



Una Ricerca sempre più vicina al Malato



**8^a CONVENTION D'AUTUNNO
DEI RICERCATORI IN FIBROSI CISTICA**
Convention of Investigators in Cystic Fibrosis

Verona, 2-4 Dicembre 2010



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

Nella foto di copertina:
Marzia, Danny, Claudia, Giuseppe, Marco, Federico:
giovani con fibrosi cistica.

Si ringrazia per l'ospitalità



VIII Italian Convention of Researchers in Cystic Fibrosis

VIII Convention d'Autunno dei Ricercatori in Fibrosi Cistica

*Verona, 2-4 dicembre 2010
Centro Convegni Banca Popolare di Verona, Via San Cosimo 10*

Work progress of projects funded by FFC 2008-2010

Presentazione dello stato di avanzamento
dei progetti finanziati dalla Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica
2008-2010

Airway Inflammation

•

Airway Infection

•

CFTR rehabilitation

•

Population screening

•

CF genetics



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

Index • Indice

Session I: Insights into airway Inflammation

■ Targets for anti-inflammatory therapy and novel strategies to control inflammation 7

Moderator: Giorgio Berton • Introduction by Cecilia Garlanda

1. De Rose V, Hirsch E, Döring G	7
Genetic and pharmacological validation of PI3K γ as a drug-target for the treatment of airway inflammation in CF (FFC Project#20/2009, in progress)	
2-3. Garlanda C, Bragonzi A	8
Infections in cystic fibrosis: role of the long pentraxin PTX3 in host resistance and as therapeutic agent (FFC Project#14/2008, completed; FFC Project#18/2010, extension)	
4-5. Dehecchi MC, Gambari R	8
– Anti-inflammatory effect of miglustat: sphingolipid ceramide metabolism as a therapeutic target for CF lung disease (FFC Project#12/2008, completed)	
– Modulation of sphingolipid metabolism as a strategy for the treatment of CF lung inflammation (FFC Project#16/2010, extension FFC Project#12/2008)	
6. Leal T, Mauri P, Sorio C	9
Effects of azithromycin (AZM) on <i>Pseudomonas aeruginosa</i> -induced chronic lung inflammation in cystic fibrosis (FFC Project#15/2008, completed)	
7. Galli F, Iuliano L, Schock CB, Goracci GF	10
Pre-clinical evaluation of new vitamin E-based anti-inflammatory agents in CF (FFC Project#13/2008, completed)	
8. Naggi A, Yates EA, Shute J	11
Identification of agents with multiple favourable activities as potential treatments for cystic fibrosis (FFC Project#20/2010, new)	
9. Gambari R, Dall'Acqua F	12
Molecular characterization of trimethylangelicin (TMA) and structurally-related compounds in CF lung disease: anti inflammatory effects and potentiation of the CFTR biological activity (FFC Project#17/2010, new)	
10. Guarino A, Braggion C, Pardo F, Morelli L	13
Modulation of intestinal and extra intestinal inflammation in infants with cystic fibrosis by early modification of intestinal micro flora (FFC Project#23/2009, in progress)	
11. Montuschi P, Lucidi V, Motta A	14
Metabolomic analysis by nuclear magnetic resonance spectroscopy as a new approach to understanding inflammation and monitoring of pharmacological therapy in children and young adults with cystic fibrosis (FFC Project#19/2010, new)	

■ Signaling in CF airways and inflammatory cells 15

Moderator: Giorgio Berton • Introduction by Giulio Cabrini

12. Cabrini G, Gambari R, Pucci P	15
Mapping IL-8 gene transcription machinery in bronchial epithelial cells (FFC Project#18/2009, in progress)	
13. Del Porto P, Ascenzi F, Quattrucci S	16
Mechanisms of bactericidal activity of human macrophages and the influence of CFTR mutations (FFC Project#21/2009, in progress)	
14. Pompella A	16
Origin of lung fluid gamma-glutamyltransferase and its effects in modulation of antioxidant balance, inflammation and CF respiratory dysfunction (FFC Project#22/2009, completed)	
15-16. Battistoni A, Berluti F	17
– Effect of glutathione and lactoferrin on redox regulation, metal homeostasis and inflammatory responses of Cystic Fibrosis bronchial cells upon infection with <i>Burkholderia cenocepacia</i> (FFC Project#11/2008, completed)	
– Evaluation of the usefulness of therapeutic approaches aiming at increasing glutathione levels in the airways of Cystic Fibrosis patients to control lung infections and bacterial-induced damage (FFC Project#15/2010, extension FFC Project#11/2008)	
17. Chanson M, Dehecchi MC	18
Role of CFTR-Connexin interaction on PGE2 signaling and inflammation: implication for cystic fibrosis (FFC Project#19/2009, in progress)	
18. Romano M, Evangelista V, Furnari ML	19
Platelet-leukocyte interactions in cystic fibrosis inflammation: a window for therapeutical opportunities (FFC Project#22/2010, new)	
19. Romani L	20
Th17 responses in cystic fibrosis: paving the way for novel anti-inflammatory strategies and immunogenetic screening (FFC Project#21/2010, new)	

■ Special interest group meeting: primary cell cultures in CF research

Leader: JV Luis Galieta

21

Session II A: Basic science of and therapeutic approaches for bacterial airway infection

■ Search of novel antimicrobial targets

Moderator: Gerd Döring • Introduction by Paolo Landini

20. Leoni L, Visca P	22
Development and validation of a novel screening system for the identification of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> virulence inhibitor (FFC Project#8/2008, completed)	
21. Visca P	23
Non-conventional strategies against <i>Pseudomonas aeruginosa</i> infection: interference with iron homeostasis and quorum sensing (FFC Project#14/2010, extension FFC Project#10/2007)	
22. Manco G, Andreacci D	24
Exploring thermo-stable quorum quenching lactonases to counteract bacterial infections in cystic fibrosis (FFC Project#10/2010, new)	
23. Landini P, Seneci P, Bernardi A, Cutruzzolà F	25
Prevention of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> biofilm formation by inhibition of cyclic-di-GMP (c-di-GMP) metabolism (FFC Project#13/2009, in progress)	
24. Pinton P	25
Calcium signal and PKC as targets of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> infection (FFC Project#12/2010, new)	
25. Bertoni G, Maiorana S	26
Design of non-conventional antibiotics against cystic fibrosis-related pathogens (FFC Project #6/2008, completed)	
26. Riccardi G	27
The role of RND transporters in <i>Burkholderia cenocepacia</i> life by microarray analysis (FFC Project#15/2009, in progress)	

Session III A: CFTR structure/function and its rehabilitation

■ Structure and pathophysiology of CFTR protein

Moderator: Antonio Cao • Introduction by Valeria Casavola

27. Casavola V, Conese M	28
Interactome in Cystic Fibrosis: role of NHERF1 in actin cytoskeleton and tight junction pathophysiology (FFC Project#1/2009, in progress)	
28-29. Luini A, Monti M	29
- 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, completed)	
- Manipulating the endoplasmic reticulum export machinery allows DF508-CFTR trafficking to the plasma membrane: a new set of potential drug targets for cystic fibrosis (FFC Project#4/2010, extension FFC Project#1/2008)	
30. Pinna LA	30
Signaling potential of the Δ508 CFTR mutation: a new paradigm to explain nonchannelopathy related aspects of cystic fibrosis (FFC Project#4/2009, completed)	
31. Vassalli M	30
Direct visualization of CFTR conformation by atomic force microscopy imaging (FFC Project#6/2009, completed)	
32. Sorio C, Melotti P, Buffelli MR	31
Functional evaluation of CFTR in blood leukocytes in human subjects as a new tool for diagnostic and clinical research applications (FFC Project#5/2009, in progress)	
33. Melotti P, Sorio C	32
Novel biomarkers for evaluation of efficacy of new therapies in cystic fibrosis (FFC Project#6/2010, new)	
34. Pedemonte N	33
Dissection by RNAi-mediated silencing of molecular mechanism leading to F508del-CFTR misprocessing (FFC Project#3/2009, completed)	

Session IV: Population screening and clinical interventions

Moderator: Roberto Buzzetti • Introduction by Teresa Repetto

35. Rosatelli MC	34
Feasibility of a screening program for the preconceptional identification of Cystic Fibrosis carriers in Sardinian population (FFC Project#5/2008, completed)	
36. Repetto T	35
The cystic fibrosis newborn screening in Italy. Survey for assessment of technical-scientific and organizational issues (FFC Project#23/2010, new)	
37. Dal Molin A, Braggion C, Furnari ML, Lucidi V, Rizzi E, Cialdella P	36
A prospective study about complications of totally implantable central venous access ports in people with CF (FFC Project#16/2008, completed)	
38. Taccetti G	37
Early antibiotic treatment in Pseudomonas aeruginosa eradication in cystic fibrosis patients: a randomised polycentric study on two different protocols (FFC Project#17/2007, completed)	
39. Ranieri VM	38
Extracorporeal lung assist as bridge to lung transplantation for patients with cystic fibrosis (FFC Project#17/2008, completed)	
40. Remuzzi G	38
Prevention of reperfusion injury in human lung transplantation for cystic fibrosis by targeting IL-8 activity (FFC Project#24/2009, in progress)	

Session III B: CFTR structure/function and its rehabilitation

■ Novel approaches to restoring CFTR function

Moderator: Antonio Cao • Introduction by JV Luis Galieta

41. Galieta JVL, Millo E, Mazzei M	40
Development of small molecules to correct the defective chloride transport in cystic fibrosis (FFC Project#2/2009, in progress)	
42. Mazzei M, Fossa P, Turco C	41
The search of HSP70/HSC70 complex inhibitors useful to correct the DF508-CFTR (FFC Project#5/2010, new)	
43-44. Moran O, Zegarra O	41
– Functional and structural basis of the molecular mechanism of CFTR potentiators (FFC Project#2/2008, completed)	
– Structural features of the intracellular domains of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (FFC Project#7/2010, extension FFC Project#2/2008)	
45. Borgatti M, Altamura N, Baasov T	42
Novel cellular model system and therapeutic molecule for the development of a read-through approach for CF caused by stop codon mutations of the CFTR gene (FFC Project#2/2010, new)	
46. Tamanini A, Reshkin S	43
Decrease apical infection of CFTR by Pseudomonas aeruginosa infection: role of NHERF1 phosphorylation (FFC Project#8/2010, new)	
47. Zegarra O	44
Strategies for the suppression of Na ⁺ and fluid hyperabsorption in cystic fibrosis airway disease (FFC Project#7/2009, in progress)	
48. Loi R	45
An Induced pluripotent stem cell (iPS)-based approach for the repopulation and phenotypic correction of cystic fibrosis airway epithelium (FFC Project#3/2010, new)	

■ Short reports on FFC Facilities

Moderator: Antonio Cao

49. Bragonzi A	46
CFaCore: Animal model facility for CF Research	
50. Nicolis E, Bezzzerri V, Cabrini G	47
QuantiGENE: CF Research facility for the analysis of gene expression	

Session V: Emerging aspects of CF genetics

Moderator: *Maria Cristina Rosatelli* • Introduction by *Maria Cristina Rosatelli*

51. Pagani F	48
Molecular pathology of the pre-mRNA splicing machinery in cystic fibrosis: mechanistic aspects and therapeutic approaches (FFC Project#9/2009, extension of several FFC projects, in progress)	
52. Gasparini P, Cabrini G	48
Influence of genetic factors in the progression of lung disease in cystic fibrosis (CF) (FFC Project#8/2009, completed)	
53. Pucci P, Tomaiuolo R, Bombieri C	49
Search of novel regulatory elements in the promoter region of CFTR gene (FFC Project#4/2008, completed)	
54. Bombieri C, Seia M, Lucarelli M	50
Molecular and functional study of the epithelial Na ⁺ channel (ENaC) in CF and CF-like disease (FFC Project#1/2010, new)	

Session II B: Basic science of and therapeutic approaches for bacterial airway infection

■ Bacterial cell wall components as therapeutic targets

Moderator: *Gerd Döring* • Introduction by *Antonio Molinaro*

55. Bernardini ML, Molinaro A, Allaoui A	51
Immune evasion strategies underlining the adaptation of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> to the airways of cystic fibrosis patients (FFC Project#17/2009, completed)	
56. Molinaro A, Bernardini ML, Döring G	52
Development of new therapeutic approaches against microbial infection in cystic fibrosis patients: biochemical analysis of cell wall fragments (FFC Project#11/2010, extens. FFC Proj#8/2007)	
57. Silipo A, De Soya A	52
In vitro and in vivo studies of novel antimicrobials targeting bacterial cytoskeleton and cell surface virulence markers pin the treatment of <i>Burkholderia cepacia</i> complex infection (FFC Project#16/2009, in progress)	
58. Polissi A, Dehò G, De Castro C, Bolognesi M, Cipolla L, De Gioia L	53
Essential proteins of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> outer membrane biogenesis as novel targets for new anti-microbial drugs design and synthesis (FFC Project#10/2008, completed)	
59. Polissi A, Bolognesi M, Dehò G, Peri F, De Castro C, De Gioia L	54
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> lipopolysaccharide cell surface transport is a target process for developing new antimicrobials (FFC Project#13/2010, new)	
60. Bragonzi A, Bertoni G	55
Validation of novel vaccine candidates of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (FFC Project#10/2009, in progress)	

■ Antibacterial peptides, bacterial interactions and microbial epidemiology

Moderator: *Gerd Döring* • Introduction by *Giovanni Taccetti*

61. Gennaro R, Di Bonaventura G, Fiscarelli E	56
Novel strategies for respiratory infection therapy in CF. Use of natural and designed antibacterial peptides (FFC Project#12/2009, in progress)	
62. Pini A	57
In vivo characterization of a novel branched antimicrobial peptide specific for Gram-negative bacteria. Efficacy in <i>P. aeruginosa</i> lung infection and pharmacological profile (FFC Project#14/2009, in progress)	
63. Bevvino A, Ascenzioni F	57
<i>Burkholderia cepacia</i> pathogenicity: synergistic interactions with <i>Pseudomonas aeruginosa</i> and adaptation to CF host (FFC Project#7/2008, completed)	
64. Campana S	58
Impact on clinical status of cystic fibrosis patients of persistent lung infections with community acquired methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (CA-MRSA) and hospital acquired methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (HA-MRSA): a multicenter longitudinal study (FFC Project#11/2009, completed)	
65. Cirillo DM, Bragonzi A, Kahl B	59
Pathogenicity of <i>Staphylococcus aureus</i> and its role in the progression of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> chronic lung infection (FFC Project#9/2010, new)	

<i>Publications and congress communications</i>	61
Pubblicazioni e comunicazioni congressuali	
<i>FFC Site Network</i>	76
Rete FFC di Istituti e Laboratori	
<i>International reviewers</i>	78
Referees internazionali	
<i>Adopted projects (2008-2010)</i>	80
Progetti 2008-2010 adottati	
<i>FFC Research Funding</i>	87
Finanziamento della Ricerca FC	

Gli autori indicati nell'indice sono i responsabili ufficiali dei progetti presentati, con gli eventuali partners.

Insights into airway inflammation

Targets for anti-inflammatory therapy and novel strategies to control inflammation

Moderator: Giorgio Berton

Introduction by Cecilia Garlanda



Virginia De Rose con Emilio Hirsch

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 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 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. The specific aims of the project are: 1) The generation of mouse models to assess the impact of PI3K γ in CF-specific backgrounds on leukocyte trafficking, inflammation and damage in uninfected mouse lungs; 2) the evaluation of the impact of PI3K γ deficiency on bacterial lung infection; 3) the evaluation of the impact of a PI3K γ inhibitor in CF mouse models on leukocyte trafficking, inflammation, damage and infection. In this first phase of the project we have generated β ENaCtg/PI3K γ KO mice and the generation of CF KO/ PI3K γ KO mice is ongoing. Our preliminary results, on a small number of mice, have shown that deletion of PI3K γ in β ENaCtg mice induces a reduction of emphysema and a decrease of neutrophil number into the airways. To confirm these preliminary results, further experiments, including the assessment of inflammatory cells and mediators in the bronchoalveolar lavage are ongoing. We will then test in CF animal models the efficacy of an active small-molecule PI3K γ inhibitor as an anti-inflammatory therapy option in CF mice.

