificanti i trasportatori responsabili di multi-resistenza ai farmaci. Il nostro secondo obiettivo sarà la costruzione di un ceppo di *B. cenocepacia* inattivato in diversi geni codificanti le pompe di efflusso RND. Ciò potrebbe portare ad un ceppo attenuato utile per lo sviluppo di un vaccino.

24. *Burkholderia cenocepacia* pathogenicity: synergistic interactions with *Pseudomonas aeruginosa* and adaptation to CF host (FFC Project#7/2008, in progress)



Annamaria Bevvino, prima da sx., con partner e collaboratrice di ricerca.

Bevvino A¹, Ascenzi F², Bragonzi A³

¹Dip. Biotecn. Agroalimentari e protezione della salute -ENEA - Casaccia, ²Dip. Biol. Cellulare e dello Sviluppo - Univ. La Sapienza, Roma, ³Divisione di Immunologia, Trapianti e Malattie infettive - Istituto San Raffaele, Milano

Bacterial human infection in the 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 *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia 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. In order to understand the pathogenesis of the CF infection, it is important to explore the interactions between the different CF 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 first year of the research project has been aimed at investigating the interactions between *P. aeruginosa* and *B. cenocepacia* in batch co-cultures, within biofilm in vitro and in animal models, and clarifying the influence of the host on *B. cenocepacia* adaptation and pathogenicity. We found a clear dominant negative effect of *P. aeruginosa* over bacterial growth of *B. cenocepacia* in late stationary-phase liquid culture and a significant increase in biofilm formation in mixed cultures of clinical strains compared to their pure culture counterparts. Both species are present in the biofilm at roughly the same concentrations, suggesting synergistic interactions within mixed biofilm. Exposure of murine airways to co-cultures of *P. aeruginosa* and *B. cenocepacia* strains revealed that *B. cenocepacia* lost its virulence in vivo when co-inoculated with *P. aeruginosa*, while *P. aeruginosa* did not change its ability to establish chronic infection in the presence of *B. cenocepacia*. Mice infected with a mixed

*inoculum of clinical strains showed higher level of proinflammatory cytokines than mice infected with single inoculations, suggesting a role of the mixed inoculum on inflammatory response process. In conclusion, our results strongly indicate that the co-presence of *P. aeruginosa* and *B. cenocepacia* during infection may have a profound effect on their ability to form biofilm and on their virulence in vivo. As concerns the second aim of our project, i.e. the role of the host on *B. cenocepacia* virulence, results obtained in the previous project (FFC#7/2006) had revealed an increased capacity of the environmental *B. cenocepacia* Mex1 strain to cause a chronic lung infection following serial passages in mice. Colonial morphology analysis and genetic profiling revealed that the Mex1-derived clones recovered from infected mice are indistinguishable from the challenge strain both at phenotypic and genetic level. By testing their virulence in *Caenorhabditis elegans* model, we selected three Mex1-derived clones with a different degree of virulence respect to the parental strain. In the second year of the project we will investigate the role of secreted compounds on dual-species biofilm formation and the mutual influence of *B. cenocepacia* and *P. aeruginosa* on their respective virulence in CF-mice models, and we will continue the characterization of the Mex1-derived clones.*

Patogenicità di *Burkholderia cenocepacia*: interazioni sinergiche con *Pseudomonas aeruginosa* e adattamento all'ospite FC

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 lo sono tra i microrganismi patogeni e la microflora indigena. Poiché *Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia cenocepacia* colonizzano le stesse nicchie ambientali e sono in grado di formare biofilm nei polmoni di pazienti FC, è verosimile che i due microrganismi interagiscano fra loro, aumentando così in modo sinergico la loro virulenza all'interno del consorzio micobico. 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.

In questo primo anno di ricerca il presente progetto si proponeva di analizzare le interazioni tra *P. aeruginosa* e *B. cenocepacia* in colture in batch, all'interno dei biofilm che entrambi producono e in un modello murino di infezione cronica, e di chiarire l'influenza dell'ospite sulla capacità di adattamento e di patogenicità di *B. cenocepacia*. I risultati da noi ottenuti indicano che *P. aeruginosa* influenza negativamente *B. cenocepacia* nella fase stazionaria di crescita. La compresenza di ceppi clinici di *P. aeruginosa* e *B. cenocepacia* ha un profondo effetto sulla formazione di biofilm e i risultati ottenuti sembrano indicare che entrambe le specie batteriche contribuiscono in modo sinergico alla formazione del biofilm. Dagli esperimenti *in vivo* è emerso che *B. cenocepacia* perde la capacità di stabilire un'infezione cronica in presenza di *P. aeruginosa* ma la compresenza di entrambe le specie causa un'alterazione del quadro infiammatorio dell'ospite provocando un aumento dell'infiltrato leucocitario totale e delle principali citochine pro-infiammatorie nei topi infettati con entrambi i patogeni. In conclusione, i risultati ottenuti sembrano suggerire che la compresenza di *P. aeruginosa* e *B. cenocepacia* ha un profondo effetto sulla formazione del biofilm e sul loro grado di virulenza *in vivo*. Per quanto riguarda il coinvolgimento dell'ospite nella selezione di batteri più virulenti, i risultati ottenuti nel precedente progetto (FFC #7/2006) avevano 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. Le analisi fenotipiche e di tipizzazione molecolare effettuate sulle colonie isolate dai topi infetti hanno evidenziato che i cloni risultano identici al ceppo parentale. Un primo screening di virulenza su *Caenorhabditis elegans* (una specie di verme usato come modello *in vivo*) ci ha permesso di selezionare tre cloni che presentano un diverso grado di virulenza rispetto al ceppo parentale. Nel secondo anno di ricerca intendiamo analizzare il ruolo di composti extracellulari nelle interazioni tra *P. aeruginosa* e *B. cenocepacia* all'interno dei biofilm *in vitro*, valutare la patogenicità di *B. cenocepacia* in presenza di *P. aeruginosa* in modelli murini FC, e completare la caratterizzazione dei cloni di *B. cenocepacia* recuperati dopo ripetuti passaggi nei topi.



Alba Silipo, in basso al centro, con il suo gruppo di ricerca.

Silipo A¹, De Soya A²

¹Dipart. Chimica organica e Biochimica - Università di Napoli,
²Department of Respiratory Medicine Freeman Hospital, Applied Immunobiology and Transplantation Group, Institute for Cellular Medicine, The Medical School University of Newcastle, UK

The *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) comprises opportunistic pathogens in CF patients whose unifying theme is the high level of antibiotic resistance. Lung transplantation is the only treatment that improves both the quantity and quality of life of CF patients with advanced lung disease. It has been shown that Bcc infections are the second most common infection in CF prior to transplantation. A dramatic drawback of Bcc infections is that they limit the selection of CF patients for lung transplantation because of the high risk of post-operative death; poor outcomes are common in

25. In vitro and in vivo studies of novel antimicrobials targeting bacterial cytoskeleton and cell surface virulence markers in the treatment of *Burkholderia cepacia* complex infection (FFC Project#16/2009, new)

those patients with pre-operative *B. cenocepacia* infection. New antimicrobial compounds with activity against the Bcc are needed. The bacterial cytoskeleton has emerged as a new target for antimicrobials. We hypothesize the bacterial cytoskeleton plays a central role in the assembly and organization of macromolecular protein complexes including those important in pathogenicity. The cytoskeleton inhibitors alter the bacterial membrane, comprising virulence factors involved in pathways controlling inflammation and host defences as lipopolysaccharides. The comprehension of such induced modifications can contribute to understand how bacteria adapt and respond to antimicrobial compounds, which are the secondary alterations induced by cytoskeleton inhibitors and their effect on bacterial viability and virulence. In this frame, to set up new antibacterial therapies, this project is aimed to: the elucidation of the *in vitro* and *in vivo* antimicrobial activity of such bacterial cytoskeleton inhibitors on clinically derived Bcc strains from patients undergoing lung transplantation with Bcc infections; analysis of secondary effects of these cytoskeleton inhibitors on bacterial membrane including changes in Lipopolysaccharide composition, structure and biological activity; assessment of the *in vivo* antimicrobial activity and host toxicity of novel cytoskeleton inhibitors in the murine model of acute and chronic infection.

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

Il trapianto polmonare è spesso l'unico trattamento che migliora la durata e la qualità della vita in pazienti affetti da fibrosi cistica; le infezioni da *Burkholderia cepacia complex* (Bcc), che comprende patogeni opportunisti accomunati dalla loro elevata resistenza a trattamenti antibiotici, sono la seconda più comune causa di infezioni pre-operatorie. Un corollario drammatico, tuttavia, associato a infezioni da Bcc, è che esse limitano fortemente la selezione di pazienti per il trapianto a causa dell'elevata mortalità post-operatoria associata alla permanenza dell'infezione. Le diagnosi sfavorevoli sono frequenti specialmente in infezioni da *B. cenocepacia*. Tali dati rendono evidente come sia importante e necessaria la messa a punto di nuovi composti, anche di sintesi, che siano dotati di attività antibiotica verso batteri appartenenti

al Bcc. Negli ultimi tempi il citoscheletro batterico sta emergendo come nuovo target di composti ad attività antimicrobica. Il citoscheletro gioca un ruolo centrale nell'assemblaggio e nella organizzazione di complessi proteici, compresi quelli importanti nell'esplicare la patogenicità e la virulenza batterica. Inibitori del citoscheletro alterano la membrana batterica, inclusi i fattori di virulenza fondamentali nell'indurre e controllare infiammazione e difese immunitarie quali i lipopolisaccaridi. La comprensione delle modificazioni indotte dal trattamento con nuovi inibitori del citoscheletro può aiutare a capire come i batteri si adattino e rispondano ad antibiotici, quali siano le alterazioni secondarie indotte e gli effetti sulla sopravvivenza e la virulenza batterica. In quest'ambito, e con lo scopo di settare nuove terapie antibiotiche, questo progetto verterà su: definizione della attività di tali antibiotici inibitori del citoscheletro batterico su isolati clinici di ceppi di Bcc isolati da pazienti sottoposti a trapianto polmonare; analisi degli effetti secondari di tali inibitori sui fattori di virulenza batterica, in primis sul lipopolisaccaride; definizione dell'attività antibiotica *in vivo* e della tossicità di tali inibitori su modelli murini di infezione cronica e acuta.

26. *Stenotrophomonas maltophilia*, a multidrug resistant emergent pathogen associated to cystic fibrosis: a post-genomic approach to identify new immunological and therapeutical targets (FFC Project#7/2007, concluded)



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

Colonna B¹, Sanguinetti M², Nicoletti M³, Casalino M⁴, Fiscarelli E⁵

¹Lab. di Microbiologia Molecolare Dip.Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Univ. "La Sapienza", Roma; ²Istituto di Microbiologia Università Cattolica del Sacro Cuore; ³Dipartimento di Scienze Biomediche, Sezione di Microbiologia, Università "G. D'Annunzio", Chieti; ⁴Dip. di Biologia Università di Roma 3; ⁵Lab. di Microbiologia Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma

Stenotrophomonas maltophilia is a Gram negative obligate aerobe microorganism carries a startling array of antimicrobial drug resistance determinants. Despite its prevalence in the environment, it appears more and more able to associate with the human hosts and in particular it is emerging as one of the most frequently isolated bacteria from cystic fibrosis (CF) patients. The molecular and cellular basis of *S. maltophilia* pathogenicity process have not been yet defined notwithstanding infections caused by *S. maltophilia* are particularly difficult to treat due to highly intrinsic antibiotic resistance. The project (FFC#7/2007) was a multicentre one, joining academic and clinical laboratories, and was aimed at understanding the biology of *S. maltophilia*, with special emphasis on the cellular and molecular mechanisms underlying the colonization process. In order to give a contribution to decipher the molecular and cellular mechanisms adopted by *S. maltophilia* to induce persistent infections in CF patients and elicit deterioration of the lung epithelium we have approached the study of *S. maltophilia* from different angles. By means of a proteomic- and genomic-related approach we have investigate both, on which

proteins are expressed upon entry of the bacterium into the host and on which among them display antigenic potential in order to identify potential antimicrobial targets that may be useful in the search for better therapies. Moreover by comparative genome analysis and *in vivo* assays we have identified genes selectively present in clinical strains and tested their virulent potential in order to understand the role played by these determinants during the colonization process. Moreover, by means of a proteomic approach paralleled by *in vivo* experiments we have analysed how *S. maltophilia* is able to form biofilms and which genes are expressed *in vivo* in the biofilm state in order to understand the role of this microorganism in establishing persistent infections and in triggering the inflammatory process. The results we have obtained contribute to a better understanding of the role of *S. maltophilia* during the pulmonary disease in CF patients and may constitute an important step towards developing new compounds suitable for a specific and efficient inhibition of this multiresistant pathogen.

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

Stenotrophomonas maltophilia è un microrganismo Gram negativo aerobio caratterizzato dalla presenza di un numero impressionante di determinanti di antibiotico resistenza. Nonostante il suo habitat naturale sia l'ambiente, con sempre maggiore frequenza *S. maltophilia* determina infezioni nell'uomo e sta emergendo come uno dei microrganismi più frequentemente isolati da pazienti affetti da fibrosi cistica (FC). Le basi molecolari e cellulari del processo di patogenicità di *S. maltophilia* non sono ancora state chiarite anche se le infezioni provocate da questo microrganismo sono difficili da eradicare a causa dell'elevata resistenza intrinseca agli antibiotici.

Il nostro progetto multicentrico (FFC#7/2007) si basa sull'esperienza di diversi laboratori italiani impegnati da anni nella ricerca microbiologica di base e clinica ed è stato incentrato sulla comprensione dei meccanismi molecolari e cellulari adottati da *S. maltophilia* durante il processo di colonizzazione.

Per cercare di comprendere quali siano le strategie utilizzate da *S. maltophilia* per indurre infezioni croniche nei pazienti FC e provocare un deterioramento dell'epitelio polmonare abbiamo affrontato lo studio di *S. maltophilia* da diverse angolazioni. Tramite tecniche di genomica e proteomica abbiamo analizzato quali fossero le proteine espresse dal batterio nell'ospite e quali tra queste fossero in grado di esprimere un potenziale antigenico in modo da poter identificare nuovi bersagli cellulari

utili per l'allestimento di terapie antimicrobiche innovative. Inoltre tramite analisi genomica comparativa e saggi *in vivo* abbiamo identificato sequenze geniche presenti esclusivamente nei ceppi clinici ed abbiamo testato il potenziale di virulenza dei determinanti da esse codificati in modo da comprenderne il ruolo durante il processo di colonizzazione. Inoltre tramite un approccio proteomico affiancato da esperimenti *in vivo* abbiamo analizzato se e come *S. maltophilia* fosse in grado di



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

Venturi V
ICGEB – Trieste

Two research projects regarding the Quorum Sensing (QS) regulatory system of Gram-negative bacteria were carried out in these two years thanks to the FFC funding. QS is a system based on cell-cell communication that permits a bacterial community to coordinate its behaviour in response to cell density and environmental changes. QS regulates genes involved in virulence, biofilm formation, colonization ability and bacterial movement. The first project involved the identification of virulence factors in *Burkholderia glumae* and *B. plantarii* two species closely related to the species belonging to the *B. cepacia* complex, which are known to cause chronic infections in cystic fibrosis patients. Mutants of the QS system of environmental and clinical isolates, were constructed and tested for pathogenicity on plants (*Oryza sativa*) and the *Caenorhabditis elegans* and *Galleria melonella* virulence models. Results showed an important decrease in virulence when the QS knock-out mutants were used in the infection. In addition, two virulence factors were identified; one is a secreted lipase encoded by the QS-regulated *lipA* gene, and the other is the anthranilic acid biosynthesis pathway. The other project regards an environmental *P. aeruginosa* strain and its QS system. As almost all studies in QS in *P. aeruginosa* have been performed using the clinical isolate PAO1, it was therefore of interest to study QS of an environmental isolate. Results of this study are summarized in Steindler et al. (2009) and Sergiu Netotea et al. (2009) where we reported that: i) environmental strain PUPa3, which has been isolated as a plant beneficial bacteria, is more pathogenic than PAO1 using the *C. elegans* and *G. melonella* virulence models; ii) its *lasIR/rhlIR* quorum sensing systems are not hierarchically organized as in PAO1 and iii) both QS systems are involved in the regulation of phenotypes important for colonization and invasive behaviour; for

formare biofilm *in vivo* e quali fossero i geni espressi allo stato di biofilm in modo da poter cominciare a comprendere il ruolo svolto da questo microrganismo sia nelle infezioni croniche che nel processo infiammatorio. I risultati ottenuti possono contribuire sia ad una migliore comprensione del ruolo di *S. maltophilia* nelle infezioni polmonari nei pazienti FC sia all'identificazione di potenziali bersagli per l'allestimento di nuove terapie nei confronti di questo microrganismo multiresistente.

27. *Burkholderia cepacia* complex: closing down on the major virulence factors (FFC Project#9/2007, concluded)

example motility (swimming and swarming), antifungal activities, secretion of proteolytic and lipolytic enzymes are regulated by the *lasIR* and the *rhlIR* regulatory pathways together or independently. This study highlights the involvement of QS in pathogenicity and underlines differences and similarities among strains of the same species. These differences have to be considered if one envisages interfering with QS in *P. aeruginosa* in order to control infections.

***Burkholderia cepacia* complex: “accerchiamento” dei suoi maggiori fattori di virulenza**

Grazie al contributo della FFC abbiamo condotto ricerche sul sistema Quorum Sensing (QS) dei batteri gram-negativi *Burkholderia* e *Pseudomonas*. Il QS è un sistema di comunicazione cellulare che permette alle comunità batteriche di coordinare l'espressione di più geni in risposta a stimoli ambientali. Tra i geni regolati si trovano quelli coinvolti nella patogenicità delle diverse specie. In un primo progetto abbiamo studiato il QS di *Burkholderia glumae* e *plantarii* sia di origine ambientale che clinica. Queste specie sono geneticamente simili a quelle appartenenti al *B. cepacia* complex, note perché capaci di provocare infezioni croniche nelle persone affette da fibrosi cistica. Mutanti dei sistemi QS sono stati costruiti e testati per la loro patogenicità in diversi ospiti sia vegetali (pianta del riso) che animali (*C. elegans* e *G. melonella*). In tutti gli ospiti i risultati sono stati omogenei e paragonabili ed hanno dimostrato l'importanza del QS nel regolare la patogenicità nelle due specie e i gradi di patogenicità dei diversi ceppi di una stessa specie. Sono stati individuati due fattori di virulenza: la lipasi codificata dal gene *lipA*, che è risultato sotto il controllo del QS, e l'acido antranilico. Esperimenti sono ancora in corso per validare i dati ottenuti e trovare altri fattori di virulenza. Abbiamo poi studiato il sistema QS di *P. aeruginosa* PAO1 perché è nostra convinzione che *P. aeruginosa* PAO1 (il ceppo standard di collezione utilizzato abitualmente negli studi microbiologici *in vitro*), dopo 50 anni nei laboratori, non rappresenti più la totalità dei membri di questa specie. I risultati di questo studio sono riassunti in Steindler et al. (2009) e Sergiu Netotea et al. (2009) dove riportiamo che: i) PUPa3, che è un ceppo ambientale associato beneficiamente alle piante, è più patogeno di PAO1 quando infetta *C. elegans* e *G. melonella*; ii) PUPa3 ha i due sistemi QS tipici di *P. aeruginosa*, ma essi, a differenza di quanto visto in PAO1, non sono gerarchicamente organizzati; iii) entrambi i sistemi QS sono coinvolti nella regolazione di fenotipi importanti per la colonizzazione e l'invasività del ceppo: motilità (swimming e swarming), alcune attività antifungine, attività proteolitiche e lipolitiche secrete. Questo studio evidenzia il coinvolgimento del QS in diversi aspetti del comportamento di *P. aeruginosa* e sottolinea differenze fra ceppi della stessa specie che sono da tenere in considerazione quando si pensa a nuove molecole che interferiscono con il sistema QS per limitare l'infezione.

4. INFIAMMAZIONE I

Inflammation I



Introduction: The excessive inflammatory response in CF airways

Giorgio Berton

Head, Department of Pathology, University of Verona. Member of Scientific Advisory Board, Italian CF Research Foundation.

A prolonged inflammatory response in the airways leads to irreversible lung damage and fibrosis in different lung diseases, including cystic fibrosis (CF). Whether an excessive inflammatory response is the simple result of chronic infection or it may be, at least in part, dissociated from it [1-3] is still a matter of controversy (see for example refs. [4-6]). However, accumulating evidence suggests that a vicious circle established by alteration of local and innate immune responses, infection, excessive epithelial-derived pro-inflammatory chemokine/cytokine secretion and cell death in the airway plays a central role in the pathogenesis of lung disease in CF. As far as alterations of innate immunity responses are concerned, recent studies reported a reduction in the CF macrophage capability to ingest and kill lung pathogens [7,8] (reviewed in [9]). Additionally, neutrophils that are recruited to CF lung in response to airway infection undergo cleavage of CXCR1, one of the two receptors for IL-8 present on the neutrophil surface. 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* [10]. Notably, IFRD1, a gene regulating neutrophil terminal differentiation and effector functions was recently identified to be a modifier of CF lung disease severity [11]. Hyperactivation (see for example [12]) coupled to impairment of microbicidal effector functions by innate immunity cells may represent one of the mechanisms leading to the "excessive" inflammatory response in CF airways, an other one being an increased cytokine secretion by bronchial epithelial cells due to a direct effect of non functional CFTR [2,13-17]. Additionally, bronchial epithelial cell may be stimulated by cleavage derived fragments of neutrophil CXCR1 (see above), that react with TLR2 receptors triggering cytokine secretion [10], and IL-8, that regulates mucin gene expression [18]. A step forward in the understanding additional molecular mechanisms of excessive inflammation in CF lung derived from 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 [19]. Notably, the effect of ceramide-induced cell death/apoptosis on lung infection, inflammation and pathology may be actually amplified as a consequence of a reduced phagocytosis of apoptotic cells by CFTR-deficient airway cells [20].

On the whole the above summarized findings suggest that inflammation may represent an important pharmacological target to ameliorate lung function in CF. Although 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 [21,22], the search for new drugs able to control excessive inflammation in CF is an active area of investigation. Notably, acid sphingomyelinase inhibitors normalize lung ceramide and inflammation in CF mice [23] and in one CF patient undergoing treatment with infliximab, an anti-TNF-alpha antibody,

to control his rheumatoid arthritis a marked improvement of his lung function was recently reported [24]. Italian scientists supported by FFC have been very active in highlighting new strategies to control inflammation in CF (see [13,17,25,26]). Recently, miglustat, an inhibitor of glycolipid biosynthesis and an approved drug for Gaucher disease, was reported to restore the F508del function and reduce the inflammatory response to *P. aeruginosa* in epithelial cells [27,28].

L'eccessiva risposta infiammatoria nelle vie aeree CF

Una risposta infiammatoria protracta nelle vie aeree porta a danno polmonare irriversibile e fibrosi in diverse malattie polmonari, tra cui la fibrosi cistica (CF). Se l'eccessiva risposta infiammatoria sia il semplice risultato di una infezione cronica o possa essere, almeno in parte, indipendente da questa (1-3) è ancora materia di controversia (vedere ad esempio i riferimenti 4-6). Tuttavia, le evidenze finora emerse suggeriscono che giochi un ruolo centrale nella patogenesi della malattia polmonare CF un circolo vizioso che si instaura per l'alterazione delle risposte immuni locali ed innate, l'infezione, l'eccessiva secrezione di chemochine/citochine proinfiammatorie derivate dall'epitelio nonché la morte delle cellule nelle vie aeree. Per quanto riguarda le alterazioni delle risposte nell'immunità innata, studi recenti hanno riportato una riduzione nella capacità dei macrofagi di ingerire e uccidere i patogeni polmonari (7, 8, recensiti in 9). Inoltre, i neutrofili che vengono reclutati al polmone CF in risposta all'infezione delle vie aeree subiscono un clivaggio di CXCR1, uno dei due recettori per IL-8 presenti sulla superficie dei neutrofili. Poiché CXCR1 è mediatore di alcune importanti funzioni microbicida, il suo clivaggio compromette la capacità dei neutrofili, reclutati nella sede polmonare in risposta all' infezione, di uccidere i patogeni, tra cui *P. aeruginosa* (10). Va sottolineato che è stato recentemente identificato come gene modificatore della gravità della malattia polmonare IFRD1, un gene che regola appunto la differenziazione terminale e alcune funzioni effettive dei neutrofili (11). L'iperattivazione (vedi ad esempio in 12), accoppiata con la compromissione delle funzioni effettive microbicida da parte delle cellule dell'immunità innata, può rappresentare uno dei meccanismi che portano alla "eccessiva" risposta infiammatoria nelle vie aeree CF. Va inoltre considerato il ruolo che svolge un'aumentata secrezione di citochine da parte delle cellule epiteliali bronchiali, dovuta ad un effetto diretto di CFTR non funzionante (2, 13 - 17). Inoltre, le cellule epiteliali bronchiali possono essere stimolate sia dai frammenti di CXCR1 dei neutrofili derivati dal clivaggio di cui sopra, e che interagiscono con i recettori TLR2 scatenando la secrezione di citochine (10), sia da IL-8, che regola l'espressione dei geni delle mucine (18). Un passo avanti nella comprensione di ulteriori meccanismi molecolari di eccessiva infiammazione nel polmone CF è stato fatto da recenti studi che hanno dimostrato come, a causa dell'alcalinizzazione di vescicole intracellulari, nei polmoni di topi mancanti di CFTR si accumuli ceramide, con l'effetto di innescare infiammazione, morte cellulare, accumulo di depositi di DNA e possibilmente infezione da *P. aeruginosa* (19). E' interessante notare che l'effetto della morte/apoptosi cellulare indotta da ceramide sull'infezione e infiammazione polmonare può essere amplificato come conseguenza di una ridotta fagocitosi delle cellule apoptotiche da parte delle cellule delle vie aeree CFTR-carenti (20).

Nell'insieme, i dati fin qui riassunti suggeriscono che l'infiammazione può rappresentare un importante bersaglio farmacologico per migliorare la funzione polmonare in fibrosi cistica. Benché gli studi sugli effetti

dell'uso prolungato di ibuprofen abbiano dimostrato che questo farmaco antinfiammatorio riduce il declino della funzione polmonare nei pazienti CF (21,22), la ricerca di nuovi farmaci che siano in grado di controllare l'eccessiva infiammazione in CF è un'area oggi molto attiva di studio. Di rilievo, gli inhibitori della sfingomielinasi acida normalizzano la ceramide nel polmone e l'infiammazione nel topo CF (23), mentre è stato recentemente riportato un miglioramento della funzione polmonare in un paziente CF sottoposto a trattamento con infliximab, un anticorpo anti-TNF-alfa, per controllare la sua artrite reumatoide (24). I ricercatori italiani supportati dalla Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica sono stati sinora molto attivi nell'evidenziare nuove strategie per il controllo dell'infiammazione in CF (vedi 13,17,25,26). Recentemente, il miglustat, un inibitore della biosintesi dei glicolipidi e farmaco approvato per la malattia di Gaucher, è stato riportato essere in grado di restaurare la funzione F508del e di ridurre la risposta infiammatoria a *P. aeruginosa* nelle cellule epiteliali (27,28).

- [1] Rao, S. and Grigg, J. (2006) New insights into pulmonary inflammation in cystic fibrosis. *Arch Dis Child.* 91, 786-788.
- [2] Rubin, B.K. (2007) CFTR is a modulator of airway inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 292, L381-382.
- [3] Elizur, A., Cannon, C.L. and Ferkol, T.W. (2008) Airway inflammation in cystic fibrosis. *Chest.* 133, 489-495.
- [4] Linnane, B.M., Hall, G.J., Nolan, G., Brennan, S., Stick, S.M., Sly, P.D., Robertson, C.F., Robinson, P.J., Franklin, P.J., Turner, S.W. and Ranganathan, S.C. (2008) Lung Function in Infants with Cystic Fibrosis Diagnosed by Newborn Screening. *Am J Respir Crit Care Med.*
- [5] Rogers, C.S., Stoltz, D.A., Meyerholz, D.K., Ostedgaard, L.S., Rokhlina, T., Taft, P.J., Rogan, M.P., Pezzulo, A.A., Karp, P.H., Itani, O.A., Kabel, A.C., Wohlford-Lenane, C.L., Davis, G.J., Hanfland, R.A., Smith, T.L., Samuel, M., Wax, D., Murphy, C.N., Rieke, A., Whitworth, K., Uc, A., Starner, T.D., Brogden, K.A., Shilyansky, J., McCray, P.B., Jr., Zabner, J., Prather, R.S. and Welsh, M.J. (2008) Disruption of the CFTR gene produces a model of cystic fibrosis in newborn pigs. *Science.* 321, 1837-1841.
- [6] Brennan, S., Sly, P.D., Gangell, C.L., Sturges, N., Winfield, K., Wikstrom, M., Gard, S. and Upham, J.W. (2009) Alveolar macrophages and CC chemokines are increased in children with cystic fibrosis. *Eur Respir J.* 34, 655-661.
- [7] Di, A., Brown, M.E., Deriy, L.V., Li, C., Szeto, F.L., Chen, Y., Huang, P., Tong, J., Naren, A.P., Bindokas, V., Palfrey, H.C. and Nelson, D.J. (2006) CFTR regulates phagosome acidification in macrophages and alters bactericidal activity. *Nat Cell Biol.* 8, 933-944.
- [8] Wright, A.K., Rao, S., Range, S., Eder, C., Hofer, T.P., Frankenberger, M., Kobzik, L., Brightling, C., Grigg, J. and Ziegler-Heitbrock, L. (2009) Pivotal Advance: Expansion of small sputum macrophages in CF: failure to express MARCO and mannose receptors. *J Leukoc Biol.* 86, 479-489.
- [9] Sorio, C. and Melotti, P. (2009) Editorial: The role of macrophages and their scavenger receptors in cystic fibrosis. *J Leukoc Biol.* 86, 465-468.
- [10] Hartl, D., Latzin, P., Hordijk, P., Marcos, V., Rudolph, C., Woitschnik, M., Krauss-Etschmann, S., Koller, B., Reinhardt, D., Roscher, A.A., Roos, D. and Giese, M. (2007) Cleavage of CXCR1 on neutrophils disables bacterial killing in cystic fibrosis lung disease. *Nat Med.* 13, 1423-1430.
- [11] Gu, Y., Harley, I.T., Henderson, L.B., Aronow, B.J., Vietor, I., Huber, L.A., Harley, J.B., Kilpatrick, J.R., Langefeld, C.D., Williams, A.H., Jegga, A.G., Chen, J., Wills-Karp, M., Arshad, S.H., Ewart, S.L., Thio, C.L., Flick, L.M., Filippi, M.D., Grimes, H.L., Drumm, M.L., Cutting, G.R., Knowles, M.R. and Karp, C.L. (2009) Identification of IFRD1 as a modifier gene for cystic fibrosis lung disease. *Nature.* 458, 1039-1042.

- [12] Makam, M., Diaz, D., Laval, J., Gernez, Y., Conrad, C.K., Dunn, C.E., Davies, Z.A., Moss, R.B., Herzenberg, L.A., Herzenberg, L.A. and Tirouvanziam, R. (2009) Activation of critical, host-induced, metabolic and stress pathways marks neutrophil entry into cystic fibrosis lungs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106, 5779-5783.
- [13] Cigana, C., Assael, B.M. and Melotti, P. (2007) Azithromycin selectively reduces tumor necrosis factor alpha levels in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Antimicrob Agents Chemother.* 51, 975-981.
- [14] Dechechchi, M.C., Nicolis, E., Bezzzerri, V., Vella, A., Colombatti, M., Assael, B.M., Mettey, Y., Borgatti, M., Mancini, I., Gambari, R., Becq, F. and Cabrini, G. (2007) MPB-07 reduces the inflammatory response to *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis bronchial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 36, 615-624.
- [15] Perez, A., Issler, A.C., Cotton, C.U., Kelley, T.J., Verkman, A.S. and Davis, P.B. (2007) CFTR inhibition mimics the cystic fibrosis inflammatory profile. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 292, L383-395.
- [16] Vij, N., Mazur, S. and Zeitlin, P.L. (2009) CFTR is a negative regulator of NF κ B mediated innate immune response. *PLoS One.* 4, e4664.
- [17] Cigana, C., Nicolis, E., Paschetto, M., Assael, B.M. and Melotti, P. (2006) Anti-inflammatory effects of azithromycin in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 350, 977-982.
- [18] Bautista, M.V., Chen, Y., Ivanova, V.S., Rahimi, M.K., Watson, A.M. and Rose, M.C. (2009) IL-8 regulates mucin gene expression at the posttranscriptional level in lung epithelial cells. *J Immunol.* 183, 2159-2166.
- [19] Teichgraber, V., Ulrich, M., Endlich, N., Riethmüller, J., Wilker, B., De Oliveira-Munding, C.C., van Heeckeren, A.M., Barr, M.L., von Kurthy, G., Schmid, K.W., Weller, M., Tummler, B., Lang, F., Grassme, H., Doring, G. and Gulbins, E. (2008) Ceramide accumulation mediates inflammation, cell death and infection susceptibility in cystic fibrosis. *Nat Med.* 14, 382-391.
- [20] Vandivier, R.W., Richens, T.R., Horstmann, S.A., deCathelineau, A.M., Ghosh, M., Reynolds, S.D., Xiao, Y.Q., Riches, D.W., Plumb, J., Vachon, E., Downey, G.P. and Henson, P.M. (2009) Dysfunctional cystic fibrosis transmembrane conductance regulator inhibits phagocytosis of apoptotic cells with proinflammatory consequences. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 297, L677-686.
- [21] Konstan, M.W., Schluchter, M.D., Xue, W. and Davis, P.B. (2007) Clinical use of ibuprofen is associated with slower FEV1 decline in children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 176, 1084-1089.
- [22] Lands, L.C., Milner, R., Cantin, A.M., Manson, D. and Corey, M. (2007) High-dose ibuprofen in cystic fibrosis: Canadian safety and effectiveness trial. *J Pediatr.* 151, 249-254.
- [23] Becker, K.A., Riethmüller, J., Luth, A., Doring, G., Kleuser, B. and Gulbins, E. (2009) Acid Sphingomyelinase Inhibitors Normalize Pulmonary Ceramide and Inflammation in Cystic Fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.*
- [24] Casserly, B. and Donat, W. (2009) Stabilization of lung function and clinical symptoms in a patient with cystic fibrosis (CF) after institution of infliximab: a monoclonal antibody that binds tumor necrosis factor alpha. *Lung.* 187, 149-152.
- [25] Bezzzerri, V., Borgatti, M., Nicolis, E., Lampronti, I., Dechechchi, M.C., Mancini, I., Rizzotti, P., Gambari, R. and Cabrini, G. (2008) Transcription factor oligodeoxynucleotides to NF- κ B inhibit transcription of IL-8 in bronchial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 39, 86-96.
- [26] Nicolis, E., Lampronti, I., Dechechchi, M.C., Borgatti, M., Tamanini, A., Bianchi, N., Bezzzerri, V., Mancini, I., Grazia Giri, M., Rizzotti, P., Gambari, R. and Cabrini, G. (2008) Pyrogallol, an active compound from the medicinal plant *Embelica officinalis*, regulates expression of pro-inflammatory genes in bronchial epithelial cells. *Int Immunopharmacol.* 8, 1672-1680.
- [27] Dechechchi, M.C., Nicolis, E., Norez, C., Bezzzerri, V., Borgatti, M., Mancini, I., Rizzotti, P., Ribeiro, C.M., Gambari, R., Becq, F. and Cabrini, G. (2008) Anti-inflammatory effect of miglustat in bronchial epithelial cells. *J Cyst Fibros.* 7, 555-565.
- [28] Norez, C., Antigny, F., Noel, S., Vandebrouck, C. and Becq, F. (2009) A cystic fibrosis respiratory epithelial cell chronically treated by miglustat acquires a non-cystic fibrosis-like phenotype. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 41, 217-225.



Elena Nicolis, resp. operativa del servizio Quantigene, e **Valentino Bezzzerri**.

Nicolis E, Bezzzerri V, Cabrini G

Laboratorio Patologia Molecolare, OCM – Azienda Ospedaliera Verona

The laboratory of Molecular Pathology of the University Hospital of Verona is engaged, since years, on the study of gene expression, goaled in particular in the pulmonary inflammation in cystic fibrosis. Since the growing interest coming from the gene quantification techniques and from their application in the research, FFC has decided to grant a project which exploited

28. QuantiGENE: the new facility for the quantification of gene expression offered by FFC (FFC Project Quantigene/2008)

the gained experience of the researchers of the Laboratory of Molecular Pathology.

This year, the new instrument ABI PRISM 7900HT Fast Real Time PCR System has been bought and already adopted. The instrument, now operating in the laboratory of Molecular Pathology, allows to measure the gene expression in different samples, in a very short time and by very small costs. The QuantiGENE Facility offers to the FFC community the possibility to increase and enrich its experimental plan by the quantitative and qualitative analysis of the gene expression in human, mouse, rat, monkey, bacteria (gram negative and positive) to perform its research in a more efficient way.

The QuantiGENE offers the possibility to:

- verify the gene expression in cells from primary cultures, from cell lines and from tissue (human, mouse, rat, monkey and bacteria expression);
- quantify the transcript of genes already optimized and validated by the Facility;
- develop the quantification of genes on demand (custom service) not yet validated, for human, mouse, rat, monkey and bacteria;

- quantify series of samples on project;
- analyze in low density array (macroarray) the gene expression (human, rat or mouse) in group of 384 genes, selectable by the researcher among more of 50.000 different genes;
- train operators belonging to the FFC community.