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 processo infiamma-

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

De Rose V¹, Hirsch E², Döring G³

¹Dipart. Scienze cliniche e biologiche, Università di Torino,

²Centro di biotecnologia molecolare, Università di Torino

³Institut for General and Environmental Hygiene, University of Tübingen

(FFC Project#20/2009, in progress)

torio 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; nessuna di queste strategie, 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 inibitori 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.

Obiettivi specifici del presente progetto sono:

- 1) generare due modelli murini di FC (β ENaCtg e CF KO) geneticamente privati di PI3K γ (β ENaCtg/PI3K γ KO e CF KO/ PI3K γ KO), per valutare se la mancanza di PI3K γ possa ridurre il reclutamento delle cellule infiammatorie ed il danno polmonare da queste mediato;
- 2) valutare l'effetto della mancanza di PI3K γ sulla suscettibilità all'infezione batterica nei due modelli murini di FC;
- 3) valutare l'effetto di un inibitore di PI3K γ sul processo infiammatorio, sul danno polmonare e sulla suscettibilità alle infezioni nei modelli murini di FC.

In questa prima fase del progetto abbiamo generato i topi β EN-aCtg/PI3K γ KO e sono in corso di generazione i topi CF KO/ PI3K γ KO. I risultati preliminari fino ad ora ottenuti, su un numero ancora limitato di animali, hanno mostrato che in assenza di PI3K γ i topi β ENaCtg presentano una riduzione delle alterazioni di tipo enfisematoso nel parenchima polmonare ed un ridotto numero di neutrofili nel lume delle vie aeree. Questo suggerirebbe che la mancanza dell'enzima riduce il processo infiammatorio neutrofilico ed il conseguente danno polmonare. Per confermare tali dati, sono attualmente in corso ulteriori esperimenti, inclusa la valutazione del processo infiammatorio nel lavaggio broncoalveolare. Verrà quindi valutato l'effetto di un inibitore di PI3K γ per verificare se l'impiego di tale molecola possa rappresentare un potenziale nuovo approccio terapeutico nel controllo dell'infiammazione bronchiale in corso di fibrosi cistica.



Cecilia Garlanda (seconda da sinistra) con il suo gruppo di ricerca

A major trust of this application has been to explore the potential of the prototypic long pentraxin PTX3, discovered by the applicant group, in a therapeutic perspective. PTX3 is a soluble receptor of the innate immune response with several biological properties involved in regulating inflammation and immune defence. In particular, PTX3 is a non-redundant component of innate immunity against selected pathogens, including *Pseudomonas aeruginosa* and *Aspergillus fumigatus*, two pathogens which play a key role in the pathology of patients with cystic fibrosis.

Studies conducted in the research project funded by Fondazione FC demonstrated the therapeutic potential of PTX3 in the context of experimental chronic lung infections by *P. aeruginosa* and the molecular mechanisms underlying its anti-microbial and anti-inflammatory activity. In particular, *in vitro* and *in vivo* studies conducted in this project, demonstrated that PTX3 binds to selected pathogens facilitating their recognition by the cells of the innate immune response and elimination by phagocytosis. In this process, PTX3 behaves as an antibody, by binding pathogens, activating complement and facilitating phagocytosis through complement receptors and receptors for the Fc portion of antibodies. Treatment with the recombinant molecule produced in the laboratory, reduced the bacterial load during chronic experimental lung infections and the inflammatory response and lung parenchyma damage associated to the infection. These studies could pave the way for future clinical studies on the therapeutic or prophylactic role of PTX3 administration in cystic fibrosis patients with the aim to control lung infections and inflammation.

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

Garlanda C¹, Bragonzi A²

¹Fondazione Humanitas per la Ricerca, Rozzano, Milano,

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

(FFC Project#14/2008, completed; FFC Project#18/2010,
extension)

Infezioni nella fibrosi cistica: ruolo della pentrassina lunga PTX3 nella resistenza dell'ospite e come agente terapeutico

L'impegno principale di questo progetto è stato quello di valutare il potenziale della pentrassina lunga PTX3, molecola scoperta dal gruppo proponente, in una prospettiva terapeutica. PTX3 è un recettore solubile della risposta immunitaria innata, prodotta da diverse cellule dell'organismo, 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* e *Aspergillus fumigatus*, due patogeni che giocano un ruolo cruciale nella patologia polmonare dei pazienti con fibrosi cistica. Il lavoro svolto ci ha permesso di dimostrare il potenziale terapeutico di PTX3 nell'ambito delle infezioni polmonari croniche sperimentali da *P. aeruginosa* e di definire i meccanismi molecolari alla base della sua attività anti-microbica e anti-infiammatoria. In particolare, gli studi *in vitro* e *in vivo* condotti in questo progetto hanno dimostrato che PTX3 lega alcuni micro-organismi patogeni facilitandone il riconoscimento da parte delle cellule del sistema immunitario e la loro eliminazione mediante fagocitosi. In questo processo, PTX3 si comporta come un anticorpo poiché lega i patogeni, attiva il complemento e facilita la fagocitosi tramite i recettori per il complemento e per la porzione Fc degli anticorpi. Il trattamento degli animali con questa molecola ricombinante prodotta in laboratorio, ha ridotto la carica batterica durante infezioni polmonari croniche, l'infiammazione a queste associate e il danno del parenchima polmonare. Questi studi costituiscono la base per futuri studi clinici sull'utilità della somministrazione di PTX3 come agente profilattico e/o terapeutico nei pazienti con fibrosi cistica per facilitare il controllo di infezioni polmonari e l'infiammazione.



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

CF lung inflammation is inefficiently managed by traditional anti-inflammatory drugs. Thus, new molecules tailored to modulate leukocyte chemotaxis are needed. Sphingolipids (SLs) play a critical role in the pathogenesis of several lung diseases, including CF. In this respect, the SL ceramide seems to regulate inflammation and infection in the airways of CF mouse models

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

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

Dechechchi MC¹, Gambari R²

¹Lab. di Patologia Molecolare, Lab. Analisi Chimico-Cliniche ed Ematologiche, Università di Verona

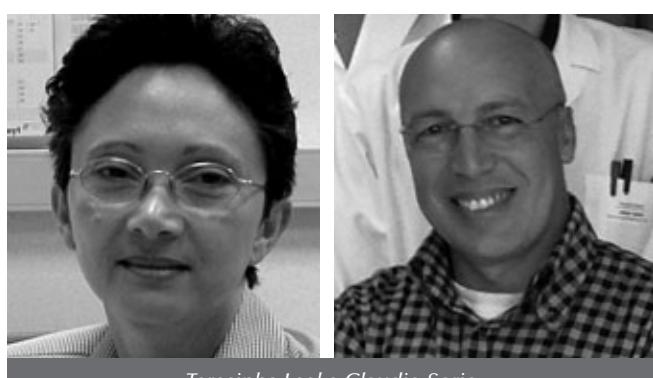
²Dip. di Biochimica e Biologia Molecolare, Università di Ferrara
(Progetti FFC# 12/2008 e FFC# 16/2010, extension)

[Teichgraber, 2008] and patients [Brodie, 2010]. We demonstrated that miglustat, an inhibitor of the synthesis of glycosphingolipids, used for treating type I Gaucher disease, reduces the *P. aeruginosa*-dependent transcription of IL-8 gene 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, in parallel with amitriptyline. In collaboration with the FFC facility QuantiGENE we studied gene expression by TaqMan Low Density Array (TLDA) in IB3-1 cells and found that *P. aeruginosa* (4 hours) up-modulated the expression of many genes, mainly chemokines (IL-8, Gro- $\alpha/\beta/\gamma$, GCP, IP-10), pro-inflammatory cytokines (IL-1 α/β , TNF α , IL-6) and the transcripts of ICAM-1, NFKB1, TLR-2, HBD-4 genes. Interestingly, both miglustat and amitriptyline reduced the expression of key genes involved in neutrophil chemotaxis. Furthermore, they decreased the expression of ceramide at the plasma membrane of cells infected by *P. aeruginosa* and did not produce any significant effect on apoptosis. In collaboration with the Department of Pathology of the University of Verona and the CFaCore facility we evaluated the effect of miglustat in vivo. C57BL/6 mice were treated with miglustat once daily for three days before pro-inflammatory challenge with LPS or with a single dose 1 hr before PAO1 infection. Miglustat significantly reduced the amount of neutrophils recruited in BALF and MPO activity in both LPS stimulated and PAO1 infected mice providing pre-clinical evidence to support the use of miglustat to treat CF lung inflammation.*

*Thanks to a collaboration with Genzyme corporation, future studies will explore the effect of other modulators of the SLs metabolism on the cellular response to *P. aeruginosa* both in vitro and in vivo, in order to characterize the molecular targets for their therapeutic application(s) to the chronic CF lung disease, in comparative anti-inflammatory effectiveness studies towards miglustat. The effect of the inhibition of function or expression of enzymes of SLs metabolism will be studied firstly in vitro at the levels of i) inflammatory response to *P. aeruginosa*, ii) modulation of intracellular ceramide and iii) activation of apoptotic pathways. The most promising pharmacological modulators will be then tested in validated murine models of airway inflammation. The present project joins together research groups with a long-time experience in the field of CF, with unique and strong expertise on innovative experimental therapeutic approaches, on the mechanisms of inflammation, on murine animal models for acute lung infections. Complementary expertises united in this collaboration will result in synergy and speed up the pre-clinical evaluation of a possible treatment for CF patients with modulators of SLs metabolism, also considering that some of these molecules are already FDA- and/or EMEA-designated orphan drugs for other rare diseases.*

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



*Colonization by *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) is a hallmark of lung disease in cystic fibrosis (CF), where microaerobiosis develops as a consequence of disease progression. It is*

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

Le limitazioni emerse dall'uso dei tradizionali anti-infiammatori, quali corticosteroidi e ibuprofene, spingono la ricerca verso nuovi farmaci specifici per modulare l'infiammazione polmonare FC. Gli sfingolipidi (SLs) e i glicosfingolipidi (GSLs) sono molecole biologicamente attive sulle quali sta crescendo l'interesse, essendo coinvolte in numerosi processi, compreso il controllo dell'infiammazione. Studi recenti indicano una possibile relazione tra anomalie nel metabolismo dello SLs ceramide e infiammazione polmonare in FC. Noi abbiamo dimostrato che il miglustat, un inibitore della sintesi degli GSLs usato per il trattamento della sindrome di Gaucher, riduce l'espressione della chemochina IL-8 in cellule bronchiali umane, infettate con *P. aeruginosa*. Grazie a questo finanziamento della FFC, abbiamo esteso lo studio dell'effetto anti-infiammatorio del miglustat in vitro e in vivo, in parallelo con il farmaco amitriptilina. In collaborazione con il Servizio FFC QuantiGENE abbiamo studiato l'espressione genica con TaqMan Low Density Array (TLDA) in cellule IB3-1 e abbiamo osservato che *P. aeruginosa* (4 ore) induce l'espressione delle chemochine IL-8, Gro- $\alpha/\beta/\gamma$, GCP, IP-10, delle citochine pro-infiammatorie IL-1 α/β , TNF α , IL-6, della molecola adesiva ICAM-1, e dei geni NFKB1, TLR-2, HBD-4. Sia il miglustat che l'amitriptilina riducono l'espressione dei geni specificamente coinvolti nella risposta infiammatoria. Abbiamo anche dimostrato che entrambi i farmaci riducono i livelli di ceramide espressa sulla membrana delle cellule bronchiali infettate con *P. aeruginosa* senza avere alcun effetto sull'apoptosi. In collaborazione con il Dipartimento di Patologia dell'Università di Verona e con il Servizio FFC CFaCore abbiamo studiato gli effetti del miglustat in vivo. Topi C57BL/6J sono stati trattati per tre giorni prima dell'instillazione nasale di lipopolissacaride (LPS) o con una sola dose 1 ora prima dell'infezione con *P. aeruginosa*. Il miglustat riduce significativamente il numero di granulociti neutrofili osservato nel BALF e l'attività mieloperossidasicia fornendo così evidenze pre-cliniche a sostegno di un possibile impiego per il trattamento dell'infiammazione polmonare FC. Questa ricerca verrà ampliata studiando altri inibitori del metabolismo degli SLs, grazie ad una collaborazione con Genzyme Corporation, per caratterizzare il bersaglio molecolare per la cura della malattia polmonare FC, confrontandone i risultati con quelli ottenuti con il miglustat. Gli effetti dell'inibizione funzionale o dell'espressione di enzimi chiave del metabolismo degli SLs verrà studiata inizialmente in vitro a livello della: i) risposta infiammatoria a *P. aeruginosa*, ii) modulazione di ceramide e iii) attivazione dell'apoptosi. I composti più promettenti saranno poi studiati in modelli murini di infiammazione polmonare. Questo progetto unisce ricercatori da tempo coinvolti nel campo FC e con esperienza specifica sugli approcci terapeutici innovativi, sui meccanismi dell'infiammazione e sui modelli murini di infezione acuta. Le diverse competenze sinergiche di questa ricerca porteranno ad una valutazione pre-clinica su un possibile trattamento anti-infiammatorio dei malati FC, anche in considerazione del fatto che alcune delle molecole utilizzate sono già farmaci orfani approvati FDA e/o EMEA, per il trattamento delle malattie rare.

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

Leal T¹, Mauri P², Sorio C³

¹Dep. of Clinical Chemistry, Université Catholique de Louvain – St. Luc University Hospital

²Ist. Tecnologie Biomediche CNR, Segrate Milano

³Dip. Patologia, Patologia Generale, Università di Verona (FFC Project#15/2008, completed)

well-known that Pa senses the environment and changes its phenotype accordingly. Bacterial released proteins are particularly important in CF pathogenesis. Little is known about

the changes in protein release induced by oxygen limitation in PAO1, the proto-typical Pa laboratory strain and no data are available on Pa strains isolated from patients affected by CF, like AA2 and AA43 used in this study.

Conditioned medium (CM) of Pa clinical strains from a CF patient after early (AA2 strain: 6 months) and late (AA43 strain: 7.5 years) colonization, unlike the CM from laboratory strain PAO1, induces IL-8 mRNA and protein expression in CF airway epithelial cells in both aerobic and microaerobic conditions. Using MudPIT proteomic approach we identified a total of 461 polypeptides and identified sets of differentially regulated proteins which are detected in the CM under different experimental conditions. We focused on proteases and their inhibitor ecatin whose expression pattern in the CM correlates with pro-inflammatory activity that was highest in the AA2 strain. An association among early Pa infection and metalloproteases activity was confirmed by the analysis of the isolates derived from sporadically infected individuals: 76% (n=38) expressed protease activity, while only 27% (n=44) scored positive in chronically infected CF patients (p<0.001).

This study indicate that high-throughput approaches coupled to carefully selected clinical samples are critical to unravel the complexity of the pro-inflammatory microenvironment associated with the presence of Pa and to facilitate the identification of key molecules involved in Pa biology/pathology. Moreover in vivo experiments performed in young adult mice using PAO1 and AA2 challenges indicated that pretreatment with both media is followed by significant inflammatory cellular and cytokine responses.

Finally, the correlation reported among MMP activity/expression and specific clinical conditions suggest that MMPs might play a role in the clinical manifestations of Pa infection supporting a link among MMP expression/activity and Pa virulence in CF patients.

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

La colonizzazione da parte del batterio gram negativo *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) è un evento caratteristico nel corso della patologia polmonare che colpisce i pazienti affetti da fibrosi cistica (FC), nel cui polmone si sviluppano condizioni di microaerobiosi come conseguenza della progressione della malattia. È noto che Pa si adatta all'ambiente e modifica di conseguenza le sue caratteristiche. Le proteine rilasciate da questo batterio sono particolarmente importanti nella patogenesi della fibrosi cistica tuttavia poco è noto in merito alla variazione delle proteine batteriche rilasciate in presenza di ossigeno nel ceppo di laboratorio PAO1 e nulla relativamente ai ceppi isolati da pazienti affetti da FC come AA2 e AA43, utilizzati in questo studio. I surnatanti derivanti dal ceppo clinico AA2 isolato nella fase precoce della colonizzazione (6 mesi) e dal ceppo clinico AA43 isolato invece nella fase tardiva (7,5 anni), cresciuti entrambi in condizioni di aerobiosi e microaerobiosi inducono un'aumentata espressione della citochina pro-infiammatoria IL-8 in cellule epiteliali bronchiali con mutazione del gene CFTR. Utilizzando l'approccio proteomico ad elevata processività denominato "MudPIT" abbiamo individuato un totale di 461 polipeptidi ed identificato una serie di proteine differenzialmente regolate nei surnatanti ottenuti in differenti condizioni sperimentali. Quindi ci siamo concentrati sulle proteasi ed un loro inhibitore "ecotina", il cui profilo di espressione correla con l'induzione di IL-8. Abbiamo quindi osservato che l'attività delle metalloproteasi (MMP) è risultata presente in una elevata percentuale (76%, n = 38) tra i ceppi clinici isolati da pazienti FC affetti da infezione sporadica mentre risulta espressa in solo il 27% (n = 44) dei ceppi isolati da pazienti FC affetti da infezione cronica (p < 0,001).

Questo studio indica che gli approcci ad elevata processività applicati a campioni clinici sono fondamentali per districare la complessità del microambiente pro-infiammatorio associato alla presenza di Pa e permettono una più rapida identificazione di molecole chiave coinvolte nella patologia/biologia di Pa. Infine, la correlazione tra l'attività e l'espressione delle MMP e specifiche condizioni cliniche suggeriscono che le MMP potrebbero giocare un ruolo importante nelle manifestazioni cliniche dovute all'infezione mettendo in luce un legame tra l'espressione/attività delle metalloproteasi e la virulenza di Pa nei pazienti FC. Le MMP potrebbero quindi rivelarsi potenziali bersagli terapeutici in soggetti FC colonizzati da specifici ceppi di Pa.



Francesco Galli, primo da destra, con il suo gruppo di ricerca

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

Galli F¹, Iuliano L², Schock CB³, Goracci GF⁴

¹Dip. Med. Interna, Sez. Bioch. Appl. e Scienze Nutrizionali, Università di Perugia

² Dip. Med. Interna e vascolare, Università "La Sapienza" Roma,

³ Queen's University Belfast, Respiratory Medicine Research Group

⁴ Dipart. Med. Interna, Sez. Biochimica, Università di Perugia (FFC Project#13/2008, completed)

Cystic fibrosis (CF) is a condition of chronic inflammation and malnutrition. Starting from this background, main end-points investigated in this two-year project were 1) the identification of novel lipid-derived biomarkers of oxidative stress and the levels of the liposoluble antioxidant vitamin E (VE) in CF patients, 2) the pre-clinical characterization of antioxidant and anti-inflammatory properties of natural and synthetic forms of VE.

As far as the first point concerns, the levels of the oxysterols 7-ketocholesterol and 7β-hydroxycholesterol (prototype molecules of free radical-mediated cholesterol oxidation) have been determined for the first time in CF blood (Am J. Clin Nutr., 2009) demonstrating an increased burden of chole-

terol oxidation in these patients. This finding was associated with the presence of specific changes of fatty acid (FA) profile and a defective VE status. In a pilot study the effect of the supplementation with the ω-3 fatty acid DHA and VE (as alpha-tocopherol) was investigated. These supplements were found to have only minor effects on the blood levels of oxysterols. More investigation is awaited to determine whether a defective VE status might contribute to lipid abnormalities and oxidative stress (as cholesterol oxidation) of CF. Further studies are in progress to better characterize levels and biological roles of minor forms, such as gamma-tocopherol and tocotrienols, which could be used in future trials to correct oxidative stress and other inflammatory symptoms in CF.

The therapeutic potential of VE compounds was investigated in vitro starting from a library of more than 50 molecules prepared during the two-year work of this project. These include amine, esters, ether and amide derivatives of tocopherol and tocotrienol molecules. Reference molecules in each sub-class of compounds were investigated in different model systems as regards chemical characteristics, toxicity effects and biological properties of relevance in therapeutic protocols against degenerative and inflammatory conditions (J Nutr Biochem 2008, Chirality 2008, J Nutr Biochem 2010, ChemMedChem 2010, Life Sci. 2010, Genes and Nutr., in press, British J Pharmacol., submitted).

*In vitro experiments on inflammatory and epithelial cells exposed to *P. aeruginosa* showed that the natural forms of VE, and particularly the synthetic form alfa-TOS, reduced the activity of the cPLA₂/COX pathway, as well as that of the secretory form of the phospholipase A2 (sPLA₂-IIA) and the production of the pro-inflammatory cytokine IL-8.*

In conclusion, this project has provided further insights into the interplay between oxidative stress and lipid metabolism abnormalities in CF, suggest the need for more effective interventions on the side of secondary prevention and therapy of inflammatory and nutritional symptoms. In vitro tests on antioxidant and anti-inflammatory activity of VE-derived compounds have confirmed the therapeutic potential of these molecules that need to be further investigated at the pre-clinical level by means of in vivo studies.

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

La fibrosi cistica (CF) è una condizione di infiammazione cronica e malnutrizione nella quale abbiamo indagato: 1) biomarcatori lipidici di stress ossidativo nel paziente CF associati al metabolismo del colesterolo e degli acidi grassi, ed al principale fattore antiossidante lipofilo vitamina E (VE); 2) le proprietà antiossidanti e anti-infiammatorie delle forme naturali e sintetiche della VE (indagine pre-clinica in vitro).

Per quanto riguarda il primo punto, un aumento dei livelli de-



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

Although cystic fibrosis is a multi-organ disease, death is mostly due to inflammatory lung disease. Dehydrated airway secretions invite infection, limiting the delivery of gene therapy and the search for a cure. The abnormally high viscosity of CF sputum is caused by high levels of extracellular DNA and actin released from necrotic neutrophils built up in the airways. Mucus clearance is severely hampered by ciliary damage caused by bacterial toxins and neutrophil elastase (ELA2) (a protease that, when expressed aberrantly, causes damage to the lung structure) as well as by adhesive mucous plaques.

The design of mucolytic agents to thin airway secretions and improve airway clearance, or of agents capable of reducing

gli ossisteroli 7-chetocolesterolo e 7 β -idrossicolesterolo (indici dell'ossidazione del colesterolo mediata da radicali liberi) è stato osservato per la prima volta nel sangue dei pazienti CF (Am. J. Clin. Nutr., 2009) in associazione con specifiche alterazioni nel profilo degli acidi grassi, dell'assetto lipidico generale e dello stato vitaminico E. In uno studio pilota la supplementazione con l'acido grasso ω -3 DHA o con VE (come alfa-tocoferolo) produceva effetti trascurabili sui livelli ematici di ossisteroli di pazienti CF. Questi dati suggeriscono che, oltre ad un difetto nei livelli di VE, nei pazienti CF vi siano ulteriori fattori responsabili delle anomalie del quadro lipidico e degli indici di stress ossidativo relativi al colesterolo. Un'estensione del trial svolto in questo progetto è in corso di svolgimento per meglio caratterizzare i livelli e il ruolo biologico delle forme minori della VE, quali ad esempio il gamma-tocoferolo ed i tocotrienoli, nello stress ossidativo ed in altri sintomi infiammatori del paziente CF.

Lo studio pre-clinico delle potenzialità terapeutiche dei composti della VE definito al punto due (vedi sopra) è stato svolto preparando una libreria di oltre 50 molecole che includono amine, esteri, eteri e derivati amminici dei tocoferoli e dei tocotrienoli. Molecole di riferimento per ogni sotto-classe di composti sono state valutate in differenti sistemi per quel che riguarda caratteristiche chimiche, effetti di tossicità e proprietà biologiche rilevanti per lo sviluppo di protocolli terapeutici contro condizioni degenerative ed infiammatorie (J Nutr Biochem 2008, Chirality 2008, J Nutr Biochem 2010, ChemMedChem 2010, Life Sci. 2010, Genes and Nutr., in press, British J Pharmacol., submitted).

Esperimenti in vitro su modelli di cellule infiammatorie ed epiteliali esposte a *P. aeruginosa* hanno mostrato come le forme naturali di VE, e particolarmente la forma sintetica alfa-tocoferol succinato, siano in grado di diminuire l'attivazione della cascata dell'acido arachidonico lungo la via cPLA₂/COX e della forma secretoria della fosfolipasi A2 (sPLA₂-IIA), agendo anche sulla produzione della citochina pro-infiammatoria IL-8.

In conclusione, questo progetto ha fornito ulteriori informazioni sull'interazione tra stress ossidativo ed anomalie del metabolismo lipidico nei pazienti CF che possono essere utili nel definire interventi di prevenzione secondaria (su base nutrizionale) e terapeutici della comorbilità infiammatoria e nutrizionale del paziente CF. I test in vitro sull'attività antiossidante e anti-infiammatoria dei composti derivati dalla VE hanno confermato le potenzialità terapeutiche di queste molecole, che dovranno essere ulteriormente investigate a livello pre-clinico utilizzando modelli in vivo.

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

Naggi A¹, Yates EA², Shute J³

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

² School of Biological Science, University of Liverpool

³ Div. Pharmacol. Pharmacy and Biom. Science, University of Portsmouth

(FFC Project#20/2010, new)

inflammation, are both attractive goals. DNase (PulmozymeR) degrades extracellular DNA thereby reducing the viscoelasticity of CF sputum both in vitro and in vivo. However, DNase does not improve lung function in all patients.

It was recently shown that DNase I could be activated by the anionic, complex polysaccharide, heparin [H], better known as a clinical anticoagulant. In addition to the desirable activation of DNase, which results in thinning of the mucus, heparin is also known to inhibit ELA2 and to bind and stabilise interleukin-8, [IL-8] which, unfortunately, is known to cause an undesirable prolonging of the inflammatory response, acting via neutrophil recruitment. Thus, H is simultaneously capable of exerting both desirable and undesirable effects in relation

to possible CF treatment with the contraindication owing to its anticoagulant properties.

Our research groups have prepared several derivatives of H, in which its undesirable anticoagulant properties are severely attenuated. This provides the first source of improved potential glycotherapeutic agents. Moreover, we have been exploring the potential of other sulfated polysaccharides to mimic many of the biological activities exhibited by H, and have assembled a library of over 50 such analogue polysaccharides, with the ability to mimic heparin and heparan sulfate activities. These constitute a valuable and largely unexplored resource in the search for agents capable of selective activity and constitute the second source of potential glycotherapeutic agents.

This project will explore the abilities of several modified heparin and analogue polysaccharides to interact and activate DNase, to inhibit ELA2 and to bind and stabilise IL-8, in the search for potential therapeutic lead compounds for the treatment of CF.

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

Sebbene la fibrosi cistica (CF) sia una patologia multiorgano, la morte è principalmente dovuta all'infiammazione polmonare. Le secrezioni tendono a ostruire le vie respiratorie inducendo infezione, e limitando la somministrazione di farmaci per inalazione. L'abnorme viscosità dell'espettorato è causata da alti livelli di DNA extracellulare e di actina rilasciata dai neutrofili necrotici accumulati nelle vie respiratorie. L'eliminazione del muco è gravemente

impedita sia dall'adesività delle placche di muco, sia dal danno alle ciglia causato dalle tossine batteriche, dall'elastasi neutrofila libera (ELA2) (una proteasi che se presente in quantità aberrante può causare danni al tessuto polmonare).

La progettazione di agenti mucolitici per diminuire le secrezioni delle vie respiratorie favorendo la loro liberazione e di agenti capaci di ridurre l'infiammazione sono entrambi obiettivi attraenti. La DNase (PulmozymeR) digerisce il DNA extracellulare, riducendo la viscoelasticità dell'espettorato in vitro e in vivo. Ciò nonostante il suo uso non migliora in tutti i pazienti la funzionalità polmonare.

Recentemente è stato mostrato che la DNase può essere attivata dall'eparina (H), un polisaccaride anionico complesso utilizzato in clinica come anticoagulante.

Oltre alla desiderabile azione di attivazione della DNase, col vantaggio di ridurre la viscosità del muco, è noto che l'eparina inibisce l'ELA2 ma lega e stabilizza l'interleukina-8 (IL-8), che è causa di un indesiderato prolungamento della risposta infiammatoria, attraverso l'attivazione del reclutamento leucocitario. L'H è quindi in grado di svolgere contemporaneamente effetti desiderati e indesiderati in relazione ad un suo possibile uso terapeutico, oltre alla controindicazione dovuta alle sue proprietà anticoagulanti. I nostri gruppi di ricerca hanno preparato diversi derivati di H, in cui l'attività anticoagulante è stata ridotta o eliminata, che possono costituire una prima classe di potenziali agenti glicoterapeutici per il trattamento della CF. Inoltre abbiamo generato una libreria di più di 50 polisaccaridi solfati capaci di mimare alcune delle attività biologiche dell'H. Queste due classi di composti costituiscono una preziosa e largamente inesplorata risorsa nella ricerca di potenziali nuovi agenti glicoterapeutici con attività selettive. Questo progetto esplorera' la capacità di numerose eparine modificate e di analoghi polisaccaridici di interagire e attivare DNase, di inibire ELA2 e di legare e stabilizzare IL-8, al fine di trovare composti lead che siano potenziali molecole per il trattamento terapeutico della CF



Foto in alto, Roberto Gambari (al centro), sotto Francesco Dall'Acqua (secondo da sinistra) con i rispettivi gruppi di ricerca

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

Gambari R¹, Dall'Acqua F², Guiotto A², Bragonzi A³, Casavola V⁴, Cabrini G⁵

¹Dip. di Biochimica e Biologia Molecolare, Università di Ferrara

²Dip. di Scienze Farmacologiche, Università di Padova

³Unità di Infezione e Fibrosi Cistica, Istituto Scientifico Ospedaliero San Raffaele, Milano

⁴Dip. di Fisiologia Generale e Ambientale, Università di Bari,

⁵Laboratorio di Chimica Clinica ed Ematologica, Azienda Ospedaliera Universitaria, Verona

(FFC Project#17/2010, new)

Cystic Fibrosis (CF) is characterized by chronic infection with strikingly few pathogens, first of all *P.aeruginosa*. Therapeutic approaches to control the process of inflammation can result beneficial in reducing the progressive fibrosis of CF lungs (1). On the other hand potentiators/correctors of CFTR functions are currently under study for therapeutic applications to CF. Molecules exhibiting dual activity, i.e. antiinflammatory and potentiating CFTR might be of great interest. Trimethylangelicin (TMA) has this very interesting property.

The major objective of the project is to characterize the biological activity of TMA, to synthesize novel structurally-related molecules, with the objective to develop the best molecules with respect to their ability to reduce the expression of proinflammatory genes induced by *P.aeruginosa*. In addition, TMA and related compounds will be analysed as potentiators

of CFTR biological activity. A second objective is to obtain complementary information on mechanisms of action of TMA and related compounds, to identify alternative targets. Finally, the project aims at testing the best compounds in pre-clinical animal models of *P. aeruginosa* infection.

This Project has been already approached using bronchial epithelial cell lines from CF patients infected with *P.aeruginosa* laboratory strains in vitro (PAO-1)(2,3). Inhibitory effects of linear and angular furocoumarins on the *P.aeruginosa*-dependent transcription of interleukin (IL)-8 was obtained. Virtual screening of putative NF- κ B interactors allowed the identification of novel molecules, able to inhibit IL-8 gene expression with high efficiency (4). Among linear and angular furocoumarins analyzed, TMA was found to be very interesting, with a dual activity, (a) the ability to inhibit IL-8 release by

PAO1-treated IB3-1 cells and (b) a strong potentiation effect on CFTR.

The project is based on the design and production of TMA, and of sets of TMA analogues, including compounds with chemical modifications facilitating solubility and release to target cells. The identification of novel molecular dual-acting compounds able to control the adverse effects of lung inflammation in CF and to potentiate CFTR is expected to have great clinical applications.