The QuantiGENE is addressed to the FFC researchers who:

- do not have the availability of the appropriate instrumentation,
- do not have the protocols and the experience,
- need a preliminary fast pilot study on a small group of samples,
- are interested in a training on the application or on the methodology of development.

The QuantiGENE facility proposes, for the macroarray analysis, a human lung inflammation array: 96 genes in quadruplicate, chosen among the most relevant in the pulmonary inflammation.

The array includes the expression analysis of Toll-like genes and of the principal kinases at the end of their activation, the principle cytokines and chemokines produced by these cells, and genes involved in the antibacterial defence and in the regulation of proteases in the airways.

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

Il Laboratorio di Patologia Molecolare dell'Azienda Ospedaliera di Verona si occupa da anni dello studio di espressione genica, mirato

particolarmente nell'ambito della infiammazione polmonare in fibrosi cistica. Visto il crescente interesse suscitato dalle tecniche di quantificazione genica e dalla loro applicazione in ricerca, la FFC ha deciso di finanziare un progetto che sfruttasse l'esperienza maturata dai ricercatori del Laboratorio di Patologia Molecolare e ne mettesse a frutto il potenziale al fine di renderlo una vera e propria piattaforma operativa in grado di offrire il servizio e nuove opportunità a tutta la comunità dei ricercatori FC italiani.

E' stato acquisito quest'anno il nuovo strumento di quantificazione ABI PRISM 7900HT Fast Real Time PCR System, che vanta già una generosa e sollecita adesione di adozioni da parte di vari sostenitori. Lo strumento, ora già operativo nel Laboratorio di Patologia Molecolare, consente di misurare l'espressione genica di diversi campioni in tempi ridotti e con costi relativamente contenuti. Il Servizio QuantiGENE offre ai gruppi di ricerca FFC la possibilità di implementare e rafforzare il proprio piano sperimentale con l'analisi qualitativa e quantitativa della espressione genica in: uomo, topo, ratto, scimmia, batteri (gram positivi e negativi) per condurre la propria ricerca in maniera più efficace ed efficiente. Lo strumento permette di quantificare fino a 384 diversi geni di un campione in una sola sessione operativa, della durata di circa mezza giornata lavorativa. QuantiGENE viene proposto come servizio completo di raccolta e processamento dei campioni che potranno essere inviati dai Centri di ricerca e presi in carico dalla Dott.ssa Elena Nicolis, responsabile operativa e dal Dott. Valentino Bezzerra, ricercatore finanziato da FFC. Ora tutti i laboratori interessati alla quantificazione genica possono avvalersi di questa opportunità al solo costo dei materiali di consumo: l'offerta è rivolta a studi nel campo dell'infiammazione ma anche della microbiologia, nelle ricerche di espressione condotte *in vitro* e *in vivo*, versatile a ricevere nuove proposte di studio e sviluppo. La speranza è che questo progetto possa servire da motore per una nuova generazione di progetti, affinare quelli già esistenti e offrire alla ricerca sulla FC un valido contributo.

- 29. - A gene-targeted anti-inflammatory approach based on the Transcription Factor "decoy" strategy (FFC Project#13/2007, concluded)**
- Mapping IL-8 gene transcription machinery in bronchial epithelial cells (FFC Project#18/2009, extension)



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

Cabrina G¹, Gambari R², Pucci P³

¹Lab. Patologia Molecolare - Az. Osp. Verona, ²Dip. Biochimica e Biol. Molec. - Univ. Ferrara, ³CEINGE Biotecnologie Avanzate, Università "Federico II", Napoli



Giulio Cabrina (primo a destra) con il suo gruppo di ricerca.

b) by studying the interaction of small organic molecules with NF-kB, the major transcription factor regulating the expression of IL-8, by *in silico* analyses with virtual screening and docking and further experimental validation *in vitro*; c) by screening small organic molecules extracted and identified from medicinal plants. Overall, the project allowed to identify in furocoumarins a class of small molecules with important anti-inflammatory effects for the characteristic mechanisms of inflammation in human respiratory cells *in vitro*, that are the bases for ongoing extension of the experimental investigation in murine lung models, in order to validate these results for further extension on clinical trials on safety and efficacy.

- **Nuovi approcci sperimentali di terapia anti-infiammatoria per la patologia polmonare**
- **Regolazione trascrizionale di interleuchina-8 in cellule epiteliali respiratorie**

L'eccessiva infiammazione cronica polmonare contribuisce in maniera determinante al graduale declino della funzione respiratoria nei

pazienti affetti da fibrosi cistica e rappresenta un importante bersaglio di cura complementare alla correzione del difetto genetico ed alla terapia antibatterica, attualmente non risolto dai tradizionali farmaci anti-infiammatori. Questo progetto biennale ha affrontato questo filone di ricerca in modelli respiratori umani *in vitro* a tre differenti livelli: a) chiarendo il ruolo dei principali fattori (di trascrizione nucleare) che regolano l'espressione della chemochina IL-8, principale responsabile dell'elevato accumulo di leucociti polimorfonucleati nei polmoni dei pazienti affetti, mediante molecole "esca" per fattori di trascrizione nucleare; b) identificando piccole molecole organiche in grado di interferire, quindi inibire, il principale fattore (fattore di trascrizione nucleare kB) che induce l'espressione della chemochina IL-8,



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

Quaglia F¹, Carnuccio R²

¹Dip.to di Chimica Farmaceutica e Tossicologica, Università di Napoli Federico II; ²Dip.to di Farmacologia Sperimentale, Università di Napoli Federico II

*Decoy oligonucleotides able to interfere with Nuclear Factor-kB (NF-kB) transactivation may be of great help in reducing NF-kB mediated pulmonary chronic inflammation, which is the primary cause of bronchiectasis, respiratory failure and consequent death in patients affected by cystic fibrosis (CF). To deliver a decoy oligonucleotide against NF-kB (dec-ODN) to the inflammation site, respirable powders able to protect dec-ODN from biological inactivation and release it at controlled rates in the lungs were developed. In the first year of activity, we found a new way to achieve large porous particles of poly(lactide-co-glycolide) (LPP) with mass mean aerodynamic diameter and aerosolization properties suitable for deposition in the lung. The cured LPP displayed high encapsulation efficiency and a sustained dec-ODN release for one month as well as high dispersibility with more than 95% of dose being emitted from a dry powder inhaler. In the second part of the study, a deeper characterization of the aerosolization properties according to Pharmacopoeial tests suggested a spread deposition of LPP over bronchi and bronchioles in humans. In vivo deposition of fluoresceine-labeled LPP in rat lungs confirmed the good aerodynamic properties of the powders and their potential for the delivery of dec-ODN to the lungs in CF patients. The effects of the dec-ODN released from LPP on IL-6 and IL-8 mRNA levels as well as NF-kB/DNA binding activity in normal and ΔF508 CFTR-mutated human bronchial epithelial cells stimulated with lipopolysaccharide (LPS) from *P. aeruginosa* were investigated and the results compared to the naked dec-ODN. LPS challenge caused an increase of either IL-6 and IL-8 mRNA expression and NF-kB/DNA binding activity, which were significantly inhibited by dec-ODN released from LPP at 24 and 72 hours. In contrast, naked dec-ODN exhibited these effects only at 24 hours. Furthermore, preliminary experiments in rats demonstrated that intratracheally instilled LPS induced a significant and selective neutrophil recruitment into the bronchoalveolar cavity when compared to the saline alone, which was significantly inhibited by naked dec-ODN. These very preliminary data were crucial*

mediante analisi computazionale e successiva verifica sperimentale; c) individuando una classe di molecole a potente effetto anti-infiammatorio mediante screening di estratti di piante medicinali, identificazione della struttura chimica ed analisi delle singole molecole su cellule respiratorie esposte a *Pseudomonas aeruginosa*, il principale batterio colonizzante le vie respiratorie. Il nuovo progetto di estensione, oltre a condurre a disseminare una serie di risultati scientifici diffusi nella comunità internazionale e a depositare un brevetto italiano su una nuova molecola anti-infiammatoria, costituirà la base per la verifica di queste nuove molecole in modelli di polmone di animale da esperimento e di successiva estensione verso studi clinici di sicurezza ed efficacia.

30. Novel particulate systems for the delivery of an oligonucleotide decoy to Nuclear Factor-kB: a potential strategy for treating cystic fibrosis (FFC Project#5/2007, concluded)

to validate the proposed therapeutic approach and to identify the range of doses to be used in incoming in vivo studies on dec-ODN-loaded LPP. Taken all together, our results suggest the enormous potential of the developed system in the control of CF-associated chronic inflammation.

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

Oligonucleotidi decoy che interferiscono con la transattivazione del fattore di trascrizione nucleare NF-kB potrebbero svolgere un ruolo nel trattamento dell'infiammazione cronica polmonare, principale causa di bronchiectasia, perdita della funzionalità polmonare e successiva morte in pazienti affetti da fibrosi cistica (FC). Per veicolare un oligonucleotide decoy per NF- kB (dec-ODN) direttamente al sito infiammatorio, sono state sviluppate polveri respirabili in grado di proteggere il dec-ODN dall'inattivazione biologica e di rilasciarlo progressivamente nel tempo direttamente a livello polmonare. Nel primo anno di attività, abbiamo messo a punto una nuova formulazione polmonare per il dec-ODN a base di particelle porose di acido poli(lattico-co-glicolico) (LPP) che presentava un diametro aerodinamico e proprietà aerosolizzanti tali da consentirne una deposizione polmonare. Le LPP si erano mostrate in grado di incapsulare il dec-ODN con elevata efficienza e di rilasciarlo lentamente nell'arco di un mese. L'eccellente disperdibilità delle LPP si traduceva anche in una erogazione di più del 95% della dose da un dispositivo aerosolico per la somministrazione di polveri nell'uomo. Nella seconda parte della ricerca, uno studio approfondito sulle proprietà aerosolizzanti, in accordo con i saggi presenti in Farmacopea, ha suggerito che le LPP dovrebbero potenzialmente distribuirsi a livello di bronchi e bronchioli. Tali dati sono stati supportati da studi di biodistribuzione in polmoni di ratto, che confermavano le eccellenti proprietà aerosolizzanti delle LPP ed il loro potenziale nel veicolare per via polmonare il dec-ODN in pazienti FC. Abbiamo studiato, poi, gli effetti del dec-ODN rilasciato dalle LPP e del dec-ODN nudo sull'espressione dell'mRNA di IL-6 e IL-8 così come sull'attività di legame di NF-kB al DNA in cellule umane bronchiali epiteliali normali e con la mutazione ΔF508 CFTR, stimolate con lipopolisaccaride (LPS) da *P. aeruginosa*. È stato osservato che la stimolazione con LPS causava un aumento sia dell'espressione dell'mRNA di IL-6 e IL-8 che dell'attività di legame di NF-kB al DNA, che erano significativamente inibiti dal trattamento delle cellule con il dec-ODN rilasciato da LPP a 24 e 72 ore. Il dec-ODN nudo, invece, esibiva questi effetti soltanto a 24 ore. Studi preliminari nel ratto, inoltre, hanno dimostrato che l'instillazione intratracheale di LPS induceva un significativo richiamo di neutrofili nella cavità broncoalveolare rispetto alla soluzione salina e che tale richiamo era inibito dal dec-ODN nudo. I risultati di questa parte della ricerca, seppure molto preliminari, sono stati cruciali per validare l'approccio terapeutico e per identificare le dosi di dec-ODN rilasciato dalle LPP da testare in studi futuri. Nel loro insieme, i risultati raggiunti suggeriscono un'enorme potenziale delle LPP respirabili contenenti il dec-ODN per il controllo dell'infiammazione cronica nei pazienti FC.



Virginia De Rose, a destra, ed Emilio Hirsch.

De Rose V¹, Hirsch E², Döring G³

¹Dipart. Scienze cliniche e biologiche - Università di Torino, ²Centro di biotecnologia molecolare - Univ. di Torino, ³Institut for General and Environmental Hygiene - University of Tübingen

In cystic fibrosis (CF) progressive lung disease, characterized by chronic airway infection and inflammation, is the major cause of morbidity and mortality. Traditional therapeutic strategies which aim to reduce the excessive inflammatory response to infection in the airways of CF patients, including oral or inhaled glucocorticoids, non-steroidal anti-inflammatory drugs, LTB₄ receptor inhibitors and serine proteinase inhibitors have been largely unsuccessful. Here, we assess the role of the kinase PI3K γ ,

which mediates leukocyte cell migration and activation, in mouse models of CF. We also evaluate the efficacy of a PI3K γ inhibitor as an anti-inflammatory strategy in patients with CF. These studies aim to overcome the limitations of the current anti-inflammatory treatments in patients with CF, providing a longer life expectancy. Moreover, the results of this study may provide more insight into the molecular mechanisms of endogenous inflammation in CF.

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

Nella fibrosi cistica (FC), la malattia polmonare, caratterizzata da infezione cronica bronchiale e da un marcato e persistente processo infiammatorio nelle vie aeree, è in larga misura responsabile della morbilità e mortalità associate alla malattia. Numerose strategie terapeutiche sia tradizionali che in fase di studio sono state volte a ridurre l'eccessivo processo infiammatorio nelle vie aeree dei pazienti con FC; tra queste i glucocorticoidi orali od inalatori, i farmaci antiinfiammatori non steroidei, gli inhibitori del recettore di LTB₄ e gli inhibitori delle proteasi seriniche; nessuna di queste strategie terapeutiche, tuttavia, ha dimostrato una utilità clinica o si è dimostrata priva di effetti collaterali. In questo progetto ci proponiamo di studiare il ruolo di PI3K γ , kinasi coinvolta nel reclutamento e nell'attivazione dei leucociti, in modelli murini di FC e il potenziale impiego di inhibitori di PI3K γ come terapia antiinfiammatoria nella malattia, con l'intento finale di definire approcci terapeutici innovativi, in grado di superare le limitazioni degli attuali trattamenti antiinfiammatori e di prolungare l'aspettativa di vita dei pazienti con FC. I risultati del nostro studio contribuiranno, inoltre, a chiarire i meccanismi molecolari del processo infiammatorio nella FC.



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

Romano M¹, Battistini L², Furnari M L³

¹Dip. Scienze Biomediche, Lab. Med. Molecolare - Univ. G. D'Annunzio - Chieti, ²Dip. Neuroscienze Sprim - Fond. S. Lucia - Roma 9, ³Centro Regionale FC - Osp. G. di Cristina - Palermo

Our project was aimed at determining whether immune-inflammatory circulating cells express the Cystic Fibrosis conductance transmembrane regulator (CFTR) and whether dysfunction of this protein occurring in cystic fibrosis (CF) may alter functions of these cells. Our hypothesis is that alterations of circulating immune-inflammatory cells may be pathogenetically relevant for the exuberant inflammatory reaction in CF, best evident in the respiratory tract, and that correcting these alterations may improve the clinical-prognostic outcome. We achieved the large majority of the objectives indicated in our proposal 2007-2009. In particular, 1. We obtained the first evidence of CFTR expression in circulating lymphocyte subpopulations. In these cells, blocking CFTR with a specific inhibitor determined a significant increase in the production of inflammatory cytokines. Likewise, cells from CF patients showed increased synthesis and release of inflammatory

32. Mechanisms of inflammation resolution in cystic fibrosis

(FFC Project#15/2007, concluded)

cytokines, compared with cells from healthy volunteers. Notably, lipoxin A4, a potent anti-inflammatory metabolite, blocked cytokine biosynthesis by CF lymphocytes. 2. We found that human platelet express CFTR, which is dysfunctional in CF platelets. We unveiled that CFTR controls platelet functions related to the inflammatory response. 3. Finally, we identified the promoter of the lipoxin A4 receptor, ALX. This finding will enable us to study regulatory mechanisms of ALX expression, which we found to be reduced in CF epithelial respiratory cells. In addition, we will be able to determine whether CF patients may present genetic variants that may influence expression levels of this anti-inflammatory receptor, thus contributing to the lack of inflammation resolution, typical of CF. Altogether, our results indicate that the molecular defect of CF is present in immune cells as well as in platelets. These findings may represent a significant advance for the diagnostic assessment of the genotype/phenotype relationship and open new perspectives for a better understanding of pathogenetic mechanisms of CF inflammation and, as a consequence, for more effective treatments.

Meccanismi della risoluzione della risposta infiammatoria nella fibrosi cistica

Il nostro progetto si proponeva di determinare se le cellule circolanti che partecipano alla risposta immuno-infiammatoria esprimono il Cystic Fibrosis conductance transmembrane regulator (CFTR) e se quindi disfunzioni di questa proteina, come quelle che si verificano nella fibrosi cistica (FC), siano in grado di alterare funzioni delle cellule immunocompetenti. La nostra

ipotesi è che l'esuberante risposta infiammatoria nella FC, particolarmente evidente nelle vie respiratorie, dipenda anche da alterazioni funzionali di cellule circolanti e che quindi intervenendo su tali disfunzioni si possa migliorare il quadro clinico-prognostico.

Nel biennio 2007-2009 abbiamo raggiunto la quasi totalità degli obiettivi che ci eravamo prefissi per questo progetto. In particolare:

1. Abbiamo ottenuto la prima evidenza della espressione del CFTR in sottopopolazioni di linfociti circolanti. In queste cellule, il blocco funzionale del CFTR mediante l'uso di un inibitore specifico ha determinato un aumento considerevole della produzione di citochine infiammatorie. Parimenti, cellule da pazienti FC hanno mostrato una più elevata capacità di sintesi e rilascio di citochine infiammatorie rispetto a cellule da volontari sani. Da notare come la lipoxina A4, un potente metabolita antiinfiammatorio, sia riuscita a bloccare la produzione di citochine infiammatorie da parte dei linfociti FC.

2. Abbiamo dimostrato che le piastrine umane esprimono il CFTR, la cui funzione è profondamente alterata nelle piastrine FC. Abbiamo inoltre

scoperto che il CFTR controlla funzioni piastriniche connesse alla risposta infiammatoria.

3. Infine abbiamo individuato la regione del promotore nel gene codificante ALX, il recettore della lipoxina A4. Questo ci permetterà di studiare i meccanismi che regolano l'espressione di questo recettore, che abbiamo osservato essere ridotta in cellule epiteliali respiratorie FC. Inoltre, potremo verificare la possibilità che pazienti con fibrosi cistica presentino varianti geniche che alterino livelli di espressione e/o funzione di questo recettore antiinfiammatorio, contribuendo così alla mancanza di risoluzione della risposta infiammatoria tipica della FC.

Nel complesso i risultati ottenuti indicano che il difetto molecolare della FC è espresso in cellule immunocompetenti e nelle piastrine. Queste osservazioni, oltre che a rappresentare un significativo progresso a fini diagnostici, in particolare per la determinazione del rapporto genotipo/fenotipo, aprono nuove prospettive per la comprensione dei meccanismi patogenetici dell'infiammazione nella FC e di conseguenza per la messa a punto di terapie più efficaci.



Cecilia Garlanda, con la collaboratrice Federica Moalli.

Garlanda C¹, Bragonzi A²

¹Fondazione Humanitas per la Ricerca, Rozzano, Milano,

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

The prototypic long pentraxin PTX3, discovered by our group, is a soluble molecule 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 our group have defined the role of this molecule in immunological mechanisms and have generated unique tools to investigate its function. The purpose of this project is to translate the knowledge on PTX3 in the clinical context of genetic diseases. The activities performed during the first year concern a preclinical study conducted to define the potential of PTX3 as a prophylactic/therapeutic agent in a model of chronic lung infection caused by *P. aeruginosa*, a formidable therapeutic challenge in cystic fibrosis. The data obtained are very promising, since the treatment of infected mice with PTX3 significantly reduced the lung bacterial load and all the inflammatory parameters analyzed. In parallel, in vitro studies conducted with this molecule are contributing in understanding the mechanisms of action of PTX3 in recognizing *P. aeruginosa* and in the innate defence towards this micro-organism

33. Infections in cystic fibrosis: role of the long pentraxin PTX3 in host resistance and as therapeutic agent (FFC Project#14/2008, in progress)

and towards the opportunistic fungus *Aspergillus fumigatus*. The results obtained in this year are in agreement with our hypothesis on the utility of the administration of PTX3 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 come candidato agente terapeutico nella fibrosi cistica

La pentrassina lunga PTX3 è stata scoperta dal nostro laboratorio. PTX3 è una molecola 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 è di trasferire le conoscenze acquisite su PTX3 dal nostro gruppo nel contesto delle infezioni opportuniste polmonari dei pazienti con fibrosi cistica. L'attività svolta durante questo primo anno ha riguardato uno studio preclinico che ha la finalità di definire il potenziale di PTX3 come agente terapeutico in un modello di infezione polmonare cronica da *P. aeruginosa*, un patogeno per il controllo del quale vi sono armi insoddisfacenti. I dati ottenuti sono molto promettenti, in quanto il trattamento degli animali infettati con PTX3 ha ridotto significativamente la carica batterica polmonare e tutti i parametri infiammatori analizzati. In parallelo, gli studi condotti *in vitro* con questa molecola hanno contribuito a comprendere i meccanismi di azione di PTX3 nel riconoscimento e nella difesa innata verso *P. aeruginosa* e verso il fungo opportunista *Aspergillus fumigatus*. I risultati ottenuti in questo primo anno di lavoro sono in accordo con la nostra ipotesi dell'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.

34. Anti-inflammatory effect of miglustat: sphingolipid ceramide metabolism as a therapeutic target for CF lung disease (FFC Project#12/2008, in progress)

Dechechchi MC¹, Mazzi P², Cioffi F³, Nicolis E¹, Tamanini A¹, Bezzerrini V¹, Mori N¹, Quiri F¹, Lampronti I⁴, Mancini I⁴, Borgatti M⁴, Rizzotti P¹, Gambari R⁴, Scupoli M T³, Berton G² and Cabrini G¹

Cristina Dechechchi, in alto a destra, con il suo gruppo di ricerca.



¹Lab. di Patologia Molecolare, Lab. Analisi Chimico-Cliniche ed Ematologiche, Università di Verona ²Dipart. di Patologia, Università di Verona, ³Lab. Interdipartimentale di Ricerche Mediche (LURM) e Dipart. di Medicina Clinica e Sperimentale, Università di Verona, ⁴Dipart. di Biochimica e Biologia Molecolare, Università di Ferrara

Growing evidences suggest sphingolipids (SLs) and glycosphingolipids (GSLs) as novel targets for the treatment of pulmonary disorders like asthma, COPD, acute lung injury and CF [Uhlig and Gulbins 2008], being involved in many biological events such as immunity, pathogen invasion and apoptosis [Hannun 2008]. Recently, the accumulation of the SL ceramide has been identified as one of the key regulators of inflammation and infection in CF airways [Teichgraber 2008]. Miglustat, an inhibitor of the synthesis of GSLs, already used for treating type I Gaucher disease, produces an anti-inflammatory effect in bronchial epithelial cells [Dechechchi 2008]. Thanks to the FFC funding, we extended the analysis of the anti-inflammatory effect of miglustat *in vitro* and *in vivo*. Miglustat reduces the leukocytes chemotaxis in bronchial cells and does not impair the anti-microbial defence or interfere with apoptosis induced by *P. aeruginosa*. The effect of miglustat on murine models of lung inflammation *in vivo*, was studied by administrating aqueous solution of miglustat (2 mg/dose) in C57BL/6J mice, by intraesophageal gavage with three administrations 72, 48 and 24 hours before intranasal instillation of lipopolysaccharide (LPS). Bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was collected 4 h post LPS challenge. Miglustat significantly reduces the amount of neutrophils recruited in BALF by 60% whereas lymphocytes or alveolar macrophages are unchanged. These results indicate that miglustat reduces the early inflammatory response *in vivo*. CF bronchial cells were then treated with amitriptyline, an inhibitor of two important enzymes of the SL metabolism: acid sphingomyelinase and acid ceramidase. Amitriptyline (10 µM), added to IB3-1 and CuFi-1 cells 4 hours before infection with *P. aeruginosa*, significantly inhibits the expression of IL-8 mRNA by about 50 %. To support the hypothesis that miglustat and amitriptyline affect the immune response through changes in cellular ceramide levels, FACS analysis with anti-ceramide antibody MAS 0020 (Glycobiotech) was performed in cells treated with both miglustat or amitriptyline. Ceramide staining in IB3-1 and CuFi-1 cells increases upon infection with *P. aeruginosa*.

Both miglustat and amitriptyline significantly reduce the increase of ceramide expression induced by *P. aeruginosa*. Collectively these data indicate a link between the anti-inflammatory effect of miglustat and the decrease of ceramide levels and strengthen the hypothesis that SL metabolism represents a target to restore a normal inflammatory response in CF epithelium.

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

Glisfingolipidi (SLs) e 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 indicano una possibile relazione tra anomalie nel metabolismo della ceramide e infiammazione polmonare in FC. Il miglustat, un inibitore della sintesi dei GSLs, usato per il trattamento della sindrome di Gaucher, ha un effetto anti-infiammatorio in cellule epiteliali bronchiali [Dechechchi 2008]. Grazie al finanziamento della FFC, abbiamo esteso l'analisi dell'effetto anti-infiammatorio del miglustat sia *in vitro* che *in vivo*. Il farmaco è stato somministrato a modelli murini di infiammazione polmonare. La riduzione significativa del 60% del numero di granulociti neutrofili osservata nel fluido di lavaggio broncoalveolare (BALF), indica che il miglustat è in grado di ridurre *in vivo* la risposta infiammatoria precoce. A sostegno dell'ipotesi che l'effetto anti-infiammatorio del miglustat è in relazione con alterazioni del metabolismo degli SLs, abbiamo trattato le cellule epiteliali bronchiali con l'amitriptilina, un farmaco inibitore di due importanti enzimi del metabolismo degli SLs, la sfingomielinasi acida e la ceramidasi acida, e abbiamo ottenuto una significativa riduzione della risposta infiammatoria all'infezione con *P. aeruginosa*, paragonabile a quella osservata con miglustat. Quindi abbiamo misurato i livelli cellulari di ceramide in cellule trattate sia con miglustat che con amitriptilina prima dell'infezione. Le misure effettuate hanno dimostrato una riduzione della ceramide espressa sulla membrana, dopo trattamento sia con amitriptilina che con miglustat. I risultati finora ottenuti da questo studio indicano una relazione tra l'effetto anti-infiammatorio del miglustat e la riduzione dei livelli cellulari di ceramide e rafforzano l'ipotesi che il metabolismo degli SL sia un bersaglio da colpire per normalizzare la risposta infiammatoria dell'epitelio respiratorio FC.

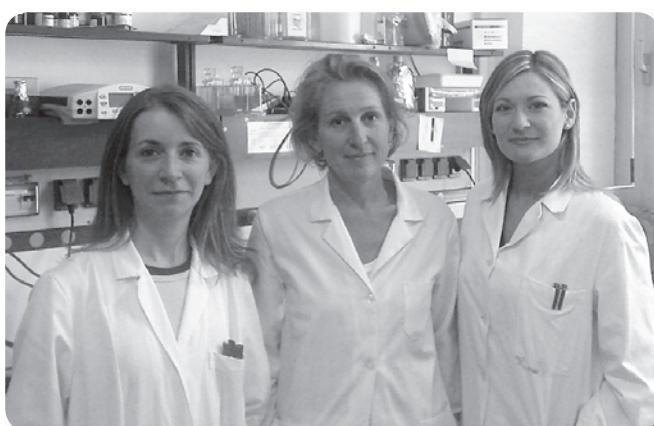
5. INFIAMMAZIONE II

Inflammation II

35. - Influence of CFTR mutations in bactericidal activity of human macrophages

(FFC Project#14/2007, concluded)

- Mechanisms of bactericidal activity of human macrophages and the influence of CFTR mutations (FFC Project#21/2009, extension)



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

Del Porto P¹, Ascenzi F¹, Quattrucci S²

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

²Centro FC Regione Lazio, Dip. Pediatria,
Univ. La Sapienza, Roma

The first line of cell mediated defence in the lung consists of macrophages and epithelial cells. Although the airway epithelial cells are the dominant cell type affected by CFTR dysfunction in the lung, recent data indicate that the absence of CFTR might lead to intrinsic cellular defects in macrophages. Indeed it has been reported that alveolar macrophages from CFTR^{-/-} mice show a reduced ability to kill intracellular *Pseudomonas aeruginosa* and display an altered pattern of hyperinflammatory cytokine secretion. In order to verify the role of CFTR mutations on human macrophage activity, we have first analyzed the expression of

*CFTR in monocyte-derived (MDM) and pulmonary macrophages and subsequently the bactericidal activity against *P. aeruginosa* in CF patients and non-CF control subjects. Assessment of CFTR gene expression was performed by real-time PCR and CFTR protein was detected by immunofluorescence. CFTR mRNA was determined in macrophages by the relative quantification method using parental monocytes as calibrator. Results of this analysis showed an up-regulation of CFTR mRNA in macrophages from the majority of individuals. Immunofluorescence analysis, with two different anti-CFTR antibodies, confirmed protein expression mainly at the plasma membrane of macrophages from healthy individuals. Since defective CFTR-mediated Cl⁻ transport was proposed to be responsible of a reduced killing activity, having verified the presence of both CFTR mRNA and protein in human macrophages, we determined their bactericidal activity. Also in this case we analysed the two macrophage populations: MDM and alveolar macrophages. The bactericidal activity was evaluated after cell infection with a clinical isolate of *P. aeruginosa* by the antibiotic protection assay. Results obtained with MDM from CF (N10) and healthy donors (N 12) failed to reveal a significant difference in the ability to kill bacteria between CF and HD cells. Although the number of lung macrophages analysed at present is too limited (4 CF samples and 10 non-CF samples) to allow any consideration on their activity, overall we observed that, as compared to MDM, lung macrophages are less efficient in killing *P. aeruginosa*.*

- **Influenza delle mutazioni nel gene CFTR sull'attività dei macrofagi umani**
- **Meccanismi dell'attività battericida dei macrofagi umani e influenza delle mutazioni CFTR**



Teresinha Leal

*Chronic lung inflammation is the leading cause of morbidity and mortality in FC. Strategies aiming at reducing the exaggerated inflammatory response are expected to improve the prognosis of the disease. Lung colonization by *Pseudomonas aeruginosa* (PA) is followed by bacterial-host interaction mediated by direct contact of the microorganism and, particularly for mucoid strains, by released pathogenic factors. During our first year of work we have demonstrated that PA clinical strains produce soluble factors capable to induce the expression of pro-inflammatory mediators in human airway cells. We have set up culture conditions to characterize the nature of these factors. Moreover we have studied oxygen limitations, known to compromise lung function in CF patients colonized by PA. Proteomic analysis of culture media from lab (PAO1) or clinical (from a CF patient, AA2) strains lead to identification of 96 and 223 released proteins, respectively. We have started validation processes for in vitro and in vivo mouse conditions in order to select a panel of biomarkers of the inflammatory response and to investigate the effects of AZM. Identification*

Diverse evidenze suggeriscono che CFTR svolga un ruolo nelle funzioni dei macrofagi. Infatti, è stato dimostrato che i macrofagi alveolari dei topi CFTR-/ hanno una ridotta capacità di uccidere *Pseudomonas aeruginosa*. Inoltre, più recentemente è stato riportato che i macrofagi alveolari contribuiscono direttamente all'aumentata produzione di citochine proinflammatorie in risposta all'LPS ed esperimenti *in vitro* hanno confermato che i macrofagi CF sia polmonari che derivati dal midollo osseo secernono livelli significativamente più elevati di CCL-2, IL-1α, IL-6, G-CSF e MCP-1 rispetto alle cellule normali. Con l'obiettivo di verificare il ruolo di CFTR nelle funzioni dei macrofagi umani, abbiamo prima verificato l'espressione di CFTR sia a livello di RNA messaggero che di proteina nei macrofagi umani isolati dal polmone o differenziati dai monociti (MDM) e successivamente analizzato la capacità dei macrofagi CF di uccidere *P. aeruginosa* intracellulare.

L'analisi dell'espressione dell'RNA messaggero di CFTR, attraverso real time PCR ha dimostrato una sovraespressione di CFTR nei macrofagi rispetto ai monociti parentali nella maggior parte degli individui analizzati e nei macrofagi polmonari rispetto alla linea epiteliale H441. Attraverso microscopia confocale abbiamo localizzato l'espressione di CFTR sulla membrana plasmatica di entrambe le popolazioni macrofagiche. La capacità battericida dei macrofagi CF è stata quindi testata infettando le cellule con un isolato clinico di *P. aeruginosa* attraverso saggi di protezione con l'antibiotico. I risultati ottenuti sugli MDM non hanno evidenziato differenze significative fra le cellule CF (10) e quelle di controllo (12). Sebbene il numero di campioni di macrofagi polmonari CF analizzati sia troppo ridotto (4 CF e 10 controlli) per trarre delle conclusioni sulla loro funzionalità, abbiamo osservato che tali cellule sono meno efficienti nell'eliminare *P. aeruginosa* intracellulare rispetto agli MDM. Attualmente il principale obiettivo del nostro progetto è di definire il ruolo di CFTR nell'attività battericida dei macrofagi polmonari, estendendo lo studio ad un maggior numero di campioni CF. Inoltre, poiché diversi meccanismi sembrano operare nei macrofagi polmonari rispetto a quelli differenziati *in vitro*, ci proponiamo di studiare il contributo del pathway ossidativo e non ossidativo nell'eliminazione di *Pseudomonas aeruginosa* nelle due popolazioni macrofagiche.

36. Effects of azithromycin (AZM) on *Pseudomonas aeruginosa*-induced chronic lung inflammation in cystic fibrosis (FFC Project#15/2008, in progress)

Leal T¹, Mauri P², Sorio C³

¹Department of Clinical Chemistry, Université Catholique de Louvain St. Luc University Hospital; ²Ist. Tecnologie Biomediche CNR, Segrate Milano; ³Dip. Patologia, Patologia Generale, Università di Verona

of pro-inflammatory markers, particularly those released by clinical PA strains, could favor specific target pharmacological interventions and further understanding of the pathogenesis of CF disease.

Effetti dell'Azitromicina (AZM) sull'infiammazione cronica indotta da *Pseudomonas aeruginosa* in fibrosi cistica (FC)

L'infiammazione polmonare cronica è la principale causa di malattia e mortalità in FC. Strategie mirate a ridurre l'esagerata risposta infiammatoria sono previste essere in grado di migliorare la prognosi della malattia. Alla colonizzazione polmonare da *Pseudomonas aeruginosa* (PA) segue l'interazione batterica con l'ospite mediata dal contatto diretto del microrganismo e, particolarmente nei ceppi mucoidi, da molecole lesive rilasciate.

Durante il nostro primo anno di lavoro abbiamo dimostrato che PA isolati da pazienti (clinici) producono molecole solubili capaci di far rilasciare da cellule delle vie aeree umane agenti proinflammatori. Abbiamo determinato le condizioni sperimentali per identificare queste molecole. Inoltre sono state esaminate condizioni con ridotto ossigeno, riscontrate in pazienti FC con funzione polmonare compromessa ed infezione da PA. L'analisi delle proteine presenti nell'ambiente in cui crescono PA di tipo laboratoristico (PAO1) o clinico (AA2) ha identificato 96 e 223 proteine, rispettivamente. Abbiamo intrapreso la verifica di condizioni sperimentali in cellule in coltura in laboratorio ed in topi al fine di selezionare un pannello di marcatori della risposta infiammatoria e procedere allo studio degli effetti dell'AZM.

L'identificazione di molecole proinflammatorie, particolarmente quelle rilasciate da PA clinici, potrebbe favorire terapie specificamente mirate ed ulteriore comprensione delle modalità di sviluppo della malattia in FC.

37. Pre-clinical evaluation of new vitamin E-based anti-inflammatory agents in CF (FFC Project#13/2008, in progress)



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

Galli F¹, Iuliano L², Schock CB³, Goracci GF⁴

¹Dipart. Med. Interna - Sez. Bioch. Appl. e Scienze Nutrizionali - Univ. Perugia, ²Dipart. Med. Interna e vascolare - Univ. La Sapienza Roma, ³Queen's University Belfast, Respiratory Medicine Research Group, ⁴Dipart. Med. Interna - Sez. Biochimica - Univ. Perugia

Vitamin E, a micronutrient with antioxidant activity often included in nutritional supplements for cystic fibrosis (CF) patients, has been proposed to exert biochemical and molecular effects that are consistent with a role as anti-inflammatory agent. The present project has investigated some nutritional and pharmacological aspects of this vitamin that will be essential to further explore at the pre-clinical level such a therapeutic application in CF.

Goals accomplished during this first year of activity are:

1. evaluation of oxidative stress, vitamin E and lipid status in plasma samples of CF patients;
2. preparation of a library of natural and synthetic vitamin E analogues;
3. analysis and pharmacological characterization of these compounds (cell uptake and metabolic processing);
4. anti-inflammatory activity in inflammatory and epithelial cell models (including epithelial cells with and without CF mutations {F508del}).

A detail of the results achieved is reported:

1. The unit of Prof. Iuliano in collaboration with the clinical unit of Dr Quattrucci has completed the cross-sectional evaluation of plasma vitamin E levels in a group of CF patients. These levels were decreased while some abnormalities in the free fatty acid profile were demonstrated in the presence of significant accumulation of cholesterol oxidation markers that are also well known indices of systemic oxidative stress and lipid peroxidation. Vitamin E and polyunsaturated (ω 3) fatty acid supplementation was also preliminarily evaluated for the effect on vitamin E levels without evidence of significant differences between supplemented and non-supplemented patients. These data have been recently published on the American Journal of Clinical Nutrition.
2. A library of 45 vitamin E derived compounds has been prepared and purity, solubility and stability after preparation in water and hydroalcoholic solutions have been determined. These include natural compounds, esters, ethers, amides, and other compounds including some tocopheramines and tocotrienolamines. A rapid screening procedure of these compounds by HPLC analysis in pharmacological preparations and biological samples has been set up. The HPLC test was used also to collect preliminary data of solute partition in hydro-alcoholic media that will be used to produce aerosolized dispersions, micelles and surfactant-

like formulation.

3. A549 type II alveolar cells, peripheral blood leukocytes, human inflammatory and epithelial cell lines derived from different types of human and mouse carcinomas, have been used to characterize cell uptake and toxicity of the test compounds, in order to proceed with a further series of experiments on their anti-inflammatory activity.
4. when used *in vitro*, pharmacological concentrations (between 1 and 100 μ M) of the natural vitamers showed the lowest toxicity in all the cell models under investigation, while the synthetic forms showed different degrees of toxicity with the following order of magnitude: succinate ester \geq ethers $>$ amides \geq amines. As a consequence, tocopheramines and tocotrienolamines were selected as the less toxic between the synthetic compounds to be assessed for an anti-inflammatory activity compared with natural THs and T3s, and CEHC metabolites.
5. Assay methods to assess expression and activity of the enzymes COX2, iNOS and sPLA2, and the production of the inflammatory cytokines TNFa, IL-1b, IL-6 and IL-8 have been set up. Moreover, in cell free experiments tocopherols and CEHC metabolites were found to be inhibitors of the inflammatory enzyme expressed in epithelial cells sPLA₂-IIA. This enzyme activity was assayed by a novel procedure using a fluorogenic substrate (PED6) that is particularly useful for detecting enzyme activity in living cells.

This preliminary evaluation on vitamin E in CF patients suggests that the vitamin E status in these patients could be close to normal, but not sufficient to prevent oxidative stress and cholesterol oxidation at the systemic level. The *in vitro* drug screening phase carried out on vitamin E compounds is in progress in order to obtain more pre-clinical information about the use of vitamin E as anti-inflammatory agent with possible application in CF.

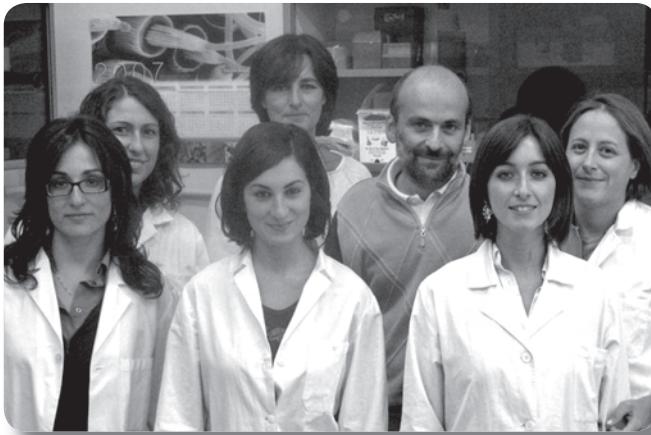
Valutazione preclinica di analoghi ad azione antiinfiammatoria della vitamina E nella Fibrosi Cistica

La vitamina E, è un micronutriente con funzione antiossidante largamente usato nella supplementazione del paziente con fibrosi cistica (CF), con proprietà anti-infiammatorie di possibile interesse farmacologico.

Questo progetto sta indagando alcune delle caratteristiche nutrizionali ed anti-infiammatorie di questa vitamina, che saranno essenziali per eseguire ulteriori fasi di studio pre-clinico ed una sua eventuale applicazione terapeutica in CF. Gli obiettivi raggiunti nel primo anno di attività sono: 1. valutazione della presenza di indici di stress ossidativo, dello stato della vitamina E e lipidico nel plasma di pazienti CF; 2. preparazione di una libreria di composti naturali e sintetici analoghi della vitamina E; 3. analisi e caratterizzazione farmacologica preliminare *in vitro* di questi analoghi (uptake cellulare, tossicità e metabolismo); 4. attività anti-infiammatoria in cellule epiteliali che includono modelli con e senza mutazioni CF {F508del}. In dettaglio, di seguito, i risultati ottenuti.

1. L'unità del Prof. Iuliano in collaborazione con lo staff clinico guidato dalla Dott.ssa Quattrucci, ha completato una valutazione trasversale dei livelli plasmatici di vitamina E in un gruppo di pazienti CF, verificando come questi in valore assoluto fossero diminuiti. Questo dato era accompagnato dalla presenza di un profilo di acidi grassi liberi che presenta caratteristicamente alcune anomalie, e dall'accumulo significativo di prodotti di ossidazione del colesterolo (ossisteroli), i quali sono utili marker della presenza di stress ossidativo a livello sistematico. L'effetto su questi indici della supplementazione con vitamina E ed acidi grassi omega 3 era preliminarmente investigato senza notare effetti significativi sui livelli circolanti di vitamina E tra pazienti supplementati e non-supplementati. Questi dati sono stati recentemente pubblicati

- sulla rivista "American Journal of Clinical Nutrition".
2. Una libreria di 45 composti analoghi alla vitamina E era preparata e la loro purezza e stabilità in soluzioni acquose ed idroalcoliche erano determinate. Questi composti includevano la serie completa delle forme naturali e diverse classi di composti di sintesi come: esteri, eteri, amidi ed amine. Una procedura HPLC per lo screening analitico rapido in preparazioni farmacologiche e campioni biologici (plasma e cellule) di questi composti è stato messo a punto. Questo metodo è stato utilizzato anche per predire il coefficiente di partizione dei composti lipofili in acqua e fasi idroalcoliche, nonché solubilità e dispersione in preparati per aerosolizzazione, micelle e surfattante artificiale.
 3. Cellule A549 (alveolari di tipo II), leucociti da sangue periferico, e linee epiteliali ed infiammatorie umane e murine di vario tipo sono state usate per mettere a punto il saglio di uptake e tossicità cellulare in modo da poter procedere con le ulteriori fasi di studio sull'attività anti-infiammatoria dei composti soggetto d'indagine.
 4. I vitameri naturali saggiati in vitro a concentrazioni farmacologiche (1 - 100 μ M) producevano in tutti i modelli cellulari un basso grado di tossicità, mentre le forme sintetiche mostravano diversi gradi di tossicità che decresceva secondo il seguente ordine di grandezza: estere succinico \geq eteri $>$ amidi \geq amine. Quindi, questi risultati hanno portato a selezionare i composti della classe delle



Andrea Battistoni, terzo da destra, assieme al suo gruppo di ricerca.

Battistoni A¹, Berlotti F²

¹Dip. Biol. Univ. Tor Vergata, Roma, ² Dip. Scienze di Salute Pubblica – Univ. "La Sapienza", Roma

Cystic Fibrosis (CF) is characterized by chronic lung inflammation 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. To identify factors contributing to inflammation and infection we are investigating the involvement in lung disease of two documented chemical modifications characterizing the airway surface liquid of CF patients, i.e. increased iron concentrations and low extracellular glutathione (GSH) levels. We have found that iron promotes biofilm formation by different *B. cenocepacia* clinical isolates and modulates the ability of this microorganism to penetrate within cultured cells. We have also tested the possibility to control invasion ability of iron-modulated *B. cenocepacia* biofilm with lactoferrin, an iron-binding glycoprotein of natural immunity. Our results suggest that low concentrations of lactoferrin are not sufficient to significantly reduce biofilm invasion, but have a deep influence on the transcriptional response of epithelial cells to *B. cenocepacia* infection. In particular, we have observed that lactoferrin can partially down-regulate the expression of some pro-inflammatory genes, such as IL-8 and IL-1 β . Preliminary results suggest that the ability of lactoferrin to modulate gene expression could be related to its ability to localize within the nucleus of treated cells. To deepen our comprehension of GSH dyshomeostasis in CF and to better evaluate the usefulness of therapeutic treatments based on GSH supplementation, we are investigating the intracellular and extracellular GSH status in different CF lines and its modifications

tocoferolamine e tocotrienolamine come molecole da studiare ulteriormente per le loro proprietà anti-infiammatorie in raffronto alle forme naturali ed ai loro metaboliti CEHC.

5. I metodi di analisi dei parametri selezionati per saggiare il potenziale anti-infiammatorio dei composti (espressione ed attività degli enzimi COX2, iNOS e sPLA2, e produzione delle citochine infiammatorie TNFa, IL-1b, IL-6 and IL-8) sono stati messi a punto usando cellule A549 e THP-1. I tocoferoli naturali ed i loro metaboliti CEHC erano osservati preliminarmente inibire l'attività dell'enzima sPLA₂-IIA isolato o da lisato di cellule epiteliali. L'attività di questo enzima infiammatorio era misurata con un metodo messo a punto per questo progetto che impiega il substrato fluorogenico PED6 ed è utile all'impiego in cellule vive. I risultati preliminari dello studio identificano la presenza nel paziente CF di alcune anomalie nello stato della vitamina E e del quadro lipidico che potrebbero predisporre ad un aumentato stress ossidativo, peraltro confermato dall'aumento in circolo dei prodotti di ossidazione del colesterolo. Questo quadro consegue alla condizione di infiammazione cronica dei pazienti CF e giustifica lo sviluppo di nuovi e più efficaci interventi di prevenzione e cura. La fase pre-clinica di "drug screening" e caratterizzazione in vitro di composti derivanti dalla struttura della vitamina E è in corso di svolgimento ed ha già fornito alcune evidenze utili a definirne l'impiego come agenti anti-infiammatori in CF.

38. Effect of glutathione and lactoferrin on redox regulation, metal homeostasis and inflammatory responses of Cystic Fibrosis bronchial cells upon infection with *Burkholderia cenocepacia* (FFC Project#11/2008, in progress)

in response to bacterial infections. *B. cenocepacia* infections have a modest impact on the intracellular GSH pool, but, although we have found that buffered GSH has no direct antibacterial activity, higher intracellular GSH levels are apparently associated to a major resistance to bacterial entry. We are currently analyzing the effects of exogenous GSH on biofilm formation and bacterial ability to adhere and invade epithelial cells.

Effetto del glutazione e della lattoferrina sulla regolazione redox, sull'omeostasi dei metalli e sulla risposta infiammatoria di cellule bronchiali da Fibrosi Cistica invase da *Burkholderia cenocepacia*

La Fibrosi Cistica (FC) è caratterizzata da un'infiammazione polmonare cronica, 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 tessuti polmonari attraverso il rilascio di molecole nocive, tra cui specie reattive dell'ossigeno ed enzimi proteolitici. Per identificare i fattori che contribuiscono all'infiammazione e all'infezione batterica, stiamo studiando il coinvolgimento nella malattia polmonare di due documentate alterazioni nella composizione chimica dei liquidi che rivestono le superfici degli epitelii polmonari, cioè l'aumento nella concentrazione del ferro ed il basso livello di glutatione (GSH) extracellulare.

Abbiamo dimostrato che il ferro promuove la formazione di biofilm da parte di diversi isolati clinici di *B. cenocepacia* e modula la capacità di tale microrganismo di penetrare nelle cellule in coltura. Abbiamo anche esaminato la possibilità di controllare la capacità invasiva del biofilm ferro-modulato di *B. cenocepacia* tilizzando la lattoferrina, una glicoproteina ferro-legante dell'immunità naturale. I nostri risultati suggeriscono che basse concentrazioni di lattoferrina non sono sufficienti per ridurre in modo significativo l'invasione batterica, ma hanno una profonda influenza sulla risposta trascrizionale delle cellule epiteliali all'infezione da *B. cenocepacia*. In particolare, abbiamo osservato che la lattoferrina può ridurre l'espressione di alcuni geni pro-infiammatori, tra cui quelli per le interleuchine IL-8 e IL-1 β . Risultati preliminari suggeriscono che la capacità della lattoferrina di modulari l'espressione genica sia legata alla sua abilità di penetrare nel nucleo delle cellule trattate.

Per meglio comprendere il significato delle alterazioni nell'omeostasi del

GSH nella FC e per valutare l'utilità di trattamenti terapeutici basati sulla somministrazione di GSH, stiamo analizzando lo stato del GSH intra- ed extracellulare in diverse linee di cellule FC e le sue modificazioni in seguito all'infezione batterica. Le infezioni di *B. cenocepacia* hanno un modesto impatto sul contenuto intracellulare di GSH, ma, sebbene abbiano

osservato che il GSH non ha una diretta attività antibatterica, alti livelli intracellulari di GSH sono apparentemente associati ad una maggiore resistenza all'ingresso dei batteri. Stiamo inoltre analizzando gli effetti della somministrazione di GSH esogeno sulla formazione di biofilm e sulla capacità dei batteri di penetrare nelle cellule epiteliali.



Alfonso Pompella

Alterations in lungs of CF patients result from repeated infections and inflammation. Inflammatory cells produce injurying substances, which eventually damage lung tissues and favour disease progression. A major defensive role is played by antioxidants, among which glutathione (GSH) is abundant in epithelial lining fluid (ELF), where it can directly quench damaging substances. ELF also contains gamma-glutamyltransferase (GGT), the enzyme capable of metabolizing GSH. In CF patients ELF GGT is increased, while GSH is correspondingly decreased. The finding suggests that accumulation of GGT in ELF might weaken antioxidant defenses in the extracellular compartment.

Increased GGT activity in ELF may produce additional undesired effects. A close relationships exists between GGT function and metabolism of S-nitrosoglutathione (GSNO), a storage form of physiologically active nitric oxide (NO). Our recent work has documented that GGT participates in GSNO degradation and NO utilization (Angeli, Arch Bioch. Bioph. 2009; Pompella, Patent PCT/IB2007/002090). GSNO is critical for bronchial dilation, and adequate levels are essential for respiration (Que, Science 2005). The increased GGT levels occurring in CF may unduly decrease available GSNO, thus contributing to respiratory dysfunction. Also, it is known that GGT catalyzes the degradation of leukotriene LTC4, a factor in turn stimulating pro-inflammatory chemokine IL-8; GGT-mediated removal of LTC4 could thus effect a down-modulation of inflammation. On the other hand, we have previously shown that GGT activates transcription factors AP-1 and NF- κ B (Paolicchi, Bioch. Pharm. 2002), both involved in promotion of inflammation through IL-8 induction (Thompson, JBC 2008).

Our Project is aimed at elucidating the significance of GGT in CF related lung inflammation. We performed preliminary experiments with CF-related cell lines and human neutrophils (PMNs), and set up procedures to analyze the molecular characteristics of the GGT protein (immunoblot, size exclusion chromatography). The results indicate that indeed activated PMNs can release GGT,

39. Origin of lung fluid gamma-glutamyltransferase and its effects in modulation of antioxidant balance, inflammation and CF respiratory dysfunction (FFC Project#22/2009, new)

Pompella A

Dipart. Patologia sperimentale - Università di Pisa

whose molecular features are the same of GGT recovered from CF excretes. The possibility thus exists that increased GGT in ELF derives from PMNs and plays a pro-inflammatory role, which would configure it as a potential pharmacological target.

Origini della gamma-glutamiltransferasi del fluido polmonare e suoi effetti nella modulazione del bilancio antiossidante, dell'infiammazione e della disfunzione respiratoria in corso di FC.

Le alterazioni polmonari in corso di FC sono conseguenza di processi infiammatori scatenati dalle ripetute infezioni. Le cellule infiammatorie producono infatti sostanze chimiche che danneggiano i tessuti polmonari stessi, contribuendo così alla progressione della malattia. Un ruolo difensivo molto importante è giocato da diversi antiossidanti, tra i quali spicca il glutathione (GSH): esso si concentra nel fluido delle vie respiratorie (ELF), e inattiva direttamente molte sostanze dannose. Il fluido ELF contiene anche gamma-glutamiltransferasi (GGT), enzima in grado di degradare il GSH. Nei pazienti FC i livelli di GGT nell' ELF aumentano, e di conseguenza i livelli di GSH diminuiscono. Probabilmente dunque l'aumento di GGT indebolisce le difese antiossidanti alla superficie respiratoria.

Nel fido ELF la GGT può produrre altri effetti nocivi. Noi abbiamo dimostrato infatti che la GGT può degradare il S-nitrosoglutathione (GSNO; Pompella, Brev. n. PCT/IB2007/002090). Il GSNO è critico per la pervietà dei bronchi, e livelli adeguati sono necessari per una corretta funzione respiratoria. La GGT nel fluido ELF potrebbe degradare troppo GSNO, aggravando così la disfunzione respiratoria. Inoltre, la GGT può degradare il leucotriene LTC4, una molecola infiammatoria che stimola l'infiammazione richiamando un'altra sostanza, l'interleuchina-8 (IL-8). L'azione della GGT sul LTC4 sembrerebbe dunque avere un significato di attenuazione del processo infiammatorio. D'altronde noi abbiamo osservato che proprio la GGT può attivare due fattori (AP-1, NF- κ B), che a loro volta stimolano la produzione di IL-8. In tal modo allora la GGT potrebbe essa stessa stimolare l'infiammazione.

Il nostro Progetto intende chiarire il significato esatto della GGT nei processi infiammatori in corso di FC. Dopo esperimenti preliminari su linee cellulari con difetto FC e su cellule infiammatorie umane, ed avendo perfezionato procedure analitiche fini per valutare le caratteristiche molecolari della proteina GGT, abbiamo ora indicazioni che sì, i leucociti neutrofili attivati possono liberare all'esterno una GGT con caratteristiche molecolari identiche a quelle della GGT isolata da escreti FC. Esiste dunque la possibilità che gli aumentati livelli di GGT nel fluido ELF derivino dalle cellule infiammatorie ed abbiano un'azione pro-infiammatoria, il che suggerirebbe l'opportunità di intervenire farmacologicamente contro questo enzima.



40. Immune evasion strategies underlining the adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients (FFC Project#17/2009, new)

Bernardini ML¹, Molinaro A², Alloui A³,

¹Dipartimento di Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Sapienza-Università di Roma, Italia, ²Dipartimento di Chimica Organica e Biochimica, Università di Napoli "Federico II", Italia ³Laboratoire de Bactériologie Moléculaire ULB, Faculté de Médecine, Bruxelles, Belgium

Maria Lina Bernardini, terza da destra, e il suo gruppo di ricerca.

The immune response detects microbe molecular signatures called PAMPs, pathogen associated molecular patterns, that are sensed by pattern recognition receptors, PRR(s). The interaction between a PRR with its cognate PAMP(s) triggers the innate immune response aimed at pathogen eradication. However, pathogens have evolved immune evasion strategies in order to escape or to modulate PRR recognition. In line with these issues, *Pseudomonas aeruginosa* (PA) isolated from Cystic Fibrosis (CF) chronically infected patients differ from PA cultured from acute infection. Phenotypic variation includes type III secretion (T3SS) system and sometimes loss of flagellum and pili. These modifications underline the PA immune evasion strategies likely resulting in increased chances of bacterial survival in the airway environment of CF patients.

The PRRs Nod1, Nod2 and Ipaf, belonging to the family of NLR proteins, are involved in cytosolic detection of microbes. Nod1 and Nod2 recognize peptidoglycan (PGN) motifs while Ipaf senses flagellin monomers and triggers a process of cell death, called pyroptosis, characterized by the release of IL-1 β and IL-18. Pyroptosis and apoptosis are opposite processes, as pyroptosis is associated with inflammation whereas apoptosis does not.

Our experimental approach involves the analysis of clinical PA strains isolated from individual CF patients at early and chronic phases of lung infection.

We are currently analyzing their: (i) PGN composition; (ii) PGN immunopotential in vitro and in vivo; (iii) T3SS structure and flagellin production; (iv) ability to induce apoptosis and/or Ipaf-mediated pyroptosis.

We have already demonstrated that during chronic infections PA modifies the PGN composition, thereby modulating the recognition by the PRR Nod1 and, consequently, the host immune response. At present, we are evaluating the biological impact of the individual muropeptides derived by the PGN enzymatic digestion. Furthermore, we are assessing whether early and chronic stages of PA infection are associated with strains harboring wild type/defective T3SS and triggering a different kind of cell death process-pyroptosis/apoptosis in CF and non-CF cells.

Our aim is to contribute to the development of new therapeutic tools focused on: (i) the (modified) bacterial structures and (ii) the effective host responses whose impact has been influenced by the modifications of the bacterial molecular complexes observed in PA from chronic infections.

Le strategie di evasione immune attuate da *Pseudomonas aeruginosa* nel processo di adattamento all'ospite nell'infezione cronica delle vie respiratorie in pazienti con fibrosi cistica

I microrganismi patogeni hanno evoluto la capacità di sfuggire al loro riconoscimento nell'ospite e di interferire con i meccanismi dell'immunità innata ed acquisita. Questo processo viene complessivamente definito come "evasione immune". L'uomo percepisce la presenza di microrganismi "invasori" mediante molecole recettoriali, chiamate PRRs (*pattern recognition receptors*) in grado di riconoscere particolari "etichette" portate dai patogeni e presenti solo nel mondo microbico, denominate PAMPs, *Pathogen Associated Molecular Patterns*. Nel mondo batterico i PAMPs sono strutture spesso indispensabili alla vita, quali il lipopolisaccaride (LPS) ed il peptidoglicano (PGN). È ormai evidente che una delle strategie di evasione immune più efficienti dei batteri è quella che comporta la modificazione dei PAMPs per limitare/modulare il riconoscimento da parte dei PRRs. È noto che *Pseudomonas aeruginosa* (PA) è il patogeno più comunemente isolato dai polmoni dei malati di Fibrosi Cistica (FC). Le infezioni da PA persistono anni e spesso sono concuse del decesso dei pazienti.

Questo progetto si propone di investigare sui meccanismi di evasione immune che permettono a PA di stabilire nelle vie aeree dei pazienti FC quei comportamenti "furtivi" che sono alla base dello sviluppo delle infezioni croniche. Il nostro "materiale di studio" è rappresentato da ceppi clinici di PA isolati da singoli pazienti FC durante la fase iniziale e cronica dell'infezione.

Il nostro scopo è quello di verificare:

- le modificazioni delle strutture agenti da PAMPs in questi ceppi, in particolare il PGN e la flagellina;
- l'impatto che queste variazioni hanno nel paziente FC, ovvero, se a modificazioni strutturali di PA corrispondano differenti risposte dei tessuti infettati.

Abbiamo già osservato che ceppi di PA derivanti da infezioni croniche dei polmoni mostrano modificazioni strutturali sinergiche che determinano un decremento nel riconoscimento da parte del sistema immunitario dell'ospite. I ceppi di PA in grado di instaurare infezioni croniche sono, quindi, capaci di "nascondersi" dal sistema immunitario e di innescare risposte differenti da quelle determinate dai ceppi isolati nelle infezioni iniziali. Stiamo proseguendo la stessa linea di ricerca al fine di contribuire allo sviluppo di nuovi strumenti terapeutici disegnati sulla base del cambiamento delle strutture batteriche e delle risposte del tessuto respiratorio durante le fasi croniche dell'infezione da PA.

41. Role of CFTR-Connexin interaction on PGE2 signaling and inflammation: implication for cystic fibrosis (FFC Project#19/2009, new)



Marc Chanson, primo da destra in basso, e il suo gruppo di ricerca.

Chanson M¹, Losa D¹, Dehecchi MC²,

¹Laboratoire d'Investigation Clinique III, Département de Pédiatrie, Hôpitaux Universitaires et Faculté de Médecine de Genève,

Suisse; ²Laboratorio di Patologia Molecolare e Laboratorio di Chimica Clinica ed Ematologia, Azienda Ospedaliera-Universitaria di Verona, Italia,

A key step in the pathogenesis of cystic fibrosis (CF) lung disease is the airway surface liquid dehydration, leading to thick mucus formation, ineffective mucociliary clearance and exaggerated inflammation in response to infection. Airway surface liquid (ASL), which is dependent on chloride transport across the apical membrane via CFTR channels, is important for efficient mucociliary clearance and defense mechanisms against airways infections. CFTR and ASL are regulated by G protein-coupled receptors (GPCRs). Increasing evidence points to a defect in the coordination of GPCRs' signaling in CF airway epithelial cells. Since GPCRs are also known modulators of inflammation, a defect in their signalling coordination could be involved in the exaggerated inflammation of the CF disease. Connexins (Cx) are important for extracellular and intercellular coordination of tissue activity and for the maintenance of tissue homeostasis; they form hemichannels releasing cytosolic compounds in the extracellular environment, and gap junction channels exchanging directly molecules between coupled cells. Our preliminary data suggest

that Cxs coordinate a signaling network, comprising CFTR and GPCRs in the airway epithelium. In particular, we found that Cxs contribute to ASL height by mediating CFTR channel activation in response to prostaglandin E2 (PGE2). PGE2 is released in response to TNF-a, ATP, adenosine as well as to protease stimulation, and is known to modulate inflammation. In this project, we will address whether dysfunction of CFTR interferes with the Cx- PGE2 signaling and the associated inflammatory response in airway epithelial cells. Because ASL height is crucial for efficient mucociliary clearance, the project may also uncover a link between Cx, infection and inflammation. We believe that understanding the mechanisms controlling ASL homeostasis is crucial for discovering new pharmacological target in CF to compensate for the defective CFTR function.

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

Un aspetto chiave nella patogenesi della malattia polmonare nella fibrosi cistica (CF) è la disidratazione del liquido di superficie delle vie aeree (ASL), che porta alla formazione di muco denso, ad una riduzione della sua rimozione e ad una esagerata infiammazione in risposta all'infezione. ASL, che dipende dallo scambio ionico transmembrana e quindi dall'azione del canale CFTR, è importante per un'efficiente

clearance mucociliare e rappresenta un meccanismo fondamentale per la difesa contro le infezioni delle vie aeree. Un numero crescente di osservazioni indica che nelle cellule epiteliali polmonari affette da CF è presente un difetto nella coordinazione dei GPCR, recettori accoppiati a proteine G che regolano entrambi CFTR e ASL. Poiché i GPCR sono anche dei modulatori della risposta infiammatoria, un difetto nella coordinazione delle loro vie di segnalazione potrebbe essere implicato nell'eccessiva risposta infiammatoria della paologia polmonare CF. Le connessine (Cx) sono proteine che coordinano l'attività inter- ed extracellulari nei tessuti e sono importanti nel mantenimento dell'omeostasi tissutale. Esse formano emicanali, per il rilascio di sostanze citosoliche all'esterno della cellula, e giunzioni gap, in grado di permettere lo scambio diretto di molecole tra cellule adiacenti. Dati preliminari indicano che le Cx coordinano una rete di segnali cellulari comprendenti CFTR e GPCR. In particolare abbiamo scoperto che le Cx contribuiscono all'aumento di ASL, modulando l'attivazione di CFTR indotta da prostaglandina E2 (PGE2). Le cellule rilasciano PGE2, molecola notoriamente coinvolta nella modulazione dell'infiammazione, in risposta a stimoli come TNF-a, ATP, adenosina e proteasi. Lo scopo di questo progetto è quindi di definire se il difetto di CFTR possa interferire con le vie di segnale mediate da Cx e PGE2, e con la risposta infiammatoria nelle cellule epiteliali delle vie aeree. Poiché ASL è fondamentale per un'efficiente clearance mucociliare, il nostro studio potrebbe rivelare un rapporto fra le Cx, l'infezione e la risposta infiammatoria. Crediamo che comprendere i meccanismi che controllano l'omeostasi di ASL sia fondamentale per identificare nuovi bersagli farmacologici nella fibrosi cistica per compensare il difetto di CFTR.





Introduction: Studies on emerging aspects of CF genetics

Rosatelli MC

Director Molecular Genetics Lab, Department Biomedical Science and Biotechnology,
Clinical and Biological Section of Development Age, University of Cagliari

In cystic fibrosis genetics the most interesting threads of scientific research are related to: 1. comprehension of pathogenetic mechanisms of the disease correlated to CFTR gene and its regulation, which are important both for the definition of the protein function and the development of therapeutic molecules, but also for important repercussions on preventive and prognostic field of the disease; 2. comprehension of mechanisms correlated with the modulation of the clinical picture, through the search for modifier genes influencing the development of pulmonary disease; 3. research and functional characterization of genes CFTR- correlated that, interacting with CFTR gene or performing analogous functions, may compensate its functional defect; 4. development of prevention programmes of the disease, already started in several populations (North America and Europe) but not in Italy. Relevant arguments will be discussed during this session.

Franco Pagani's team will show the progresses of two projects, both focused on the study of splicing processes. One of the projects, already concluded, refers to CFTR gene, and the second one, still in progress, with the aim at studying gene splicing correlated to CFTR function, in particular to TMEM16A gene. The importance of the splicing processes in CFTR gene function is well known, as it is one of the most frequent cause of loss or reduction of gene function, and Pagani in the past published several works on this matter. The fine definition of mechanisms regulating this process represents as well an important starting point for the development of drugs. During these studies they hypothesized a role of CELF proteins in the inclusion of exon 9, this role being already proved in neurofibromatosis type 1, where alternative splicing modulates the activity of different isoforms. In the second project, in progress, the same team focused the attention to those genes correlated to Cystic Fibrosis, always studying physiologic and pathologic mechanisms of splicing, with the aim at finding target molecules for their correction. They analyzed TMEM16A gene, recently identified as a novel calcium dependent chloride channel (CaCC), which plays a fundamental role in the secretion of chloride at the airways epithelial level but also in other organs. CaCC may have an important function compensating the defect of dysfunction of CFTR gene. Pagani's team is co-author in a very recent work published on this matter.

Giuseppe Castaldo and his team studied some members of SLC26 protein family, that is transport proteins interacting with CFTR, in patients with different CF-like phenotypes and with not defined genotype. Their goal is to define if pathological picture may be ascribed to functional defects of genes codifying for some of those proteins. They are studying four genes: SLC26A3, expressed by colon, responsible of a rare form of chronic diarrhoea (CLD), SLC26A6, expressed by pancreas, SLC26A8, expressed by testis and SLC26A9, expressed by lung. In particular the last type of gene has been found in airways epithelium and it behaves as chloride channel. Recently, electrophysiological studies demonstrated, in vitro, that SLC26A9 protein acts as anion conductor in the apical

cells of the human bronchial epithelium and it needs a CFTR functional protein to perform its functions. Castaldo highlighted different mutations, however they did not show a different allele frequency among CF patients compared to the control subjects. Despite of the fact that this result can suggest the absence of a pathogenetic effect correlated to the mutations, as some of those are situated in critical regions of the examined genes, the project will develop functional studies aimed at verifying the effect on the genetic product.

Another important aspect implicated in the pulmonary pathology was studied by the groups of **Gasparini and Cabrini**, in a project recently concluded. They looked for genetic factors able to modify the pulmonary disease amongst 509 CF patients characterized by homogeneous genotype (F508del homozygous), divided in two groups with different phenotypes: severe and mild pulmonary presentation. In particular, they searched for a correlation between chronic infection and innate immune response starting, by this way, a study of association of SNP on 149 genes implicated in the innate immune response: amongst them, the two groups identified a significant association with 2 SNP. Of course, further investigations will be necessary to demonstrate their possible role. Moreover, three polymorphisms on hBD-1 gene were studied on a cohort of Italian patients, evidencing a protective genotype. In any case, for all of these studies, it is necessary to do replications on different populations, otherwise the study would not be valid. This aspect is a part of a project of the same group, now in progress. In addition, it has been started a study of GWAS to identify new modifier genes involved in the improvement of the clinical pulmonary presentation in CF.

With the same intent to find new molecular mechanisms causing CF disease, **Pucci-Tomaiuolo-Bombieri's** groups analysed the role of the CFTR gene promoter in the regulation of the expression. It is well-known that even though CFTR gene has an expressive pattern strongly controlled, since now they have not yet defined implicated regulatory sequences. It may be possible that these regions might be located in different regions from the promotion "core" or in other regions normally not implicated in this process, i.e. the intronic sequences. In this project they found many different variations of sequences, some of them specific for the singular patient. Through a proteomic approach, they also searched for proteins with regulating function interacting with a promoter region of 320bp. However, it is necessary to do more investigations in order to evaluate both the cis-acting sequences and the protein role in regulating the gene expression.

In the end, **Maria Cristina Rosatelli** and her group, has obtained a fund from the FFC Foundation to develop a screening model for couples aimed at measuring the risk of CF. Sardinia has appeared the ideal region to experiment the model for many reasons: the predictive power of the test is now at 94% rating, despite of the fact that the research is circumscribed to a few number of mutations. In the same place where they effect the molecular screening, there are also services dedicated to genetic counselling and to the Thalassemia screening: both services started in seventies with excellent outcomes and nowadays they

are well validate. At the same time there is also a gynaecological service offering assistance to pregnant couples: the service also takes the fetal samples. For these reasons screening refers to the same catchments using the same structures. Preliminary results show a massive adhesion, demonstrating the sensitivity of users and feasibility of the programme.

Introduzione: Studi su aspetti emergenti della genetica CF

Nell'ambito della genetica della Fibrosi cistica i filoni della ricerca più interessanti riguardano: la comprensione dei meccanismi patogenetici della malattia correlati con il gene CFTR e con la sua regolazione, importanti sia per una più fine definizione della funzione proteica, sia per lo sviluppo di molecole terapeutiche nonché per le importanti ripercussioni in campo prognostico e di prevenzione della malattia; la comprensione dei meccanismi correlati con la modulazione del quadro clinico, attraverso la ricerca di geni modificatori che influenzano in special modo lo sviluppo della patologia polmonare; la ricerca e la caratterizzazione funzionale di geni CFTR correlati che interagiscono con il gene CFTR o che, svolgendo funzioni analoghe, possono sopperire ad un suo deficit funzionale; lo sviluppo di programmi di prevenzione della malattia, già avviati in numerose popolazioni (nord America ed Europa) ma non in Italia.

Alcuni degli argomenti più attuali verranno discussi durante questa sessione. Il gruppo di **Franco Pagani** ci illustrerà i progressi di due progetti entrambi focalizzati a studiare i processi di splicing, uno ormai concluso, riferito al gene CFTR, l'altro in progresso volto a studiare lo splicing di geni correlati con la funzione del CFTR, in particolare il gene TMEM16A. L'importanza del processo di splicing nella funzione del gene CFTR, rappresentando una delle più frequenti cause di perdita o riduzione di funzione del gene, è ben nota e Pagani ha pubblicato in passato numerosi lavori sull'argomento. La fine definizione dei meccanismi che regolano questo processo rappresenta inoltre una importante base di partenza per lo sviluppo di farmaci. Durante questi studi è stato ipotizzato un ruolo nella inclusione dell'esone 9 delle proteine CELF, ruolo già provato recentemente nella neurofibromatosi tipo 1, dove splicing alternativi modulano l'attività delle diverse isoforme. Nel secondo progetto, ancora in corso, lo stesso gruppo volge la propria attenzione verso geni correlati con la fibrosi cistica, sempre studiandone i meccanismi fisiologici e patologici dello splicing, con l'obiettivo di individuare molecole target per la loro correzione. Inoltre focalizzano la loro attenzione sul gene TMEM16A, recentemente identificato come un canale del cloro Ca^{++} dipendente (CaCC) che gioca un ruolo fondamentale nella secrezione del cloro a livello degli epitelio delle vie aeree ma anche di altri organi. I CaCC possono rivestire una importante funzione nel compensare un difetto da disfunzione del gene CFTR. Il gruppo di Pagano è coautore di un recentissimo lavoro pubblicato sull'argomento.

In ambito affine sono state condotte le ricerche di **Giuseppe Castaldo** e del suo gruppo, che hanno invece studiato alcuni membri della famiglia delle proteine SLC26, proteine di trasporto che interagiscono con CFTR, in pazienti con diversi fenotipi CF-like e genotipo non definito, con l'intento di definire se il quadro patologico potesse essere ascrivibile a difetti di funzione dei geni che codificano per alcune di queste proteine. Quattro i geni studiati: SLC26A3, espresso nel colon e responsabile di una rara forma di diarrea cronica (CLD), SLC26A6, espresso nel pancreas, SLC26A8, espresso nel

testicolo e SLC26A9, espresso nei polmoni. In particolare, quest'ultimo si esprime nell'epitelio delle vie aeree e si comporta come canale del cloro. Molto recentemente, studi elettrofisiologici hanno dimostrato, in vitro, che la proteina SLC26A9 agisce come conduttore di anioni nelle cellule apicali dell'epitelio bronchiale umano e necessita di una proteina CFTR funzionale per svolgere la sua funzione. Castaldo ha messo in evidenza diverse varianti, che però non mostrano una frequenza allelica diversa nei pazienti affetti rispetto a quelli di controllo. Pur deponendo questo dato per una assenza di effetto patogenetico correlato alle varianti, poiché alcune di esse risiedono in regioni critiche dei geni esaminati, il progetto prevede lo sviluppo di studi funzionali atti a verificarne l'effetto sul prodotto genico. Un altro importante aspetto correlato con la patologia polmonare è stato studiato dai gruppi **Gasparini-Cabrini** che hanno, in un progetto appena concluso, ricercato fattori genetici capaci di modificare la malattia polmonare in 509 pazienti affetti da fibrosi cistica con genotipo omogeneo (F508del omozigoti), divisi in due gruppi fenotipicamente ben distinti di quadro polmonare grave e lieve. In particolare hanno cercato una correlazione tra infezione cronica e risposta immunitaria innata, avviando uno studio di associazione di SNP su 149 geni implicati nella risposta immunitaria innata e tra questi identificato una associazione significativa con 2 SNP per i quali saranno comunque necessari ulteriori studi atti a determinarne il possibile ruolo. Sono stati inoltre studiati tre polimorfismi sul gene hBD-1, ed evidenziato un genotipo protettivo, su una coorte di pazienti italiani. Per tutti questi studi sono comunque sempre necessari degli studi di replicazione su differenti popolazioni, requisito indispensabile per la loro validazione. Questo aspetto è parte integrante di un progetto dello stesso gruppo tuttora in corso. Inoltre è stato avviato uno studio di GWAS per l'identificazione di nuovi geni modificatori coinvolti nel miglioramento del quadro clinico polmonare in fibrosi cistica.