Caratterizzazione molecolare della trimetilangelicina (TMA) e di analoghi strutturali in fibrosi cistica: effetti anti-infiammatori e potenziamento dell'attività biologica del CFTR

La malattia polmonare nei pazienti affetti da fibrosi cistica (FC) è caratterizzata da un'infezione cronica sostenuta da pochi tipi di microrganismi patogeni, tra cui *Pseudomonas aeruginosa*. L'eccessiva risposta infiammatoria cronica dominata dalla pre-

senza di neutrofili nel polmone FC non è in grado di eradicare l'infezione ed è ritenuta il principale meccanismo che porta al progressivo danneggiamento del polmone FC ed alla insufficienza respiratoria. Per questo, efficaci terapie anti-infiammatorie possono essere utili all'inizio nel ridurre la progressiva fibrosi polmonare FC (1). D'altra parte è anche molto importante potenziare l'attività del CFTR. Abbiamo dimostrato in precedenza che la trimetilangelicina (TMA) ha un'attività antiinfiammatoria ed è in grado di potenziare l'attività di CFTR. L'obiettivo principale del progetto è caratterizzare l'attività biologica della TMA, di sintetizzare molecole strutturalmente correlate, con l'obiettivo di ridurre l'espressione di geni pro-infiammatori indotti da *P. aeruginosa*. Inoltre, la TMA e i suoi analoghi saranno analizzati per l'attività di potenziamento del CFTR. Un secondo obiettivo è di ottenere informazioni sul meccanismo d'azione di queste molecole, con lo scopo di identificare anche nuovi target molecolari. Infine, il progetto ha come obiettivo l'analisi dell'attività delle migliori molecole su modelli animali che mimano l'infezione acuta di *P. aeruginosa*. Questo progetto si basa sui dati sperimentali ottenuti utilizzando la linea cellulare umana dell'epitelio bronchiale IB3-1 infettata con *P. aeruginosa* (2-4) e trattata con TMA, ottenendo effetti inibitori sull'espressione di IL-8.



Alfredo Guarino

10. Modulation of intestinal and extra intestinal inflammation in infants with cystic fibrosis by early modification of intestinal micro flora

Guarino A¹, Braggion C², Pardo F³, Morelli L⁴

¹Dip. Pediatria, Università di Napoli

²Centro Regionale fibrosi cistica, Ospedale Meyer, Firenze

³Centro Regionale fibrosi cistica, Ospedale "G. Di Cristina, Palermo

⁴Ist. Microbiologia, Università Sacro Cuore, Piacenza

(FFC Project#23/2009, in progress)

It is becoming clear that intestinal microflora is a complex functional unit that lives with the host in a symbiotic relationship. There is evidence that a healthy intestinal microflora reduces the risk of 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 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. Chronic respiratory inflammation and respiratory infections represent the major cause of morbidity and mortality in patients with CF. The widespread implementation of a screening program for newborns has focused on the advantage of early 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. In CF patients, the intestine is a site of inflammatory processes. Preliminary results in 15 CF children in whom analysis of intestinal microflora has been performed by DGGE showed that CF patient showed different profile of intestinal microflora characterised by a reduced richness and a major interindividual variability compared to age-matched healthy controls. Aim of the present project is to demonstrate that 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 preventing or reducing irreversible organ damage and improving clinical outcomes without unacceptable adverse effects. A multicenter prospective

randomised double blind clinical trial has been designed. Six infants with CF diagnosed by newborn screening have been enrolled and randomly assigned to LGG or placebo group for 12 months. Preliminary data showed that intestinal inflammation has already present in the first months of life as judged by an increased fecal calprotectin concentration and rectal nitric oxide production. At enrolment, 3,6 and 12 months after enrolment nutritional, microbiological, inflammatory and clinical assessment will be performed for each patient. At the moment, no follow up data are available.

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

La microflora intestinale è attualmente considerata come un vero e proprio "organo microbico" che vive in uno stato di simbiosi con il resto dell'organismo umano. Sono sempre più numerose le evidenze che una "sana" microflora intestinale protegge dallo sviluppo di malattie allergiche e di altre patologie immunitarie indirizzando lo sviluppo della risposta immunitaria verso la difesa dalle infezioni intestinali ed extraintestinali ed in particolare le infezioni respiratorie. I bambini affetti da Fibrosi Cistica (FC) sono particolarmente a rischio di avere una microflora intestinale alterata in seguito all'utilizzo frequente di dosi elevate di antibiotici, all'uso di estratti pancreatici e di inibitori dell'acidità gastrica e per un'alterazione primitiva del microambiente intestinale legata alle alterazioni della proteina CFTR.

L'infiammazione cronica rappresenta, insieme alle infezioni respiratorie, la causa principale di morbilità e di mortalità nella FC. Negli ultimi decenni il programma di screening neonatale per

la FC si è focalizzato sul fatto che una diagnosi precoce di FC consente un intervento precoce, con la possibilità di prevenire e rallentare il danno progressivo a livello polmonare. Evidenze preliminari effettuate su feci di 15 bambini mediante DGGE dimostrano che il bambino con FC presenta una microflora intestinale diversa rispetto al coetaneo sano, caratterizzata da una minore ricchezza e da una maggiore variabilità interindividuale. Scopo del progetto è dimostrare se una precoce modifica della composizione della microflora intestinale attraverso la somministrazione di LGG al lattante con FC, individuato allo screening, possa esercitare effetti benefici riducendo l'infiammazione

intestinale ed extraintestinale e rallentando la progressione del danno a livello respiratorio. Per testare questa ipotesi è stato disegnato uno studio prospettico randomizzato controllato in doppio cieco, multicentrico. I dati finora ottenuti su un campione di 6 lattanti confermano la presenza di un'infiammazione intestinale già nei primi mesi di vita, come dimostrato dal riscontro di concentrazioni elevate di calprotectina fecale e di ossido nitrico rettale. A tre di questi pazienti è stato somministrato in doppio cieco il probiotico e agli altri 3 il placebo. Il trattamento durerà 12 mesi e durante il follow up verranno valutati parametri clinici, nutrizionali, microbiologici ed infiammatori.



Paolo Montuschi

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

Montuschi P¹, Lucidi V², Motta A³

¹Ist. di Farmacologia, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università Cattolica del Sacro Cuore e Unità Operativa di Farmacologia, Policlinico Universitario Agostino Gemelli, Roma

²Dip. Pediatria, Unità Operativa Fibrosi Cistica, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma

³Ist. di Chimica Biomolecolare, CNR, Pozzuoli (Napoli)

(FFC Project#19/2010, new)

Airway inflammation and oxidative stress, an imbalance between free radical production and antioxidant defenses, have a central role in the pathological mechanisms that underly cystic fibrosis. The assessment of lung inflammation is relevant for management of patients with cystic fibrosis as it may indicate that pharmacological therapy is required before onset of respiratory symptoms and decrease in lung function. The development of effective antiinflammatory/ antioxidant therapies has been limited by the lack of sensitive outcome measures and non-invasive techniques for assessing lung inflammation/oxidative stress. Exhaled breath condensate (EBC) is a completely non-invasive method for sampling bronchial secretions. Metabolomics, a new method that uses a highly sensitive and specific technique, called nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy, to study endogenous metabolites, can be applied to EBC analysis. Azithromycin is an antibiotic that has antioxidant effects in experimental models of cystic fibrosis, but its effects on oxidative stress in patients with cystic fibrosis are largely unknown. The main objectives of this project will be to study 1) whether treatment with azithromycin would have antioxidant effects as reflected by concentrations of 8-isoprostane, a reliable biomarker of oxidative stress, and patterns of metabolites, including oxidized metabolites, detected by NMR spectroscopy in EBC and serum in patients with stable cystic fibrosis; 2) to compare the effects of the combination of azithromycin/vitamin E versus vitamin E alone on biomarkers of inflammation/oxidative stress (8-isoprostane, profiles of metabolites) in addition to clinical, functional and radiological parameters. A study will be undertaken in which two groups of patients with stable cystic fibrosis will be treated with a known antioxidant (vitamin E) alone or a combination of vitamin E and azithromycin, a potential antioxidant. This study could provide new insights into the pathological mechanisms of cystic fibrosis, indicate that pharmacological therapy is required at an early stage of cystic fibrosis, propose a new approach, based on direct specific measures of oxidative stress, for assessing the efficacy of currently available drugs for cystic fibrosis, and suggest new therapeutic strategies for this disease with the ultimate goal of a better management of patients with cystic fibrosis.

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

Infiammazione polmonare e stress ossidativo, un'alterazione dell'equilibrio tra produzione di radicali liberi e difese antiossidanti, svolgono un ruolo importante nei meccanismi patologici della fibrosi cistica. La valutazione dell'infiammazione polmonare è molto importante nei pazienti con fibrosi cistica in quanto può indicare la necessità di terapia farmacologica per prevenire la comparsa di sintomi respiratori e di diminuzione della funzionalità respiratoria. Lo sviluppo di terapie anti-infiammatorie/antiossidanti è limitato dalla mancanza di parametri sufficientemente sensibili per valutarne l'efficacia e di tecniche non invasive per valutare l'infiammazione polmonare e lo stress ossidativo. mll condensato del respiro (EBC) è una metodica non invasiva per la raccolta delle secrezioni bronchiali. La metabolomica, un nuovo metodo che impiega una tecnica molto sensibile e specifica, la spettroscopia in risonanza magnetica nucleare (NMR), per lo studio dei metaboliti endogeni, può essere applicata all'analisi dell'EBC. L'azitromicina è un antibiotico che ha effetti antiossidanti in modelli sperimentali, ma i suoi effetti sullo stress ossidativo nei pazienti con fibrosi cistica sono in gran parte sconosciuti.

I principali obiettivi di questo progetto sono studiare 1) se l'azitromicina ha effetti antiossidanti valutati sulla base delle concentrazioni di 8-isoprostano, un indicatore di stress ossidativo, e di profili di metaboliti, compresi metaboliti ossidati, misurati mediante spettroscopia NMR nell'EBC e nel siero di pazienti con fibrosi cistica; 2) confrontare gli effetti della terapia di associazione azitromicina/vitamina E con quelli della terapia con sola vitamina E su infiammazione stress/ossidativo oltre agli effetti su parametri clinici, funzionali e radiologici. Sarà intrapreso uno studio nel quale due gruppi di pazienti con fibrosi cistica stabile saranno trattati con vitamina E, un noto antiossidante, o una associazione di vitamina E ed azitromicina, un potenziale antiossidante. Questo progetto può contribuire a chiarire i meccanismi patologici della fibrosi cistica, indicare la necessità della terapia farmacologica in una fase iniziale della fibrosi cistica, proporre un nuovo approccio, basato su misure dirette di stress ossidativo, per la valutazione dell'efficacia dei farmaci per la fibrosi cistica attualmente disponibili e suggerire nuove strategie terapeutiche per questa patologia con l'obiettivo ultimo di migliorarne il controllo.

Signaling in CF airways and inflammatory cells

Moderator: Giorgio Berton

Introduction by Giulio Cabrini



Giulio Cabrini, secondo da destra, con il suo gruppo di ricerca

The hallmark in CF airway pathology is a characteristic neutrophil (PMN)-dominated inflammation. PMNs, continuously activated by bacterial products, release Reactive Oxygen Species and proteases, that are the major contributors of CF lung tissue injury. Broad-spectrum anti-inflammatory drugs showed major limitation in intervening on the chronic tissue damage in CF lungs. Reduction of PMN infiltrates is now considered a CF-specific anti-inflammatory target. However, the precise mechanisms of transcription of Interleukin 8 (IL-8), the main chemokine released by epithelial respiratory cells to recruit PMNs in CF lungs, are not fully understood, thus limiting the possibility of tailoring novel well-targeted anti-inflammatory molecules. The objective of this research project is to fully explore the transcriptional machinery of IL-8 in respiratory epithelial cells exposed to pro-inflammatory stimuli specific of CF lung disease. The role of the different nuclear transcription factors and the major transmembrane signals leading to the activation of the multimeric transcriptional complex of IL-8 gene will be investigated. A transcriptomic approach will be expanded from cellular to molecular technologies. The characterization of the IL-8 expression machinery in human bronchial epithelial cells exposed to classical CF pro-inflammatory challenges will identify possible molecular targets that will be utilized to design and test novel, effective and safe anti-inflammatory molecules, to reduce the progressive lung tissue damage of patients affected by CF. The ultimate goal of this project is to transform mechanistic insights regarding IL-8 gene transcription into practical innovative applications for the treatment of CF lung disease. During the first year of the project we studied the potential role of nuclear transcription factors, that is the proteins that bind directly to the regulatory elements of the IL-8 gene (the IL-8 gene promoter). In bronchial epithelial cells exposed to *P. aeruginosa* we propose the involvement of the transcription factors NF-*kB*, AP-1, CREB e CHOP. To understand further the role of the major pathways that give information to the cell of the presence of the bacterium *P. aeruginosa* (signal transducers), we studied a panel of proteins transferring phosphate molecules (phosphokinases), such as MAPK ERK1/2, P38, JNK, RSK1/2, MSK2, p70S6K, HSP27, GSK3 ed AKT1-3.

In conclusion, we are widening our knowledge on the cellular components regulating the expression of IL-8, to find cystic fibrosis - specific molecular targets to control excessive lung inflammation, and we are confident to validate and extend these findings during the second part of the project.

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

Cabrini G¹, Gambari R², Pucci P³

¹Lab. Patologia Molecolare, Azienda Ospedaliera Verona

²Dip. Biochimica e Biol. Molecolare, Università di Ferrara,

³CEINGE Biotecnologie Avanzate, Università "Federico II", Napoli

(FFC Project#18/2009, in progress)

Regolazione trascrizionale di interleuchina 8 in cellule epiteliali respiratorie

La caratteristica distintiva della malattia polmonare dei pazienti affetti da fibrosi cistica è una infiammazione cronica dominata dalla presenza di una grande quantità di neutrofili polimorfonucleati (PMN).

I neutrofili nei bronchi e bronchioli dei pazienti sono continuamente attivati da prodotti della degradazione dei batteri e rilasciano radicali tossici dell'ossigeno ed enzimi che degradano le proteine del tessuto polmonare (proteasi), essendo i neutrofili i principali responsabili, assieme ai batteri del danno progressivo dei polmoni. Farmaci anti-infiammatori ad ampio spettro, pur mostrando un parziale effetto migliorativo, hanno mostrato grossi limiti nel rallentare il danneggiamento polmonare. Attualmente la riduzione della quantità di PMN nei polmoni dei pazienti è considerato uno dei bersagli rilevanti per la terapia anti-infiammatoria nella fibrosi cistica. A questo riguardo, il preciso meccanismo di espressione della interleuchina 8 (IL-8), la principale molecola che guida il reclutamento (chemiotassi) dei PMN dal circolo alla mucosa bronchiale, non è sufficientemente conosciuto, limitando quindi la possibilità di disegnare nuove molecole anti-infiammatorie, ben indirizzate a questo meccanismo peculiare della infiammazione polmonare in fibrosi cistica. L'obiettivo di questo progetto di ricerca è di approfondire estesamente il meccanismo della trascrizione di IL-8 nelle cellule epiteliali respiratorie esposte a stimoli pro-infiammatori tipici della malattia polmonare nella fibrosi cistica.

Nel corso del primo anno del progetto è stato studiato il possibile ruolo di fattori di trascrizione nucleare, ossia quelle proteine che, legandosi direttamente alle strutture regolatrici della espressione del gene della IL-8 (promotore del gene), inducono la sua espressione. Nelle cellule epiteliali bronchiali, che rivestono la superficie delle vie aeree, coltivate in vitro ed esposte al patogeno tipicamente coinvolto nella infezione delle vie aeree in fibrosi cistica, *Pseudomonas aeruginosa*, abbiamo proposto l'intervento dei fattori di trascrizione nucleare NF-*kB*, AP-1, CREB e CHOP. Per comprendere le principali vie di trasferimento intracellulare dei segnali che rivelano alle cellule respiratorie la presenza del batterio *P. aeruginosa*, abbiamo studiato un pannello di fosfochinasi (MAPK ERK1/2, P38, JNK, RSK1/2, MSK2, p70S6K, HSP27, GSK3 ed AKT1-3).

In conclusione, stiamo allargando il ventaglio di conoscenze sui componenti intracellulari che intervengono nella regolazione della espressione di IL-8, per individuare nuovi bersagli molecolari specifici per la malattia polmonare cronica della fibrosi cistica, e contiamo nel corso del secondo anno di convalidare ed estendere questi elementi di conoscenza.



Paola del Porto

Chronic inflammation of the lung, as a consequence of persistent bacterial infections by several opportunistic pathogens, represents the main cause of morbidity and mortality in patients affected by cystic fibrosis. At present the causes of the inability of CF patients to eradicate bacterial infections have been mainly ascribed to dysfunctions in the defence mechanisms mediated by airway epithelial cells. More recently several studies in the murine model demonstrated that dysfunctional CFTR might alter both the bactericidal activity and the secretion of pro-inflammatory cytokines of macrophages thus contributing to the establishment of chronic lung infection and to sustenance of exaggerated inflammatory responses. With the aim to define the role of CFTR mutations in the bactericidal activity of human macrophages we have analyzed the ability of both monocyte derived- and lung-macrophages from CF individuals to kill intracellular Pseudomonas aeruginosa by antibiotic protection assay. Analysis of the intracellular bacterial survival in monocyte derived macrophages from CF (N=15) and control individuals (N=12) revealed that both CF and non-CF macrophages killed P. aeruginosa, although the percentage of surviving bacteria recovered from CF was significantly higher than that from control cells. Results from the same analysis performed with CF (N=7) and non-CF lung macrophages (N=8) demonstrated that only non-CF macrophages were able to kill intracellular bacteria. These results suggest that both monocyte-derived and lung CF macrophages have defects in their bactericidal activity, which are more pronounced in the latter. In order to define the contribution of dysfunctional CFTR in the altered bactericidal activity of human macrophages we have analysed the functional activity of CFTR in monocyte derived macrophages demonstrating, for the first time to our knowledge, that the CFTR protein acts as a cAMP-dependent chloride channel in macrophages from healthy individuals. Finally in order to define the molecular mechanisms responsible for the killing defects of human macrophages we have set up a model to study the NADPH oxidase-dependent oxidative burst. Experiments aimed to define the role of this mechanism in the bactericidal activity of CF macrophages are underway.

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

Del Porto P¹, Ascenziioni F², Quattrucci S³

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

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

(FFC Project#21/2009, in progress)

Meccanismi dell'attività battericida nei macrofagi umani ed influenza delle mutazioni CFTR

L'infiammazione cronica delle vie aeree, conseguente a infezioni batteriche persistenti da parte di patogeni opportunisti, rappresenta una delle maggiori cause di malattia e mortalità nei pazienti affetti da fibrosi cistica. Attualmente, le cause responsabili della ridotta capacità dei pazienti CF di eradicare le infezioni batteriche sono state attribuite a disfunzioni nei meccanismi di difesa mediati dalle cellule epiteliali delle vie aeree. Più recentemente diversi studi sul modello murino hanno dimostrato che disfunzioni di CFTR possono alterare sia l'attività battericida dei macrofagi che la produzione di citochine pro infiammatorie favorendo sia la persistenza batterica che una esagerata risposta infiammatoria. Con l'obiettivo di verificare se alterazioni di CFTR possano influenzare l'attività battericida dei macrofagi umani, abbiamo analizzato la capacità dei macrofagi umani CF di uccidere *P. aeruginosa*. Per questo abbiamo studiato sia i macrofagi derivati dai monociti, sia isolati dal polmone. L'analisi della sopravvivenza dei batteri nei macrofagi differenziati dai monociti effettuata su 15 individui CF e 12 di controllo ha dimostrato che sebbene sia le cellule CF che non-CF erano in grado di uccidere *P. aeruginosa* una percentuale significativamente più elevata di batteri sopravviveva all'interno delle cellule CF. Quando la stessa analisi è stata effettuata sui macrofagi polmonari di 7 pazienti CF e 8 di controllo abbiamo osservato che solo i macrofagi non-CF erano in grado di uccidere *P. aeruginosa* dimostrando quindi che i difetti delle capacità battericide interessano sia i macrofagi derivati dai monociti che, in modo anche più pronunciato, i macrofagi polmonari CF. Inoltre per poter definire il coinvolgimento di CFTR nelle disfunzioni della capacità battericida dei macrofagi umani abbiamo verificato l'attività funzionale del CFTR dimostrando per la prima volta che esso agisce da canale del cloro cAMP dipendente nei macrofagi derivati dai monociti umani. Infine per poter identificare i meccanismi molecolari responsabili dei difetti di uccisione dei batteri nei macrofagi CF abbiamo messo a punto un sistema per studiare la produzione degli intermedi reattivi dell'ossigeno generati dall'attivazione della NADPH ossidasi. Esperimenti per definire il ruolo di tale meccanismo nell'attività battericida dei macrofagi CF sono attualmente in corso.



Alfonso Pompella, a destra, con un collaboratore

14. Origin of lung fluid gamma-glutamyltransferase and its effects in modulation of antioxidant balance, inflammation and CF respiratory dysfunction

Pompella A

Dip. Patologia sperimentale, Università di Pisa

(FFC Project#22/2009, completed)

Inflammatory cells accumulating in airways of CF patients during repeated infections produce injuring substances,

which eventually damage lung tissues and favour disease progression. A major defensive role is played by antioxi-

dants, 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. Accumulation in ELF of GGT itself likely concurs in GSH consumption, thus weakening 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 et al., Arch. Bioch. Bioph. 2009; Pompella et al., Pat. N. PCT/IB2007/002090). GSNO is critical for adequate bronchial dilation, and antiinflammatory effects have also been documented. The increased GGT levels occurring in CF may unduly decrease available GSNO, thus contributing to respiratory dysfunction. On the other hand, we have previously shown that GGT activates transcription factors AP-1 and NF- κ B, both involved in promotion of inflammation through induction of proinflammatory cytokine IL-8. In this way GGT activity in ELF could then directly exert a proinflammatory action. Our experimental studies have been first of all aimed at elucidating the precise origin of elevated GGT activity in ELF of CF patients. By using a novel analytical procedure, developed in our laboratory and internationally patented (Franzini et al., Anal. Biochem. 2008; Pat. N. PCT/IB2008/05499), the molecular characteristics of the GGT protein in CF excretes was found to be identical with those of GGT released by activated neutrophils, the main inflammatory cells involved in CF lung inflammation. Secondly, we have documented that GGT activity can indeed participate in prooxidant mechanisms leading to increased IL-8 expression and maintainance of inflammation, and that – in this perspective – drug agents capable of inhibiting ELF GGT activity may represent a valid antiinflammatory approach. In a different/complementary perspective, we have also observed that GGT-dependent metabolism is required for the occurrence of anti-IL-8 effects of GSNO – which strongly suggests that this compound (rather than GSH) could represent a better candidate for aerosol treatment of CF inflamed lungs.



Andrea Battistoni, quarto da destra, con il gruppo di ricerca

Cystic Fibrosis is characterized by chronic lung inflammation, stimulated by opportunistic bacterial pathogens, caused by the persistent and massive recruitment of neutrophils in the airway

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 cellule infiammatorie che si accumulano nelle vie aeree dei pazienti FC durante il ripetersi delle infezioni producono 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. E' probabile che l'aumento stesso di GGT partecipi al consumo del GSH e concorra a indebolire le difese antiossidanti alla superficie respiratoria. Nel fluido ELF la GGT può produrre altri effetti nocivi. Noi abbiamo dimostrato infatti che la GGT può degradare il S-nitrosoglutathione (GSNO; Angeli et al., Arch. Bioch. Bioph. 2009; Pompella et al., Brev. N. PCT/IB2007/002090). Il GSNO è critico per una adeguata pervietà dei bronchi, e sembra inoltre dotato di effetti antiinflammatori. La GGT nel fluido ELF potrebbe degradare troppo GSNO, aggravando così la disfunzione respiratoria. D'altronde noi abbiamo osservato che la GGT può attivare due fattori trascrizionali (AP-1, NF- κ B), che a loro volta stimolano la produzione della citochina infiammatoria IL-8. In tal modo allora la GGT potrebbe essa stessa stimolare direttamente l'infiammazione. I nostri studi sono stati innanzitutto diretti a chiarire l'origine precisa della più alta attività GGT riscontrabile nel fluido ELF in corso di FC. Con l'impiego di una nuova procedura analitica, sviluppata nei nostri laboratori e brevettata a livello internazionale (Franzini et al., Anal. Biochem. 2008; Brev. N. PCT/IB2008/05499), abbiamo verificato che le caratteristiche molecolari dell'enzima GGT presenti negli escreti di pazienti FC sono sovrapponibili a quelle dell'enzima rilasciato dopo attivazione dei neutrofili, le principali cellule infiammatorie coinvolte nell'infiammazione polmonare. In secondo luogo, abbiamo documentato che l'attività GGT può effettivamente partecipare ai meccanismi ossidativi che mediane l'aumentata espressione di IL-8 e il protrarsi dell'infiammazione. In questa prospettiva, agenti farmacologici capaci di inibire l'attività GGT nel fluido ELF potrebbero rappresentare un valido approccio antiinflammatorio. In una prospettiva diversa e complementare, abbiamo anche osservato che gli effetti anti-IL-8 del GSNO dipendono dal metabolismo di questo agente da parte della GGT – il che suggerisce con forza che proprio il GSNO (piuttosto che il GSH) può rappresentare il candidato migliore per un trattamento inalatorio dei polmoni infiammati dei pazienti FC.

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

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

Battistoni A¹, Berlotti F²

¹Dip. Biol. Università Tor Vergata, Roma,

²Dip. Scienze di Salute Pubblica, Università "La Sapienza", Roma

(FFC Project#11/2008, completed; FFC Project#15/2010, extension)

lumen. Such an exaggerated neutrophils activation cause damage to the lung by the release of harmful molecules, including reactive oxygen species and proteolytic enzymes. Therefore, a

current challenge for CF research is to identify factors substantially contributing to inflammation and infection which could be neutralized by innovative therapeutic approaches. To this aim, we have investigated the possible involvement in lung disease of two well documented chemical modifications characterizing the airway surface liquid of CF patients, i.e. increased iron concentrations and low extracellular glutathione (GSH) levels.

Since we have previously shown that iron promotes biofilm formation by *B. cenocepacia* and its ability to invade cultured cells, we have investigated the effect of lactoferrin (Lf), an iron-binding glycoprotein endowed with a strong antibacterial activity, on the invasion efficiency of *B. cenocepacia* iron-induced biofilm as well as on the inflammatory response of infected CF bronchial cells. We have found that Lf does not significantly affect invasion efficiency, but modulates the expression of some cytokines involved in the inflammatory response. These data let us to hypothesize the possible therapeutic use of Lf to decrease inflammation in infected CF patients.

We have also investigated the GSH status in CF epithelial cells and its influence on *B. cenocepacia* infections. We have found that high levels of extracellular GSH, but not of its oxidized form GSSG, significantly impair *B. cenocepacia* ability to penetrate into epithelial cells and the inflammatory response caused by bacterial infection. Moreover, we have shown that extracellular GSH increases the level of exofacial thiols in epithelial cells, suggesting that the GSH-mediated inhibition of *B. cenocepacia* invasion occurs through an alteration of the oxidative state of disulfide bonds of membrane proteins involved in *B. cenocepacia* recognition. These results are the first demonstration that extracellular GSH may have a role in controlling the bacterial infections typical of CF and provide a rational for antibacterial and anti-inflammatory therapies based on the exogenous supply of this antioxidant molecule.

– 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



Marc Chanson (in basso a destra) e il suo gruppo di ricerca

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 airway infections. CFTR and ASL are regulated by G protein-coupled receptors (GPCRs). GPCRs are a family of receptors that sense molecules outside the cell and activate inside sig-

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

La Fibrosi Cistica (FC) è caratterizzata da un'infiammazione polmonare cronica, stimolata da batteri patogeni opportunistici, causata dal massiccio reclutamento di neutrofili nel lume delle vie respiratorie. L'esagerata attivazione dei neutrofili causa danni ai polmoni attraverso il rilascio di molecole nocive, tra cui specie reattive dell'ossigeno ed enzimi proteolitici. Quindi, una sfida per la ricerca sulla FC è quella di identificare quei fattori che contribuiscono in modo sostanziale all'infiammazione che possono essere neutralizzati attraverso nuovi approcci terapeutici. A questo scopo, stiamo studiando il possibile 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 glutazione (GSH) extracellulare.

Poiché abbiamo precedentemente dimostrato che il ferro promuove la formazione di biofilm e l'invasione delle cellule in coltura da parte di *B. cenocepacia*, abbiamo studiato l'effetto della lattoferrina (Lf), una glicoproteina capace di legare il ferro dotata di forte attività antibatterica, sull'efficienza di invasione di *B. cenocepacia* e sulla risposta infiammatoria delle cellule infettate. Abbiamo scoperto che la Lf non influenza significativamente l'efficienza di invasione, ma modula l'espressione di alcune citochine coinvolte nella risposta infiammatoria. Questi dati ci permettono di ipotizzare il possibile uso terapeutico della Lf per diminuire l'infiammazione nei pazienti CF.

Abbiamo inoltre esaminato lo stato del GSH in cellule epiteliali FC e la sua influenza sulle infezioni batteriche. Abbiamo trovato che alti livelli di GSH extracellulare, ma non della sua forma ossidata GSSG, limitano considerevolmente la capacità di *B. cenocepacia* di penetrare nelle cellule epiteliali nonché la loro risposta infiammatoria all'infezione. Il GSH extracellulare aumenta il livello di thioli esofacciali nelle cellule epiteliali, suggerendo che l'inibizione dell'invasione batterica mediata dal GSH sia dovuta ad una modifica dello stato ossidativo dei legami disolfuro in proteine di membrana coinvolte nel riconoscimento di *B. cenocepacia*. Questi risultati sono la prima dimostrazione che il GSH extracellulare può avere un ruolo nel controllare le infezioni batteriche tipiche della FC e forniscono un spiegazione razionale per terapie basate

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

Losa D¹, Dehecchi MC², Chanson M¹

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

(FFC Project#19/2009, in progress)

nals for ultimately inducing cellular responses. Increasing evidence points to a defect in the coordination of GPCR signaling in CF airway epithelial cells. Since GPCRs are also known modulators of inflammation, a defect in coordination of their signaling could be involved in the exaggerated lung inflammation in CF. Connexins (Cx) are important for intercellular coordination of tissue activity and for maintenance of tissue homeostasis; they form gap junction channels exchanging directly molecules between coupled cells, a process referred to as gap junctional intercellular communication (GJIC).

*During this first year we determined the contribution of Cxs to the ASL homeostasis. In airway epithelial cells, we found that parallel activation of CFTR and GJIC in response to GPCR stimulation induces an increase in ASL volume and mucus hydration. These effects were mostly mediated by prostaglandin E2 (PGE2) and its receptor. PGE2 is released in response to physiological and inflammatory stimuli, and is known to modulate inflammation. Interestingly, inhibition of Cx channels prevented the CFTR activation and consequent increase in ASL volume induced by PGE2. These results indicate that GJIC coordinates a signaling network, comprising CFTR and PGE2 receptors, which is required for ASL volume homeostasis. During the course of these experiments, we also observed that *P. aeruginosa* induced a marked increase in Cx expression in Calu-3 cells, suggesting that Cxs are target of *P. aeruginosa*-dependent signaling. To determine whether dysfunction of CFTR interferes with GJIC, we studied a genetically modified Calu-3 airway epithelial cell line lacking CFTR. As expected, PGE2 did not increase ASL volume in these cells. Surprisingly, the inflammatory response to *P. aeruginosa*, assessed by transcript expression of IL-8, was lower in Calu-3 cells lacking CFTR as compared to parental cells expressing CFTR. In addition, no GJIC was observed in these cells. The relationship between the pathogen, Cxs and inflammation will be further investigated during the second year of the grant. We believe that Cxs may represent a pharmacological target to hamper inflammation in CF.*

Ruolo della 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 un'esagerata infiammazione in risposta all'infezione. ASL, che dipende dallo scambio ionico transmembrana e quindi dall'azione del canale CFTR, è quindi importante per un'efficiente clearance mucociliare e rappresenta un meccanismo fondamentale per la difesa contro

le infezioni delle vie aeree. Nell'epitelio polmonare, CFTR e ASL sono regolati dai GPCR (recettori accoppiati a proteine G), una famiglia di recettori in grado di percepire la presenza di molecole all'esterno della cellula e d'indurre una risposta biologica cellulare ad esse, attraverso l'attivazione di segnali biochimici intracellulari. Un numero crescente di osservazioni indica che nelle cellule epiteliali polmonari affette da CF è presente un difetto nella coordinazione dei GPCR. 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 patologia polmonare CF. Le connessine (Cx) sono proteine che coordinano l'attività inter-cellulare nei tessuti e sono importanti nel mantenimento dell'omeostasi tissutale. Esse formano giunzioni gap in grado di permettere lo scambio diretto di molecole tra cellule adiacenti, un processo definito "comunicazione intercellulare mediata da giunzioni gap".