Sempre nell'intento di definire nuovi meccanismi molecolari che causano fibrosi cistica il gruppo **Pucci-Tomaiuolo-Bombieri** ha analizzato con diversi approcci il ruolo del promotore del gene CFTR nella regolazione dell'espressione. E' noto che nonostante il gene CFTR abbia un pattern di espressione fortemente regolato, non sono sinora state definite sequenze regolatorie implicate. E' possibile che tali regioni possano essere localizzate in regioni diverse dal "core" del promotore, o in altre regioni classicamente non coinvolte nel processo, ad esempio sequenze introniche. In questo progetto sono state identificate numerose variazioni di sequenza, alcune delle quali peculiari dei pazienti. Con un approccio proteomico sono state inoltre ricercate proteine a funzione regolatoria interagenti con una regione promotrice di 320bp. Per valutare il ruolo sia delle sequenze cis-acting che delle proteine nella regolazione dell'espressione del gene sono però necessari ulteriori approfondimenti.

Per finire, **Maria Cristina Rosatelli** e il suo gruppo, ha avuto dalla Fondazione un finanziamento per lo sviluppo di un modello di screening di coppia per la ricerca delle coppie a rischio per Fibrosi cistica. La Sardegna è risultata la regione ideale per sperimentare il modello per ragioni diverse: il potere predittivo del test si attesta ormai al 94%, con la ricerca di un numero ridotto di mutazioni (14); nella stessa struttura dove viene attuato lo screening molecolare, insistono un servizio dedicato alla consulenza genetica e allo screening delle talassemie, per le quali il programma di prevenzione, avviato negli anni '70 con risultati eccellenti, è ormai ben collaudato, ed un servizio di ginecologia che segue le coppie in gravidanza ed eventualmente effettua i prelievi fetali. Lo screening è stato pertanto avviato sullo stesso bacino di utenza e utilizzando le stesse strutture. I risultati preliminari mostrano una adesione massiccia, dimostrando la sensibilità dell'utenza e la fattibilità del programma.



Franco Pagani, terzo da sx., in seconda fila con il suo gruppo di ricerca.

42. - Evaluation of disease causing mutations in CFTR co-transcriptional splicing units: diagnostic and therapeutic aspects

(FFC Project#20/2007, concluded)

- Molecular pathology of the pre-mRNA splicing machinery in cystic fibrosis: mechanistic aspects and therapeutic approaches (FFC Project#9/2009, extension)

Pagani F, Goina E
ICGEB, Trieste

When a gene is expressed, the first step is the production of a precursor RNA molecule that is identical to the one of the DNA strands. This molecule contains the information necessary to direct the synthesis of a protein, the ultimate product of a gene. However, this information is distributed on a small segment of the RNA molecule, and the large bits between the segments have to be removed. In CFTR gene, changes in the DNA may in turn affect the signals in the RNA that are required for splicing. This means that splicing either does not happen, or proceed incorrectly which means that the protein is not produced and the disease results.

In this project, we have explored the regulation of pre-mRNA splicing in different CFTR systems. Our attention has focussed on novel and trans-acting elements and co-transcriptional events involved in normal and pathological splicing. Through studies in minigenes, binding experiments, cotransfection and siRNA-mediated analysis of splicing factors, we have elucidated for each system basic mechanisms that are involved in their normal and/or pathological regulation. In CFTR exon 9 we have identified novel trans-acting splicing factors belonging to the CELF proteins that negative regulate its inclusion. We also provide evidence that the recognition of this exon depends on the elongation rate of the polIII. In CFTR exon 12 we have evaluated novel exonic mutations and studied the effect of regulatory splicing factors involved. On the other hand, the study of the 5' part of CFTR did not reveal any regulatory effect mediated by long range interactions, suggesting that additional splicing regulatory elements are involved.

In the novel project we intend to test novel strategies for correction of individual splicing defects in CFTR gene and to explore the contribution of other recently identified genes in the disease. Through the analysis of the basic mechanism of aberrant and normal splicing this study intends to identify suitable targets for oligonucleotide-mediated splicing correction. In parallel, to understand the contribution of the recently identified TMEM16A gene (a novel calcium dependent chloride channel) in the disease pathogenesis we will characterize its alternative splicing variants, their tissue specific distribution and splicing regulation.

- **Valutazione di mutazioni che causano malattia in unità co-trascrizionali di splicing del gene CFTR: aspetti diagnostici e terapeutici**
- **Patologia molecolare del meccanismo dello splicing: aspetti meccanicistici ed approcci terapeutici**

Il progetto ha come scopo quello di identificare le cause a livello molecolare dei difetti di "splicing" nel gene CFTR al fine di provvedere a nuovi mezzi diagnostici e strategie terapeutiche. I difetti di "splicing" rappresentano una parte delle mutazioni CFTR e interferiscono con la normale maturazione dell'RNA. Quando un gene viene espresso, il primo passo consiste nella produzione di una molecola di precursore di RNA, che è identica a quella del DNA che funge da stampo. Questa molecola contiene l'informazione necessaria per dirigere la sintesi di una proteina, ed è il prodotto finale di un gene. Tuttavia, l'informazione che riguarda la proteina è contenuta solo in un piccolo segmento della molecola di RNA, mentre i più larghi pezzi tra questi segmenti devono essere rimossi. Questo avviene grazie ad un processo conosciuto come "splicing" ed una serie di complessi RNA/proteine identificabili come il "macchinario dello splicing" sono coinvolti. La macchina dello splicing può essere implicata nella CF a diversi livelli. Alcune mutazioni CF causano un difetto di "splicing" e, interferendo con la normale maturazione dell'RNA, riducono la produzione della proteina CFTR. Spesso il difetto avviene in modo difficilmente prevedibile poiché le nostre conoscenze sulla regolazione dello splicing sono ancora limitate. Il progetto ha studiato le cause a livello molecolare di alcuni difetti di "splicing" nel gene CFTR. Durante lo studio sono stati identificate proteine regolatorie (fattori di splicing come TDP43 e CELF) e le corrispondenti sequenze coinvolte nello splicing normale e patologico. Nel nuovo progetto parte delle conoscenze acquisite verranno utilizzate per sviluppare strategie terapeutiche mirate per correggere singoli difetti di splicing. In particolare, attraverso un ulteriore approfondimento dei meccanismi di base verranno identificate sequenze bersaglio per correzioni mediante oligonucleotidi. Inoltre si studierà la regolazione di un gene recentemente identificato che produce un canale del cloro alternativo la cui modulazione potrebbe rappresentare un nuovo approccio terapeutico. In particolare, l'attivazione di alcune forme di splicing specifiche di questo canale potrebbe compensare il difetto del gene CFTR.

43. Genetic factors influencing pulmonary disease in Cystic Fibrosis (CF) patients (FFC Project#3/2008 concluded; FFC Project#8/2009, extension)



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

Gasparini P¹, Cabrini G²

¹Dipart. Scienze dello Sviluppo e Riproduttive - Univ. Trieste, ²Lab. Patologia Molecolare - Az. Osp. Verona

In this work we tried to identify the genetic component responsible for the different clinical manifestations of cystic fibrosis. Our interest has been aimed about lung function in patients characterized by the same genetic background at the level of CFTR gene primarily responsible for cystic fibrosis.

The role of natural or innate immunity, responsible for the first non-specific defenses of our body against any type of pathogen, had not yet been analyzed in patients with cystic fibrosis. For this we designed a study involving the analysis of 768 SNPs (single nucleotide polymorphisms) distributed in 149 genes involved in innate immune response in 509 cystic fibrosis patients (308 with mild and 201 with severe clinical manifestations pulmonary illness) characterized by genetic homogeneity at the level of the locus CFTR (homozygous F508del).

Our study showed for the first time a statistically significant association between Akt3 and PLCB3 genes and pulmonary phenotype. To our knowledge the two 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.

The gene Akt3 belongs to a family of kinases known to be involved in proliferation and cell differentiation, in apoptosis and in the tumor genesis. The Gene PLCB3, however, is crucial in the process of signal transduction and its activation can respond to stimuli, such as hormonal, neural, etc. In order to clarify and better understand the role of these two genes in determining the lung disease in cystic fibrosis require further functional studies are currently underway. Moreover, in a group of Italian patients, enrolled by the various Regional Reference Center for Cystic Fibrosis Italians, three functional polymorphisms of the gene encoding the DEFB1 antimicrobial peptide beta defensin-1 (hBD-1) were tested. Given the important role of hBD-1 in

defense against external pathogens we investigated the possible phenotype-genotype correlation. The DEFB1 -20 AA genotype was associated with a protective predisposition for lung phenotype and thus a more effective elimination of pathogens. Again, further studies on the functional gene DEFB1 are needed as well as replication studies on other populations to confirm results.

The major aim of the extension project is to identify new modifier genes of CF lung phenotype in Italian and Czech DF508 homozygous CF patients. The preliminary results carried out 3 potential candidate SNPs to be considered as modifiers of the lung phenotype in a North American group of CF DF508 homozygous patients by analyzing 768 SNPs localized in 149 genes of the innate immunity. Final results will lead to gain further insights on the mechanisms of CF lung pathology, in particular on the identification of potential "master" gene(s), and address therapeutic perspectives aimed to modulate the detrimental inflammatory status in the airways of CF patients.

Fattori genetici che influenzano il fenotipo polmonare di pazienti con Fibrosi Cistica

In questo lavoro si è cercato di identificare la componente genetica responsabile delle diverse manifestazioni cliniche della fibrosi cistica focalizzando l'attenzione sulla funzionalità polmonare in pazienti caratterizzati dallo stesso background genetico a livello del gene CFTR principale responsabile della Fibrosi Cistica. Dal momento che il ruolo dell'immunità naturale o innata, responsabile delle prime difese non-specifiche del nostro organismo contro qualsiasi tipo di patogeno non era stato ancora analizzato a fondo in pazienti con fibrosi cistica, abbiamo disegnato uno studio che prevedeva l'analisi di 768 marcatori genetici, SNPs (single nucleotide polymorphisms) distribuiti in 149 geni coinvolti nella risposta immunitaria innata, in 509 pazienti affetti da fibrosi cistica (308 con manifestazioni cliniche polmonari lievi e 201 con manifestazioni cliniche polmonari gravi), caratterizzati da omogeneità genetica a livello

del locus CFTR (omozigoti F508del). Il nostro studio, effettuato con tecnologia Illumina Golden Gate e DNA-chips ha evidenziato per la prima volta un'associazione statisticamente significativa tra i geni Akt3 e PLCB3 ed il fenotipo polmonare nei 509 pazienti arruolati per lo studio. Il gene Akt3 appartiene ad una famiglia di chinasi note per essere coinvolte nella proliferazione e nel differenziamento cellulare, nel processo apoptotico e nella genesi dei tumori. Il gene PLCB3, invece, è fondamentale nel processo di trasduzione del segnale e la sua attivazione permette di rispondere a stimoli, come quelli ormonali, neuronali, ecc.. Per poter chiarire e comprendere meglio il ruolo di questi due geni nel determinare la patologia polmonare nella fibrosi cistica sono necessari ulteriori studi funzionali, attualmente in corso.

Infine, questa volta in un gruppo di pazienti italiani seguiti dai vari Centri di Riferimento regionali per la Fibrosi Cistica Italiani, sono stati analizzati tre polimorfismi funzionali a carico del gene DEFB1 codificante per il peptide antimicrobico Beta defensina-1 (hBD-1), al fine di investigare l'eventuale presenza di correlazione genotipo-fenotipo polmonare, visto il ruolo importante dell'hBD-1 nella difesa contro patogeni esterni. Il genotipo DEFB1 -20 AA è stato associato ad una predisposizione per miglior fenotipo polmonare e quindi ad una maggior efficacia nella eliminazione di patogeni polmonari. Anche in questo caso ulteriori studi funzionali sul gene DEFB1 sono necessari così come studi di replica su altre popolazioni per confermare i risultati ottenuti.

L'obiettivo principale del progetto di estensione è quello di identificare nuovi geni modificatori, capaci di spiegare il diverso fenotipo polmonare. Per questo studio saranno presi in considerazione pazienti affetti da fibrosi cistica e omozigoti per la mutazione DF508 provenienti da diversi centri di riferimento Italiani e della Repubblica Ceca. In queste due popolazioni di pazienti sarà condotta un'analisi genetica dell'intero genoma per identificare i geni modificatori. Allo stesso tempo sarà condotta un'ulteriore analisi in cui verranno saggiai 3 potenziali polimorfismi candidati che, da uno studio precedente, sono risultati associati con il fenotipo polmonare in pazienti omozigoti per DF508 provenienti dal Nord-America.

I risultati finali di questo studio permetteranno di aggiungere nuove significative conoscenze rispetto al meccanismo della patologia polmonare nella fibrosi cistica, suggerendo nuove terapie di cura.

44. Search of novel regulatory elements in the promoter region of CFTR gene (FFC Project#4/2008 in progress)



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

Pucci P¹, Tomaiuolo R¹, Bombieri C²

¹CEINGE - Biotec. Avanzate s.c.a.r.l. - Univ. Federico II NA, ²Ist. Biol. Genetica – Univ. Verona

At present, molecular analysis of the CFTR gene leads to the identification of about 92% of the mutations responsible for disease. The aim of this project is the identification of new mutations in non coding regions not yet analyzed for diagnostic purposes, such as the promoter region. In the first year of the study, a DNA sequence of about 6000 bp around CFTR promoter was analysed in patients with classic or atypical forms of CF disease bearing one or two unknown mutations, and in healthy controls. Many allelic variants were detected, 6 of which were only found in CF patients and are not described in literature. Moreover,

functional proteomic were performed in order to describe protein factors interacting with a 320bp region of the wild type promoter. This used as a bait to isolate new protein interactors. Among the identified interactors, several transcription factors and protein involved in splicing process could be detected.

In the next year, the influence of the identified allelic variants on the production and activity of the CFTR protein will be evaluated by in vitro assays, to assess their potential role in triggering the disease. Moreover, functional experiments will be performed on the proteins identified by the proteomic approach to understand their role in the regulation of CFTR gene expression. Finally, further proteomic studies will be carried out using a mutated promoter sequence as a bait to assess the real impact of promoter mutations on CF at the molecular level.

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

Attualmente, l'analisi molecolare del gene CFTR consente di identificare fino al 95% delle mutazioni responsabili della malattia. Lo scopo di questo progetto è l'individuazione di nuove mutazioni in regioni non codificant del gene finora poco analizzate ai fini diagnostici, come il promotore. Durante il primo anno di attività, è stato analizzato per intero il promotore ed una regione fiancheggiante di circa 6000 bp in soggetti che presentano forme classiche o atipiche di FC, portatori di una o di entrambe le mutazioni sconosciute, nonché in soggetti sani. Tra le numerose varianti alleliche riscontrate, 6 sono presenti esclusivamente in pazienti FC e non sono descritte in letteratura. Inoltre, sono stati condotti studi di proteomica funzionale allo scopo di identificare i fattori proteici che interagiscono specificamente con una regione di 320bp all'interno del promotore di CFTR. Tale regione è stata quindi utilizzata come esca per isolare nuovi interattori. Tra le proteine identificate sono stati individuati fattori

trascrizionali e proteine coinvolte nella maturazione dell'RNA. La fase successiva del progetto prevede l'analisi dell'influenza delle varianti alleliche identificate sulla produzione ed il funzionamento della proteina CFTR attraverso saggi *in vitro*, per valutare il loro potenziale ruolo nell'insorgenza della malattia. Inoltre, verranno condotti esperimenti funzionali per comprendere il ruolo svolto nella regolazione



Giuseppe Castaldo (al centro seduto), con il suo vasto gruppo di ricerca.

Castaldo G

CEINGE - Biotec. Avanzate s.c.a.r.l. - Univ. Federico II, Napoli

The SLC26 (Solute Linked Carrier) are a gene family encoding ionic exchangers, involved in many physiological processes, like chloride and bicarbonate transport in epithelial cells. Actually, about 10 proteins belong to this family, as SLC26A3 that is the disease gene of rare and severe form of chronic chloride loosing diarrhoea (CLD). Two domains of SLC26A3 protein, the "STAS-like" and PDZ domains, play a role in its activation and bicarbonate secretion. This activation requires the presence of CFTR protein (the protein altered in cystic fibrosis, CF) that in turn is activated by the interaction with SLC. Infact the proteins form a unique complex by a direct interaction between SLC26A3 "STAS-like" and CFTR "R" domains and by a indirect interaction between PDZ domains of both proteins connected by the "PDZ Binding Protein". A percentage of CF patients do not bear mutations within the CFTR gene, and the percentage increases if we consider atypical CF forms. It is possible that in these cases, the disease-causing mutation may be present in SLC26 gene, thus reducing the activation of CFTR channel. To explore this hypothesis, we selected four members of the SLC26 family that are expressed in the tissues typically involved in CF. In particular, we selected SLC26A3, expressed by colon; SLC26A6, expressed by pancreas; SLC26A8, expressed by testis and SLC26A9, expressed by lung. We analyzed 99 patients affected by atypical CF and classified as follows: i) 59 patients affected by Congenital Bilateral Absence of Vasa Diferentes (CBAVD); ii) 21 patients affected by Acute Recurrent Pancreatitis (ARP); iii) 19 patients affected by Diffuse Bronchiectasies (DB). For these patients, DNA was extracted and CFTR gene was analyzed by direct gene sequencing. After the CFTR scanning, in 40 subjects only one or none mutation was found. In these subjects and in 40 non CF controls, we studied by direct gene sequencing the whole coding regions of SLC26 genes. We found several variants in these genes, but the differences of allelic frequencies between patients

dell'espressione del gene CFTR dalle proteine identificate negli esperimenti di proteomica. Infine, ulteriori studi di proteomica verranno realizzati per verificare eventuali differenze tra i fattori riconosciuti dalla sequenza nativa del promotore e da quella mutata, allo scopo di valutare dal punto di vista molecolare il reale impatto di tali mutazioni nella manifestazione della CF.

45. Molecular analysis of genes encoding CFTR interactors of SLC26 family in CF patients (FFC Project# 19/2007, concluded)

and controls were not statistically significant. However, some variants involve highly conserved nucleotides or change aminoacid residuals, thus these mutations may affect SLC protein synthesis or the interaction between SLC and CFTR, and act as causative mutation for CF if a CFTR mutation is present in heterozygosis. We are now performing *in-vitro* functional studies to reveal the effect of these mutations.

Analisi molecolare di geni che codificano per interattori di CFTR nell'ambito della famiglia SLC26 in pazienti CF

La famiglia SLC26 (Solute Linked Carrier) è una famiglia di geni che codifica per scambiatori ionici coinvolti in molti processi fisiologici, tra cui il trasporto di cloro e bicarbonato negli epitelii. Di questa famiglia fanno parte circa 10 proteine, tra cui SLC26A3, gene malattia della cloridorrhea congenita (CLD), una rara e severa forma di diarrea cronica con perdita di ioni cloro. La proteina prodotta da questo gene, lega la proteina CFTR (responsabile di Fibrosi Cistica, FC) e la stimola, facendone aumentare di circa 6 volte l'attività. Poiché è noto che in diversi pazienti con CF (e ancor più in pazienti con forme atipiche della malattia) non sono presenti mutazioni nella regione codificante del gene CFTR, abbiamo ipotizzato che in questi casi possano essere presenti mutazioni in geni della famiglia SLC26. Queste mutazioni potrebbero ridurre l'interazione con CFTR e la sua attivazione, e quindi essere responsabili dello sviluppo di FC.

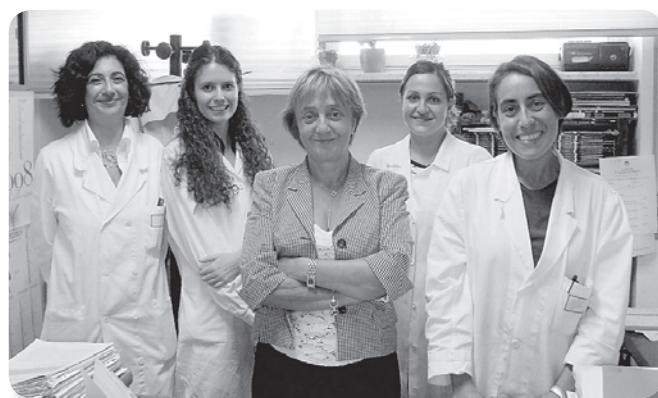
Allo scopo di verificare quest'ipotesi, abbiamo selezionato 4 geni membri della famiglia SLC26, espressi negli organi coinvolti nella FC. In particolare, abbiamo analizzato il gene SLC26A3, espresso nel colon; SLC26A6, espresso nel pancreas; SLC26A8, espresso nel testicolo e SLC26A9, espresso nel polmone. Abbiamo studiato 99 pazienti affetti da forme atipiche di FC suddivise nei seguenti sottogruppi: i) 59 pazienti affetti da Agenesia Congenita Bilaterale dei Vasi Diferenti (CBAVD); ii) 21 pazienti affetti da Pancreatite Ricorrente Acuta (ARP); iii) 19 pazienti affetti da Bronchiectasie Diffuse (DB). Per questi pazienti, è stato estratto il DNA e successivamente è stata compiuta l'analisi molecolare del gene CFTR. In 40 dei 99 pazienti analizzati è stato possibile identificare una o nessuna mutazione del gene CFTR. Per questi pazienti e per 40 soggetti di controllo è stata effettuata l'analisi molecolare delle regioni codificant dei geni SLC26. Sono state trovate numerose varianti in questi geni, ma la differenza delle frequenze alleliche tra pazienti e controlli non è risultata statisticamente significativa. Tuttavia, diverse varianti alleliche colpiscono residui altamente conservati delle rispettive proteine, e alcune determinano anche un cambio aminoacidico, e quindi, anche se queste varianti sono presenti anche in soggetti di controllo, potrebbero essere causative di malattia se è presente una mutazione di CFTR anche in eterozigosi. Abbiamo quindi avviato uno studio funzionale *in vitro* per valutare l'effetto di queste varianti.

46. Feasibility of a screening program for the preconceptional identification of Cystic Fibrosis carriers in Sardinian population (FFC Project#5/2008, in progress)

Rosatelli MC

Dipart. Scienze Biom. e Biotechn. Lab. Genetica Molecolare
Univ. Cagliari

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



Aim of this project is to develop a pilot study for preconceptional cystic fibrosis (CF) carrier screening in Sardinian population. In the last 15 years, our Laboratory has characterized the molecular defects of the large majority of Sardinian CF patients and performs routinely about 350 genetic test for cystic fibrosis per year in CF patients, in couples with family CF history as well as fetal bowel hyperecogenicity and in male infertility cases. By searching 15 mutations, we are able to have, in the Sardinian population, a detection rate of 94% (1-4). This lead us to reduce the risk to be a CF carrier from 1 in 27 to 1 in 416. A couple from general Sardinian population, negative for 94% most frequent CFTR mutations, has a reducted risk from 1 in 2500-3000 to 1 in 690 000 to have a CF-affected child, while a couple with only one CF carrier, has a risk of 1 in 1700. The high diagnostic efficiency of the molecular CFTR test routinely performed in our laboratory, suggests that Sardinia may be considered a model for a pilot study on the feasibility of screening programs for the preconceptional identification of CF carrier. Furthermore we do not have to set up preventive educational programmes to enroll general Sardinian population in order to perform a preconceptional CF screening. In fact in Sardinia, since the late 1970s, it has been introduced a program for prevention of beta thalassemia based on population screening, genetic counselling and prenatal diagnosis (5). In order to carry out a preconceptional CF screening, we used these information and people recruitment services already operating in Sardinia for the screening of beta thalassemia. For this purpose, we collaborated with our Genetic Counselling and Screening Service.

Before starting the program, we requested and obtained the Ethical Committee's Authorization in accordance with the laws of the Italian Ministero della Salute. During the first year, we presented the project to 205 couples that requested carrier screening test for beta thalassemia. Two-hundred couples (97,6%), mean age 33 years accepted to partecipate: 117/200 (58,5%) were in preconceptional age, while 83/200 (41,5%) where in early pregnancy (4-10 weeks). The geographic origin of the couples was predominantly from the South-Centre of Sardinia (92,5%), while a minority of them was from the North of Sardinia (7,5%). Informed consent was obtained by all subjects participating to the project. CF molecular test was carried out on DNA extracted from peripheral blood samples. The 15 most frequent CF mutations in the Sardinian population, were detected by PCR-based methods. Screening of the F508del, T338I, G542X, N1303K, 2183AA>G, G1244E, 3849+10kb C>T, S912X, 1717-1G>A, 621+1G>T, G85E, R1066H, 1706del 17bp mutations were performed by reverse hybridization on amplified DNA with a commercial kit (Fibrosi Cistica - Nuclear Laser Medicine). The 991del5bp mutation of exon 6b was detected by heteroduplex analysis of PCR products separated on 8% polyacrylamide gel electrophoresis. A medical report and details of genetic test results was given to all the couples during a post-test genetic counselling. In those subjects negatives for 94% CF mutations, the remaining risk to be a CF carrier was calculated and explained. During CF carrier screening programme, in the

first year of the project we didn't identified any couple at risk. We identified 16 couples with one partner carrier of a CF mutation: F508del (5 subjects), T338I (8 subjects), 2183AA>G (1 subject), N1303K (1 subject). The most frequent mutations detected, F508del and T338I, account for about 50% and 19% respectively of Sardinians CF alleles (4). Moreover we activated a cascade screening for CF carriers relatives. In addition, we identified a 43 year old woman homozygous for the T338I mutation. Her clinical evaluation resulted in a very mild disease. This is consistent with the fact that T338I is a mild mutation that shows a mild phenotype. CF carrier frequency calculated from the data obtained in this first year is 1/25. These preliminary data don't permit yet to calculate an attendable value of CF carrier frequency because the size sample is, at the moment, still quite small. For the second year, we are planning to continue the recruitment of Sardinian couples for CF carrier identification and disease prevention, and to analyze the collected data both for the evaluation of the efficacy and the efficiency of this prevention project, and for the evaluation of feasibility to apply this model in other Italian regions.

Fattibilità di un programma di screening per l'identificazione preconzionale di portatori di fibrosi cistica nella popolazione sarda

Gli studi eseguiti negli ultimi 15 anni dal nostro Laboratorio hanno permesso di delineare lo spettro mutazionale della fibrosi cistica in Sardegna e di sviluppare una carta di flusso che è in grado di diagnosticare il 94% dei portatori sardi e che permette di ridurre il rischio di coppia di avere un figlio affetto, da 1/3000 a 1/690000. Questa elevata efficienza diagnostica, associata alla possibilità di utilizzo degli stessi canali di informazione ed arruolamento della popolazione generale già attivi in Sardegna per lo screening della talassemia, attraverso la collaborazione con il Servizio di Screening e Consulenza Genetica del nostro ospedale, ci ha posti nella condizione ideale per avviare un progetto pilota di prevenzione della patologia basato sullo screening della popolazione in epoca riproduttiva.

Nel primo anno di studio, abbiamo proposto la partecipazione allo screening per la fibrosi cistica a 205 coppie di origine sarda che hanno richiesto il test di screening per la microcitemia. Hanno accettato 200 coppie (97,6%), con età media di 33 anni: 117 in epoca preconzionale (58,5%), 83 nelle prime settimane di gravidanza (range 4-10) (41,5%). Tutte le coppie hanno firmato il consenso informato. Ad ogni soggetto è stato prelevato un campione di sangue su cui sono state determinate le 15 mutazioni CF più frequenti nella popolazione sarda. A tutte le coppie è stato consegnato un referto in sede di consulenza genetica post-test. Tra le coppie esaminate non è stata identificata nessuna coppia a rischio. Sono state identificate 16 coppie in cui un partner è risultato portatore di una mutazione CF: F508del (5/16), T338I (8/16), 2183AA>G (1/16), N1303K (1/16). I soggetti risultati portatori sono stati invitati ad informare i collaterali per l'attuazione dello screening a cascata. Abbiamo identificato inoltre una donna di 43 anni con genotipo omozigote per la mutazione T338I, la cui valutazione clinica ha evidenziato una forma di fibrosi cistica molto lieve. La frequenza del portatore CF nella popolazione esaminata è di 1/25. Lo studio prosegue con l'arruolamento delle coppie sarde allo scopo di valutare la frequenza dei portatori CF e di identificare le coppie a rischio di generare figli affetti. In base ai risultati ottenuti, seguirà la valutazione dei risultati ottenuti e della possibile trasferibilità del modello in altre regioni italiane.





Introduction: Italian contributions in the context of international research

Roberto Buzzetti

Epidemiologist and medical statistician. Member of the Italian Cystic Fibrosis Research Foundation Scientific Advisory Board

1. An overview of the literature.

The Cochrane Library now has 55 systematic reviews available. Many ongoing studies: the website clinicaltrials.gov records 54 Phase I studies, 85 phase II trials, 61 Phase III studies, 25 phase IV studies.

2. Some promising clinical trials

Ataluren (PTC124), a small molecule, which allows the read-through of premature stop codons in CFTR mRNA, is being tested in a phase III trial conducted in the US, Canada and Europe.

Another subset of CF mutations cause impaired conductance despite normal trafficking to the apical membrane (Class III/IV) and are amenable to agents which improve conductance. These drugs are labeled "potentiators." The most active program involves **VX-770** which has already moved through early phase trials which demonstrated safety and strong improvements in biological measures of CFTR function, as well as improved lung function. Two phase III trials are recruiting patients. A third compound, **VX-809**, is a corrector of misfolded CFTR protein which is a key defect in DF508 mutation (Class II/III). A phase II trial in the US is ongoing.

A CFFT-sponsored multicenter trial (Infant Study of Inhaled Saline or ISIS) has begun in order to compare **hypertonic saline** (7% NaCl) to isotonic saline (control) in children aged 4 to 59 months. 48 weeks duration. The primary endpoint is the rate of pulmonary exacerbations requiring oral, inhaled or intravenous antibiotics.

Denufosol (1), a chloride channel agonist able to modulate existing ion channels, is now being tested in a second phase III trial. The previous phase III study showed progressive improvement in lung function (FEV1) for the treated group compared to placebo and in the open label period, patients previously receiving placebo showed improvement after starting Denufosol.

The EPIC Clinical trial (2) is comparing the effectiveness of four treatment strategies to maintain **eradication of Pseudomonas aeruginosa** in children aged 1 to 12 years over an 18 month period following new acquisition of Pseudomonas. The treatment strategies involve frequency of therapy (every 3 months compared to treatment only on demand positive) and antibiotic selection (4 weeks of tobramycin solution for inhalation alone or in combination with two weeks of oral ciprofloxacin). A multicenter trial was developed with CFFT support to assess effectiveness of **chronic azithromycin** in **Pseudomonas negative** subjects. Enrollment is complete for both trials and results are being published.

The need for additional inhaled antibiotics to manage chronic airway infection in patients with CF led to the development of **aztreonam lysine** for inhalation (AZLI). In a randomized, double-blind, placebo-controlled, international study (3), 164 patients (>or= 6 years of age) with FEV₁ >or= 25% and <or= 75% predicted values, and no recent use of antipseudomonal antibiotics or azithromycin) were treated with 75 mg of aztreonam (three times daily for 28 days) or placebo (1:1 randomization). The

treatment with AZLI significantly improved respiratory symptoms and pulmonary function, and was well tolerated.

Another inhaled antibiotic relies on the novel application of liposomal technology in a **new formulation of amikacin**: Arikace is currently in phase 2 testing in the US and Europe. Other inhaled antibiotic formulations under clinical development and testing include **TOBI Inhaled Powder** (TIP), **inhaled fluoroquinolones**, ciprofloxacin and levofloxacin.

3. Searching for "Cystic fibrosis" as Major topic in PubMed, we found some interesting randomized controlled trials.

A randomized trial (4) performed on seventy-nine children aged 4 to 12 years below the 40th percentile for weight for age show that a behavioral plus **nutritional education** intervention was more effective than a nutrition education intervention alone at increasing dietary intake and weight over a 9-week period. However, across the 24-month follow-up, both treatments achieved similar outcomes.

In a randomised, double-blinded, placebo-controlled, cross-over pilot study (5), 4 adult CF patients received 37.5 mg of **amitriptyline** or placebo twice daily for 14 days. Subsequently in a phase II study 19 adult CF patients were randomly allocated to four treatment groups receiving amitriptyline once daily for 28 days at doses of 25 mg (n=7), 50 mg (n=8), or 75 mg (n=8) or placebo (n=13). The primary outcome was the difference of forced expiratory volume in 1 sec FEV₁ at day 14 between amitriptyline and placebo. Amitriptyline as a novel therapeutic option in patients with CF is safe and well tolerated and seems to be efficacious.

In order to assess the relative efficacy of three modes of **vitamin D therapy**: cholecalciferol (D3), ergocalciferol (D2), and UV light in raising or maintaining 25(OH)D levels above 30 ng/ml, thirty adult CF subjects with vitamin D deficiency were randomized into one of three treatment arms (6). This study demonstrates that CF subjects are able to achieve or maintain optimal vitamin D status (>30 ng/ml) with two oral regimens of either D3 or D2 treatment, the former being more efficacious.

Another randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial (7) aimed to assess the safety, tolerability and effect on bone mass density (BMD) of intravenous **zoledronate** in adults with CF and osteopenia. Intravenous zoledronate was significantly more effective than placebo for increasing BMD in adults with CF and osteopenia, but side effects limited its tolerability.

In a prospective, randomised, multi-centre study (8), 40 infants and toddlers received both **Creon for children** (CfC) and Creon 10000 (C10) for two weeks each in a cross-over design. The primary endpoint was the parents' treatment preference. Those parents who had a preference favoured CfC over C10. Both enzyme preparations improved malabsorption to a similar degree, although the applied dosages could have been too low in some children reflected in a suboptimal coefficient of fat absorption. These data support the use of CfC for young patients with cystic fibrosis improving the daily care of this cohort detected mainly now through neonatal screening programmes.

4. Scientific contributions presented in this session.

Taccetti - Primary objective of this multicentric randomized study was to compare the efficacy of two schemes of eradication treatment (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.

At present 164 patients were randomised in 13 centres. 38.4% patients were less than 5 years old at PA isolation. In the colistin inh/oral ciprofloxacin arm (61 patients) the treatment succeeded in 29/61 (47.5%) patients and failed in 18 (29.5%). In the tobramycin inh/oral ciprofloxacin arm (71 patients) the treatment succeeded in 34/71 (47.8%) patients and failed in 16 (22.5%). incomplete follow-up or drop out in the other patients.

Dal Molin - The main aim was to calculate the incidence of late complications of totally implanted venous access devices (TIVADs) in CF people. An observational multicenter study was performed, where patients recruited [69 patients: 15 males and 54 females, mean age 26.5 years ($sd = 7.9$)] were observed for 1 year. The rate of late complications registered was 13% (N=9). In 3 cases the device was removed (due to infection or catheter rupture). So far the estimated incidence of complications and of removal is 0.99/1000 and 0.33/1000 days of port use.

Ranieri - The study aimed 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.

Since the start of the project, 5 patients with cystic fibrosis (2 males, 3 females, average age 26) admitted to the ICU for respiratory failure and refractory hypercapnia have been recruited in the study. All patients were treated with extracorporeal carbon dioxide removal technique for a time ranging from 3 to 9 days. Clinical results show that extracorporeal carbon dioxide removal was able to reduce hypercapnia in all patients and assist in the maintenance of arterial oxygenation. One patient successfully received lung transplantation.

Campana - Hospital-acquired MRSA (HA-MRSA) are known to be responsible for infections in hospitalized patients, however highly virulent community-acquired MRSA (CA-MRSA) are increasing worldwide. The goal of this project is to analyse the impact on clinical status of CF patients with persistent MRSA infections. MRSA strains from patients attending 11 Italian CF centers will be collected and characterized to evaluate whether they represent HA-MRSA or CA-MRSA strains. They will be genotyped with Multi-Locus-Sequence-Typing in order to assess whether they belong to epidemic lineages.

Guarino - This study aims to test the hypothesis that intestinal microenvironment is modified in CF likely as a consequence of CFTR mutations and that a long term therapy with live biological supplements probiotics in infants diagnosed for CF through newborn screening may have an effect on intestinal and extraintestinal inflammation modifying the natural history of cystic fibrosis. A multicenter randomised double blind clinical trial will be performed.

Remuzzi - A significant cause of morbidity and mortality after lung transplantation is represented by ischemia-reperfusion-induced lung injury. The syndrome typically occurs with respiratory failure within the first 72 hours after transplantation. The development of new agents and their application in clinical trials are to be expected to prevent this complication. The aim of this pilot study is to evaluate the relative role of IL-8 in ischemia-reperfusion-induced lung injury by examining the efficacy of reparixin to limit early postoperative lung dysfunction and its related complications in lung allograft recipients with cystic fibrosis.

Introduzione: Contributi italiani nel contesto della ricerca clinica internazionale

1. Uno sguardo generale alla letteratura. La Cochrane library ha ora 55 revisioni sistematiche disponibili. Molti gli studi in corso: il sito clinicaltrials.gov registra 54 studi di fase I, 85 studi di fase II, 61 studi di fase III, 25 studi di fase IV.

2. Alcuni studi clinici promettenti

Ataluren (PTC124), una piccola molecola modulatrice di CFTR, che riavvia la sintesi di RNAm di CFTR quando è bloccata da mutazioni che ne provocano un arresto prematuro (mutazioni stop), viene attualmente testata in uno studio di fase III negli USA, in Canada e in Europa.