Durante questo primo anno abbiamo accertato il contributo delle Cx all'omeostasi del liquido di superficie delle vie aeree. Abbiamo scoperto che in cellule epiteliali bronchiali i GPCR inducono un aumento dell'idratazione del muco, attivando contemporaneamente CFTR e le giunzioni gap. Questo effetto è principalmente dovuto alla prostaglandina E2 (PGE2), molecola rilasciata dalle cellule e notoriamente coinvolta nella modulazione dell'infiammazione, in risposta a stimoli sia fisiologici che patologici. PGE2 attiva CFTR e di conseguenza aumenta l'ASL; tuttavia l'azione di PGE2 è bloccata se vengono inibite le Cx. Le Cx, quindi, attraverso la formazione di giunzioni gap, coordinano una rete di segnali cellulari, comprendenti CFTR e PGE2, che sono fondamentali per mantenere l'idratazione del muco. Allo stesso tempo, abbiamo anche osservato che *P. aeruginosa* induce un aumento delle espresioni delle Cx nelle cellule bronchiali Calu-3. Per determinare se il difetto di funzionalità di CFTR interferisce con l'azione delle Cx, abbiamo studiato una linea di cellule Calu-3 non esprimenti la proteina CFTR e, come atteso, in queste cellule PGE2 non stimola l'idratazione del muco. Sorprendentemente, *P. aeruginosa* induce una risposta infiammatoria più debole nelle cellule Calu-3 senza CFTR rispetto a quelle esprimenti il canale; inoltre, le cellule non esprimenti CFTR non formano giunzioni gap. Durante il secondo anno la relazione tra patogeno, connessine e infiammazione verrà ulteriormente indagata, poiché pensiamo che le connessine possano rappresentare un target farmacologico per diminuire l'infiammazione nella fibrosi cistica.



Background/Rationale

Persistent lung inflammation is a trademark of cystic fibrosis (CF). Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) has been unveiled in white blood cells and platelets, indicating that these cells may be primarily affected by the molecular defect of CF. Increased platelet activation and circulating platelet/leukocyte complexes have been detected in CF, suggesting that aberrant interactions between platelets and leukocytes may be of pathogenetic relevance in CF inflammation. Targeting these interactions may represent an alternative or complementary approach to combat CF lung disease.

18. Platelet-leukocyte interactions in cystic fibrosis inflammation: a window for therapeutic opportunities

Romano M¹, Evangelista V², Furnari ML³

¹Dip. Scienze Biomediche, Lab. Med. Molecolare, Università G. D'Annunzio, Chieti

²Dip. Farmacol. Translaz., Consorzio Mario Negri Sud, Chieti

³Centro Regionale FC, Ospedale G. di Cristina, Palermo

(FFC Project#22/2010, new)

Objectives

1. To define the impact of CFTR dysfunction on platelet-modulated leukocyte activities.
2. To assess the impact of CFTR dysfunction on leukocyte intracellular signaling.
3. To evaluate pharmacological modulation of deranged platelet/leukocyte interactions in CF.

Project description

We plan to investigate:

- 1) The impact of CFTR dysfunction on platelet-modulated leukocyte activities namely:
 - a) Polymorphonuclear neutrophil (PMN) and monocyte

- adhesion to human endothelial cells*
b) PMN and monocyte transmigration in human respiratory epithelial cells
c) Bacterial killing by PMN and monocyte-derived macrophages
d) Non-phlogistic phagocytosis of apoptotic PMN by monocyte-derived macrophages
- 2) Proteomic and secretomic profile of CF platelets.*
3) The impact of CTFR dysfunction on leukocyte intracellular signaling pathways, involved in adhesion and functional interactions with platelets.
4) Pharmacological options to correct deranged platelet/leukocyte interactions in CF.

- a) Phosphodiesterase inhibitors*
b) The lipoxin A4/FPR2/ALX system

To achieve these tasks, we will employ cell biology, molecular biology, proteomics approaches.

Anticipated output

The identification of mechanism of CF inflammation to be exploited for innovative pharmacological approaches to combat CF lung disease.



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

Although the life outlook for patients with Cystic Fibrosis (CF) has improved steadily over many years, many aspects of CF pathophysiology are still areas of ongoing debate that need to be clarified. Resolving some controversies will be important to identifying the most promising diagnostic strategies and treatment. We will use CF as a paradigm of how better understanding of the underlying disease process can translate into new and potentially more causative treatment approaches. Although the pathogenetic role of mutations in CFTR gene in the defective mucociliary clearance is largely undisputed, controversies exist on multiple aspects of this cascade. Whether the inability to properly handle respiratory pathogens is secondary or primarily responsible for the state of chronic inflammation seen in CF patients is an important challenge with important clinical implications. Although reactive oxygen species are generally regarded as pro-inflammatory and contribute to the pathogenesis of CF, the phagocyte NADPH oxidase system has also an anti-inflammatory role by inducing the indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), the rate-limiting enzyme in tryptophan degradation along the kynurenine pathway. IDO and the other kynurenine pathway enzymes represent a means of generating regulatory T cells (Tregs) that are known to oppose inflammatory responses in the lung driven by T helper (Th) lymphocytes secreting IL-17 (Th17). One important corollary of this model is whether therapeutic strategies in CF should target inflammation rather than attempting to reverse the primary defect of the CFTR channel. We will test the hypothesis that an inadequate activation of the IDO pathway is central to the Th17/Treg imbalance in CF. We propose to: a) assess the functional activation IDO and

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

La compromissione del sistema respiratorio rappresenta la causa più frequente di morte per i pazienti affetti da fibrosi cistica (FC). L'insufficienza respiratoria si sviluppa a causa di una eccessiva reazione infiammatoria, ma le cause che portano a una risposta infiammatoria eccessiva nei pazienti con FC non sono completamente note. Ipotizziamo che il difetto genico della FC comprometta la capacità delle cellule del sangue di rispondere adeguatamente alle infezioni e le porti invece a produrre molecole che alimentano l'infiammazione e il danno dei tessuti. In particolare, riteniamo che nella FC, si possano verificare interazioni aberranti tra piastrine e leucociti. Ci proponiamo quindi di studiare gli effetti del difetto genico alla base della FC su alcune funzioni leucocitarie e sulle interazioni di queste cellule con le piastrine e con le cellule della parete vascolare e dell'epitelio delle vie respiratorie. Ci proponiamo inoltre di valutare l'efficacia di alcune molecole come correttori di interazioni anomale tra leucociti e piastrine. Il nostro obiettivo primario è individuare meccanismi che possano essere utilizzati per la messa a punto di nuove e più efficaci terapie per combattere l'infiammazione nella FC.

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

Romani L

¹Dip. di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche/Microbiologia, Perugia
(FFC Project#21/2010, new)

of the Th17/Treg cell axis in experimental and human CF; b) identify strategies to counteract and/or overcome the excessive inflammatory response driven by the Th17/Treg imbalance; c) develop a powerful high-throughput SNPs screening to uncover potential associations between single nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes of the IDO/Th17/Treg signaling pathway and susceptibility to inflammatory/infectious diseases in CF patients.

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

Le infezioni respiratorie ricorrenti associate ad uno stato infiammatorio cronico della mucosa bronchiale sono la causa principale di morbosità e morbilità nei pazienti affetti da Fibrosi Cistica (FC). Sebbene sia assodato il ruolo delle mutazioni del gene CFTR nel difetto di barriera antimicrobica muco-ciliare, non è ben chiaro se l'incapacità a difendersi dagli agenti patogeni preceda o sia conseguenza dello stato infiammatorio. Questo concetto è fondamentale per strategie terapeutiche che mirino al mantenimento dell'omeostasi immunologica, garanzia di efficienza ed equilibrio del processo infiammatorio. La risposta immune può essere regolata in modo ambivalente da meccanismi complessi. Uno di questi è il sistema NADPH ossidasi dei fagociti e le specie reattive dell'ossigeno prodotte in seguito alla sua attivazione. Tra le specie reattive dell'ossigeno, l'anione superossido è un cofattore dell'enzima indoleamina 2,3-diossigenasi (IDO), enzima che catalizza la degradazione del triptofano attraverso la via metabolica denominata "delle chinurene". IDO e gli altri enzimi della via metabolica "delle chinurene" rappresentano un mezzo per espandere

cellule T regolatorie (Treg) che, come è ben noto, si comportano da freno immunologico a risposte infiammatorie del tessuto polmonare guidate da linfociti secerenti IL-17 (Th17). Questi ultimi sono implicati in un ampio spettro di patologie immuno-mediate che vanno dalle infezioni alle malattie cancerose. Il razionale del progetto si basa sulle seguenti evidenze: a) presenza di elevati livelli di IL-17 nell'infiammazione polmonare cronica e, più specificamente, nella saliva di pazienti con FC; b) associazione del subset Th17 con stati di infezione persistente, infiammazione cronica ed autoimmunità; c) antagonismo funzionale del subset Th17 con linfociti regolatori (Treg) indispensabili nel controllo e

nella risoluzione dell'infiammazione tessutale; d) regolazione reciproca tra Th17 e metabolismo del triptofano i cui metaboliti sono mediatori essenziali dell'omeostasi immunologica. Lo studio sarà condotto su modelli animali di FC nei quali sarà studiato l'assetto immunologico Th17/Treg e la possibilità di manipolarlo in senso anti-infiammatorio mediante l'uso di potenziali e nuovi immuno-modulatori. Contestualmente, sarà verificata, in pazienti FC, una eventuale associazione di polimorfismi genetici con l'aberrante attivazione dell'asse Th17/Treg. In caso positivo se ne verificherà la correlazione con suscettibilità alle infezioni polmonari batteriche e fungine e loro gravità.

Special interest group meeting: primary cell cultures in CF research

Leader: JV Luis Galietta



Luis Galietta

Ipotesi di servizio alla ricerca

Scopo generale

Il Servizio intende offrire ai gruppi di ricerca della rete FFC, ed in via secondaria ad altri ricercatori attivi in questo campo, la possibilità di lavorare su colture epiteliali primarie di cellule epiteliali bronchiali di pazienti FC e di soggetti di controllo.

Considerazioni generali

Le colture primarie di cellule epiteliali bronchiali (CEB) rappresentano un modello molto importante per la ricerca FC. Al momento, molti studi sono effettuati su linee cellulari immortalizzate, che costituiscono una valida alternativa pur avendo, come noto, inevitabili limiti. Per questo, è spesso opportuno convalidare su una coltura primaria i risultati ottenuti su linee cellulari. Le CEB primarie sono un campione biologico difficile da ottenere e mantenere. La FFC intende promuovere l'uso delle CEB primarie nei laboratori che si occupano di FC attraverso la creazione di un servizio che raccolga le cellule da centri di trapianto polmonare e le renda disponibili ai ricercatori FC dopo una prima fase di espansione in coltura. È

ovvio che tali cellule rappresentano una risorsa non rinnovabile, in quanto ogni lotto di cellule CEB può essere coltivato per un numero limitato di passaggi. Pertanto, sarà opportuno definire dei criteri per l'assegnazione delle cellule (es. cellule di pazienti omozigoti per ΔF508 solo per studi specifici collegati a questa mutazione) e un eventuale numero massimo di cellule per laboratorio. È in corso una sperimentazione di fattibilità di un tale servizio.

Cosa offre

- l'invio di cellule epiteliali bronchiali umane congelate (da 0.5 a 1 milione di cellule per spedizione) ai primi passaggi dopo l'isolamento e la prima fase di coltura in vitro;
- eventuale terreno di coltura "serum-free" per l'ulteriore espansione del numero di cellule;
- assistenza e formazione per l'allestimento della coltura e la produzione di epители bronchiali differenziati su supporti porosi (Snapwell).

A chi è rivolto

A ricercatori che siano interessati a svolgere esperimenti su colture primarie di epitelio bronchiale per convalidare dati ottenuti su linee cellulari, su progetti validati da un sistema di peer-review internazionale, in primis quelli selezionati e finanziati dalla Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica.

Basic science of and therapeutic approaches for bacterial airway infection

Search of novel antimicrobial targets

Moderator: Gerd Döring

Introduction by Paolo Landini



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 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 (QS) 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 has been the identification of a new generation of "anti-virulence" drugs acting against the QS and/or pyoverdine signalling systems, and hence against the ability of *P. aeruginosa* to cause infection. Research laboratories and biotech companies have huge libraries of compounds with potential anti-virulence activity, however methods for the fast and cost-effective screening of these libraries are lacking.

In the first part of this project, different whole-cell biosensors for the detection of compounds able to inhibit QS or pyoverdine signalling were constructed and tested. Then, we focused on the most promising biosensor, named PA14-R3. This biosensor is able to directly detect picomolar concentrations of 3OC12-HSL, the main QS signal molecule produced by *P. aeruginosa*. Since PA14-R3 can be used in microtiter plates and results are made available in approximately 4 hours, it is well suited for high-throughput screening of 3OC12-HSL levels. Using PA14-R3, we developed a cost-effective method for the high-throughput screening of QS inhibitors. A library of 1,120 highly diverse drugs was screened in few months and two promising QS inhibitory compounds were found. Moreo-

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

Leoni L¹, Visca P²

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

²Lab. Microbiologia clinica e Virologia, Dip. Biologia, Università "Roma Tre"

(FFC Project#8/2008, completed)

ver, we showed that PA14-R3 can be used for the direct detection of 3OC12-HSL in sputum samples from CF patients, paving the way to high-throughput studies aimed at correlating 3OC12-HSL levels in the sputum with the progression of the *P. aeruginosa* chronic infection.

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

L'infezione cronica 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 ed alla formazione di biofilm. Una strategia terapeutica innovativa è quella di affiancare agli antibiotici dei farmaci "anti-virulenza", in grado di inibire in modo specifico la capacità di *P. aeruginosa* di proliferare e persistere nel polmone FC. Le industrie farmaceutiche ed i laboratori di ricerca posseggono collezioni di migliaia di composti che potrebbero essere testati per trovare quelli con attività "anti-virulenza", tuttavia per poter eseguire questi test è necessario sviluppare dei sistemi ad hoc rapidi ed economicamente sostenibili. Il "quorum sensing" ed il "pyoverdine signalling" sono dei meccanismi utilizzati da *P. aeruginosa* per mettere in atto il processo infettivo e formare il biofilm, e quindi costituiscono dei promettenti bersagli per lo sviluppo di farmaci "anti-virulenza".

L'obiettivo generale di questo progetto è stato la messa a punto di biosensori per l'identificazione rapida di molecole in grado di inibire il "pyoverdine signalling" ed il "quorum sensing". Nella prima parte del progetto abbiamo costruito e testato una serie di biosensori per la loro capacità di identificare inibitori di questi due processi. In seguito, abbiamo concentrato i nostri sforzi sul biosensore più promettente. Questo biosensore, chiamato PA14-R3, è in grado di rilevare in piccolissimi volumi ed in poco tempo concentrazioni picomolari di 3OC12-HSL, la principale molecola

prodotta da *P. aeruginosa* nel processo del quorum sensing. PA14-R3 è adatto all'analisi simultanea di centinaia di campioni e grazie ad esso abbiamo testato in pochi mesi una collezione di 1,120 composti ed abbiamo identificato due possibili composti "antivirulenza". Inoltre PA14-R3 può anche essere usato per rilevare in



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

The poor efficacy of antibiotics in eradicating the chronic lung infection caused by *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis (CF) patients calls for the development of novel antimicrobial therapies. An innovative approach in such direction is the use of drugs able to specifically inhibit the development of the chronic infection. Targeting of the pathogenic potential has the advantage of reducing the bacterial adaptability to the host environment and the severity of the infection without creating, in principle, the selective pressure generally caused by conventional antibiotics. In the CF patient, the use of these drugs is expected to provide the host immune system with a better chance of clearing the infection. In *P. aeruginosa*, iron uptake and quorum sensing (QS) are processes critical for the establishment of the infection, representing ideal targets for the development of such drugs.

In our previous researches on *P. aeruginosa*, we characterized key iron-uptake strategies and the RsaL protein, a master suppressor of QS and virulence. Recent studies indicate gallium as a potent inhibitor of iron metabolism. In addition, efflux pumps inhibitors (EPI) have been proposed as QS inhibitors, since QS signal molecules are secreted through efflux pumps. It is worth mentioning that gallium is already approved for medical use by the US Food and Drug Administration (FDA), while some EPI are tested in clinical trials as antibiotic therapy adjuvants.

Taking into account the peculiar features of CF lung chronic infection, two main objectives will be pursued: 1) characterization of *P. aeruginosa* key factors involved in iron uptake and QS in the lung environment and their evaluation as drug targets; 2) characterization of the activity of gallium, efflux pump inhibitors (EPI), and RsaL protein against *P. aeruginosa* chronic infections.

The specific role played in *P. aeruginosa* chronic infection by iron-uptake systems, the RsaL protein and the QS signals efflux pumps will be evaluated *in vitro*, in CF clinical strains and *in vivo* in a murine model of chronic lung infection. The same model will be used to preliminarily test the feasibility of gallium treatments in the therapy of CF infections. Finally, selected EPI will be evaluated for their activity against QS, biofilm formation and virulence in *P. aeruginosa* reference strains and in CF clinical strains.

modo semplice e diretto la presenza di 3OC12-HSL negli espettorati dei malati FC. Pertanto potrebbe essere utilizzato in studi su larga scala volti ad acquisire informazioni sulla correlazione esistente tra il quorum sensing e l'andamento dell'infezione nel paziente FC cronicamente infettato da *P. aeruginosa*.

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

Visca P¹, Leoni L²

¹Lab. Microbiologia clinica e Virologia, Dip. Biologia, Università "Roma Tre"

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

(FFC Project#14/2010, extension FFC Project#10/2007)

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

L'infezione cronica ad opera del batterio *Pseudomonas aeruginosa* è la principale causa di perdita della funzionalità polmonare negli individui affetti da Fibrosi Cistica (FC). Le terapie antibiotiche tradizionali dirette ad inibire la crescita batterica sono spesso inefficaci nell'eradicare l'infezione cronica polmonare da *P. aeruginosa*, soprattutto a causa dell'emergere di ceppi resistenti agli antibiotici e della formazione di biofilm. In *P. aeruginosa* i processi che controllano il metabolismo del ferro e la comunicazione tra batteri (quorum sensing) sono necessari per l'instaurarsi dell'infezione e per la produzione di biofilm, e pertanto rappresentano dei promettenti bersagli per lo sviluppo di nuovi farmaci. L'uso di tali farmaci darebbe al sistema immunitario migliori possibilità di risolvere spontaneamente l'infezione rendendo meno probabile l'insorgenza di ceppi resistenti. In un precedente progetto abbiamo caratterizzato alcuni dei più importanti sistemi di acquisizione del ferro di *P. aeruginosa* ed abbiamo identificato un fattore, la proteina RsaL, in grado di sopprimere il quorum sensing ed il processo infettivo. Inoltre, dalla letteratura sono emersi nuovi studi che suggeriscono come composti a base di gallio, che interferiscono con il metabolismo del ferro, e composti che inibiscono la secrezione delle molecole del quorum sensing (dall'inglese, efflux pump inhibitors o EPI), potrebbero inibire il processo infettivo di *P. aeruginosa*. È importante notare che farmaci a base di gallio sono già stati approvati per la cura di malattie umane, mentre alcuni EPI si trovano in fase clinica di studio per valutarne il possibile impiego come adiuvanti della terapia antibiotica nel trattamento di infezioni batteriche.

In questo progetto intendiamo studiare il ruolo specifico svolto dai processi di trasporto del ferro e delle molecole del quorum sensing nell'infezione polmonare cronica, anche usando modelli animali di virulenza. Inoltre, verrà valutata la capacità di alcuni composti a base di gallio, della proteina RsaL e di alcuni EPI di inibire il processo infettivo causato da *P. aeruginosa* nel contesto specifico dell'infezione polmonare cronica. Ci aspettiamo, al termine dei due anni di progetto, di dare un'indicazione chiara sul potenziale utilizzo dei fattori sopra descritti per lo sviluppo di terapie in grado di prevenire e/o controllare l'infezione polmonare causata da *P. aeruginosa* nei malati di FC.



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

The general aim of this project is to develop a new enzymatic technology based on QS signals quenching able to counteract the *Pseudomonas* growth and virulence. We propose to analyse the effect *in vitro* and *in vivo* of thermostable PLLs, on the *P. aeruginosa* growth and infection in comparison with human PON1 and PON2 enzymes known to counteract the *Pseudomonas* QS system.

Quorum Sensing is an interbacterial mode of communication accomplished through the coordinated production, secretion, and detection of chemical signals (QS signals) that trigger the expression of specific bacterial genes. The QS signals self-produced by *Pseudomonas aeruginosa* are in the form of small molecules, or autoinducers, termed acyl-homoserine lactones (acyl-HSLs). *P. aeruginosa* uses acyl-HSL quorum-sensing molecules to regulate the expression of genes implicated in virulence (elastase, pyocyanin, motility) and biofilm formation. Biofilm formation is the main problem for eradication of bacterial infection in disease like Cystic Fibrosis. Promising new therapies that target biofilm formation include molecules (quenching enzymes or small molecules) that disrupt QS. It has been shown that all of the human PONs can inactivate 3OC12-HSL. The question of whether there is direct involvement of the QS system in biofilm formation has been a key issue for some time. However, in a mouse infection model, QS inhibitory drugs reduce biofilm formation. In addition, PON1 inhibits *P. aeruginosa* biofilm growth in an *in vitro* biofilm model as well as in an *in vivo* animal model. We have recently cloned, overexpressed, purified and characterised three thermophilic and thermostable phosphotriesterase-like lactonases from the archaea *Sulfolobus solfataricus* (*SsoPox*) and *S. acidocaldarius* (*SacPox*) and the bacterium *Deinococcus radiodurans* (*DraPox*). The enzymes have predominant lactonase activity and promiscuous paraoxonase activity. A prominent property is the intrinsic stability not only to temperature but also to other stressing agents (detergents, organic solvents, oxidants). The most relevant result to the aim of the present project is the demonstration that the enzymes are able to degrade *in vitro* the natural QS lactones. We previously demonstrated that *SsoPox* is able to degrade QS lactones and in doing so the reaction with biosensor CV026 is abolished. We have also demonstrated that *SacPox* possesses the same activity and at the same level.

The aim of our project is to evaluate the ability of these enzymes to interfere with virulence and biofilm formation. Preliminary experiments with *Pseudomonas* (PAO1) suggest that the three enzymes substantially inhibit motility *in vitro*.

22. Exploring thermo-stable quorum quenching lactonases to counteract bacterial infections in cystic fibrosis

Manco G¹, Andreacci D²

¹Ist. Biochimica delle Proteine, CNR Napoli,

²Ist. Genetica e Biofisica, CNR Napoli

(FFC Project#10/2010, new)

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

Lo scopo di questo progetto è lo studio di nuove molecole (lattonasi termostabili) in grado di contrastare il meccanismo chiamato "quorum sensing" (QS), di cui il batterio *Pseudomonas aeruginosa* è dotato. Questo meccanismo permette a *Pseudomonas* l'aggregazione in colonie (chiamata "biofilm") particolarmente resistenti alla terapia antibiotica e alle difese innate dell'organismo. L'efficacia di queste nuove molecole sarà studiata *in vitro* e *in vivo* (modelli animali) e sarà paragonata all'attività di enzimi come PON1-2 normalmente presente nell'uomo e conosciuti per la loro attività di contrasto al quorum sensing di *Pseudomonas*.

Il Quorum Sensing è un particolare modo di comunicazione interbatterica che si esplica attraverso la produzione, rilascio e captazione di segnali chimici (segnali QS) che attivano l'espressione di specifici geni batterici. I segnali QS rilasciati da *Pseudomonas aeruginosa* sono nella forma di piccole molecole o autoinduttori, gli acil omoserina lattoni (acylHSLs). *P. aeruginosa* usa gli omoserina lattoni per regolare l'espressione di geni implicati nella virulenza (elastasi, piocianina, motilità) e nella formazione del biofilm. La formazione del biofilm è la principale causa della difficoltà di eradicazione dell'infezione in pazienti quali quelli affetti da fibrosi cistica. Esistono nuove promettenti terapie (enzimi quorum quenching, piccole molecole) che hanno come target il dissolvimento del biofilm. È stato dimostrato che tutte e tre le paraoxonasi/lattonasi umane (PON1-3) sono in grado di inattivare il 3OC12-HSL. La questione se il QS sia implicato nella formazione del biofilm è stata dibattuta per lungo tempo. Tuttavia in un modello di infezione murina, molecole che inibiscono il QS sono in grado di ridurre la formazione del biofilm. Inoltre la PON1 è in grado di inibire la formazione del biofilm *in vitro* e in un sistema modello *in vivo*.

Nel nostro laboratorio abbiamo recentemente clonato, espresso, purificato e caratterizzato tre enzimi termofili e termostabili della famiglia delle lattonasi fosfotriesterasi-simili, due da Archea (*Sulfolobus solfataricus* e *acidocaldarius*) e una da *Deinococco radiodurans*, un batterio termofilo. Gli enzimi hanno attività lattonasiche e attività promiscua fosfotriesterasiche. Una importante proprietà di questi enzimi è la loro intrinseca stabilità che si riflette anche nella stabilità ad altri agenti denaturanti (detergenti, solventi organici, ossidanti). La proprietà più rilevante ai fini di questo progetto è la capacità di questi enzimi di degradare *in vitro* i lattoni QS. Questo è stato dimostrato prima con *SsoPox* utilizzando come biosensore il ceppo CV026 e poi è stato confermato anche per *SacPox* che possiede livelli simili di attività.

Il principale obiettivo del nostro progetto sarà quello di verificare la possibilità che questi enzimi interferiscano con la virulenza e la formazione del biofilm in *P. aeruginosa* sia *in vitro* che in un modello animale *in vivo*. Esperimenti preliminari con PA01 sembrano indicare inibizione sostanziale della motilità.



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

In cystic fibrosis (CF) patients, bacterial infection of the respiratory tract can cause very severe, and often fatal, forms of pneumonia. These infections are caused by bacterial biofilms, in which the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* plays a dominant role. The physiological properties of bacterial biofilms make them less sensitive to antibiotics, even after prolonged treatments. The production of extracellular matrix that characterizes bacterial biofilms is strongly influenced by a signal molecule, cyclic di-GMP (c-di-GMP). The enzymes in the metabolism of c-di-GMP are highly conserved among bacteria but absent in humans, which makes these proteins attractive targets for the control of the development of bacterial biofilms. In recent years, we have outlined a strategy to search for inhibitors of the synthesis of c-di-GMP that would be able to block biofilm formation. Our work has led to the identification of two molecules that can inhibit the synthesis of c-di-GMP in the model bacterium *Escherichia coli*. Unfortunately, neither of these molecules has shown activity on *P. aeruginosa*, although they have confirmed their antibiofilm activity on different clinical isolates of *E. coli*. We are currently isolating proteins with biosynthetic c-di-GMP activity, in order to study their behavior in highly purified systems and to verify the mechanism of action of the molecules identified in our previous experiments. The discovery of a direct inhibitor of the biosynthetic enzymes of c-di-GMP would be of great scientific interest; in addition, chemical modifications could improve their activity towards *P. aeruginosa*, possibly making them useful drugs in the treatment of infections in CF patients.



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

Signal transduction, the process by which a cell receives and responds to stimuli, lies at the heart of many interesting and important processes, including inflammation. Second messengers are molecules that relay signals received at receptors on the cell surface – such as the arrival of hormones, growth factors, patho-

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

Landini P¹, Seneci P², Bernardi A³, Cutruzzolà F⁴

¹Dip. Scienze Biomolecolari e biotecnologiche, Università di Milano

²Dipart. Chimica Industriale e Organica, Università di Milano

³Dipart. Chimica Industriale e Organica, Università di Milano

⁴Dipart. Scienze biochimiche, Università "La Sapienza", Roma (FFC Project#13/2009, in progress)

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. La produzione della matrice extracellulare che caratterizza i biofilm batterici è fortemente influenzata da una molecola segnale, il di-GMP ciclico (c-di-GMP). Gli enzimi del metabolismo del c-di-GMP sono altamente conservati tra i batteri, ma assenti nell'uomo; questo rende queste proteine dei bersagli interessanti per il controllo dello sviluppo dei biofilm batterici. Negli anni scorsi, abbiamo delineato una strategia per la ricerca di inibitori della sintesi del c-di-GMP in grado di bloccare la formazione di biofilm, che ci ha portato all'individuazione di due molecole in grado di inibire la sintesi del c-di-GMP nell'batterio modello *Escherichia coli*. Purtroppo, nessuna delle due molecole ha mostrato attività su *P. aeruginosa*, pur mostrando un'interessante attività antibiofilm su diversi isolati clinici di *E. coli*. Attualmente stiamo isolando proteine con attività di sintesi di c-di-GMP per studiare il loro comportamento in sistemi altamente purificati e poter verificare il meccanismo d'azione delle molecole identificate nei nostri esperimenti precedenti. La scoperta di un inibitore diretto degli enzimi biosintetici del c-di-GMP sarebbe di grande interesse scientifico; inoltre, modificazioni chimiche potrebbero migliorare la loro attività verso *P. aeruginosa*, rendendole un possibile farmaco di utilizzo nel trattamento delle infezioni di questo batterio.

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

Pinton P

Dip. Medicina Sperimentale e Diagnostica, Università di Ferrara (FFC Project#12/2010, new)

gens, etc. – to target molecules in the cytosol and/or nucleus. But in addition to their job as relay molecules, second messengers serve to greatly amplify the strength of the signal. Binding of a ligand to a single receptor at the cell surface may end up causing massive changes in the biochemical activities within the cell. Re-

cent evidences suggest that among the intracellular second messengers, intracellular Ca²⁺ and its effector, the Protein Kinase C (PKC), play an important role in transducing the cell interaction of *Pseudomonas aeruginosa* in a inflammatory response.

The hypothesis underlying this proposal is that the comprehension of the mechanisms regulating intracellular second messengers in response to *Pseudomonas aeruginosa* may have a significant impact for development of novel therapies for treatment of inflammation in CF patients. Preliminary experiments indicate that this is a very promising line of research. Indeed, both Ca²⁺ and PKC undergo to important modifications during PAO infection. The project should obtain the following results: i) Identification of involvement of Ca²⁺ homeostasis and of mitochondria and PKC in controlling activation of innate immune responses triggered by PAO ii) if compounds acting on Ca²⁺, mitochondria or PKC can be used for pharmacological strategies to contrast the PAO-dependent innate immune response.