Un altro gruppo di mutazioni FC (di Classe IV) causa un'alterazione della conduttanza della proteina CFTR, che in questi casi è stata normalmente prodotta ed è arrivata a collocarsi sulla membrana apicale della cellula. Queste mutazioni sono trattabili con farmaci che migliorano la conduttanza, chiamati "potenziatori". Il programma più avanzato riguarda **VX-770**, che è già passato attraverso studi iniziali che hanno dimostrato la sicurezza del farmaco, la capacità di produrre notevoli miglioramenti del funzionamento di CFTR, oltre che il miglioramento della funzione polmonare. Due studi di fase III stanno reclutando i pazienti. Un terzo composto, **VX809**, è un correttore della proteina CFTR quando è mal "riplegata", difetto chiave nella mutazione DF508 (Classe III). Uno studio di fase 2 con questo farmaco è in corso.

E' iniziato un trial multicentrico sponsorizzato dalla CFFT nei bambini (Infant Study of Inhaled Saline= ISIS), con lo scopo di confrontare la soluzione **salina ipertonica** (NaCl al 7%) con la soluzione isotonica (trattamento di controllo) in bambini di età compresa fra i 4 e i 59 mesi di età, per un periodo di 48 settimane. Il risultato principale che verrà misurato è il numero di esacerbazioni polmonari che richiedono antibiotici per bocca, per aerosol o per endovenosa.

Il **Denofusol** (1) un farmaco in grado di favorire l'azione del canale del cloro, viene testato in uno studio di fase III, in corso. Lo studio precedente di fase III ha mostrato un miglioramento della funzione polmonare nel gruppo trattato rispetto al gruppo placebo e un miglioramento anche nei soggetti che passavano dal trattamento con placebo al trattamento (conosciuto) con il farmaco.

Il trial clinico chiamato EPIC (Early Pseudomonas Infection Control = Controllo Precoce dell'Infezione da *Pseudomonas*) (2) paragona l'efficacia di quattro strategie di trattamento per mantenere l'**eradicazione di *Pseudomonas aeruginosa*** nei bambini da 1 a 12 anni, per un periodo di 18 mesi dopo la prima comparsa di *Pseudomonas*. Le strategie studiate differiscono per la frequenza della terapia (un trattamento ogni 3 mesi in confronto con trattamenti fatti solo se le colture di *Pseudomonas* successive al primo trattamento sono positive) e per il tipo di antibiotici (4 settimane di tobramicina per inalazione da sola o in combinazione con due settimane di ciprofloxacinina per bocca).

E' stato organizzato dalla CFFT un trial multicentrico per valutare l'efficacia dell'**azitromicina** nei soggetti *Pseudomonas* negativi. E' stato completato l'arruolamento dei pazienti e i risultati sono in fase di pubblicazione.

La necessità di avere più antibiotici per inalazione per controllare l'infezione cronica FC ha portato allo sviluppo **dell'aztreonam lisina** per inalazione (AZLI). In uno studio internazionale randomizzato, in doppio cieco, controllato con placebo (3), 164 pazienti (di almeno 6 anni di età) con FEV1 compreso tra 25% e 75% del predetto, che non avevano fatto uso recentemente di antibiotici antipseudomonas o azitromicina, sono stati trattati (randomizzati in rapporto 1:1) con 75 mg di aztreonam tre volte al giorno per 28 giorni o placebo. Il trattamento con AZLI ha migliorato significativamente i sintomi respiratori e la funzione polmonare, ed è stato ben tollerato.

Un altro antibiotico per inalazione sfrutta una nuova tecnologia: i liposomi. Queste sono particolari particelle lipidiche che dovrebbero veicolare in profondità l'antibiotico, che è l'**amikacina**: Arikace è attualmente in sperimentazione di fase 2 in America e in Europa. Si stanno studiando anche altre formulazioni di antibiotici per inalazione: il **TOBI in polvere** per inalazione (TIP), i **fluorochinolonici** per inalazione (ciprofloxacinina e levofloxacinina).

3. Ricercando in PubMed il termine "Cystic fibrosis" come argomento principale, abbiamo trovato alcuni interessanti studi randomizzati e controllati.

Uno studio randomizzato (4) effettuato su settantanove i bambini dai 4 ai 12 al di sotto del 40° percentile di peso per età, mostra che l'insieme di un intervento comportamentale e di uno di **educazione alimentare** è più efficace rispetto all'intervento di educazione alimentare da solo, nel

migliorare la dieta e il peso corporeo, nell'arco di 9 settimane. A 24 mesi di follow-up tuttavia entrambi i trattamenti raggiungono risultati simili. In uno studio randomizzato, in doppio cieco, controllato con placebo, a disegno cross-over (5), 4 pazienti adulti affetti da fibrosi cistica hanno ricevuto 37,5 mg di **amitriptilina** o placebo due volte al giorno per 14 giorni. Successivamente, in uno studio di fase II 19 pazienti adulti affetti da fibrosi cistica sono stati assegnati casualmente a tre gruppi di trattamento che ricevono amitriptilina una volta al giorno per 28 giorni a dosi di 25 mg (n = 7), 50 mg (n = 8), o 75 mg (n = 8) o placebo (n = 13). L'outcome primario era la differenza FEV 1 dopo 14 giorni. L'Amitriptilina come nuova opzione terapeutica per i pazienti con fibrosi cistica è sicura, ben tollerata e sembra essere efficace.

Al fine di valutare l'efficacia relativa di tre modalità di **terapia con vitamina D**: colecalciferolo (D3), ergocalciferolo (D2), e alla luce UV in aumento o il mantenimento di 25(OH) D livelli superiori a 30 ng/ml, trenta soggetti adulti CF con insufficienti livelli di vitamina D sono stati randomizzati in uno dei tre bracci di trattamento (6). Questo studio mostra che i soggetti CF sono in grado di raggiungere o mantenere lo stato ottimale di vitamina D (>30ng/ml) con due regimi orale di entrambi i trattamenti D2 o D3 (il primo sembra più efficace).

Un altro studio randomizzato, in doppio cieco, controllato con placebo (7) è stato eseguito per valutare la sicurezza, la tollerabilità e l'effetto sulla densità della massa ossea (BMD) di **Zoledronato** per via endovenosa in pazienti adulti affetti da fibrosi cistica e Osteopenia. Lo Zoledronato per via venosa è significativamente più efficace del placebo nell'aumentare la BMD negli adulti affetti con fibrosi cistica e osteopenia, ma gli effetti collaterali ne limitano la tollerabilità.

In uno studio prospettico, randomizzato, in studio multicentrico (8), 40 neonati o lattanti hanno ricevuto il **Creon per i bambini** (CFC) o il Creon 10000 (C10), ciascuna formulazione per due settimane in un disegno cross-over. L'esito primario era la preferenza dei genitori, che è andata al CFC rispetto al C10. Entrambi i preparati enzimatici hanno migliorato il malassorbimento in misura analoga. Questi dati supportano l'utilizzo di CFC per i pazienti più piccoli con fibrosi cistica; utilizzo in grado di migliorare le cure quotidiane di questo gruppo, oggi individuato soprattutto attraverso i programmi di screening neonatale.

4. I contributi scientifici di questa sessione.

Taccetti - Obiettivo primario di questo studio multicentrico randomizzato è quello di confrontare l'efficacia di due regimi di trattamento di eradicazione (colistina per via inalatoria e ciprofloxacina somministrata per via orale rispetto a ciprofloxacina e tobramicina per via inalatoria e orale), somministrati per uno stesso periodo (28 giorni) nelle fasi iniziali di infezione da *Pseudomonas aeruginosa*. Attualmente 164 pazienti sono stati randomizzati in 13 centri. 38,4% dei pazienti avevano meno di 5 anni al momento dell'isolamento di PA. Nel braccio colistina/ ciprofloxacina per via orale (61 pazienti), il trattamento ha avuto esito positivo in 29 pazienti su 61 (47,5%) e negativo in 18 (29,5%). Nel braccio tobramicina/ ciprofloxacina per via orale (71 pazienti), il trattamento ha avuto esito positivo in 34/71 pazienti (47,8%) e negativo in 16 (22,5%) (gli altri casi hanno avuto un follow-up incompleto o sono stati persi di vista).

References

- Deterding RR, Lavange LM, Engels JM, Mathews DW, Coquillet SJ, Brody AS, Millard SP, Ramsey BW; for the Cystic Fibrosis Therapeutics Development Network and the Inspire 08-103 Working Group. Phase 2 randomized safety and efficacy trial of nebulized denufosal tetrasodium in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007; 176:362-9.
- Tregiari MM, Rosenfeld M, Mayer-Hamblett N, Retsch-Bogart GZ, Gibson RL, Williams J, Emerson J, Kromal R, Ramsey BW, EPIC Study Group. Early anti-pseudomonal acquisition in young patients with cystic fibrosis: Rationale and design of the EPIC clinical trial and observational study. *Contemp Clin Trials* (2009), doi:10.1016/j.cct.2009.01.003, in press.
- Retsch-Bogart GZ, Quittner AL, Gibson RL, Oermann CM, McCoy KS, Montgomery AB, Cooper PJ. Efficacy and safety of inhaled aztreonam lysine for airway pseudomonas in cystic fibrosis. *Chest.* 2009 May;135(5):1223-32.
- Stark LJ, Quittner AL, Powers SW, Opiplari-Arrigan L, Bean JA, Duggan C, Stallings VA. Randomized clinical trial of behavioral intervention and nutrition education to improve caloric intake and weight in children with cystic fibrosis. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2009 Oct;163(10):915-21.
- Riethmüller J, Anthony Samy J, Serra E, Schwab M, Döring G, Gulbins E. Therapeutic efficacy and safety of amitriptyline in patients with cystic fibrosis. *Cell Physiol Biochem.* 2009;24(1-2):65-72. Epub 2009 Jul 1.
- Khazai NB, Judd SE, Jeng L, Wolfenden LL, Stecenko A, Ziegler TR, Tangpricha V. Treatment and prevention of vitamin D insufficiency in cystic fibrosis patients: comparative efficacy of ergocalciferol, cholecalciferol, and UV light. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009 Jun;94(6):2037-43. Epub 2009 Mar 31.
- Chapman I, Greville H, Ebeling PR, King SJ, Kotsimbos T, Nugent P, Player R, Topliss DJ, Warner J, Wilson JW. Intravenous zoledronate improves bone density in adults with cystic fibrosis (CF). *Clin Endocrinol (Oxf).* 2009 Jun;70(6):838-46. Epub 2008 Sep 24.
- Munck A, Duhamel JF, Lamireau T, Le Luyer B, Le Tallec C, Bellon G, Roussey M, Foucaud P, Giniès JL, Houzel A, Marguet C, Guillot M, David V, Kapel N, Dyard F, Henniges F. Pancreatic enzyme replacement therapy for young cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros.* 2009 Jan;8(1):14-8. Epub 2008 Aug 21.

Dal Molin - L'obiettivo principale era quello di calcolare l'incidenza di complicanze tardive dovute a dispositivi di accesso venoso totalmente impiantabili (TIVADs) in pazienti CF. Uno studio osservazionale multicentrico è stato condotto, in cui i pazienti reclutati (69 pazienti: 15 maschi e 54 femmine, età media 26,5 anni (SD = 7,9) sono stati osservati per 1 anno. Il tasso di complicanze tardive è stato del 13% (N = 9). In 3 casi il dispositivo è stato rimosso (a causa di infezioni o rottura del catetere). L'incidenza stimata di complicanze e di rimozione è pertanto rispettivamente pari a 0,99/1000 e a 0,33/1.000 giorni di utilizzo del PORT.

Ranieri - Lo studio mirava a valutare l'efficacia clinica di tecniche di ventilazione extracorporea per il trapianto polmonare in pazienti CF che sono in lista d'attesa per il trapianto e sviluppano una insufficienza respiratoria acuta ipercapnica. Dall'inizio del progetto, sono stati reclutati nello studio 5 pazienti con fibrosi cistica (2 maschi, 3 femmine, età media 26 anni) ammessi alla terapia intensiva per insufficienza respiratoria e ipercapnia resistente. Tutti i pazienti sono stati trattati con una tecnica extracorporea di rimozione dell'anidride carbonica, per un tempo variabile da 3 a 9 giorni. I risultati clinici mostrano che questa tecnica è stata in grado di ridurre l'ipercapnia in tutti i pazienti e contribuire al mantenimento dell'ossigenazione arteriosa. Un paziente ha ricevuto con successo il trapianto polmonare.

Campana - Gli stafilococchi meticillino-resistenti acquisiti in ospedale (HA-MRSA) sono noti per essere responsabili di infezioni in pazienti CF ricoverati; sono anche in aumento in tutto il mondo ceppi di MRSA acquisiti in comunità, altamente virulenti (CA-MRSA). L'obiettivo del progetto è quello di analizzare l'impatto sullo stato clinico dei pazienti con fibrosi cistica di infezioni persistenti da MRSA. Saranno raccolti i ceppi MRSA provenienti da pazienti che frequentano 11 centri italiani CF; verranno tipizzati e classificati come HA-MRSA o CA-MRSA. Saranno sottoposti a genotipizzazione con tecnica Multi-Locus-Sequence-Typing, per valutarne l'appartenenza a ceppi epidemici.

Guarino - Questo studio si propone di verificare l'ipotesi che nella FC il microambiente intestinale venga modificato, probabilmente come conseguenza di mutazioni CFTR; e che nei bambini diagnosticati grazie allo screening neonatale, una terapia a lungo termine con integratori biologici "vivi" possa avere un effetto sulla infiammazione intestinale ed extraintestinale, modificando la storia naturale della FC. Per questo verrà condotto uno studio clinico multicentrico randomizzato in doppio cieco.

Remuzzi - Una causa importante di morbilità e mortalità dopo il trapianto polmonare è rappresentato dalla ischemia-riperfusione indotta dalle lesioni polmonari. La sindrome si verifica in genere entro le prime 72 ore dopo il trapianto, con insufficienza respiratoria. Lo sviluppo di nuovi farmaci, testati in studi clinici, potrebbero essere in grado di prevenire questa complicanza. L'obiettivo di questo studio pilota è quello di valutare il ruolo relativo della IL-8 nel danno polmonare da ischemia-riperfusione, esaminando l'efficacia della reparixina nel limitare precocemente la disfunzione polmonare post-operatoria e le complicanze connesse, nei pazienti FC trapiantati.

**Giovanni Taccetti**

an unfavourable event for the prognosis of cystic fibrosis (CF) patients. In the absence of a definitive cure of this disease, eradication of Pa at the time of first isolation is a simple and efficacious way to improve long-term prognosis. A limited number of studies have analyzed the possibility of early eradication of Pa, but there are still no publications on large numbers of patients in order to compare the efficacy of the various treatments available. 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 Pa free with at least three cultures negative over 6 months. At present 164 patients were randomised (76F 86M, 2 missing). Mean age 9,3 ±7 yrs, median 8, range 1-37) in 13 centres. 63/164 (38,4%) patients were less than 5 years old at PA isolation. 72 (44%) patients were previously colonised by PA, in 92 (56%) it was the first episode of colonisation. The culture was performed on sputum in 35,3% of patients, on throat swab in 25,6%, on laryngeal suction in 31,7% (missing data 7,4%). 73/164 (44,5%) patients were treated with colistin inh/oral ciprofloxacin, 91/164 (55,5%) patients were treated with tobramycin inh/ oral ciprofloxacin. 132/164 patients (drop out 11%) completed a follow-up of six months. In the colistin inh/oral ciprofloxacin arm (61 patients) the treatment succeeded in 29/61 (47,5%) patients and failed in 18 (29,5%). We observed an incomplete follow-up in 7 (11,4%) patients, drop out 7 (11,4%). In the tobramycin inh/oral ciprofloxacin arm (71 patients) the treatment succeeded in 34/71(47,8%) patients and failed in 16 (22,5%). We observed an incomplete follow-up in 10 (14%) patients, drop out 11 (15,4%). PA strains showed full susceptibility to colistin, tobramycin and ciprofloxacin. At isolation of the germ in the airways, 17% and

47. Early antibiotic treatment in *Pseudomonas aeruginosa* eradication in cystic fibrosis patients: a randomised policentric study on two different protocols (FFC Project#17/2007, in progress)

Taccetti G¹, Cariani L²

¹Dipart. di Pediatria,
Centro Regionale FC,
Azienda Ospedaliera
Universitaria Meyer,
Firenze ²Lab. Microbiol.
Centro Regionale FC
- Milano

Chronic *P. aeruginosa* (Pa)
infection is considered

24% of patients had respectively IgA anti LPS antibodies and IgG anti LPS antibodies above the cut off. After an antibiotic treatment lasting 28 days, 65% of patients were Pa free. The third interim analysis showed no differences between the two treatments.

Trattamento antibiotico precoce per l'eradicazione di *Pseudomonas aeruginosa* in pazienti affetti da fibrosi cistica: uno studio randomizzato policentrico su due differenti tipi di trattamento

L'infezione cronica da *P. aeruginosa* (PA) è un evento sfavorevole per la prognosi dei pazienti FC. Un limitato numero di studi ha analizzato la possibilità di eradicazione precoce di PA ma non esistono studi per comparare l'efficacia dei trattamenti. L'obiettivo primario di questo studio era quello di comparare, in un trial multicentrico randomizzato, l'efficacia dei due schemi di trattamento eradicante (colistina inalatoria/ciprofloxacin per os versus tobramicina inalatoria/ciprofloxacin per os) per lo stesso periodo (28 giorni) nelle fasi iniziali dell'infezione da PA. Il trattamento era giudicato efficace se 3 colture risultavano negative per PA in 6 mesi. Sono stati attualmente randomizzati 164 pazienti (76F e 86M, 2 missing data, età media 9,3 ±7, mediana 8, range 1-37) in 13 centri. Al momento dell'isolamento del germe 63/164 (38,4%) pazienti avevano un' età un'inferiore a 5 anni, 60 (36, 5%) un'età fra 5 e 12 anni e 41 (25%) un'età oltre i 12 anni. In 72 (44%) pazienti veniva riferita pregressa colonizzazione da PA, in 92 (56%) primo isolamento del germe nelle vie aeree. Nel 35,3% dei soggetti l'esame culturale è stato eseguito su espettorato, nel 25,6% su tampone, nel 31,7% su aspirato e nel 7,4% la metodica non è precisata. 73/164 (44,5%) pazienti ha ricevuto colistina inalatoria/ciprofloxacin per os. 91/164 (55,5%) pazienti ha ricevuto tobramicina inalatoria/ciprofloxacin per os. In 132/164 pazienti sono stati completati 6 mesi dalla fine del trattamento, 18 (11%) pazienti sono usciti dallo studio. Su 61 pazienti trattati con l'associazione colistina inalatoria/ciprofloxacin per os 7 (11,4%) sono usciti dallo studio, in 29 (47,5%) il trattamento ha avuto successo e in 18 (29,5%) la terapia non è stata efficace. Il follow-up deve essere completato in 7 (11,4%) soggetti. Su 71 pazienti trattati con l'associazione tobramicina inalatoria/ciprofloxacin per os 11 (15,4%) sono usciti dallo studio, in 34 (47,8%) il trattamento ha avuto successo e in 16 (22,5%) la terapia non è stata efficace. Il follow-up deve essere completato in 10 (14%) soggetti. La sensibilità dei ceppi nei confronti di colistina, tobramina e ciprofloxacin era completa. La presenza di anticorpi anti-Pa oltre il cut-off al primo isolamento del germe è stata osservata nel 17% (IgA) e nel 24% (IgG) dei pazienti. L'eradicazione dopo un trattamento antibiotico di 28 giorni è stata raggiunta nel 65% dei soggetti. La terza analisi ad interim non ha mostrato differenze fra i trattamenti a confronto.

48. Impact on clinical status of cystic fibrosis patients of persistent lung infections with hospital-acquired MRSA (HA-MRSA) and community-acquired (CA-MRSA): a multicenter longitudinal study (FFC Project#11/2009, new)



Campana S

Dipart. di Pediatria,
Centro Regionale FC,
Azienda Ospedaliera
Universitaria Meyer, Firenze

The prevalence of MRSA infection in CF has been increased worldwide. Recently has been

Silvia Campana

demonstrated that persistent infection with MRSA is associated with a more rapid rate of decline in lung function. In spite of these evidences at the moment there is no consensus about treatment strategies of MRSA infections in CF patients. Hospital-acquired MRSA (HA-MRSA) are known to be responsible for infections in hospitalized patients, however highly virulent community-acquired MRSA (CA-MRSA) are increasing worldwide. Recently CA-MRSA were introduced into the hospital, displacing classic hospital-associated MRSA in different setting included the CF patients. HA-MRSA and CA-MRSA are characterized by different structures

of the genetic element (SCCmec) carrying the methicillin-resistance. The genetic background of MRSA implicated in CF infections has been poorly investigated. Results delineated from our previous studies show a high prevalence of CA-MRSA in the Italian CF population. The goal of the this project is to analyse the impact on clinical status of CF patients of persistent MRSA infections. MRSA strains from patients attending 11 Italian CF centers will be collected and characterized to evaluate whether they represent HA-MRSA or CA-MRSA strains (SCCmec typing). They will be genotyped with Multi-Locus-Sequence-Typing in order to assess whether they belong to epidemic lineages. One strains/patient/year will be collected from persistently colonized patients over a period of four years. Newly infected patients will also be included in the study. This project will allow the evaluation of the incidence and prevalence of CA-MRSA and HA-MRSA over a prolonged period of time. Furthermore the characteristic of MRSA responsible for the first colonization will be clarified. The impact of persistent infections with CA-MRSA and HA-MRSA on the clinical status of CF patients will be delineated. Identification of dangerous MRSA strains and clarification of their role in the pathogenesis of pulmonary damage in CF patients will lead to improved segregation strategies. Monitoring and treatment of MRSA infections in CF patients could be optimized performing a specific eradication treatment against pathogenic MRSA strains.

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



Alberto Dal Molin

Osp. Bambini Gesù Roma, ⁵Centro Fibrosi Cistica - OCM Verona,
⁶Servizio Fibrosi Cistica - Cerignola (Foggia)

The use of "totally implanted venous access devices" (TIVADs) or PORTs, in Cystic Fibrosis (CF) people has increased in recent years thanks to the advantages that this system ensures compared to external central venous catheters, but some important complications can occur. In our study the main aim is to calculate the incidence of TIVADs' late complications in CF people. It's a observational multicenter study, where patients recruited will be observed for a period of 1 year.

So far we have recruited 69 patients: 15 (21.7%) males and 54 (78.3%) females. Mean age 26.5 years ($ds \pm 7.9$). At the moment of recruitment, the major part of patients had pancreatic insufficiency (87%) and 37.7% had the CFRD. The Median of FEV1 had 42.5% and the median of BMI had 20.15 kg/m². A large part of patients have PORT with single reservoir in the thoracic area. The most frequently vein used is the jugular. At the moment of

multicentrico longitudinale

La prevalenza delle infezioni da *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA) è in aumento in tutto il mondo ed anche nei pazienti con fibrosi cistica. E' stato dimostrato che l'infezione persistente da MRSA incide in maniera significativa sul decremento della funzionalità polmonare, tuttavia ad oggi non vi è una strategia terapeutica universale per il trattamento di tali patogeni.

Le infezioni in ambito nosocomiale sono dovute a ceppi di MRSA "di acquisizione ospedaliera" (HA-MRSA), tuttavia un'altra tipologia più virulenta di MRSA, nota per causare infezioni comunitarie (CA-MRSA), sta rimpiazzando i ceppi HA-MRSA. I ceppi di CA-MRSA e HA-MRSA si distinguono grazie ad una diversa struttura dell'elemento genetico responsabile della meticillino-resistenza (SCCmec). Il background genetico dei ceppi di MRSA che colonizzano i pazienti con fibrosi cistica è stato scarsamente studiato. Nel corso di nostri precedenti progetti è stata evidenziata un'alta prevalenza di CA-MRSA nei pazienti italiani. Lo scopo di questo progetto è di valutare l'impatto clinico dell'infezione persistente da CA-MRSA e HA-MRSA nei pazienti con fibrosi cistica. I ceppi di MRSA verranno isolati dai pazienti seguiti da 11 centri di cura. Verranno raccolti un ceppo all'anno e i dati clinici per ogni paziente che presenta un'infarto persistente da MRSA in un periodo di 4 anni. I pazienti che presentano per la prima volta l'infarto da MRSA saranno ugualmente inclusi nello studio. I ceppi raccolti verranno sottoposti alla caratterizzazione della cassetta SCCmec in modo da determinare se rappresentano CA-MRSA oppure HA-MRSA. Inoltre verranno genotipizzati con Multi-Locus-Sequence-Typing per valutare la loro eventuale appartenenza a cloni epidemici noti. Questo progetto permetterà di valutare le variazioni di prevalenza ed incidenza di CA-MRSA e HA-MRSA e caratterizzare i ceppi di MRSA responsabili della prima infarto e dell'infarto persistente. Lo studio valuterà inoltre quali tipologie di MRSA hanno un maggiore impatto clinico sul paziente. La caratterizzazione dei ceppi di MRSA che hanno un alto potenziale patogenetico può migliorare le norme di prevenzione e ottimizzare le strategie terapeutiche effettuando un trattamento eradicante tempestivo.

49. A prospective study about complications of totally implantable central venous access ports in people with CF (FFC Project#16/2008, in progress)

Dal Molin A¹, Braggion C², Furnari ML³, Lucidi V⁴, Rizzi E⁵, Cialdella P⁶

¹Dipartimento di Pediatria - Univ. Firenze, ²Centro Fibrosi Cistica, Ospedale Meyer, Firenze, ³Centro Regionale FC - 2° Unità Pediatria Osp. dei Bambini "G. Di Cristina" - Palermo, ⁴Serv. di Supporto FC -

⁵Servizio Fibrosi Cistica - Cerignola (Foggia)

positioning, the mean age of patient was 25.2 years ($ds \pm 8$). The most frequent reason for positioning the PORT is the "lack of superficial veins", but other reasons were indicated: "Need to carry out home therapy", "repeat access to hospital" and "infusion of hypertonic medications". About PORT management: Huber needles are used in all cases to access the device. The disinfectant most frequently used for skin is iodio - povidone, but other disinfectants are indicated too (for example: amukine and chlorhexidine). Different types of dressing are used to fix huber needle, such as plaster and gauze or transparent dressing. When PORT is not in use, flushing was performed every 90 days in 8 subjects. About complications: the rate of late complications registered is 13% (N=9) (see the table 1). In 3 cases the device was removed (in 2 cases due to infection and in 1 case due to catheter rupture). The mean of observation is 131.3 days. So far the incidence of complication is 0.99/1000 days of port use and the incidence of removal is 0.33/1000 days of port use.

Table 1: Late complications

Infection 3	(4.3%)
Trombosis 3	(4.3%)
Occlusion 2	(2.9%)
Other complication 1	(1.5%)
Total 9	(13%)

In conclusion the lack of superficial veins is the most common reason for positioning a TIVAD. Our preliminary results show that some important late complication could occur. Our incidence data is higher than indicated in a recent retrospective study (overall incidence of complications = 0.58 per 1000 catheter-days).

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

L'uso dei dispositivi vascolari totalmente impiantati (TIVAD) o PORT, nelle persone con Fibrosi Cistica (FC) è aumentato negli ultimi anni grazie ai vantaggi che questo presidio garantisce rispetto ai cateteri venosi centrali esterni. Tuttavia alcune importanti complicazioni possono verificarsi. L'obiettivo principale del nostro studio è quello di calcolare l'incidenza di complicanze tardive associate ai TIVAD nei pazienti con FC. Si tratta di uno studio osservazionale multicentrico, in cui i pazienti arruolati sono osservati per un periodo di un anno. Finora abbiamo reclutato 69 pazienti: 15 (21,7%) maschi e 54 (78,3%) femmine. Età media 26,5 anni ($ds \pm 7,9$). Al momento del reclutamento, la maggior parte dei pazienti soffrivano di insufficienza pancreatica (87%) e il 37,7% di CFRD. La mediana del FEV1 era 42,5% e la mediana del BMI era 20,15 kg / m². La maggior parte dei pazienti ha un catetere PORT con una camera collocata nella zona del torace. La vena più frequentemente utilizzata è la giugulare. Al momento del posizionamento, l'età media dei pazienti era 25,2 anni ($ds \pm 8$). La causa più frequentemente indicata per il posizionamento è "la mancanza di vene superficiali", ma anche altre motivazioni sono state segnalate, quali la "necessità di effettuare la terapia domiciliare", "ripetuti accessi in ospedale" e "l'infusione di farmaci ipertonici". Rispetto alla gestione del catetere di PORT, l'ago di Huber è utilizzato in tutti i centri per l'accesso al

presidio. Il disinfettante più frequentemente utilizzato è lo iodio - povidone, anche se altri disinfettanti sono stati indicati (per esempio: amukina e clorexidina). Per fissare l'ago di Huber sono utilizzati diversi tipi di medicazione, come il cerotto con garze o medicazioni trasparenti. Quando il PORT non è in uso, il lavaggio è effettuato ogni 90 giorni in 8 soggetti. In merito alle complicanze: il tasso di complicanze tardive registrato è del 13% (N = 9) (vedi tabella 1). In 3 casi il presidio è stato rimosso (in 2 casi a causa di infezione e in 1 caso a causa della rottura del catetere). Il tempo medio di osservazione è 131,3 giorni. Finora l'incidenza di complicanze è 0.99/1000 giorni uso PORT, mentre l'incidenza di rimozione è 0.33/1000 giorni uso PORT.

Tabella 1: complicanze tardive

Infezioni 3	(4.3%)
Trombosi 3	(4.3%)
Oclusioni 2	(2.9%)
Altre complicanze 1	(1.5%)
Totale 9	(13%)

In conclusione, la mancanza di vene superficiali è la ragione più comunemente riferita per posizionare un TIVAD. I nostri risultati preliminari evidenziano come alcune importanti complicanze tardive si possano sviluppare. Tale dato risulta maggiore rispetto a quello evidenziato in un recente studio retrospettivo (incidenza di complicanze totali = 0.58/1000 giorni).



Vito Marco Ranieri

50. Extracorporeal lung assist as bridge to lung transplantation for patients with cystic fibrosis (FFC Project#17/2008, in progress)

Ranieri VM

Dipart. Discipline Medico Chirurgiche - Sez. Anestesia e Rianimazione Univ. Torino

Cystic fibrosis is a common hereditary disease which causes progressive lung failure and disability. Recent medical advances have increased the life expectancy of cystic fibrosis patients, however nearly

all patients will eventually develop end-stage respiratory failure. For these patients the only option for survival is to receive a lung transplantation. Although the success rate of these patients following a lung transplantation is very high, due to a shortage of donor organs and transplant facilities many people die while awaiting transplantation. One of the major confounding issues leading to death on the waiting list is the intubation of patients requiring the support of mechanical ventilation. In fact, patients with cystic fibrosis are particularly susceptible to ventilator induced lung injury and ventilator associated pneumonia as their lungs are already severely inflamed for a prolonged period of time from the typical recurrent infections. Our project aims at studying the efficacy of a novel pumpless interventional lung assist treatment, which supports respiratory function by removing excess carbon dioxide directly from the circulatory system, in reducing the need of intubation and the use of invasive mechanical ventilation. This treatment should ultimately lead to the significant reduction of the mortality rate of cystic fibrosis patients on the lung transplantation waiting list and to the incrementation of the number of patients undergoing transplantation. Since the start of the project, 5 patients with cystic fibrosis (2 males, 3 females, average age 26) admitted to the ICU for respiratory failure and refractory hypercapnia have been recruited in the study protocol. All patients were treated with extracorporeal carbon dioxide removal technique for a time ranging from 3 to 9 days. Invasive mechanical ventilation was eventually initiated in all 5 patients. However, clinical results show that extracorporeal carbon dioxide removal was able to

reduce hypercapnia in all patients and assist in the maintenance of arterial oxygenation. Out of the five patients recruited in the protocol, one successfully received lung transplantation. We intend to complete the study and reach the target number of recruitments, while we are finalizing the data collection of the historical controls, which will be compared with the treated patients to evaluate the real clinical impact of this novel technological treatment of cystic fibrosis patient outcome.

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

L'aspettativa di vita dei pazienti con fibrosi cistica è aumentata grazie agli sviluppi delle conoscenze mediche, tuttavia la quasi totalità dei pazienti sviluppa inesorabilmente insufficienza respiratoria terminale. La sola opzione terapeutica che garantisca a questi pazienti la possibilità di prolungare la durata e la qualità della vita è il trapianto di polmone. La percentuale di sopravvivenza di questi pazienti dopo trapianto di polmone è buona, tuttavia per la mancanza di organi o per la gravità delle condizioni cliniche, molti muoiono quando ancora in lista d'attesa.

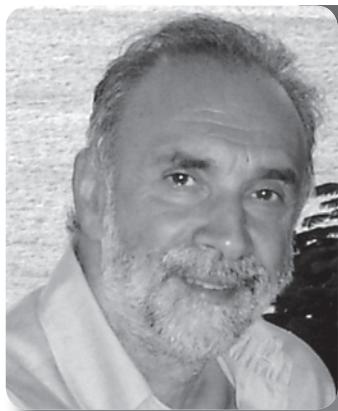
Uno dei problemi più rilevanti che possono rivelarsi fatali per i pazienti con fibrosi cistica in lista d'attesa per trapianto di polmone è il trattamento con ventilazione meccanica invasiva. Infatti, tali pazienti, data la ricorrenza di infezioni polmonari, sono particolarmente suscettibili all'insorgenza di polmonite associata a ventilazione meccanica e all'esacerbazione del danno polmonare indotta dal ventilatore stesso.

Il nostro progetto ha come obiettivo la valutazione dell'efficacia di una nuova tecnica di assistenza alla funzione respiratoria mediante rimozione extracorporea di anidride carbonica nel ridurre la necessità di intubazione ed utilizzo della ventilazione meccanica invasiva nei pazienti con fibrosi cistica ed insufficienza respiratoria ipercapnica refrattaria. L'applicazione di questa strategia terapeutica dovrebbe ridurre la necessità di ventilazione meccanica invasiva, aumentare il numero di pazienti eleggibili al trapianto di polmone ed, infine, diminuire la mortalità dei pazienti con fibrosi cistica in lista d'attesa per trapianto polmonare.

Dal momento in cui il progetto è stato iniziato, cinque pazienti con fibrosi cistica (2 maschi, 3 femmine, età media 26 anni) sono stati ricoverati in terapia intensiva per insufficienza respiratoria ipercapnica refrattaria e reclutati nello studio. Tutti e cinque i pazienti sono stati trattati con la tecnica di decapneinizzazione extracorporea per un periodo di tempo che è variato da 3 a 9 giorni a seconda del paziente. È stato necessario, inoltre, trattare tutti i pazienti con ventilazione meccanica invasiva. I dati clinici dimostrano che la rimozione extracorporea di anidride carbonica ha consentito la significativa riduzione dell'ipercapnia e il mantenimento

di una adeguata ossigenazione in tutti e cinque i pazienti. Uno dei pazienti dello studio è stato sottoposto con successo a trapianto di polmone. Per il futuro, intendiamo completare lo studio reclutando il numero di pazienti prestabilito (n.30). Stiamo inoltre completando la raccolta dei

dati dei controlli storici, che saranno utilizzati come termine di paragone per valutare il reale impatto clinico di questa nuova tecnica terapeutica sulla prognosi dei pazienti con fibrosi cistica.



Giuseppe Remuzzi

defective gene causes the body to produce an abnormally thick, sticky mucus that clogs the lungs and leads to life-threatening infections. Three decades ago only a quarter of children with CF were expected to reach their 16th birthday. Despite life expectancy has improved dramatically in the last years, a substantial number of patients do not survive into adulthood, with lung disease being the commonest cause of death. In patients with advanced pulmonary disease lung transplantation is the only effective option to prolong survival and enhance quality of life. Since 1983, lung transplantation had enjoyed increasing success. Nevertheless, survival of lung-transplanted patients is still limited. A significant cause of morbidity and mortality after lung transplantation is represented by ischemia-reperfusion-induced lung injury. The syndrome typically occurs within the first 72 hours after transplantation with respiratory failure. The development of new agents and their application in clinical trials are to be expected to prevent this complication. Experimental studies have shown that ischemia-reperfusion of solid organs such as the kidney, liver, heart and lung, induces a rapid release of pro-inflammatory molecular mediators, including interleukin-8 (IL-8). Recently a new class of inhibitors that specifically block IL-8 activity has been described. Among them, reparixin has proven safe and well tolerated in animal studies and in healthy subjects.

The aim of this pilot study is to evaluate the relative role of IL-8 in ischemia-reperfusion-induced lung injury by examining the efficacy of reparixin to limit early postoperative lung dysfunction and its related complications in lung allograft recipients with cystic fibrosis. In this context, the prevention of reperfusion injury will also limits episodes of pulmonary infections related

51. Prevention of reperfusion injury in human lung transplantation for cystic fibrosis by targeting IL-8 activity (FFC Project#24/2009, new)

Remuzzi G

Department of Immunology and Clinical Transplantation, Ospedali Riuniti di Bergamo; Mario Negri Institute for Pharmacological Research, Bergamo, Italy

Cystic fibrosis (CF) is a genetic disease affecting more than 5000 children and adults in Italy. A

to prolonged mechanical ventilation due to the ischemia/reperfusion damage, enhancing lung resistance to infections and ultimately patient survival. Thus, targeting this aim, the present proposal would contribute to add further survival benefit for patients with cystic fibrosis.

Prevenzione del danno da riperfusione nel trapianto di polmone in pazienti con fibrosi cistica mediante inibizione farmacologica dell'attività IL-8

La fibrosi cistica è una malattia genetica che interessa oltre 5000 bambini e adulti in Italia. A causa del difetto genetico, l'organismo produce muco molto viscoso che ostruisce le vie respiratorie e favorisce lo sviluppo di infezioni. In passato solo il 25% dei bambini sopravviveva sino all'età di 16 anni. Oggi l'aspettativa di vita è migliorata, ma numerosi sono ancora i pazienti che non raggiungono l'età adulta. La causa di morte più comune è la malattia polmonare avanzata. Il trapianto di polmone rappresenta perciò l'unica opzione terapeutica efficace per prolungare la sopravvivenza e migliorare la qualità di vita. Dal 1983 i risultati del trapianto di polmone sono progressivamente migliorati. Tuttavia la sopravvivenza di questi pazienti rimane ancora limitata. Il danno da riperfusione dell'organo è tra le cause principali di disfunzione e mortalità dopo trapianto di polmone. Si manifesta tipicamente nelle prime 72 ore dall'intervento chirurgico come insufficienza respiratoria. Lo sviluppo di nuovi farmaci e la loro applicazione clinica potrebbero contribuire a prevenire questa complicanza del trapianto. Studi sperimentali hanno dimostrato che la riperfusione dopo trapianto di organi come il polmone, si associa a liberazione locale di mediatori dell'infiammazione, tra i quali interleuchina-8 (IL-8). Di recente è stata descritta una nuova classe di farmaci che inibisce selettivamente l'attività di IL-8. Tra questi, reparixin si è dimostrato ben tollerato ed efficace in modelli sperimentali e privo di effetti avversi significativi in volontari sani.

L'obiettivo di questo studio è di definire il ruolo relativo di IL-8 nel danno polmonare da ischemia-riperfusione attraverso la valutazione dell'efficacia di reparixin nel limitare a breve termine la disfunzione polmonare e le complicanze (infezioni e rigetto acuto) ad essa correlate in pazienti con fibrosi cistica sottoposti a trapianto di polmone. In questo contesto va infatti considerato che la prevenzione del danno da riperfusione dovrebbe limitare anche gli episodi di infezione polmonare associata all'uso prolungato della ventilazione meccanica, che può essere necessaria in presenza di danno da ischemia-riperfusione dell'organo trapiantato. Il progetto che qui si propone dovrebbe contribuire ad aggiungere ulteriore beneficio in termini di sopravvivenza per i pazienti con fibrosi cistica e danno polmonare avanzato.

52. Modulation of intestinal and extraintestinal inflammation in infants with cystic fibrosis by early modification of intestinal microflora (FFC Project#23/2009, new)

Guarino A¹, Braggioni C², Pardo F³, Morelli L⁴

¹Dipart. Pediatria - Università di Napoli, ²Centro Regionale fibrosi cistica – Ospedale Meyer, Firenze, ³Centro Regionale fibrosi cistica Ospedale “G. Di Cristina, ⁴Ist. Microbiologia, Università Sacro Cuore, Piacenza

There is evidence that a healthy intestinal microflora protects from allergy and other immune disorders, driving the development of immune response toward an effective protection against intestinal and extraintestinal infections, including respiratory infections. Children with cystic fibrosis (CF) are at risk to have a disturbed intestinal microflora, as a consequence of the abnormal intestinal microenvironment due to the impaired CFTR, the heavy load of antibiotics, the pancreatic enzyme supplementation and the acid suppression treatment. The widespread implementation of a screening program for newborns has focused on the advantage of early



Alfredo Guarino

diagnosis of CF including nutritional benefits, early access to specialized care, a reduction in the time of diagnostic uncertainty and the ability to counsel parents for prenatal testing.

Objectives

To test the hypothesis that:

1. *Intestinal microenvironment is modified in CF likely as a consequence of CFTR mutations.*
2. *A long term therapy with live biological supplements in infants diagnosed for CF through newborn screening may have an effect on intestinal and extraintestinal inflammation modifying the natural history of cystic fibrosis.*

Preliminary results

Evaluating fecal flora of 15 children with CF by DGGE each patient showed its own profile although some bands were found to be common to all faecal samples suggesting that Cystic Fibrosis present a peculiar composition of intestinal microflora.

Project description

A multicenter prospective randomised double blind clinical trial will be performed. Three different clinical centres in charge of paediatric cystic fibrosis, in which newborn screening for cystic fibrosis diagnosis is used, will participate. Sixty infant will be enrolled and randomly assigned to LGG or placebo group. At enrolment, 3,6 and 12 months after enrolment the following parameters will be recorded: nutritional parameters, intestinal and systemic inflammation, number of respiratory infections, number of hospital admissions, number of antibiotic prescriptions, composition of intestinal microflora. In addition for each children a blood, an urine and a fecal sample will be collected at enrolment, 6 and 12 months after the enrolment to evaluate intestinal and systemic inflammation.

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

Premessa: una microflora intestinale sana riduce il rischio di allergie, di altri disordini immunologici e di infezioni intestinali ed extraintestinali, incluse quelle respiratorie. I bambini con fibrosi cistica (CF) possono avere una microflora intestinale alterata a causa dell'anomalo microambiente intestinale dovuto alla patologia di base e alla terapia a cui sono sottoposti. Lo screening neonatale per FC comporta alcuni vantaggi, come i benefici nutrizionali, l'accesso precoce a centri specializzati.

Obiettivi del progetto: valutare se il microambiente intestinale è modificato nei bambini con FC; valutare se una terapia a lungo termine con probiotici in bambini con diagnosi di FC effettuata attraverso lo screening neonatale possa avere un effetto sull'infiammazione intestinale ed extraintestinale.

Risultati preliminari: alcuni dati preliminari ottenuti valutando la microflora fecale di 15 bambini con FC fanno ipotizzare che i bambini con FC hanno una microflora peculiare rispetto ai bambini sani.

Descrizione del progetto: verrà eseguito uno studio prospettico, randomizzato controllato, doppio cieco. Lo studio coinvolgerà 3 Centri di Riferimento Pediatrici per FC (Napoli, Palermo, Firenze), in cui viene utilizzato lo screening neonatale per FC. Sessanta bambini verranno suddivisi casualmente in 2 gruppi: il gruppo A riceverà Lactobacillus rhamnosus GG (LGG) per 12 mesi; il gruppo B riceverà il placebo per lo stesso periodo. Al tempo dell'arruolamento e al 3°, 6° e 12° mese dall'arruolamento verranno registrati i seguenti parametri: parametri nutrizionali, infiammazione sistemica ed intestinale, numero di infezioni respiratorie, numero delle ammissioni in ospedale, numero delle prescrizioni di antibiotico, composizione della microflora intestinale. Ciascun bambino dovrà raccogliere ai tempi prestabiliti un campione di fuci e di urine per la valutazione dell'infiammazione sistemica ed intestinale ed in occasione dei controlli previsti per la patologia di base un campione di sangue per la valutazione dell'infiammazione sistemica.

Publications and congress communications from the studies funded by Italian CF Research Foundation 2002 - 2009

Pubblicazioni e comunicazioni congressuali dagli studi finanziati dalla Fondazione FFC dal 2002 al 2009

1. FISIOPATOLOGIA CFTR E TERAPIE DEL DIFETTO DI BASE

CFTR Pathophysiology and therapy of the basic defect

- FFC Project#1/2002 “**Mini-chromosomes: a new approach for cystic fibrosis gene therapy**”

Fiorentina Ascenzi (Dipart. Biologia cellulare e dello sviluppo - Univ. La Sapienza Roma), Massimo Conese (Ist. per il Trattamento 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

- FFC Project#2/2002 “**Evaluation of efficiency efficacy and safety of CFTR-gene delivery mediated by lentivirus vectors in model systems of cystic fibrosis airway epithelium**”

Massimo Conese (Ist. per il Trattamento speriment. della FC - Osp. San Raffaele - Milano)

Publications

- Copreni E. et al. “Lentivirus-mediated gene transfer to the respiratory epithelium: a promising approach to gene therapy of cystic fibrosis” Gene Therapy (2004) 11, S67-S75.

- Carrabino S. et al. “Serum albumin enhances polyethylenimine-mediated gene delivery to human respiratory epithelial cells” The Journal of Gene Medicine 2005; 7: 1555-1564

Abstracts

- Copreni E. et al. “Pseudomonas aeruginosa infection of airway epithelium in a human fetal respiratory xenograft model in view of lentiviral gene therapy of CF lung disease” Journal of Cystic Fibrosis 2 (2003) S19-S23 – 26th Congress European Cystic Fibrosis Society, Belfast 4-7 June 2003.

- Copreni E. et al. “Biosafety of a third generation lentiviral vector for gene transfer to the airway epithelium” NACFC, 2005

- Copreni E. et al. “Gene transfer to the airway epithelium mediated by a third generation HIV-1 based vector: efficiency and role of heparin sulphate” American Society of Gene Therapy, 8th Annual Meeting June 1-5 2005.

- Copreni E. et al. “Study of clearance and internalization of pseudomonas Aeruginosa in a human fetal respiratory xenograft model” Pediatric Pulmonology Suppl. 25, 2003. 17th Annual North American Cystic Fibrosis Conference – Anaheim, 16 – 19 October 2003

- Copreni E. et al. “Lentivirus-mediated gene transfer to the respiratory epithelium in vitro and in vivo in the absence of preconditioning of the airways” 2nd European Conference & Practical Course, February 1-14th, 2004 – Bellaterra, Spain

- Copreni E. et al. “Gene transfer to the airway epithelium by HIV-based vectors” ECFS Conference, Tomar, Portugal 30 April – 3 May 2004;

- Copreni E. et al. “Optimisation of gene transfer to the respiratory epithelium in vitro and in vivo by a last generation lentiviral vector” 3rd European Conference & Practical Course 14 – 26 June 2004, Genopole-Evry, France;

- Copreni E. et al. “Gene transfer to the airway epithelium mediated by last generation lentiviral vectors does not require preconditioning of the epithelial tight junctions” Pediatric Pulmonology Suppl. 27 – The 18th Annual North American CF Conference; America’s Center, St. Louis, Missouri, Oct. 14-17 2004

- Copreni E. et al. “Trasferimento genico in modelli in vitro e pre-clinici di epitelio respiratorio mediante vettori virali e non virali” I incontro dei ricercatori di base della fibrosi cistica, Roma 1-2 luglio 2004

- Copreni E. et al. “Trasferimento genico mediato da un vettore lentivirale in modelli di epitelio respiratorio in vitro e in vivo: efficienza e ruolo dell’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

- FFC Project#1/2003 “**CFTR regulation by protein-protein interactions**”

Valeria Casavola (Dipart. Fisiologia Gen. ed Amb. - Univ. Bari), Manuela Zacco (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

- Zacco 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;

- FFC Project#2/2003 “**Activators of the CFTR ionic transport: identification and molecular modelling of the binding sites**”

Oscar Moran, (Ist. Biofisica – CNR – Genova), Olga Zegarra, (Lab. Gen. Molec. - Ist. Gaslini – Genova), Vincenzo Martorana, (Ist. Biofisica – CNR – Palermo)

Publications

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



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

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

Publications

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

Abstracts

- Pedemonte N. et al. "Screening of a chemical library containing approved drugs and natural compounds to identify small molecules for the functional correction of CFTR mutants" 2004 North American Cystic Fibrosis Conference
- Pedemonte N. et al. "Dual activity of aminoarylhiazoles on trafficking and gating defects caused by CF mutations" Pediatric pulmonology, Suppl. 31, 2008. 22nd Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Orlando, Florida, 22-25 October 2008, p. 311

- FFC Project#11/2003 **"Pathogenesis and treatment of Cystic Fibrosis-related liver disease"**

Mario Strazzabosco (Dipart. Med. Spec. e dei trapianti, U.O. Gastroenterologia, Osp. Riuniti – BG)

Publications

- Spirli C. et al. "Glibenclamide Stimulates Fluid Secretion in Rodent Cholangiocytes through a CFTR-Independent Mechanism" Gastroenterology 2005; 129: 220-33
- Strazzabosco M. et al. "Pathophysiology of Cholangiopathies" J. Clin Gastroenterology. Vol. 39, suppl. 2, April, 2005;
- Fiorotto R. et al. "Ursodeoxycholic Acid Stimulates Cholangiocyte Fluid Secretion in Mice via CFTR-Dependent ATP Secretion" Gastroenterology (2007); 133: 1603-1613

Abstracts

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

- FFC Project#13/2003 **"Biochemical and physiopathological aspects of plasma membrane of human bronchial epithelial cells expressing DF508 mutation before and after supplementation of methylated folic acid and B12 vitamin"**

Lisa Bambara (Medicina Interna B, Policlinico, 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

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

Publications

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

- FFC Project#3/2004 **"Natural and synthetic amino acids as chemical chaperones to promote CFTR folding"**

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

Abstracts

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

- FFC Project# 4/2004 **"Role of adenovirus receptors in the activation of mitogen activated protein kinase pathways and nuclear factor - kB in human airways epithelial cells"**

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

Publications

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

Abstracts

- Tamanini A. et al. "Adenovirus Vector Receptor Interactions and Early Pro-Inflammatory Signalling" 2005 – European Cystic Fibrosis Conference – New Frontiers in Basic Science of Cystic Fibrosis – 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.

- FFC Project#1/2005 **"Role of the scaffolding protein NHERF in the PKA-mediated regulation of CFTR sorting and activity"**

Valeria Casavola (Dipart. Fisiologia Gen. ed Amb. - Univ. Bari)

Publications

- Guerra L. et al. "Na⁺/H⁺ Exchanger regulatory factor isoform 1 over expression modulates cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) expression and activity in human airway 16HBE140 – cells and rescues ΔF508 CFTR functional expression in Cystic Fibrosis cells" The Journal of Biological Chemistry vol. 280, No. 49, pp. 40925-40933, December 9, 2005.

- Favia M. et al. "NHE3 inhibits PKA-dependent functional expression of CFTR by NHERF2 PDZ interactions" Biochemical and Biophysical Research Communications 2006 Aug 25;347(2):452-9.

- Pantano S. et al. "Molecular basis of the allosteric mechanism of cAMP in the regulatory PKA subunit" FEBS Letters 579 (2005) 2679-2685;
- Fanelli T. et al. "Beta-estradiol rescues Delta-F508 CFTR functional expression in human cystic fibrosis airway CFBE 41 o-cells through the up-regulation of NHRF1". Biol Cell 2008 Jan 9

Abstracts

- Fanelli T. et al. "β-estradiol rescues ΔF508-CFTR functional expression in CFBE41o-cells via NHERF1 up-regulation" Workshop Transporters 2006, Parma 6-9 September 2006.
- Guerra L et al. "Rescue of deltaF508 CFTR in CFBE410-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 CFBE410-cells is dependent on actin cytoskeleton interaction with ezrin and NHERF1" 58th National Congress of the Italian Physiological Society, Lecce 19-21 Sept. 2007; Acta Physiologica, vol. 191, suppl. 657

- FFC Project#2/2005 **"Macrolides and ion transport across CFTR"**

Emanuele Giordano (Ist. Naz. Ricerca Cardiovascolare (INRC) - Dipart. Biochimica)

Abstracts

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

- FFC Project#4/2005 **"Novel generation lentiviral vectors: evaluation of inflammatory potential in human respiratory cells"**

Giulio Cabrini (Lab. Patologia Molecol. – Centro FC - OCM Verona)

Abstracts

- Copreni E. et al. " Novel generation lentiviral vectors: evaluation of inflammatory potential in human respiratory epithelial cells" North American CF Conference 2006. Denver co, USA
- Bezzzeri V. et al. " Selective modulation of P. aeruginosa-dependent induction of interleukin-8 by transcription factor decoy oligonucleotides in CF bronchial epithelial cells" The 20th North American CF Conference, Denver, Colorado, Nov. 2-5 2006
- Lampronti I. et al. "Medicinal plant extracts inhibit the induction of pro-inflammatory genes in bronchial epithelial cells" The 21st Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Anaheim Convention Center, Anaheim, California, October 3-6 2007
- Bezzzeri V. et al. "Modulation of expression of genes involved in leukocyte chemotaxis by interfering with nuclear transcription factors" The 21st Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Anaheim Convention Center, Anaheim, California, October 3-6 2007

- FFC Project#5/2005 **"CFTR gene correction in human embryonic stem cells mediated by Small Fragment Homologous Replacement (SFHR)"**

Federica Sanguinolo (Dipart. Biopatologia e Diagnostica per imm. - Univ. Tor Vergata RM), Massimo De Felici (Dipart. Salute pubblica e Biologia cellulare - Univ. Tor Vergata RM), Lorenzo Guerra (Dipart. Fisiologia Gen. ed Amb. - Univ. Bari), Marco Lucarelli (Dipart. Biotecn. Cell. ed ematologia - Univ. La Sapienza Roma)

Publications

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

Abstracts

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

- FFC Project#1/2006 **"Novel methods of intracellular delivery of ΔF508-CFTR correctors"**

Marco 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 ΔF508-CFTR corrector deoxyspergualin to transporter human serum albumin enhances its ability to rescue CL-channel functions" Pediatric pulmonology, Suppl. 31, 2008. 22nd Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Orlando, Florida, 22-25 October 2008, p. 313.

- FFC Project#2/2006 **"Homing of bone marrow-derived stem cells to the respiratory epithelium in a cystic fibrosis mouse model: Role of bioenergetic metabolism"**

Massimo Conese (Ist. per il Trattamento speriment. della FC - Osp. San Raffaele - Milano), Nazareno Capitanio (Dipart. Scienze Biomediche - Univ. Foggia), Valeria Casavola (Dipart. Fisiologia Gen. ed Ambientale - Univ. Bari)

Abstracts

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

- FFC Project#3/2006 **"Identification, optimization, and validation of potentiators and correctors for the pharmacotherapy of cystic fibrosis"**

Luis JV Galletta (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.

- FFC Project#4/2006, FFC#2/2008 **"Functional and structural basis of the molecular mechanism of CFTR potentiators: towards therapeutic feasible molecules"**

Oscar Moran, (Istituto di Biofisica CNR - Genova), Olga Zegarra, Nazareno Dimasi (Lab. Gen. Molec. - Ist. Gaslini - Genova)

Publications

- O. Zegarra 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 measurement of the functional properties of the CFTR" Journal of Cystic Fibrosis, 7 (2008) 483-494
 - Moran O. "Model of the cAMP activation of chloride transport by CFTR channel and the mechanism of potentiators" J. of Theoretical Biology, 2009 Sep 17, ahead of print.
 - Bisignano P. et al. "Molecular dynamics analysis of the wild type and dF508 mutant structures of the human CFTR-nucleotide binding domain 1" Biochimie, 2009 Sep 23, ahead of print
 - Melani R. et al. "Analysis of ion transport in the airway epithelium using RNA interference" Current Opinion in Molecular Therapeutics, 11 (3): 282-291, 2009
- Abstracts**
- Bisignano P. "Dinamica molecolare della CFTR: stabilità strutturale e termodinamica del primo dominio legante il nucleotide (NBD1)" Università degli Studi di Genova, Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali, Corso di laurea specialistica in Biologia Cellulare e Molecolare, Tesi di laurea, a.a. 2008/2009.
 - Galfrè E. et al. "Biophysical characterisation of the interaction of recombinant nucleotide binding domains of the CFTR and potentiators" XIX Congresso Nazionale SIBPA, Roma, 17-20 settembre 2008
 - Ferrera L. et al. "Modulation of CFTR activity by interactions between the UCCF-029 potentiator and ATP analogues" The 22nd Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Orlando, Florida, October 23-25, 2008
 - Melani R. et al. "Interaction between CFTR and Genistein at different values of intracellular pH"
 - Martorana V. et al. "A molecular dynamics study of the CFTR nucleotide binding domains interaction" European Biophysics Journal, 7th EBSA European Biophysics Congress, Genova, July 11-15, 2009
 - Moran O., moderators "Pharmacology – how do correctors and potentiators work?" Special group discussion – IV, European CF Society, Tavira, Portugal, April 15-19, 2009

- FFC Project#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
- Favia M. et al. "NHERF1 overexpression-dependent increase of cytoskeleton organization is fundamental in the rescue of F508del-CFTR in human airway CFBE41o- cells" under revision for publication in Mol. Biol. Cell

Abstracts

- Favia M. et al "Ezrin phosphorylation and activation of RHOA play a role in the rescue of ΔF508 un CFBE410-cells by NHERF1" XIII Congresso italiano della Fibrosi cistica, III Congresso nazionale SIFC, Milano, 30 novembre – 2 dicembre 2007
- Favia M. et al. "Ezrin phosphorylation and activation of RhoA play a role in the NHERF1 overexpression-dependent rescue of F508del CFTR in human airway CFBE41o- cells" IV Congresso Nazionale della Società Italiana Fibrosi Cistica, Torino, 27-29 novembre 2008
- Monterisi S. et al. "Ezrin and cAMP/PKA have different compartmentalization in CFBE41o- and 16HBE14o- cells" 31st European Cystic Fibrosis Conference, Prague 11-14 June 2008
- Favia M. et al. "Rescue of F508del-CFTR in CFBE41o- cells is dependent on actin cytoskeleton interaction with Ezrin and NHERF1" ECFS Basic Science Conference, Regua, Douro, Portugal, 9-13 April 2008

- FFC Project#4/2007 **"Assessing the implication of protein kinase CK2 in cystic fibrosis pathogenesis"**
Lorenzo A. Pinna (Dipart. Chimica Biologica – Università di Padova)

Publications

- Pagano M. et al. "Modulation of protein kinase CK2 activity by fragments of CFTR encompassing F508 may reflect functional links with cystic fibrosis pathogenesis" Biochemistry 2008, 47, 7925-7936
- Pagano M. et al. "CFTR fragments with the F508 deletion exert a dual allosteric control over the master kinase CK2" Biochem. J. In press.
- Pagano M. et al. "La sorprendente diffusione del gene della fibrosi cistica: indizi per una nuova ipotesi" Atti dell'Istituto Veneto di Scienze, Lettere ed Arti, Tomo CLXVII (2008-2009) – Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali

2. GENETICA

Genetics

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

Publications

- Groman J. D. et al. "Variation in a Repeat Sequence Determines Whether a Common Variant of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene is Pathogenic or Benign" Am. J. Hum. Genet. 74:176-179, 2004
- Sangiuliano F. et al. "Toward the pharmacogenomics of Cystic Fibrosis – an update" Future Medicine – Pharmacogenomics, 2004 Oct., 5 (7), pp. 861-878
- 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 al. "CAP70: nuovo gene modificatore del fenotipo nella Fibrosi Cistica?" 7° Congresso Nazionale S.I.G.U. 2004

- FFC Project#5/2003 “**Molecular pathology of CFTR pre mRNA splicing. Diagnostic and therapeutic aspects**”

Franco Pagani (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;
- Zuccato E. et al. “An Intronic Polypyrimidine-rich Element Downstream of the Donor Site Modulates Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Exon 9 Alternative Splicing” The Journal of Biological Chemistry – Vol 279, No. 17, Issue of April 23, pp. 16980-16988, 2004

- FFC Project# 6/2003 “**Assessing the possible utilization of CFTR-M470V genotyping for CF risk determination**”

Pierfranco Pignatti (Ist. Biol. Genetica – Dip. Materno Infantile - Univ. Verona), Carlo Castellani (Centro FC – Ospedale Civile Maggiore - Verona), Guido Modiano (Dipart. Biologia “E. Calef” Università di Roma -Tor Vergata)

Publications

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

Abstracts

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

- FFC Project#5/2004 “**Screening of CFTR gene rearrangements in Italian CF patients**”

Giuseppe Castaldo (CEINGE - Biotec. Avanzate s.c.a.r.l. - Univ. Federico II Napoli), Carlo Castellani (Centro FC – Ospedale Civile Maggiore – Verona), Cristina Bombieri (Ist. Biol. Genetica – Dip. Materno Infantile - Univ. Verona), Federica 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” Journal of Cystic Fibrosis 7 (2008) 347 – 351

Abstracts

- Bombieri C. et al. “Ricerca di riarrangiamenti del gene CFTR in pazienti italiani con Fibrosi Cistica” 7° Congresso Nazionale S.I.G.U. 13 – 15 ottobre 2004, Pisa;
- Bombieri C. et al. “Screening of CFTR gene rearrangements in Italian CF patients” Poster: Molecular Basis of Mendelian Disorder – The American Society of Human Genetics, 54th Annual Meeting;
- 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

- FFC Project#7/2004 “**The Cystic Fibrosis mutation spectra in Italy: regional distribution and the European framework**”

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

Abstracts

- Riccardino F. et al. “Geografia (e storia) delle mutazioni della Fibrosi Cistica: l’Italia in un contesto europeo” 8° Congresso Nazionale S.I.G.U. – Cagliari 28 – 30 Settembre 2005.
- Viviani L. et al. “Cystic Fibrosis mutations spectra in Italy: a regional distribution” Journal of Cystic Fibrosis 4 (2005) S3-S10;

- FFC Project# 8/2004 “**CF: characterization of the unknown mutations in Italian patients and assessment of their pathogenic role**”

Maria Cristina Rosatelli, (Dipart. Scienze Biom. e Bioteecn. Lab. Genetica Molecolare - Univ. Cagliari), Franca Dagna Bricarelli (Lab. Genetica Umana - Osp. Galliera Genova), Alberto Bonizzato (Centro FC – Ospedale Civile Maggiore – Verona), Manuela Seia (Lab. Genetica Molecolare ICP – Milano), Antonio Amoroso (Scuola di Genetica Medica - Univ. Trieste)

Publications

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

- FFC Project#9/2004 “**Selection and functional characterization of CFTR intronic sequence variations potentially causing atypical forms of CF: modulation of CFTR alternative splicing?**”

Roberto Strom (Dipart. Biotecnologie cellulari ed Ematologia - Univ. La Sapienza Roma), Serena Quattrucci (Centro FC Regione Lazio, Dipart. Pediatria - Univ. La Sapienza Roma), Fernando Mazzilli (Dipart. Fisiopatologia Medica - Univ. La Sapienza Roma)

Publications

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

- FFC Project#15/2005 “**Splicing Affecting Genomic Variants in CFTR: Diagnostic and Therapeutic Aspects**”

Franco Pagani (ICGEB, Trieste)

Publications

- Youhna M. A. et al. “ TDP43 depletion rescues aberrant CFTR exon 9 skipping” FEBS Letters 580 (2006) 1339-1344.
- Raponi M. et al. “Reduced splicing efficiency induced by synonymous substitutions may generate a substrate for natural selection of new splicing

isoforms: the case of CFTR exon 12" Nucleic Acids Research, 2007, Vol. 35, No. 2, pp. 606-613

- FFC Project#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 indefinite genotype" 13th Italian Cystic Fibrosis Conference, Milan, 30 Nov. – 2 Dec. 2007, J. Cyst Fibrosis 2008; 7, suppl. 3: pp. S12
- Tomaiuolo R. et al. "Molecular analysis of genes encoding CFTR interactors of SLC26 family in CF patients: preliminary results" 13th Italian Cystic Fibrosis Conference, Milan, 30 Nov. – 2 Dec. 2007, J. Cyst Fibrosis 2008; 7, suppl. 3: pp. S12-S13

- FFC Project#4/2008 "Search of novel regulatory elements in the promoter region of CFTR gene"

Pietro Pucci (CEINGE - Biotec. Avanzate s.c.a.r.l. - Univ. Federico II Napoli)

Abstracts

- Cozzolino F. et al. "Identification of novel CFTR promoter regulatory elements" Italian Proteomics Association, 4th Annual National Conference, Milano, June 22-25, 2009.

3. MICROBIOLOGIA

Microbiology

- FFC Project#4/2002 "Taxonomy and virulence markers of *B. cepacia* strains associated with respiratory infections in patients with cystic fibrosis"

Roberta Fontana (Lab. Microbiol e Virologia, Ospedale Civile Maggiore – Verona)

Publications

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

Abstracts

- G. Golini et al. "Distribution of Burkholderia Cepacia complex isolates from patients with cystic fibrosis" 12th ECCMID, Milan, 24-27 April 2002. Clinical Microbiology and Infection 2002; 8 Supp. 1:114
- G. Golini et al. "Distribution of Burkholderia Cepacia complex isolates from patients with cystic fibrosis" 25th European Congress CF Society, Genoa; 20-23 June 2002. Journal of CF 2002; 1 Supp. 1: 127.
- G. Golini et al. "Burkholderia Cepacia infection and clinical course in cystic fibrosis" 26th European Congress CF Society, Belfast; 4-7 June 2003. Journal of CF 2003; 2 Supp. 1:34.
- G. Golini et al. "In vitro of levofloxacin and ciprofloxacin on clinical isolates obtained from patients with cystic fibrosis" 11th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases – Istanbul, Turkey – 1-4 April 2001

- FFC Project#8/2003 "Gene regulation and adaptive mutation of *Pseudomonas aeruginosa* in a chronic lung infection model for Cystic Fibrosis"

Alessandra Bragonzi (Istituto per il trattamento sperimentale della fibrosi cistica, Osp. S. Raffaele, Milano), Gerd Döring (Institute for Gen. and Environ. Hygien - Univ. Tuebingen – Germany)

Publications

- Bragonzi A. et al. "Sequence diversity of the mucABD locus in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis" Microbiology (2006), 152, 3261-3269

- Bragonzi A. et al. "Nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* expresses alginate in the lungs of patients with cystic fibrosis and in a mouse model" J. Infect Dis. 2005; 192(3): 410-419

Abstracts

- Montanari S. et al. "Evaluation of the biological cost of *Pseudomonas aeruginosa* hypermutation in a murine model of chronic pulmonary infection" Paediatric Pulmonology, Suppl. 28: 289, 2005. (19th North American Cystic Fibrosis Conference, Baltimore, USA)
 - Paroni M. et al. "Pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* clonal strains isolated from CF patients in a murine model of chronic pulmonary infection" 20th Annual North American CF Conference; Denver – Colorado, 2-5 Nov. 2006
 - Montanari S. et al. "Cost versus benefit of *Pseudomonas Aeruginosa* hypermutation in the absence or presence of antibiotic treatment" 20th Annual North American CF Conference; Denver – Colorado, 2-5 Nov. 2006
 - Montanari S. et al. "Evaluation of the biological cost of hypermutation in *Pseudomonas aeruginosa* from patients with cystic fibrosis" 2nd FEMS Congress of European Microbiologists, Madrid, July 4-8, 2006

- FFC Project#9/2003 "Development of a rapid diagnostic test to discriminate *B. cepacia* complex species and genomovars in routine clinical analysis involving CF patients"

Renato Fani (Dipart. Biologia Animale e Genetica - Univ. Firenze), Giovanni Taccetti (Dipart. Pediatria – Centro Fibrosi Cistica - Ospedale Meyer - Firenze), Graziana Manno (Dipart. Pediatria - Osp. G. Gaslini - Genova), Silvia Tabacchioni (Dipart. Biotec. Prot. della Salute e degli Ecosistemi - Sez. Gen. e Genomica veg. - ENEA - CRE - CASACCIA -UTS - Roma)

Publications

- Tabacchioni S. et al. "Use of the gyrB gene to discriminate among species of the Burkholderia cepacia complex" FEMS Microbiol. Lett (2008) 1-8
- Papaleo M.C. et al. "Structural, evolutionary and genetic analysis of the histidine biosynthetic "core" in the genus *Burkholderia*" Gene 448 (2009) 16-28

Abstracts

- Cocchi P. et al. "Identification of Burkholderia cepacia complex species by SNuPE analysis of recA and gyrB genes" 28th European CF Conference, Crete, Greece 22-25 June 2005;

- FFC Project#10/2003 "The quorum sensing of the emerging 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

- FFC Project#10/2004 “**Genome-wide identification of target genes for the design of non-conventional antibiotics against CF related pathogens**”

Giovanni Bertoni (Dipart. Scienze Biomolecolari e Biotecnologie - Univ. Milano)

Abstracts

- Vidal Aroca F. et al. “Functional genomics of the opportunistic pathogen *Pseudomonas Aeruginosa* by interfering antisense RNA” 25° Congresso Nazionale della SIMGBM, Orvieto 8- 10 giugno 2006;
- Vidal Aroca F. et al. “Functional genomics of the opportunistic pathogen *Pseudomonas Aeruginosa* by interfering antisense RNA” Summer School – International Univ. Bremen, 28 luglio – 4 agosto 2006;
- Milani A. et al. “Functional genomics of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* by interfering antisense RNA” 1st European CF Young Investigator Meeting, Lille, Aug. 29-31, 2007

- FFC Project#11/2004 “**Evaluation of the pathogenicity of environmental and clinical isolates of *Burkholderia cepacia* complex alone and in the presence of *Ps aeruginosa***”

Annamaria Bevvino (Dipart. Biotecnologie Agroindustr. e protezione della salute - ENEA - Casaccia – Roma), Fiorentina Ascenzioni (Dipart. Biologia cellulare e dello sviluppo - Univ. La Sapienza Roma), Alessandra Bragonzi (Ist. per il Trattamento speriment. della FC - Osp. San Raffaele – Milano)

Publications

- Chiarini L. et al. “*Burkholderia Cepacia* complex species: health hazards and biotechnological potential” Trends in Microbiology Vol. 14 No. 6 June 2006; 277-286
- Pirone L. et al. “*Burkholderia cenocepacia* strains isolated from cystic fibrosis patients are apparently more invasive and more virulent than rhizosphere strains” Environmental Microbiology (2008) Oct;10(10):2773-84

Abstracts

- Pirone L. et al. “In vitro and in vivo pathogenicity of *Burkholderia cenocepacia* strains of clinical and environmental origin” 28th European CF Conference, Crete, Greece 22 – 25 June 2005;
- Pirone L. et al. “Clinical and environmental *Burkholderia cenocepacia* strains: evaluation of pathogenicity by in vitro and in vivo models” International *Burkholderia Cepacia* Working Group meeting April 20 – 23, 2006, Gent, Belgium
- Pirone L. et al. “Clinical and environmental *Burkholderia cenocepacia* strains: evaluation of pathogenicity by in vitro and in vivo models” 19th Annual North American CF Conference, Baltimore; October 20 – 23 2005

- FFC Project#12/2004 “**Antimicrobial resistance in *Burkholderia cepacia* complex from CF patients: identification, characterization and role of efflux transporters in intrinsic and acquired drug resistance**”

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

Publications

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

- FFC Project#6/2005, #12/2006, #11/2007 “**Community-acquired MRSA and hospital- acquired MRSA in cystic fibrosis patients: a 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
- Taccetti G. et al. “Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Cystic Fibrosis”, European Infectious Diseases, 2008, vol. 2, issue 2.

Abstracts

- Piluso A. et al. “A national overview of MRSA epidemiology: emergence of an epidemic clone” NACFC 2006.
- Cocchi P. et al. “Epidemiology of Community acquired MRSA and hospital acquired MRSA in cystic fibrosis patients: a national overview” North American CF Conference, Anaheim, California, Oct. 3-6, 2007
- Cocchi P. et al. “Emergence of an epidemic clone of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) Panton-Valentine leukocidin (PVL) negative in Cystic Fibrosis patients” 30th European CF Conference, Belek, turkey, 13-16 June 2007
- Cocchi P. et al. “Epidemiologia italiana di *staphylococcus aureus* meticillino-resistente: risultati di uno studio multicentrico” XII Congresso Italiano Fibrosi Cistica, Firenze, 23-25 Nov. 2006
- Taccetti G. et al. “Methicillin-resistant *S. Aureus* (MRSA) in cystic fibrosis patients: prevalence and clinical findings” Pediatric pulmonology, Suppl. 31, 2008. 22nd Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Orlando, Florida, 22-25 October 2008, p. 343.
- Cocchi P. et al. “MLST analysis of an epidemic clone of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) panton-valentine leukocidin (PVL) negative in cystic fibrosis patients” Pediatric pulmonology, Suppl. 31, 2008. 22nd Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Orlando, Florida, 22-25 October 2008, p. 348
- Campana S. et al. “Community-Aquired MRSA cause earlier infection than Hospital Acquired MRSA in patients with cystic fibrosis” 32nd European Cystic Fibrosis Conference, 10-13 giugno 2009, Brest, France.
- Cocchi P. et al. “Characterization of SCCmec types involved in persistent MRSA infections in cystic fibrosis patients” 32nd European Cystic Fibrosis Conference, 10-13 giugno 2009, Brest, France.
- Campana S. et al. “Infection with community-and hospital-acquired MRSA: influence on pulmonary function in CF patients” 23rd Annual North American Cystic Fibrosis Congress, Minneapolis, Minnesota, 15-17 October 2009.
- Cocchi P. “SCCMCEC types involved in persistent MRSA infections in CF patients: a longitudinal study” 23rd Annual North American Cystic Fibrosis Congress, Minneapolis, Minnesota, 15-17 October 2009.

- FFC Project#7/2005 “***Stenotrophomonas maltophilia*, an emergent pathogen associated to cystic fibrosis: identification and molecular characterization of virulence determinants as potential targets for new therapeutic 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 “Bambino Gesù” – Roma)

Publications

- Di Bonaventura G. et al. “Molecular characterization of virulence determinants of *Stenotrophomonas maltophilia* strains isolated from patients affected by cystic fibrosis”. Internat J Immunopath Pharmacol 2007;Vol. 20:529-37
- E. Roscetto et al. “PCR-based rapid genotyping of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates” BMC Microbiol 2008 Nov 24;8:202.

Abstracts

- De Carolis E. et al. "Analisi proteomica di Stenotrophomonas Maltophilia" Congresso Società Italiana di Microbiologia (SIM), Genova 15-18 ottobre 2006.
- Del Chierico F. et al. "Caratterizzazione genetica e molecolare dei geni codificanti il flagello in ceppi di Stenotrophomonas Maltophilia isolati da pazienti con fibrosi cistica (FC)" Congresso Società Italiana di Microbiologia (SIM), Genova 15-18 ottobre 2006.
- Di Bonaventura G. et al. "Effetto di concentrazioni sub-inibenti di Moxifloxacină su Stenotrophomonas Maltophilia isolati da fibrosi cistica" Congresso Società Italiana di Microbiologia (SIM), Genova 15-18 ottobre 2006.

- FFC Project#8/2005 "**Genetic fingerprinting of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Italian cystic fibrosis patients: comparison with isolates from the environment and other clinical origins in Europe**"

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

- FFC Project#9/2005 "**Studies of the Quorum Sensing Systems of *Pseudomonas* and *Burkholderia***"

Vittorio Venturi (ICGEB Trieste)

Publications

- Rampioni G. et al. "The Quorum sensing negative regulator RsaL of *Pseudomonas Aeruginosa* binds to the *lasI* Promoter" Journal of Bacteriology (2006), vol. 188, No. 2, pp. 815-819.
- Solis R. et al. "Involvement of quorum sensing and RpoS in rice seedling blight caused by *Burkholderia plantarii*" FEMS Microbiol Lett 259 (2006) 106-112
- Bertani I. et al. "The *Pseudomonas putida* Lon protease is involved in N-acyl homoserine lactone quorum sensing regulation" BMC Microbiol 2007 Jul 26; 7:71
- Devescovì G. et al. "Involvement of a Quorum-Sensing-Regulated Lipase Secreted by a Clinical Isolate of *Burkholderia glumae* in Severe Disease Symptoms in Rice" Applied and Environmental Microbiology, (2007); 73 (15): 4950-8
- Licciardello G. et al. "Pseudomonas corrugata contains a conserved N-acyl homoserine lactone quorum sensing system; its role in tomato pathogenicity and tobacco hypersensitivity response" FEMS Microbiol. Ecol. (2007); 61 (2): 222-34
- Rampioni G. et al. "The *Pseudomonas* quorum sensing regulator RsaL belongs to the tetrahelical superclass of H-T-H proteins" Journal of Bacteriology, 2007, Vol. 189, No. 5, pp. 1922-1930
- Massa C. et al. "Isolation, heterologous and characterization of an endo-polygalacturonase produced by the phytopathogen *Burkholderia cepacia*". Protein Expression and Purification 2007; 54(2): 300-308
- Steindler L. et al. "Detection of quorum sensing N-acyl homoserine lactone signal molecules by bacterial biosensors" FEMS Microbiol. Lett. 266 (2007)

- FFC Project#6/2006 "**Genome-wide identification of target genes for the design of non-conventional antibiotics against cystic fibrosis-related pathogens**"

Giovanni Bertoni (Dipart. Scienze Biomolecolari e Biotecnologie - Univ. Milano), Alessandra Bragonzi (Istituto per il trattamento sperimentale della fibrosi cistica, Osp. S. Raffaele, Milano)

Abstracts

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

- FFC Project#7/2006 "**Influence of *Pseudomonas aeruginosa* and CF host on *Burkholderia cenocepacia* pathogenicity**"

Annamaria Bevvino (Dipart. Biotecnologie Agroindustr. e protezione della salute - ENEA - Casaccia - Roma), Fiorentina Ascenzioni (Dipart. Biologia cellulare e dello sviluppo - Univ. La Sapienza Roma), Alessandra Bragonzi (Ist. per il Trattamento speriment. della FC - Osp. San Raffaele - Milano)

Publications

- Pirone L. et al. "Burkholderia cenocepacia strains isolated from cystic fibrosis patients are apparently more invasive and more virulent than rhizosphere strains" Environmental Microbiology (2008) Oct;10(10):2773-84

Abstracts

- Pirone L. et al. "Influence of *Pseudomonas aeruginosa* on the growth rate and internalization of *Burkholderia cenocepacia*" 9° Convegno Nazionale FISV, Riva del Garda (TN), 26- 29 Sett. 2007
- Bevvino A. et al. "Influence of *Pseudomonas aeruginosa* on the growth rate and internalization of *Burkholderia cenocepacia*" 13th Italian Cystic Fibrosis Conference, Milan, 30 Nov. - 2 Dec. 2007, J. Cyst Fibrosis 2008; 7, suppl. 3: S16
- Paroni M. et al. "Pathogenicity of environmental *Burkholderia cenocepacia* strains" Poster + Oral communication: 10° Convegno FISV - Federazione italiana scienze della vita, Riva del Garda (Trento), 24-27 settembre 2009
- Pirone L. et al. "Dual-species biofilm formation and cell invasion of *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cenocepacia*" 10° Convegno FISV - Federazione italiana scienze della vita, Riva del Garda (Trento), 24-27 settembre 2009

- FFC Project#8/2006 "**A genome-wide approach to the identification of novel targets for immuno-antibacterials in *Pseudomonas aeruginosa***"

Alessandra Bragonzi (Istituto per il trattamento sperimentale della fibrosi cistica, Osp. S. Raffaele, Milano) Giovanni Bertoni (Dipart. Scienze Biomolecolari e Biotecnologie - Univ. Milano), Maria Scarselli (Centro Ricerche Chiron - Unità Bioinformatica - Siena)

Abstracts

- Bragonzi A. et al. "Pseudomonas aeruginosa pathogenicity within clonal strains from patients with cystic fibrosis" 13th Italian Cystic Fibrosis Conference, Milan, 30 Nov. - 2 Dec. 2007, J. Cyst Fibrosis 2008; 7, suppl. 3: S17
- Leone M. et al. "Chemical and biological characterization of lipopolysaccharide and peptidoglycan of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a patient at different stages of cystic fibrosis" Pediatric pulmonology, Suppl. 31, 2008. 22nd Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Orlando, Florida, 22-25 October 2008, p. 265.
- Bragonzi A. et al. "Genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* for the commitment to chronic lung infection" Pediatric pulmonology, Suppl. 31, 2008. 22nd Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Orlando, Florida, 22-25 October 2008, p. 342



- FFC Project#9/2006 “**Counteracting *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation by inhibition of novel targets: regulation of the levels of the di-cyclic-GMP signal molecule**”

Paolo Landini (Università di Milano Dip.to Scienze Biomolecolari e Biotecnologie), Anna Bernardi (Università di Milano, Dip. chimica Organica ed Industriale), Pierfausto Seneci (Università di Milano, Dip. Chimica Organica e Industriale)

Publications

- Antoniani D. et al. “Monitoring of diguanylate cyclase activity and of cyclic-di-GMP biosynthesis by whole-cell assays suitable for high-throughput screening of biofilm inhibitors” Appl Microbiol Biotechnol, August 2009, DOI 10.1007/s00253-009-2199-x, ahead of print.

- FFC Project#10/2006 “**The role of RND drug efflux transporters in the intrinsic antibiotic resistance of *Burkholderia cenocepacia***”

Giovanna Riccardi (Università di Pavia Dip.to Genetica e Microbiologia), Miguel Valvano (Dept. of Microbiology and Immunology, University of Ontario, Canada)

Publications

- Buroni S. et al. “Assessment of three Resistance-Nodulation-Cell Division drug efflux transporters of *Burkholderia cenocepacia* in intrinsic antibiotic resistance” BMC Microbiology 2009, 9:200, <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/9/200>

Abstracts

- Buroni S. et al. “The role of RND drug efflux transporters in intrinsic antibiotic resistance of *Burkholderia cenocepacia*” 28th National Meeting Società Italiana di Microbiologia generale e Biotecnologie microbiche, Spoleto, June 11-13, 2009

- FFC Project#11/2006 “**A structure-function investigation of exopolysaccharides and lipopolysaccharides produced by clinical strains of the *Burkholderia cepacia* complex and of their interaction with antimicrobial peptides of the host innate immune system**”

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

Publications

- Herasimenka Y. et al. “Exopolysaccharides produced by *Inquilinus limosus*, a new pathogen of cystic fibrosis patients: novel structures with usual components” Carbohydrate. Res. (2007); 342, 2404:2415

- De Soya A. et al. “Chemical and biological features of *Burkholderia cepacia* complex lipopolysaccharides” Innate Immunity (2008); 14(3); 127-144

- Herasimenka Y. et al. “Macromolecular properties of cepacian in water and dimethylsulfoxide” Carbohydr. Res. 343 (2008) 81-89

- Ieranò T. et al. “The structure and pro-inflammatory activity of the lipopolysaccharide from *Burkholderia multivorans* and the differences between clonal strains colonizing pre- and post-transplanted lungs” Glycobiology, 2008, 18: 871-881

- Cescutti P. “Bacterial capsular polysaccharides and exopolysaccharides” in “Microbial Glycobiology Structures, Relevance and Application” Eds. Moran A. P., Brennan P. J., Holst O., and von Itzstein M., Elsevier, 2009, 93-108

- Foschiatti M. et al. “Inhibition of cathelicidin activity by bacterial exopolysaccharides” Molecular Microbiology 72, 2009, 1137–1146

- Ieranò T. et al. “Structural and conformational behavior of the two lipopolysaccharide O-antigens produced by the cystic fibrosis pathogen *Burkholderia multivorans*” Chemistry European Journal, 2009, 15:7156:7166

Abstracts

- Furlanis L. et al. “Determinazione dell’unità ripetitiva del cepaciano traslocata nello spazio periplasmico da una flippasi codificata dal gene *bceQ*” 37° Congresso Nazionale di Microbiologia, Torino 11 - 14 Ottobre 2009

- Rizzo R. et al. “Aggregation properties of cepacian. A model for biofilm formation” 15th European Carbohydrate Symposium - Vienna Luglio 19 - 24, 2009

- Cescutti P. et al. “Identification of the gene involved in the transfer of cepacian repeating unit to the periplasmic space. Determination of the biological repeating unit of cepacian” 15th European Carbohydrate Symposium - Vienna Luglio 19 - 24, 2009

- Rizzo R. et al. “Aggregation properties of cepacian. A model for biofilm formation” 13th Annual Meeting of the International *Burkholderia cepacia* working group, 2009, April 23-26 University of Toronto - Canada

- Cescutti P. “Determination of the biological repeating unit of cepacian translocated to the periplasmic space by a flippase coded by the *bceq* gene” 13th Annual Meeting of the International *Burkholderia cepacia* working group, 2009, April 23-26 University of Toronto – Canada

- Molinaro A. “Analysis of endotoxin from *B. cepacia*” XI Convegno-Scuola sulla Chimica dei Carboidrati, Pontignano (SI - Italy), June 22-26 2008

- Silipo A. “Structure and pro-inflammatory activity of endotoxin from the *Burkholderia cepacia* complex” International *Burkholderia Cepacia* Working Group, Ca’ Tron di Roncade (TV - Italy) April 14-17 2008

- T. Ierano, “Analysis of endotoxins from *B. cepacia* complex” European CF Young Investigator Meeting, Lille (France), August 27 - 29 2008

- T. Ierano’ “Analysis of endotoxins from *B. cepacia* complex” Summer Course Glycosciences-10th European Training Course on Carbohydrates – Wageningen (The Netherlands), June 9-12, 2008

- Rizzo R. et al. “Structure and Functions of Exopolysaccharides Produced by *Inquilinus limosus*: A Pathogen of Cystic Fibrosis Patients” International carbohydrate symposium, Oslo (Norway), 27 July – 1 August 2008

- Furlanis L. et al. “L’esopolisaccaride batterico come fattore di patogenicità nelle infezioni respiratorie da *Burkholderia cepacia*” 36° Congresso Società italiana di Microbiologia, Roma (Italy) 12-15 ottobre 2008

- Cescutti P. et al. “Structure-function relationships in cepacian biofilm formation” 14th European Carbohydrate Symposium, Lubeck 3-7 September 2007

- Cescutti P. et al. “Structure-function relationships in cepacian biofilm formation” XVIII convegno dell’Associazione Italiana di Scienza e Tecnologia delle Macromolecole, Catania 16-20 September 2007

- Cescutti P. et al. “Exopolysaccharides as bacterial defence tools: the case of *Burkholderia cepacia* Complex” XIV European Meeting on Carbohydrates, Lubeck, September 3-7, 2007

- FFC Project#14/2006 “**Longitudinal study of *Pseudomonas aeruginosa* resistance: selection and evolution of resistance mechanisms in relation to antibiotic treatment in cystic fibrosis patients**”

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

Abstracts

- Campana S. et al. “*Pseudomonas aeruginosa* e metallo beta-lattamasi in pazienti affetti da fibrosi cistica: prevalenza e persistenza nel tempo” XII Congresso Italiano della Fibrosi Cistica, Firenze 23-25 Nov. 2006

- Campana S. et al. “Persistence of metallo-β-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

- FFC Project#6/2007 “**Dissecting a surface target candidate for the rational design of novel antibacterial drugs against *Pseudomonas aeruginosa***”

Francesco Bonomi (Dipartimento di Scienze Molecolari Agroalimentari, Università degli Studi di Milano), Giovanni Bertoni (Dipartimento di Scienze Biomolecolari e Biotecnologie, Università degli Studi di Milano)

Abstracts

- Milani A. et al. “Analysis of a novel membrane protein in the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*” Poster ed abstract: 28th National Meeting Società Italiana di Microbiologia generale e Biotecnologie microbiche, Spoleto, June 11-13, 2009.
- Milani A. et al. “Analysis of a novel membrane protein in the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*” Poster: 10° Convegno FISV – Federazione italiana scienze della vita, Riva del Garda (Trento), 24-27 settembre 2009.
- Iametti S. et al. “A fluorescence-based assay for bacterial transglutaminase activity” Poster: VII European Symposium of the Protein Society, Zurich (Switzerland), June 14-18, 2009.

- FFC Project#7/2007 “***Stenotrophomonas maltophilia*, a multidrug resistant emergent pathogen associated to cystic fibrosis: a post-genomic approach to identify new immunological and 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)

Publications

- Di Bonaventura G. et al. “Molecular characterization of virulence determinants of *Stenotrophomonas maltophilia* strains isolated from patients affected by cystic fibrosis” Int. J. Immunopathol. Pharmacol., 2007, Vol. 20, n. 3, pp. 529-537.
- Roscetto E. et al. “PCR-based rapid genotyping of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates”, BMC Microbiol, 2008, 8:202 doi:10.1186/1471-2180-8-202
- Rocco F. et al. “*Stenotrophomonas maltophilia* isolated from patients affected by cystic fibrosis: genotyping analysis and molecular characterisation of virulence determinants” Int. J. Med. Microbiol., 2009, Jun 30 (Ahead of print)

Abstracts

- De Carolis E. et al. “Analisi proteromica di *Stenotrophomonas maltophilia*” 34° Congresso nazionale della Società Italiana di Microbiologia, 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” 34° Congresso nazionale della Società Italiana di Microbiologia, Genova 15-18 ottobre 2006.
- Di Bonaventura G. et al. “Effetto di concentrazioni subinibenti di moxifloxacina su *Stenotrophomonas maltophilia* isolati da fibrosi cistica” 34° Congresso nazionale della Società Italiana di Microbiologia, Genova 15-18 ottobre 2006.
- Prosseda G. et al. “Virulence factors of *Stenotrophomonas maltophilia*, an emergent pathogen associated to cystic fibrosis” 9° Convegno Nazionale FISV, Riva del Garda (TN), 26- 29 Sett. 2007
- Casalino M. et al. “Molecular characterization of *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from cystic fibrosis patients” 9° Convegno Nazionale FISV, Riva del Garda (TN), 26- 29 Sett. 2007
- Di Bonaventura G. et al. “Interazione in vitro tra *Stenotrophomonas maltophilia* e cellule epiteliali bronchiali IB3-1: implicazioni in fibrosi cistica” 35° Congresso nazionale della Società Italiana di Microbiologia, Catania 30 settembre – 3 ottobre 2007
- Ficarelli E. et al. “*Stenotrophomonas maltophilia* isolated from patients affected by cystic fibrosis: genotyping analysis and molecular characterisation of virulence determinants” 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Barcelona, 19-22 April 2008
- Di Bonaventura G. et al. “Adhesion to and biofilm formation on IB3-1 bronchial cells by *Stenotrophomonas maltophilia*: implications in cystic fibrosis” 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Barcelona, 19-22 April 2008
- Ficarelli E. et al. “Caratterizzazione molecolare di ceppi di *Stenotrophomonas maltophilia* isolati da pazienti con fibrosi cistica” 36° Congresso nazionale della Società Italiana di Microbiologia, Roma 12-15 ottobre 2008.
- Di Bonaventura G. et al. “Caratterizzazione fenotipica e genotipica della formazione di biofilm da parte di *Stenotrophomonas maltophilia* isolati da pazienti con fibrosi cistica” 36° Congresso nazionale della Società Italiana di Microbiologia, Roma 12-15 ottobre 2008.
- Di Bonaventura G. et al. “Patogenesi microbica in fibrosi cistica: clearance di *Stenotrophomonas maltophilia* ed infiammazione in un modello murino di infezione polmonare” 36° Congresso nazionale della Società Italiana di Microbiologia, Roma 12-15 ottobre 2008.
- Michelacci V. et al. “Identification of genes expressed at the host temperature in *S. maltophilia*, an emergent pathogen in CF patients” 7th Louis Pasteur Conference on Infectious Disease, 11-13 Novembre 2008, Paris, France.

- FFC Project#09/2007 “***Burkholderia cepacia* complex: closing down on the major virulence factors**”

Vittorio Venturi (ICGB Trieste)

Publications

- Rampioni G. et al. “RsaL provides quorum sensing homeostasis and functions as a global regulator of gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*” Molec. Microbiol. (2007) 66 (6), 1557-1565
- Licciardello G. et al. “*Pseudomonas corrugata* contains a conserved N-acyl homoserine lactone quorum sensing system; its role in tomato pathogenicity and tobacco hypersensitivity response” FEMS Microbiol Ecol 61 (2007) 222-234.
- Steindler L. et al. “The presence, type and role of N-acyl homoserine lactone quorum sensing in fluorescent *Pseudomonas* originally isolated from rice rhizospheres are unpredictable” FEMS Microbiol. Lett. 288 (2008) 102-111.
- Steindler L. et al. “LasI/R and RhlI/R Quorum Sensing in a strain of *Pseudomonas aeruginosa* beneficial to plants” Appl. Environ. Microbiol., August 2009, p. 5131-5140.
- Netoeta S. et al. “A simple model for the early events of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*: modeling bacterial swarming as the movement of an “activation zone” Biology direct 2009, 4:6, <http://www.biology-direct.com/content/4/1/6>

- FFC Project#10/2007 “**Iron uptake and quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* virulence**”

(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, 61(1):80-83 January 2009

- Imperi F. et al. "Analysis of the periplasmic proteome of *Pseudomonas aeruginosa*, a metabolically versatile opportunistic pathogen" Proteomics 2009, 9, 1901-1915.

Abstracts

- Rampioni G. et al. "RsaL is a global regulator controlling quorum sensing homeostasis and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*" ASM Conference Pseudomonas 2007, Seattle, Washington, 26-30 August 2007, pp. 15-16.
- Rampioni G. et al. "RsaL, a quorum sensing homeostatic effector controlling virulence and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*" 9° Convegno Nazionale FISV, Riva del Garda (TN), 26-29 Sett. 2007
- Rampioni G. et al. "RsaL is a global regulator controlling quorum sensing homeostasis and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*" ASM Conference Cell-Cell Communication in Bacteria, Austin, Texas, 7-10 October 2007, p. 41
- Tiburzi F. et al "A new regulator involved in the control of pyoverdine synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: the role of the LysR-type transcriptional regulator CysB" 28th National Meeting Società Italiana di Microbiologia generale e Biotecnologie microbiche, Spoleto, June 11-13, 2009.

- FFC Project#7/2008 **"Burkholderia cenocepacia pathogenicity: synergistic interactions with *Pseudomonas aeruginosa* and adaptation to CF host"**

Annamaria Bevilacqua (ENEA C.R. Casaccia - Biotecn. Agroindustriale e Protezione della Salute), Fiorentina Ascenzioni (Dip. Biologia Cellulare e dello Sviluppo - Univ. La Sapienza)

Abstracts

- Pirone L. et al. "Interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cenocepacia* strains in biofilm and in a mouse model of chronic infection" Eurobiofilms, Rome, 2-5 September 2009
- Paroni M. et al. "Interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cenocepacia* strains in biofilm and in a mouse model of chronic infection" Poster + oral communication: XV Congresso Italiano della Fibrosi Cistica - V Congresso SIFC, 1-4 ottobre, Soverato, Squillace, (CZ)
- Paroni M. et al. "Pseudomonas aeruginosa and Burkholderia cenocepacia polymicrobial interactions in biofilm and murine model of chronic infection" XXVIII Convegno nazionale SIMGBM, Società Italiana di Microbiologia generale e Biotecnologie microbiche, Spoleto, 11/13 Giugno 2009
- Paroni M. et al. "Pseudomonas aeruginosa and Burkholderia cenocepacia polymicrobial interactions in biofilm and murine model of chronic infection" 23rd Annual North American Cystic Fibrosis Congress, Minneapolis, Minnesota, 15-17 October 2009.

- FFC Project#10/2008 **"Essential proteins of *Pseudomonas aeruginosa* other membrane biogenesis as novel targets for new anti-microbial drugs design and synthesis"**

Alessandra Polissi (Dipartimento Biotecnologie e Bioscienze - Università Bicocca Milano), Gianni Dehò (Dipartimento Scienze Biomolecolari e Biotecnologie - Università di Milano), Cristina De Castro (Dipartimento di Chimica e Biochimica Organica - Università di Napoli "Federico II"), Martino Bolognesi (Dipartimento Scienze Biomolecolari e Biotecnologie - Università di Milano), Laura Cipolla (Dipartimento Biotecnologie e Bioscienze - Università Bicocca Milano), Luca De Gioia (Dipartimento Biotecnologie e Bioscienze - Università Bicocca Milano)

Publications

- Sommaruga S. et al. "Structure prediction and functional analysis of KdsD, an enzyme involved in lipopolysaccharide biosynthesis" Biochemical and Biophysical Research Communication, 388 (2009) 222-227

Abstracts

- Airoldi C. et al. "D-arabinose-5-phosphate isomerase: NMR characterisation of natural substrates recognition and binding requirements" Biotech.org - Chimica Organica e Biotecnologie: Sfide e Opportunità, May 20-23, 2009, Forte dei marmi (Lucca)
- Sommaruga S. et al. "3D structure by homology modeling of the Escherichia coli KdsD, an enzyme involved in lipopolysaccharide biosynthesis" FISV 2008 10th Annual Congress (Riva del Garda - TN, 24-27 Settembre 2008)
- Airoldi C. et al. "NMR as tool for the characterization of carbohydrate processing enzymes: the example of E. coli arabinose 5-phosphate isomerase (API)" XI Convegno-Scuola sulla Chimica dei Carboidrati, 22-26 Settembre 2008, Pontignano (Siena)
- Sommaruga S. et al. "Structural and biochemical characterization of KdsD, an enzyme involved in lipopolysaccharide biosynthesis" XXVIII Convegno nazionale SIMGBM, Società Italiana di Microbiologia generale e Biotecnologie microbiche, Spoleto, 11/13 Giugno 2009
- Sperandeo P. et al. "Biogenesis of lipopolysaccharide, an immunomodulatory molecule of the outer membrane of Gram-negative bacteria" XXVIII Convegno nazionale SIMGBM, Società Italiana di Microbiologia generale e Biotecnologie microbiche, Spoleto, 11/13 Giugno 2009
- Polissi A. "Biogenesis of outer membrane of Gram-negative bacteria: new genes implicated in Lipopolysaccharide transport to the cell surface" Meeting on: Cellular Lipid Transport Processes and their Role in Human Disease, October 22-26, 2008 Canmore (Alberta, Canada)

- FFC Project#8/2008 **"Development and validation of a novel screening system for the identification of *Pseudomonas aeruginosa* virulence inhibitor"**

Livia Leoni (Lab. Microbiologia molecolare e Biotecnologie dei microrganismi, Dip. Biologia, Università "Roma 3"), Paolo Visca (Lab. Microbiologia clinica e Virologia, Dip. Biologia, Università "Roma Tre")

Abstracts

- Rampioni G. et al. "Role of the RsaL quorum sensing regulator in *Pseudomonas aeruginosa* pathogenic potential" 28th National Meeting Società Italiana di Microbiologia generale e Biotecnologie microbiche, Spoleto, June 11-13, 2009
- Rampioni G. et al. "Role of the RsaL quorum sensing regulator in *Pseudomonas aeruginosa* pathogenic potential" Pseudomonas XII Conference, August 3-17, Hannover, Germany
- Rampioni G. et al. "The RsaL quorum sensing regulator controls surface motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*" Eurobiofilms, Rome, 2-5 September 2009
- Longo F. et al. "Picking up *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing regulators" 28th National Meeting Società Italiana di Microbiologia generale e Biotecnologie microbiche, Spoleto, June 11-13, 2009
- Massai F. et al. "Development and validation of screening systems for the identification of *Pseudomonas aeruginosa* virulence inhibitors" 28th National Meeting Società Italiana di Microbiologia generale e Biotecnologie microbiche, Spoleto, June 11-13, 2009

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
- Bergamini G. et al. "Effects of Azithromycin (AZM) on Glutathione-S-Transferases (GST)s in cystic fibrosis airways cells" Am J Respir Cell Mol Biol, 2009 Aug;41(2):199-206

Abstracts

- Cigana C. et al. "Azithromycin reduces tumour necrosis factor alpha expression in CF airway epithelial cells" The 20th Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Denver, Colorado, Nov. 2-5, 2006
- Bergamini G. et al. "Azithromycin (AZM) decreases Glutathione-S-Transferase (GST)-T1 expression and activity in CF airway epithelial cells" 30th European Cystic Fibrosis Conference, Belek, Turkey, 13-16 June 2007
- Cigana C. et al. "Possible mechanisms of action of azithromycin in cystic fibrosis" 15th ERS Annual Congress. Copenhagen, Denmark – September 17-21 2005.
- Cigana C. et al. "Anti-inflammatory effects of azithromycin in cystic fibrosis airway epithelial cells" 16th European Congress of Immunology. Paris, 6-9 September 2006.
- Cigana C. et al. "Reduction of tumour necrosis factor alpha (TNF α) expression by azithromycin (AZM) in CF airway epithelial cells" Journal of Cystic Fibrosis, 29th European Cystic Fibrosis Conference. Copenhagen, 15-18 June 2006.
- Nicolis E. et al. "Analisi della ripetizione GCC nel promotore del gene Multidrug Resistance-Associated Protein 1 (MRP1) in pazienti con Fibrosi Cistica (FC) 6° Congresso Nazionale S.I.G.U. Società Italiana di Genetica Umana – Verona 24 – 27 settembre 2003;
- Cigana C. et al. "Differential expression of the multidrug resistance-associated protein 1 in isogenic CF and non-CF human bronchial epithelial cells" Journal of Cystic Fibrosis 3 (2004) S4-S9 27th European CF Conference. Birmingham, UK 12 – 17 June 2004
- Pasetto M. et al. "Inhibitory effects of azithromycin on interleukin 8 expression by CF airway epithelial cells" Journal of Cystic Fibrosis 3 (2004) S20-S25 27th European CF Conference. Birmingham, UK 12 – 17 June 2004
- Pasetto M. et al. "Inhibitory effects of azithromycin on interleukin 8 production by Cystic Fibrosis airway epithelial cells" Paediatric Pulmonology – The 18th annual North American CF Conference – America's Center, St. Louis, Missouri, October 14-17, 2004;
- Cigana C. et al. "ATP binding cassette proteins: differential expression in isogenic cystic fibrosis and non-cystic fibrosis human bronchial epithelial cell lines" 7° Congresso Nazionale S.I.G.U. – Pisa 13 – 15 Ottobre 2004;
- Nicolis E. et al. "Is the GCC repeat polymorphic length in the Multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1) gene relevant for regulating transcriptional activity constitutively and in response to azithromycin (AZM)?" 28th European CF Conference - Crete, Greece: 22-25 June 2005;
- Cigana C. et al. "Azithromycin (AZM) inhibits Nuclear Factor-kB (NF-kB) activity and expression of interleukin 8 (IL8) in CF airway epithelial cells" Journal of Cystic Fibrosis 4 (2005) S26-S33; 28th European CF Conference - Crete, Greece: 22-25 June 2005;
- Cigana C. et al. "Effects of macrolides on interleukin 8 expression in cystic fibrosis airway epithelial cells" 4th National Conference SIICA; Brescia – June 8-11 2005;
- Cigana C. et al. "Regulation of pro-inflammatory transcription factors by azithromycin in Cystic Fibrosis airway epithelial cells" 2005 North American Cystic Fibrosis Conference – Baltimore, Maryland October 20-23 2005;
- Nicolis E. et al. "Meccanismi non antibiotici dell'Azitromicina: rilevanza per la terapia della fibrosi cistica" X Congresso Nazionale di Fibrosi Cistica – Palermo, 27-30 ottobre 2004
- Cigana C. et al. "Possible mechanisms of action of Azithromycin in cystic fibrosis" ERSNET, 2005
- Melotti P. "Detection of bacterial secretion variations among *Pseudomonas aeruginosa* strains by multidimensional protein identification technology" Rediscovering Biomarkers, San Diego, July 23-24 2007
- Bergamini G. et al. "Azithromycin (AZM) decreases Glutathione-S-Transferase (GST)-T1 and M1 (GSTM1) expression and activity in CF airway epithelial cells" North American Cystic Fibrosis Conference, Anaheim, California, 3-6 Oct. 2007
- Cigana C. et al. "Relevance of oxygen limitation on *Pseudomonas aeruginosa* strains: effects on released proteins expression" North American Cystic Fibrosis Conference, Anaheim, California, 3-6 Oct. 2007
- Cigana C. et al. "Mudpit analysis of *Pseudomonas aeruginosa* secretome: consequences of oxygen limitation in clinical and laboratory strains" 13th Italian Cystic Fibrosis Conference, Milan, 30 Nov. – 2 Dec. 2007, J. Cyst Fibrosis 2008; 7, suppl. 3: S16
- Cigana C. et al. "Proteins released from *Pseudomonas aeruginosa* (PA) referent and clinical strains under microaerobiosis and their effects on cystic fibrosis airways" 31st European CF Conference, Prague, June 11-14 2008

- FFC Project# 7/2003 **"Proteomics of the airway surface liquid: implications for cystic fibrosis"**

Olga Zegarra Moran (Lab. Gen. Molec. - Ist. Gaslini – Genova), Giovanni Candiano (Lab. Nefrologia - Ist. "G. Gaslini" – Genova), Luca Bini (Dipart. Biologia Molecolare - Univ. Siena)

Publications

- Candiano G. et al. "Gelsolin secretion in interleukin 4 treated bronchial epithelia and in asthmatic airways" Am J Respir Crit Care Med. 2005; Vol 172 pp 1-7
- Candiano G. et al. "Proteomic analysis of the airway surface liquid: modulation by proinflammatory cytokines" Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2007 Jan;292(1):L185-98

- FFC Project# 14/2004 **"Interaction in vitro between CF pathogens and epithelial cells expressing the CF transmembrane conductance regulator (CFTR)"**

Maria Cristina Dechechci (Lab. Patologia Molecolare - Centro FC – Ospedale Civile Maggiore – Verona)

Abstracts

- Dechechci 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
- Dechechci 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;
- Dechechci M.C. et al. "Increased *Pseudomonas aeruginosa* induced inflammatory response in epithelial cells expressing mutated CFTR" Journal of Cystic Fibrosis 4 (2005) S17-S25; 28th European CF Conference, Heronissos, Crete, Greece; 22-25 June 2005
- Dechechci M.C. et al. "The inflammatory response of CF airway cells to *Pseudomonas aeruginosa* is reduced by benzo(c)quinolizinium compound MPB-07" Congresso NAFC 2006;

- FFC Project# 15/2004 **"Novel diagnostic and therapeutic approaches for CF"**

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

Publications

- Bezzieri V. et al. "Transcription factor oligodeoxynucleotides to NF-kB Inhibit Transcription of IL-8 in Bronchial Cells" Am J Respir Cell Mol Biol. 2008 Jul;39(1):86-96
- Borgatti M. et al. "Induction of IL-6 gene expression in a CF bronchial epithelial cell line by *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on transcription factors belonging to the Sp1 superfamily" BBRC 357 (2007) pp. 977-983.

- Piccagli L. et al. "Doking of molecules identified in bioactive medicinal plants extract into the p50 NF-kappaB transcription factor: correlation with inhibition of NF-kappaB/DNA interactions and inhibitory effects on IL-8 gene expression" BMC Structural Biology, 2008 Sep 3;8:38

Abstracts

- Bezzetti V. et al. "Selective modulation of P. Aeruginosa dependent induction of interleukin-8 by transcription factor decoy oligonucleotides in CF bronchial epithelial cells" XX North American CF Conference, Denver 2-4 Nov. 2006

- FFC Project# 16/2004 **"Nasal polyps of Cystic Fibrosis patients as an ex vivo model to study inflammation and its modulation via the inhibition of the p-38 MAP-kinase pathway: implications for therapy"**

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

Publications

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

- FFC Project# 11/2005 **"Chronic oxidative lung injury during cystic fibrosis – protective roles of gamma-glutamyltransferase and ascorbic acid"**

Alfonso Pompella (Dipart. Patologia Sperimentale, Biotec. Mediche, Infettivologia ed Epidemiologia - Univ. Pisa)

Publications

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

- FFC Project# 15/2006 **"Contribution of alterations in metal and glutathione homeostasis to the bacterial infections typical of Cystic Fibrosis and examination of the possible protective role of lactoferrin and antioxidants"**

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

Publications

- Berluti 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 cepacia" Int J Immunopathol Pharmacol., 2008 Jan-Mar;21(1):51-9

- FFC Project# 16/2006 **"Effect of correctors of defective CFTR on the Pseudomonas aeruginosa-dependent inflammatory response in respiratory epithelial cells"**

Maria Cristina Dechechi (Lab. Patologia Molecolare - Centro FC – Ospedale Civile Maggiore – Verona), Frederic Becq (Inst. De Physiologie et Biologie Cellulaires - Poitiers (France)), Roberto Gambari (Dipart. di Biochimica e Biologia Molecolare - Università di Ferrara)

Publications

- Dechechi 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,

- Dechechi M. C. et al. "Anti-inflammatory effect of miglustat in bronchial epithelial cells" Journal of Cystic Fibrosis, 7 (2008) pp. 555-565.

Abstracts

- Dechechi 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

- Dechechi 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

- Dechechi M. C. et al. "Miglustat, an inhibitor of the synthesis of glycosphingolipids, has an anti-inflammatory effect in vitro and in vivo" Pediatric pulmonology, Suppl. 31, 2008. 22nd Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Orlando, Florida, 22-25 October 2008, pp. 257-258.

- Dechechi 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.

- Dechechi 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

- Dechechi M. C. et al. "Anti-inflammatory effect in vitro and in vivo of miglustat, an inhibitor of the synthesis of glycosphingolipids" XIV Congresso italiano della fibrosi cistica – IV Congresso nazionale Sifc, Torino, 27-29 novembre 2008

- FFC Project#5/2007 **"Novel particulate systems for the delivery of an oligonucleotide decoy to Nuclear Factor-kB: a potential strategy for treating cystic fibrosis"** Fabiana Quaglia (Dipart. Chimica Tossicologica e Farmaceutica - Univ. Federico II Napoli), Rosa Carnuccio (Dip.to di Farmacologia Sperimentale, Università di Napoli Federico II)

Abstracts

- Giovino C. et al. "Large Porous Particle for lung delivery of hydrophilic macromolecules: preliminary technological studies" 49° Simposio AFI, Rimini 10-12 giugno 2009

- Giovino C. "Veicolazione polmonare di un oligonucleotide decoy contro NF-Kb per il trattamento della fibrosi cistica: progettazione e sviluppo di Large Porous Particles a base di PLGA" 8° Scuola avanzata per Dottorandi di ricerca del settore farmaceutico tecnologico applicativo, Recent advances in vesicle drug carriers, Università della Calabria, Arcavacata di Rende, 22-27 settembre 2008

- Giovino C. et al. "Design and development of microsphere-loaded drug eluting stents for the controlled release of the antirestenosis agents" AAPA Italian University Network, Fisciano, March 6-7, 2009

- De Stefano D. et al. "ODN decoy to NF-KB released from respirable PLGA large porous particles: a potential for treating cystic fibrosis?" 34° National Congress of the Italian Pharmacology Society, Rimini, October 14-17, 2009

- Giovino C. et al. "A new approach for cystic fibrosis treatment: large porous particles for local and prolonged delivery of an oligonucleotide decoy to Nuclear Factor-kB in the lung" AAPS Annual Meeting and Exposition, Los Angeles, California, November 8-12, 2009

- FFC Project# 13/2007 **"A gene-targeted anti-inflammatory approach based on the Transcription Factor "decoy" strategy"**

Giulio Cabrini (Lab. Patologia Molecolare - Centro FC – Ospedale Civile Maggiore – Verona), Roberto Gambari (Dipart. di Biochimica e Biologia Molecolare - Università di Ferrara)

Publications

- Bezzetti V. et al. "Transcription Factor Oligodeoxynucleotides to NF-kB Inhibit Transcription of IL-8 in Bronchial Cells" Am J Respir Cell Mol Biol. 2008 Jul;39(1):86-96

- Nicolis E. et al. "Pyrogallol, an active compound from the medicinal plant Emblica officinalis, regulates expression of pro-inflammatory genes in bronchial epithelial cells" Int Immunopharmacol. 2008 Dec 10;8(12):1672-80

- Piccagli L. et al. "Doking of molecules identified in bioactive medicinal plants extract into the p50 NF-kappaB transcription factor: correlation with inhibition of NF-kappaB/DNA interactions and inhibitory effects on IL-8 gene expression" BMC Structural Biology, 2008 Sep 3;8:38

Abstracts

- Bezzetti V. et al. "Transcription factor (TF) decoy strategy to silence expression of pro-inflammatory genes in cystic fibrosis (CF) bronchial epithelial cell line" 2nd European CF Young Investigator Meeting, 2008, Lille, France
- Cabrini G. et al. "Decoy" molecules for nuclear transcription factors and regulation of expression of proinflammatory genes" 13th Italian Cystic Fibrosis Conference, Milan, 30 Nov. - 2 Dec. 2007, J. Cyst Fibrosis 2008; 7, suppl. 3: pp. S18.
- Nicolis E. et al. "Isolation of active anti-inflammatory compounds from medicinal plant extracts" Pediatric pulmunology, Suppl. 31, 2008. 22nd Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Orlando, Florida, 22-25 October 2008, p. 259.
- Tamanini A. et al. "Effect of furocoumarin derivatives on *P. aeruginosa*-dependent pro-inflammatory response in bronchial epithelial cells" Pediatric pulmunology, Suppl. 31, 2008. 22nd Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Orlando, Florida, 22-25 October 2008, pp. 260-261.
- Nicolis E. et al. "Does anti-inflammatory treatment have any effect on PAO1 dependent induction of the antimicrobial genes?" Pediatric pulmunology, Suppl. 31, 2008. 22nd Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Orlando, Florida, 22-25 October 2008, pp. 261-262.
- Piccagli L. et al. "Anti-inflammatory molecules obtained from virtual screening of a furocoumarin database against NF-kB" 23rd Annual North American Cystic Fibrosis Congress, Minneapolis, Minnesota, 15-17 October 2009.
- Nicolis E. et al. "Nigella arvensis extract inhibits the induction of IL-8 gene in bronchial epithelial cells" 23rd Annual North American Cystic Fibrosis Congress, Minneapolis, Minnesota, 15-17 October 2009.
- Tamanini A. et al. "Combined effects of furocoumarin compounds as anti-inflammatory and CFTR potentiation in CALU-3 epithelial cells" 23rd Annual North American Cystic Fibrosis Congress, Minneapolis, Minnesota, 15-17 October 2009.
- FFC Project#12/2008 **"Anti-inflammatory effect of miglustat: sphingolipid ceramide metabolism as a therapeutic target for CF lung disease"**
Maria Cristina Dehecchi (Lab. di Patologia Molecolare, Lab. Analisi Chimico-Cliniche ed Ematologiche, Università di Verona), Roberto Gambari (Dipart. di Biochimica e Biologia Molecolare, Università di Ferrara)

Abstracts

- Dehecchi M.C. et al. "Anti-inflammatory effect of miglustat: sphingolipid metabolism as a therapeutic target for CF lung inflammation" 23rd Annual North American Cystic Fibrosis Congress, Minneapolis, Minnesota, 15-17 October 2009
- Dehecchi M.C. et al. "Lack of efficacy of dexamethasone in reducing the inflammatory response to *P. aeruginosa* in a cell line derived from bronchial epithelium of a CF patient" 23rd Annual North American Cystic Fibrosis Congress, Minneapolis, Minnesota, 15-17 October 2009

- FFC Project#13/2008 **"Pre-clinical evaluation of new vitamin E-based anti-inflammatory agents in CF"**

Francesco Galli (Dipart. Med. Interna - Sez. Bioch. Appl. e Scienze Nutrizionali - Univ. Perugia), Luigi Iuliano (Dipart. Med. Interna e vascolare - Univ. La Sapienza Roma), Claudia Bettina Schock (Queen's University Belfast, Respiratory Medicine Research Group), Gianfrancesco Goracci (Dipart. Med. Interna - Sez. Biochimica - Univ. Perugia)

Publications

- Iuliano L. et al. "Association of cholesterol oxidation and abnormalities in fatty acid metabolism in cystic fibrosis" Am J Clin Nutr, July, 2009 Sep;90(3):477-84, doi:10.3945/ajcn.2009.27757

- FFC Project#14/2008 **"Infections in cystic fibrosis: role of the long pentraxin PTX3 in host resistance and as therapeutic agent"**

Cecilia Garlanda (Fondazione Humanitas per la Ricerca, Rozzano, Milano), Alessandra Bragonzi (Divisione di Immunologia, Trapianti e Malattie infettive - Istituto San Raffaele, Milano)

Publications

- Bragonzi A. et al. "Pseudomonas aeruginosa microevolution during cystic fibrosis lung infection establishes clones with adapted virulence" 2009 Jul 15; 180 (2): 138-45
- Moalli F. et al. "Role of Complement and FcγR in the protective activity of the long pentraxin PTX3 against *Aspergillus fumigatus*" Submitted.

5. RICERCA CLINICA ED EPIDEMIOLOGICA

Epidemiology & Clinical Research

- FFC Project 2005 **"Infection Control"**

Roberto Buzzetti (Fondazione per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica)

Publications

- Buzzetti R. et al. "Controllo e prevenzione delle infezioni respiratorie nel paziente affetto da fibrosi cistica" Edit. Fondazione per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica. Verona, 2005
- Festini F. et al. "Isolation measures for prevention of infection with respiratory pathogens in cystic fibrosis: a systematic review" Journal of Hospital Infection (2006) 64, 1-6

- FFC Project 2006 **"The CAIRO Project" (Analysis and review of the international scientific literature from the CF registries)**

Roberto Buzzetti (Fondazione per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica), Donatello Salvatore (U. O. Pediatria, Azienda Ospedaliera San Carlo, Potenza)

Publications

- Buzzetti R. et al. "An overview of international literature from cystic fibrosis registries: 1. Mortality and survival studies in cystic fibrosis", Journal of Cystic Fibrosis 8 (2009) 229-237
- Salvatore D. et al. "An overview of international literature from cystic fibrosis registries: 2. Newborn screening and nutrition/growth. Jurnal of Cystic Fibrosis. 2009 (in press)

Abstracts

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

- FFC Project#18/2004 **"Early eradication of *P. aeruginosa* and subsequent colonization in cystic fibrosis patients"**

Giovanni Taccetti (Dipart. di Pediatria, Centro Regionale FC, Azienda Ospedaliera Universitaria Meyer)

Publications

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

- FFC Project# 19/2004 **"Quality control and update of follow-up data in the Italian cystic fibrosis registry: a starting point for the analysis of clinical data and the dissemination of results"**

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

Abstracts

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

settembre - 1 ottobre 2005;

- FFC Project#16/2005 **“Diabetes, glucose intolerance and hypoglycemia in Cystic Fibrosis”**

Carla Colombo (Dipart. Pediatria - Centro FC - Fond. IRCCS Osp. Maggiore Polic. Mangiagalli e Regina Elena - Milano), Alberto 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" Pediatric pulmonology, Suppl. 31, 2008. 22nd Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Orlando, Florida, 22-25 October 2008, p. 344-345

- FFC Project#19/2006 **“Prolonging the duration on site of short peripheral venous catheters used to administer intravenous antibiotic courses in adult subjects with cystic fibrosis. a randomized controlled trial to evaluate the effect of different concentrations of antibiotic in normal saline solution”**

Filippo Festini (Dipart. Pediatria - Centro FC Ospedale Meyer- Firenze)

Abstracts

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

- FFC Project#20/2006 **“Prevention of pulmonary exacerbations in children with Cystic Fibrosis, through the modification of intestinal microflora”**

Alfredo Guarino (Dipart. Pediatria - Univ. Federico II Napoli), Carla Colombo (Dipart. Pediatria - Centro FC - Fond. IRCCS Osp. Maggiore Polic. Mangiagalli e Regina Elena - Milano), Lorenzo Morelli (Tecnologie analitiche ed avanzate - Univ. Piacenza)

Publications

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

Abstracts

- Guarino A. et al. "Probiotics in cystic fibrosis: help from old friends" Pediatric pulmonology, Suppl. 31, 2008. 22nd Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Orlando, Florida, 22-25 October 2008, pp. 130-131.

- FFC Project#17/2007 **“Early antibiotic treatment in Ps aeruginosa eradication”**

Giovanni Taccetti (Centro Reg. Toscano FC – Osp. Meyer Firenze), Cariani L. (Lab. Microbiol., Centro Reg. F.C. – Milano)

Abstracts

- Taccetti G. et al. "Early antibiotic treatment for Pseudomonas aeruginosa eradication in cystic fibrosis patients: a randomised multicenter study of two different protocols" 23rd Annual North American Cystic Fibrosis Congress, Minneapolis, Minnesota, 15-17 October 2009.

- FFC Project#16/2008 **“A prospective study about complications of totally implantable central venous access ports in people with CF”**

Alberto Dal Molin (Ospedale Meyer - Dip.to Pediatria, Firenze), Cesare Braggion (Dip. Pediatria - Osp. Meyer – Firenze), Maria Lucia Furnari (Centro Reg. FC - Ospedale dei Bambini – Palermo), Vincenzina Lucidi (Servizio di Supporto FC Ospedale Bambin Gesù – Roma), Elena Rizzi (Centro Reg. FC – Verona), Pietro Cialdella (Centro Reg. FC – Cerignola)

Publications

Dal Molin A. et al. "Management of totally implantable vascular access devices in patients with cystic fibrosis" Minerva Pediatr. 2009 Oct; 61(5):549-55

Abstracts

Dal Molin A. et al. "National cohort study about complications of totally implantable central venous access ports in Italian people with CF: preliminary results" 23rd Annual North American Cystic Fibrosis Congress, Minneapolis, Minnesota, 15-17 October 2009.

INSTITUTES AND LABORATORIES INVOLVED IN THE 140 PROJECTS FUNDED BY ITALIAN CF RESEARCH FOUNDATION 2002-2009

Istituti e Laboratori attivi nei 140 progetti finanziati da FFC dal 2002 al 2009

ABRUZZO

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

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 Tossicologica e Farmaceutica, Univ. Federico II, Napoli
- Dip. Farmacologia Sperimentale, Napoli
- Dip. Chimica e Biochimica organica, Univ. Federico II, Napoli

EMILIA ROMAGNA

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

FRIULI VENEZIA GIULIA

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

LAZIO

- Dip. Biologia Cellulare e dello Sviluppo - Università La Sapienza, Roma
- Dip. di Biopatologia e Diagnostica per Immagini - Università Tor Vergata, Roma
- Dip. di Biologia - Università Tor Vergata, Roma
- Dip. Biotecnologie Cellulari ed Ematologia - Università La Sapienza, Roma
- Istituto di Clinica Pediatrica, Centro Regionale FC - Università Roma 1, Roma
- Dip. di Fisiopatologia Medica - Università La Sapienza, Roma
- Dip. di Biotecnologie, protezione della salute e degli ecosistemi - ENEA Casaccia, S. Maria di Galeria, Roma
- Lab. di Microbiologia-Ospedale Bambin Gesù-Roma
- Lab. Microbiologia Molecolare - Università La Sapienza, Roma
- Istituto di Microbiologia - Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma
- Dip. Microbiologia - Università di Roma 3, Roma
- Dip. Salute Pubblica e biologia cellulare - Università Tor Vergata, Roma
- Dip. Neuroscienze Sperimentali, Fondazione S. Lucia, Roma
- Dip. Scienze di Sanità Pubblica - Univ. "La Sapienza", Roma
- Dip. di Medicina interna e vascolare - Univ. "La Sapienza", Roma
- Lab. di Microbiologia Ospedale Pediatrico Bambin Gesù, Roma
- Serv. Supporto FC, Osp. Bambin Gesù, Roma
- Lab. Microbiologia Molecolare e Biotecnologia dei Microrganismi, Dip. Biologia, "Università Roma Tre"
- Lab. Microbiologia Clinica e Virologia, Dipartimento di Biologia, "Università Roma Tre", Roma;
- Dip. Scienze Biochimiche - Università "La Sapienza", Roma

LIGURIA

- Istituto di Biofisica - CNR, Genova
- Dip. di Scienze Farmaceutiche - Università di Genova, Genova
- **Lab. di Fisiopatologia dell'Uremia - Istituto G. Gaslini, Genova**
 - Lab. Genetica umana E.O. Ospedali Galliera, Genova
 - Lab. Genetica Molecolare - Istituto G. Gaslini, Genova
 - Lab. Medicina Molecolare - Istituto G. Gaslini, Genova
- **Lab. Centrale Analisi - Istituto G. Gaslini, Genova**
 - Sezione Microbiologia - DISCAT, Genova
 - ARPAL (Agenzia Reg. Protezione Ambiente Ligure), Genova
 - Lab. Diagnostica e Ricerca Malattie Infettive, Dip. Pediatria - Istituto G. Gaslini, (GE)
 - Dip. Pediatria - Lab. Microbiologia - Istituto G. Gaslini, Genova
 - Dip. Pediatria - Centro Fibrosi Cistica - Istituto G. Gaslini, Genova
 - Sezione di Epidemiologia e Biostatistica, Istituto G. Gaslini, Genova
 - Dip. Medicina Sperimentale - Istituto G. Gaslini, Genova
 - Dip. Medicina Sperimentale - Università degli Studi di Genova
 - Lab. Fisiopatologia molecolare dei canali ionici - Centro Biotecnologie Avanzate, Genova

LOMBARDIA

- Istituto Statistica e Biometria - Università di Milano, Milano
- Istituto per il Trattamento Sperimentale della Fibrosi Cistica - Osp. S. Raffaele, (MI)
- Dip. Medicina Specialistica e dei Trapianti - Ospedali Riuniti, Bergamo
- Dip. Immunologia e Clinica dei Trapianti - Ospedali Riuniti, Bergamo
- Lab. di Genetica Medica A. O. Istituti Clinici di Perfezionamento, Milano
- Dip. di Scienze Biomolecolari e Biotecnologie - Università degli Studi di Milano
- Dip. di Genetica e Microbiologia - Università di Pavia, Pavia
- Dip. di Pediatria, Centro Fibrosi Cistica - Fondazione IRCCS, Policlinico Mangiagalli e Regina Elena, Milano
- Lab. di Microbiologia, Centro Fibrosi Cistica, Milano
- Unità di Genomica per Diagnosi di Patologie Umane - Fond. Centro San Raffaele, (MI)
- Istituto per le Tecnologie Biomediche, CNR, Segrate (MI)
- Lab. di Ricerca Clinica - Istituto per la Ricerca Farmacologica "M. Negri", Milano
- Dip. Chimica Organica ed Industriale, Milano
- Dip. Scienze Molecolari Agroalimentari, Milano
- Dip. Biotecnologie e Bioscienze - Università Bicocca, Milano
- Fondazione Humanitas per la ricerca, Rozzano (Milano)
- Div. Immunologia, Trapianti e Malattie infettive - Istituto "San Raffaele", Milano

MARCHE

- Centro Fibrosi Cistica - Ospedale dei Bambini - Centro FC, Ancona

PIEMONTE

- Centro FC Adulti Divisione Malattie Respiratorie, Dip. di Scienze Biologiche e Cliniche - Università di Torino, Ospedale S. Luigi Gonzaga, Orbassano (TO)
- Dip. di Genetica, Biologia e Biochimica - Università di Torino, Torino
- Dip. di Patologia Clinica, S.S. di Diagnostica Molecolare e Test Genetici Integrati, Torino
- Dip. Discipline medico chirurgiche, Sez. Anestesia e rianimazione, Univ. Torino
- Dip. di Scienza e Tecnologia del Farmaco, Università di Torino
- Dip. di Scienze cliniche e biologiche, Università di Torino
- Centro di biotecnologia molecolare, Università di Torino

PUGLIA

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

SARDEGNA

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

SICILIA

- Istituto di Biofisica - CNR, Palermo
- Centro Fibrosi Cistica - Policlinico, Messina,
- Centro Regionale FC-Ospedale dei Bambini "G. di Cristina", Palermo
- Istituto per lo Studio dei Materiali Nanostrutturati, CNR, Palermo

TOSCANA

- Dip. di Biologia Animale e Genetica-Università di Firenze, Firenze
- Lab. di Proteomica Funzionale, Dip. di Biologia Molecolare - Università di Pisa (PI)
- Dip. di Pediatria - Centro Fibrosi Cistica - Ospedale Meyer, Firenze
- Servizio Fibrosi Cistica - Ospedale di Livorno, Livorno
- Dip. Patologia Sperimentale, Biotecnologie Mediche, Infettivologia ed Epidemiologia - Università di Pisa, Pisa
- Unità Bioinformatica, Centro di Ricerche Chiron, Siena
- Lab. Fisiologia Microbica e Biotecnologia, Dip. Biologia Molecolare, Policlinico "Santa Maria alle Scotte", Siena
- Dipartimento Diagnostica di Laboratorio Servizio di Diagnostica Genetica- Azienda Ospedaliero Universitaria Careggi, Firenze
- Dip. Biologia Molecolare, Sez. Chimica Biologica - Università di Siena

UMBRIA

- Dipart. Med. Interna - Sez. Bioch. Appl. e Scienze Nutrizionali - Univ. Perugia
- Dipart. Med. Interna - Sez. Biochimica - Univ. Perugia



VENETO

- Medicina Interna-Università di Verona, Verona
- Istituto Veneto Medicina Molecolare, Padova
- Servizio Clinico di Genetica e Screening neonatale - Centro Fibrosi Cistica, Verona
- Dip. di Patologia, Sezione immunologia-Università di Verona, Verona
- Sezione di Anatomia ed Istologia, Dip. di Scienze Morfologico - Biomediche - Università di Verona, Verona
- Lab. Patologia Molecolare - Azienda ospedaliera, Verona
- Dip. Materno Infantile, Biologia Genetica - Università di Verona, Verona
- Dip. Scienze Biomediche e Chirurgiche, Divisione di Nefrologia - Università di Verona, Verona
- Dip. di Patologia - Patologia Generale - Università di Verona, Verona
- Lab. di Microbiologia,Istituti Ospitalieri, Verona
- Facoltà di Scienze della Formazione - Università di Verona, Verona
- Dip. Scienza e Tecnologia del Farmaco - Università di Verona, Verona
- Dip. Scienze Farmaceutiche, Padova
- Dip. Chimica Biologica, Padova
- Dip. Scienze Neuropediatriche e della Visione - Università di Verona

BELGIUM

- Department of Clinical Chemistry, Catholic University of Louvain – St. Luc University Hospital, Lourain
- Lab. of Molecular Bacteriology ULB, Faculty of Medecine, Bruxelles

CANADA

- Department of Microbiology and Immunology, University of Western Ontario

FRANCE

- Institut de Cell Physiology and Biology, University of Poitiers

GERMANY

- Institute of Medical Microbiology and Hygiene, University of Tübingen

IRELAND

- Queen's University Belfast, Respiratory Medicine Research Group

UNITED KINGDOM

- Department of Respiratory Medicine, Freeman Hospital, The Medical School University of Newcastle

SWITZERLAND

- Department of Pediatrics, University Hospital and Faculty of Medicine, Geneva

INTERNATIONAL REVIEWERS WHO COLLABORATED WITH THE ITALIAN CF RESEARCH FOUNDATION FOR THE EVALUATION OF THE RESEARCH PROJECTS (2002-2009)

Referees internazionali che hanno collaborato con FFC per la valutazione dei progetti di ricerca (2002-2009)

Attraverso bandi annuali di concorso pubblico, sono pervenuti alla Fondazione, dal 2002 al 2009, 313 progetti di ricerca CF, tra i quali 140 sono stati selezionati per un finanziamento. 189 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 189 international experts that cooperated with FFC to review and to evaluate the grant proposals. Through annual public announcements issued between 2002 and 2009, the Italian CF Research Foundation received 313 grant proposals. Among those 140 have been selected for funding. One hundred and eighty nine 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

Israele

Kerem Batsheva

AUSTRALIA

Scott Bell
Manohar Garg
Timothy Kidd
John Mattick
Cynthia Whitchurch

EUROPE

Belgium

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

Denmark

Niels Hojby
Marie Johannesson
Christian Koch

France

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

Juliet Royet

Germany

Robert Bals
Michael De Vrese
Jahn Dieter
Gerd Döring
Hans Peter Fischer
Christoph Freiberg
Fritz Götz
Matthias Griese
Erick Gulbins
Dominik Hartl
Jürgen Heesemann
Karl Kunzelmann
Hermann Schillers
Ursula Seidler
Gratiana Steinkamp
Burkhard Tuemmler

Italy

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

Portugal

Margarida Amaral
Jorge Leitão

Spain

Raquel Barrio
Jaume Bertranpetti
Xavier Estivill

Sweden

Ute Romling
Birgitta Strandvik

Switzerland

Leo Eberl
Dieter Haas
Bernard Rossier

The Netherlands

Lidewij Henneman
Peter Klijn
Daan Touw
Bernt Van Den Blink

U.K.

Matthew Avison
James Birchall
Marina Botto
Andrew Bush
Philip Calder
Steven Conway
Jane Davies
Robert Dorner
Alistair Duff
Madeleine Ennis
Glenda Esmond
Alain Filloux
Andrew Fisher
Claire Glasscoe
John Govan
Michael Gray
Andrew Greening
Uta Giesenbach
Maurice Hallett
Andrew Jones
Julian Parkhill
Tyrone Pitt
Martin Savage
David Sheppard
Maurice Super
John Widdicombe

NORTH AMERICA

Canada

André Cantin
Tom Clandinin
Peter Durie
Hartmut Grasemann
Bob Hancock
Sheila Innis
Roger Levesque

Paul Linsdell	Diane Krause	Justin Hanes	James Chmiel
Mingyao Liu	Florida	Sam Lai	Mitchell Drumm
Gergely Lukacs	Alexander Cole	Gary Mansfield	Dana S. Hardin
Robert Newton	Alexandra Quittner	Jonathan Orens	Daniel Hassett
Paul Pencharz	Arlan L. Rosenbloom	Harvey Pollard	Scott Harness
Felix Ratjen		Pamela Zeitlin	Lloyd Horrocks
Andrew Sandfor			Christopher Karp
Molly Schmid	Illinois		Michael Konstan
Aaron Shawn	John Christman	Massachusetts	
Pamela A. Sokol	Ann Harris	Steven Freedman	
David Speert	Lee P. Shulman	Roberto Kolter	
Herman Yeger	Jerrold Turner	Brady Joyce Marty	
Julian Zielensky		John Ladis	
Miguel A. Valvano	Indiana	Stephen Lory	
	Roman Dziarski	Gerald Pier	
	Won Kyoo Cho	Charles Serhan	
U.S.A. 			
Alabama	Iowa	Missouri	Texas
Lisa Schwiebert	Dwight Look	Carolyn Cannon	Philip Thomas
Bakhrom K. Berdiev	Joseph Zabner		
California	Kansas	Minnesota	Utah
Carroll Cross	John Gatti	Antoinette Moran	Valerie Hudson
Ronald Kopito			
Terry Machen	Kentucky	New York	Virginia
Richard Moss	Stefan Stamm	David Goldfarb	Joanna Goldberg
Malla M. Reddy	Joseph Zwischenberger	Alice Prince	
Alan Verkman		Lisa Saiman	
Jeffrey Wine	Louisiana	Stefan Worgall	
	Guoshun Wang	Isabel Aznarez	
Colorado	Maine	North Carolina	Washington
Frank Accurso	Robert Owens	Richard Boucher	Moira Aitken
Brian Doctor		Andrew Ghio	Jane Burns
Jerry A. Nick	Maryland	Michael Knowles	E. Peter Greenberg
Herbert Schweizer	Michael Boyle	John Riordan	Matt Parsek
	Gary Cutting		Margaret Rosenfeld
Connecticut	William Guggino	Ohio	
		Melvin Berger	
		Wisconsin	SOUTH AMERICA
		Philip Farrel	
		Costa Rica 	
		Arthur Solis	

FFC PROJECTS 2007-2009 ADOPTED BY DONORS

Progetti FFC 2007-2009 adottati dai donatori

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)

LOIFUR



ASSOCIAZIONE SERGIO VALENTE

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
Lega Italiana FC



FFC #4/2007

Ruolo della proteinchinasi CK2 nella patogenesi della fibrosi 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-κB: 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
(Univ. 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: Vicieni Biscotti Spa S. Giovanni Lupatoto (€ 8.000), Ferretti Yacht (€15.000), Man Nutzfahrzeuge Vertrieb Sud Ag (€7.000), Associazione Volontari Contro la Fibrosi Cistica Messina (€ 8.000), Delegazione FFC di Rovigo (€ 6.000)



FERRETTI



Delegazioni

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), Del. FFC di Bologna (€ 23.000)



GVS



Delegazioni

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: Delegaz. 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#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, Ass. Veneta Onlus



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



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 #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 Srl



FFC #17/2007

Trattamento antibiotico precoce per l'eradicazione di Pseudomonas 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 #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 #20/2007

Valutazione di mutazioni che causano malattia in unità co-transcrizionali di splicing del gene CFTR: aspetti diagnostici e terapeutici

Responsabile: Franco Pagani (I.C.G.E.B. - Trieste)
Costo: € 78.000

Adottato totalmente da: GVS Spa Zola Predosa (€ 10.000), Delegazione FFC di Bologna (€ 34.000), Delegazione FFC di Ferrara (€ 34.000)



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 -



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 #5/2008

Fattibilità di un programma di screening per l'identificazione preconcezionale di portatori di Fibrosi Cistica nella popolazione sarda

Responsabile: Maria Cristina Rosatelli Lab. Genetica Molecolare - Dip. Scienze Biomediche e Biotecn. - Università di Cagliari)

Costo: € 60.000

Adottato totalmente da: C.M.A.E. Club Milanese Automotoveicoli d'Epoca con Dompè Farmaceutici (€ 10.800), Net Srl (€ 19.500), Sky Italia srl (€ 29.700)



FFC #6/2008

Disegno di antibiotici non-convenzionali contro i patogeni correlati alla fibrosi cistica

Responsabile: Giovanni Bertoni (Università di Milano - Dip.to Scienze Biomolecolari e 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:

Lega Italiana FC Associazione Siciliana Onlus



Adottato totalmente da:

Studio Palladio 2000 - Sandrigo VI

FFC#12/2008

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

Responsabile: Maria Cristina Dechechchi
(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)

Associazione Amici di Don Lucio

ASSOCIAZIONE SERGIO VALENTE



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 totalmente da: Delegazione FFC di Vittoria-Ragusa, Delegazione FFC di Catania e Gruppo di Sostegno di Paternò - CT (€ 20.000), Delegazione FFC di Latina (€ 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-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 FC di Ferrara con Aziende di Ferrara e Bologna *, Gruppo di Sostegno di Comacchio e Delegazione 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

Associazione Amici di Don Lucio

ASSOCIAZIONE SERGIO VALENTE



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#15/2008

Effetti dell'Azitromicina (AZM) sull'infiammazione cronica indotta da *Pseudomonas aeruginosa* in fibrosi cistica

Responsabile: Teresinha Leal (Dip.to di Chimica Clinica - St. Luc University Hospital – Université Catholique de Louvain - Brussels)

Costo: € 55.000

Adottato totalmente da:

"Amici per la Ricerca" (€ 20.000),

Loifur srl (€ 9.000), Medusa Film (€ 26.000)



LOIFUR

FFC #16/2008

Studio osservazionale sulle complicanze degli accessi venosi centrali totalmente impiantabili, 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 di Belluno con lascito della Sig.ra Pia Antonia de Martin Fabbro in memoria del nipote Franco Zandorella



"Giannina Gaslini" - Genova)

Costo: € 125.000

Adottato totalmente da:

Delegazione FFC di Vicenza

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 totalmente da:

Delegazione FFC La Bottega delle Donne Montebelluna TV (€ 40.000), Delegazione FFC di Foggia (€ 8.000), Marzio Bruseghin, Alessandro Da Re e gli amici e i ragazzi del Grest di Valmareno Daniela Salton (€ 8.300), 40° compleanno Tiziana Lazzarin (€ 8.326), Antonio Guadagnin e Figlio di Montebelluna (€ 8.000), Latteria Montello SpA (€ 8.000), Delegazione FFC del Lago di Garda (€ 15.000), Donatori SMS Solidale 2008 con il supporto di Vodafone, Tim, Telecom Italia, Wind, Italia "3" (€ 53.077), Bartolo Bonavoglia Group (€ 8.000), Delegazione FFC di Villa d'Almè Bergamo (€ 11.700), Delegazione FFC di Avellino (€ 8.000), Associazione VisVitae (€ 26.080)

FFC #1/2009

Interazione proteina-proteina nella fibrosi cistica: ruolo di NHERF1 nell'organizzazione citoscheletrica e nella patofisiologia delle giunzioni strette.

Responsabile: Valeria Casavola

(Dip. di Fisiologia generale ed ambientale, Università degli Studi di Bari)

Costo: € 50.000

Adottato parzialmente da:

Delegazione FFC della Valdadige (€ 10.000), Nicola Petrucci e Delegazione FFC di Molfetta (€ 8.000)

Adottabile parzialmente per € 32.000

FFC #2/2009

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

Responsabile: J. Luis V. Galietta

(Laboratorio di Genetica Molecolare Istituto

FFC#3/2009

Dissezione mediante silenziamento genico mediato da RNA dei meccanismi molecolari che determinano il difetto di maturazione di F508del-CFTR

Responsabile: Nicoletta Pedemonte (Laboratorio Fisiopatologia Molecolare delle Catene Ioniche – Centro Biotecnologie Avanzate – Genova)

Costo: € 50.000

Adottato parzialmente da: Anna Iacomini – Roma (€ 8.000)

Adottabile parzialmente per € 42.000

FFC#4/2009

La mutazione dellF508 di CFTR come sorgente di segnali cellulari: un nuovo concetto per spiegare alcuni aspetti della Fibrosi Cistica (Progetto di continuazione)

Responsabile: Lorenzo A. Pinna (Dipartimento Chimica Biologica – Università degli Studi di Padova)

Costo: € 30.000

Adottato parzialmente da: Loifur srl (€ 10.000)

Adottabile parzialmente per € 20.000



FFC#5/2009

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

Responsabile: Claudio Sorio (Dipartimento di Patologia Generale - Sezione Patologia generale Università degli Studi di Verona)

Costo: € 45.000

Adottato parzialmente da: Rotary Club Trentino Nord e Tomasi Gioielli (€ 40.000)

Adottabile parzialmente per € 5.000



FFC #6/2009

Visualizzazione della struttura della CFTR con tecniche di microscopia a forza atomica

Responsabile: Massimo Vassalli (Istituto di Biofisica – Consiglio nazionale delle ricerche)

Costo: € 25.000

Adottato totalmente da: Delegazione FFC del Lago di Garda



FFC #7/2009

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

Responsabile: Olga Zegarra

(Laboratorio di Genetica Molecolare – Istituto "Giannina Gaslini" - Genova)

Costo: € 50.000

Adottato totalmente da: Work in Progress Communication Srl (€ 13.000), Brooks Brothers Retail Brand Alliance Europe Srl (€ 37.000)



FFC #9/2009

Patologia molecolare del macchinario dello splicing: aspetti meccanistici ed approcci terapeutici

Responsabile: Franco Pagani (ICGEB – Trieste)

Costo: € 70.000

Adottato parzialmente da: CIV Campionato

Italiano Velocità (€ 10.283),

DediKato 2009 (€ 26.860)

Adottabile parzialmente per € 32.857



FFC #10/2009

Validazione di nuovi candidati vaccini in *Pseudomonas aeruginosa*

Responsabile: Alessandra Bragonzi (Unità di Infezione e fibrosi cistica – Divisione di Immunologia, Trapianti e Malattie infettive – Istituto San Raffaele - Milano)

Costo: € 60.000

Adottato totalmente da: Delegazione FFC di Como

Delegazioni



FFC #11/2009

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

Responsabile: Silvia Campana (Dipartimento di Pediatria - Centro regionale fibrosi cistica Azienda Ospedaliera Universitaria Meyer - Firenze)

Costo: € 50.000

Adottato totalmente da: Angelini con il brand azienda Corpotto per l'iniziativa "La Fibrosi cistica merita un occhio di riguardo"

Corpo Otto
DOPO LA LETTURA



FFC #12/2009

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

Responsabile: Renato Gennaro (Dip. di Scienze della vita – Università degli Studi di Trieste)

Costo: € 25.000

Adottato totalmente da: Delegazione FFC di Genova

Delegazioni



FFC #13/2009

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

Responsabile: Paolo Landini (Dipartimento Scienze Biomolecolari e Biotecnologia – Università degli Studi di Milano)

Costo: € 25.000

Adottato totalmente da: Delegazione FFC di Cosenza 2 con l'Agriturismo La locanda del parco (€ 8.000), Delegazione FFC di Novara in ricordo di Andrea e Annalisa (€ 17.000)

Delegazioni



FFC #14/2009

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

Responsabile: Alessandro Pini (Dip. di Biologia Molecolare – Sezione di Chimica Biologica – Università di Siena)

Costo: € 65.000

Adottato parzialmente da:

Un Natale da fiaba – Prato (€ 30.000)

Adottabile parzialmente per € 35.000

FFC#17/2009

Le strategie di evasione immune attuate da *Pseudomonas aeruginosa* nel processo di adattamento all'ospite nell'infezione cronica delle vie respiratorie in pazienti con fibrosi cistica

Responsabile: Maria Lina Bernardini (Dipartimento di Biologia Cellulare e dello Sviluppo Università "La Sapienza" Roma)

Costo: € 60.000

Adottato parzialmente da:

Antonio Guadagnin e Figlio srl (€ 8.000)

Adottabile parzialmente per € 52.000



FFC #18/2009

Regolazione trascrizionale di interleuchina-8 in cellule epiteliali respiratorie

Responsabile: Giulio Cabrini (Laboratorio Patologia Molecolare – Laboratorio Chimica Clinica ed Ematologia OCM – Azienda Ospedaliera di Verona)

Costo: € 70.000

Adottato totalmente da:

Delegazione FFC di Belluno

FFC #19/2009

Ruolo delle interazioni CFTR-connessina nel segnale di PGE2 e nella infiammazione: implicazioni per la fibrosi cistica

Responsabile: Marc Chanson (Dip. di Pediatria - Laboratorio indagini cliniche – Ospedale Universitario di Ginevra)

Costo: € 40.000

Adottato totalmente da: Delegazione FFC La Bottega delle Donne – Montebelluna TV



FFC #20/2009

Validazione genetica e farmacologica di PI3Ky come target per il trattamento dell'infiammazione delle vie aeree nella fibrosi cistica

Responsabile: Virginia De Rose (Dip. Scienze Cliniche e Biologiche – Divisione Malattie Respiratorie Università di Torino, AUO "S. Luigi")

Costo: € 80.000

Adottato totalmente da: Delegazione FFC di Torino



FFC #21/2009

Meccanismi della attività battericida nei macrofagi umani ed influenza delle mutazioni CFTR

Responsabile: Paola Del Porto (Dip. di Biologia cellulare e dello Sviluppo – Università degli Studi “La Sapienza” – Roma)

Costo: € 25.000

Adottato totalmente da: Delegazione FFC di Latina (€ 12.500), Lega Italiana FC Associazione Laziale Onlus (e 12.500)



FFC #22/2009

Origini della gamma-glutamiltransferasi del fluido polmonare e suoi effetti nella modulazione del bilancio redox, dell’infiammazione e della disfunzione respiratoria in corso di fibrosi cistica

Responsabile: Alfonso Pompella (Dip.to di Patologia sperimentale – Università degli Studi di Pisa)

Costo: € 20.000

Adottato totalmente da: Associazione Trentina FC Onlus in ricordo di Mauro Walgoi



FFC #23/2009

Modulazione dell’infiammazione intestinale ed extraintestinale in lattanti con fibrosi cistica come conseguenza di una precoce manipolazione della microflora intestinale

Responsabile: Alfredo Guarino (Dip.to di Pediatria – Università degli Studi “Federico II” Napoli)

Costo: € 30.000

Adottato totalmente da:
Lega Italiana FC Associazione Toscana Onlus (€ 15.000), For Me srl – Prato (€ 15.000)

FOR ME Srl



FFC #24/2009

Prevenzione del danno da riparazione nel trapianto di polmone in pazienti con fibrosi cistica mediante inibizione farmacologica dell’attività IL-8

Responsabile: Giuseppe Remuzzi (Dip.to Immunologia e clinica dei trapianti – Ospedali Riuniti di Bergamo, Ist.Farmacologico “Mario Negri”)

Costo: € 50.000

Adottato totalmente da:
Lega Italiana FC Associazione Lucana Onlus



Progetto FFC CFaCore 2009 - 2012

Attivazione e supporto di un servizio di ricerca su modelli animali per la rete italiana di ricerca sulla fibrosi cistica

Responsabile del servizio: Dr.ssa Alessandra Bragonzi Sede del servizio: Ospedale San Raffaele, Milano

Costo: € 400.000

Adottato parzialmente da: Amici della Ricerca di Milano (€ 19.250), Star Management Srl (€ 10.000), Credito Bergamasco SpA (€ 30.000), Comitato Correggio Parma (€ 70.000), Fidenza Village Outlet (€ 10.000), Delegazione FFC Villa d’Almè Bergamo (€ 8.000). Adottabile parzialmente per € 252.750



(*) Gruppo Aziende Province di Ferrara e Bologna:

- Zagatti William 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 Siro 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 - Vicenza
- Liceo Quadri - Vicenza



*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: Eugenio Bertolotti,
Andrea Bolla,
Luigi Bozzini,
Donato Bragantini,
Sandro Caffi,
Paolo Del Debbio,
Giuseppe Ferrari,
Annamaria Giunta,
Gianni Mastella,
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

Grafica testo: Paolo Tosi

Stampato il 19 novembre 2009
Tipolitografia Artigiana
San Giovanni Lupatoto (VR)



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