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

La trasduzione del segnale, il processo mediante il quale una cellula riceve e risponde ad uno stimolo, è al centro di molti dei più interessanti ed importanti processi, inclusa l'infiammazione. I secondi

messaggeri sono molecole che rilasciano segnali ricevuti dai recettori posti sulla superficie delle cellule, come l'arrivo di ormoni, fattori di crescita, patogeni, ecc., per direzionare molecole nel citosol e/o nel nucleo. Oltre al loro lavoro di rilascio di molecole, i secondi messaggeri intervengono nell'amplificare maggiormente la forza del segnale. Il legame di un ligando ad un singolo recettore sulla superficie della cellula induce massivi cambiamenti nell'attività biochimica all'interno della cellula stessa. Recenti studi suggeriscono che, tra i secondi messaggeri intracellulari, il Calcio intracellulare ed un suo effettore, la Protein Kinase C (PKC), svolgono un ruolo importante nel trasdurre l'interazione cellulare di *Pseudomonas aeruginosa* nella risposta infiammatoria. L'ipotesi alla base di questo progetto è che la comprensione di questi meccanismi che regolano i secondi messaggeri intracellulari in risposta a *Pseudomonas aeruginosa* potrebbe avere un effetto significativo per lo sviluppo di nuove terapie per il trattamento dell'infiammazione in pazienti affetti da fibrosi cistica. Risultati preliminari indicano che questa è una linea di ricerca molto promettente. Infatti sia il segnale Ca²⁺ che le PKC vanno incontro a importanti modificazioni a seguito di infezioni da *Pseudomonas aeruginosa*, PAO. Al termine del seguente progetto si dovrebbero quindi ottenere i seguenti risultati: i) una maggior comprensione dell'importanza del segnale Ca²⁺, dei mitocondri e delle PKC nell'attivazione della risposta immunitaria innata innescata da PAO ii) se composti che agiscono sull'omeostasi del Ca²⁺, mitocondri e PKC possono essere farmacologicamente importanti per contrastare la risposta immunitaria innata scatenata da PAO.



Giovanni Bertoni, primo a sinistra, e il suo gruppo di ricerca

The long-term outlook of this project is the development of novel antibacterial drugs able to elude the 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 aimed 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 candidate essential functions of *P. aeruginosa* 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 PNAs pairing along the mRNA of two selected target. These PNAs showed a certain degree, unfortunately low, of inhibition activity of the bacterial growth at micromolar concentrations. The inhibition

25. Design of non-conventional antibiotics against cystic fibrosis-related pathogens

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

¹Dip. di Scienze Biomolecolari e Biotecnologie, Università degli Studi di Milano

²Dip. di Chimica Organica e Industriale, Università degli Studi di Milano

(FFC Project #6/2008, completed)

occurs at the end of the bacterial growth indicating inefficient PNA uptake into the bacterial cells. The future perspectives of this project are the design of a broader collection of PNAs against the same targets with the aim to improve the PNA uptake through the use of innovative carriers.

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 inibire 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 antisenso 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 antisenso avviene normalmente attraverso il blocco della traduzione dell'RNA messaggero del gene bersaglio.

Questo progetto si prefissò 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 funzioni candidate 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 antisenso. Utilizzando la bioinformatica applicata all'analisi strutturale dell'RNA, abbiamo disegnato PNA che si appaiano lungo l'RNA messaggero di due geni bersaglio. Questi PNA mostrano

un'attività, purtroppo non elevata, di inibizione della crescita batterica a concentrazione micromolare. Questa inibizione si manifesta alla fine della crescita del batterio indicando possibili problemi di ingresso del PNA nella cellula batterica. Le prospettive future di questo progetto sono di disegnare altri PNA contro gli stessi bersagli cercando di migliorare l'ingresso del PNA nei batteri attraverso l'uso di carriers innovativi.



Giovanna Riccardi

Over the last decades, *Burkholderia cenocepacia* has emerged as an important respiratory pathogen in the Cystic Fibrosis community. Pulmonary colonization/infection by these bacteria may persist for months or even years and some patients exhibit a rapid clinical deterioration associated with severe respiratory inflammation, epithelial necrosis and invasive disease, a condition known as cepacia syndrome. Antimicrobial therapy for *B. cenocepacia* is often ineffective as members of the *B. cenocepacia* complex are highly resistant to most clinically relevant antimicrobial agents and disinfectants. Among mediators of multi-drug resistance in Gram-negative bacteria, particularly interesting are transporters belonging to the RND (Resistance-Nodulation-Cell Division) family, which catalyze the active efflux of many antibiotics and chemotherapeutic agents. We previously identified and named the operons encoding the RND efflux pumps in *B. cenocepacia* RND-1 to RND-16. Employing a recently developed mutagenesis strategy, we successfully deleted three of these operons in *B. cenocepacia* strain J2315 finding a significant reduced accumulation of lactones in the growth medium of one mutant, and for two mutants a higher sensitivity to different compounds, indicating the involvement of these proteins in biofilm formation and in drug resistance. The aim of this work is to analyze new mutants of *B. cenocepacia* J2315 impaired in other rnd genes to assess their role in the efflux of toxic compound and to compare the transcriptome of mutants with that of the wild-type strain using microarray analysis, in collaboration with Dr. Mahenthiralingam of the University of Cardiff. To this purpose we focused the attention on the previously characterized RND-4 and on RND-9. After a global analysis of the microarray data obtained, different gene lists were generated: genes induced in each mutant vs wild-type J2315, down-regulated genes in each mutant strain vs J2315, genes differentially expressed in common among the different mutants. Using a functional enrichment analysis it was possible to individuate statistically significant functional categories that are differentially expressed in the efflux pump(s)-deleted mutants strains in respect to the wild-type: the motility and adherence and the chemotaxis associated genes. Our data were confirmed both by qRT-PCR and by phenotypic analysis, thus confirming the role of efflux pumps in important pathways. Moreover, our aim is also the construction of a *B. cenocepacia* strain containing multiple rnd inactivated genes. In this way we succeeded in obtaining a double mutant D4/D9, which was characterized by microarray analysis, showing some similarities with D4 mutant, and a triple mutant (D4/D9/D14). In the future we hope to achieve the construction

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

Riccardi G

Dip. Genetica e microbiologia, Università degli Studi di Pavia
(FFC Project#15/2009, in progress)

of a multiple inactivated strain which could lead to an attenuated strain, useful for the design of a vaccine.

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

Negli ultimi anni *Burkholderia cenocepacia* è emerso come uno dei patogeni più importanti associati alla Fibrosi Cistica. Le colonizzazioni/infezioni polmonari provocate da questi batteri possono protrarsi per mesi o anni e alcuni pazienti mostrano un rapido declino clinico associato a gravi infiammazioni respiratorie, necrosi epiteliale e malattie invasive, una sindrome nota come "sindrome da cepacia". La terapia antimicrobica contro *B. cenocepacia* è spesso inefficace in quanto membri del *B. cenocepacia* complex sono altamente resistenti alla maggior parte degli agenti antimicrobici clinicamente rilevanti e ai disinfettanti. Tra i mediatori della resistenza multipla agli antibiotici nei batteri Gram-negativi particolarmente interessanti sono i trasportatori appartenenti alla famiglia RND (Resistance-Nodulation-Cell Division), che catalizzano l'efflusso di parecchi antibiotici e agenti chemioterapici.

Il nostro gruppo ha identificato in precedenza gli operoni codificanti le pompe di efflusso RND in *B. cenocepacia*, denominandoli RND-1/RND-16. Utilizzando una strategia messa a punto recentemente, abbiamo inattivato con successo tre di questi operoni nel ceppo *B. cenocepacia* J2315, riscontrando un ridotto accumulo di lattoni nel terreno di coltura di due dei mutanti e una maggior sensibilità a diversi composti antimicrobici, indicando il loro coinvolgimento nella formazione di biofilm e nella resistenza agli antibiotici.

Lo scopo di questo lavoro è analizzare nuovi mutanti di *B. cenocepacia* J2315 deleti in altri geni rnd per stabilire il loro ruolo nell'efflusso di composti tossici e di confrontare il profilo trascrittomico dei mutanti con quello del ceppo wild-type utilizzando la tecnica dei microarray, in collaborazione col Dr. Mahenthiralingam dell'Università di Cardiff. A questo scopo abbiamo focalizzato la nostra attenzione sulla pompa RND-4 e su RND-9. Da un'analisi globale dei dati di microarray ottenuti, sono stati generati diversi elenchi: geni indotti in ciascun mutante contro il wild-type J2315, geni sottoespressi nei mutanti contro J2315, geni differenzialmente espressi e comuni tra i mutanti. Utilizzando un'analisi di arricchimento funzionale è stato possibile individuare geni statisticamente significativi appartenenti a categorie funzionali, differenzialmente espressi nei mutanti rispetto al wild-type: i geni associati alla motilità e aderenza e alla chemotassi. I nostri dati sono stati confermati sia mediante qRT-PCR sia mediante analisi fenotipica, confermando il ruolo dei trasportatori RND in importanti pathways. Inoltre, lo scopo del nostro lavoro è costruire un ceppo di *B. cenocepacia* inattivato in più geni rnd. Siamo riusciti ad ottenere un doppio mutante D4/D9, caratterizzato mediante microarray, che mostra analogie col mutante D4, e un triplo mutante (D4/D9/D14). In futuro speriamo di ottenere un inattivato multiplo che possa portare ad un ceppo attenuato utile per lo sviluppo di un vaccino.

CFTR structure/function and its rehabilitation

Structure and pathophysiology of CFTR protein

Moderator: Antonio Cao

Introduction by Valeria Casavola



Valeria Casavola, seconda da sinistra, e il suo gruppo di ricerca

Lungs affected with Cystic Fibrosis (CF) have two defects: 1) they do not have the protein CFTR expressed on the apical membrane of the respiratory epithelial cells and; 2) they have an exaggerated influx of inflammatory cells (PMN) in the airway lumen. Clearly both of these defects are responsible for the pathological and clinical consequences in the lung. Recent studies have highlighted the role of the interaction of PDZ proteins with CFTR in the regulation of both the activation and stability of CFTR in the apical membrane.

We have already demonstrated that the over-expression of the PDZ interacting protein, NHERF1, in CF airway cells homozygous for F508del CFTR induce a redistribution of F508del CFTR from the cytoplasm to the apical membrane. Moreover, we found that NHERF1 modulates the actin cytoskeleton organization, favours F508del CFTR stability on the membrane and rescues the chloride secretion, by the formation of a multiprotein complex. In this project, we propose to uncover the mechanism underlying this phenomenon of 'recovery' of the mutated CFTR protein function. To do this, we are studying how NHERF1 interacts with other intracellular molecules known to be important for transport of CFTR to the apical membrane, such as: ezrin (a small protein that anchors PKA) and F-actin (a component of the cytoskeletal filaments of the cytoskeleton). In parallel, we are investigating whether these molecules are involved in the creation of the barrier function of the respiratory epithelium by studying its "tightness".

During the first year of this project, we have observed that the airway CF cells, compared to healthy cells, have both a highly disorganized actin cytoskeleton and an alteration of the protein complexes with a consequent incorrect compartmentalization of PKA and ezrin in the microareas directly under the cell membrane. Further, we observed a reduction in cell-cell junction organization with a consequent increase in permeability. Treating these FC cells such to increase the expression of either NHERF1 or activated ezrin resulted in (i) an increased organization actin cytoskeleton with the consequent restoration compartmentalization of PKA near the cell membrane; (ii) the rescue of chloride secretory activity with

27. Interactome in Cystic Fibrosis: role of NHERF1 in actin cytoskeleton and tight junction pathophysiology

Casavola V¹, Conese M²

¹ Dip. di Fisiologia Generale ed Ambientale, Università di Bari

² Dip. di Scienze Biomediche, Università di Foggia

(FFC Project#1/2009, in progress)

the consequent (iii) re-organization of the cell-cell junctions. In the course of the second year of this project we will proceed with the identification of the proteins that can augment the stability of mutated CFTR on the membrane, increase its chloride secretion and decrease the permeability between cells. At the end of this study, we will have a better understanding of possible novel therapeutic targets that will permit us to correct the defect that is at the basis of CF and its resulting inflammatory pulmonary disease.

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

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

Negli ultimi anni particolare interesse è stato rivolto allo studio del ruolo modulatorio di proteine cellulari che, interagendo con CFTR, ne regolano l'inserimento e la stabilità sulla membrana cellulare. I due gruppi di ricerca proponenti il progetto, hanno dimostrato che è possibile indurre, mediante l'aumento di concentrazione di una piccola proteina NHERF1 in cellule respiratorie FC in coltura, omozigoti per la mutazione F508del CFTR, il ripristino della presenza funzionale della proteina CFTR mutata sulla membrana cellulare. Inoltre abbiamo osservato che NHERF1 modula l'organizzazione del citoscheletro cellulare costituito da filamenti di actina e promuove la formazione di un complesso multiproteico che favorisce l'inserimento nella membrana apicale della proteina CFTR mutata con conseguente ripristino della fisiologica secrezione di cloro.

Questo progetto si propone di definire i meccanismi di formazione dei complessi multiproteici costituiti da NHERF1 con l'ezrina (proteina di ancoraggio per la proteinchinasi AMPc dipendente) e con l'actina (componente dei filamenti citoscheletrici) ed il ruolo dei complessi multiproteici nell'organizzazione citoscheletrica e nella permeabilità delle giunzioni cellula-cellula che costituiscono una barriera fra l'ambiente interno ed esterno.

Nel corso del primo anno di svolgimento del progetto abbiamo

osservato che le cellule bronchiolari FC in coltura, rispetto alle cellule sane, mostrano sia un citoscheletro disorganizzato che una alterazione dei complessi multiproteici, con conseguente mancata compartimentazione delle chinasi e di ezrina in microaree vicine alla membrana cellulare. Abbiamo inoltre osservato una riduzione dell'organizzazione delle giunzioni tra cellule e conseguente aumentata permeabilità.

Trattando le cellule FC in modo da aumentare la concentrazione di NHERF1 o di ezrina attiva, abbiamo osservato i.) una aumentata organizzazione dei filamenti di actina con una conseguente



Alberto Luini, secondo da destra, e il suo gruppo di ricerca

*Cystic Fibrosis is caused by mutations associated with the gene encoding the chloride channel, Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator (CFTR). Nearly 70% of the patients carry the allele DF508, where phenylalanine at position 508 of the protein is lost leading to misfolding and retention of the protein in the Endoplasmic Reticulum. The mutations result in the absence of chloride channel activity at the apical membrane of epithelia lining the lung, gut, testis etc leading to dehydration and pathologically thickened mucus, as well as chronic inflammation and frequent infections. Thus Cystic Fibrosis is a disease associated with the improper trafficking of the chloride channel and so we have attempted here to modulate the trafficking machinery to rescue the mutant CFTR from intracellular retention and transport it to the plasma membrane. It has been shown in yeast cells that COPII machinery, a key component of the secretory trafficking, plays a role in the segregation of CFTR to aggresomes where it is degraded (*J Cell Biol.* 2003 160(2):157-63) and in a related series of studies, CFTR has been reported to take an unconventional secretory route at least under certain circumstances (*J Biol Chem.* 283(2):833-9 and *J Biol Chem.* 277(13):11401-9). Putting them together we hypothesised that reduction in the COPII machinery might not only prevent the degradation of the mutant CFTR but also increase the flux through the unconventional secretory pathway allowing its transport to the plasma membrane. We tested this hypothesis and show that such an unconventional transport pathway can indeed be activated when selected COPII components like Sar1b or Sec23 are downregulated. We have also developed a synchronization protocol using regulated secretion/aggregation kit from Ariad to map this unconventional transport route. We are at present engaged in identifying and characterising the morphological and molecular machineries involved in this unconventional transport. Given that the reduction in the flux through the conventional secretory transport route can activate or divert the cargo flux (atleast for CFTR) through the unconventional route, we are also exploring the use of siRNA or drugs known to downregulate the conventional transport route (like protein kinase inhibitor H89), as possible candidates for therapeutic drugs.*

compartimentazione delle chinasi nei pressi della membrana ii) il ripristino dell'attività secretoria di cloro iii) una significativa riorganizzazione delle giunzioni cellula-cellula.

Nel corso del secondo anno i nostri studi proseguiranno nell'identificazione di proteine che possano aumentare la stabilizzazione della CFTR mutata sulla membrana, aumentarne l'attività secretoria e diminuire la permeabilità tra cellule, allo scopo di individuare possibili bersagli terapeutici che potrebbero correggere il difetto di base della FC e la malattia infiammatoria polmonare.

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

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

Luini A¹, Monti M²

¹ TIGEM Telethon Institute of Genetics and Medicine, Napoli,

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

(FFC Project#1/2008, completed; FFC Project#4/2010, extension)

– **Analisi del trasporto secretorio della CFTR (Cystic Fibrosis transmembrane conductance regulator) e del suo mutante patogenico D508-CFTR**

– **Nuovi candidati terapeutici per correggere il traffico intracellulare della proteina CFTR-DF508 mutata**

La fibrosi cistica è una grave malattia genetica causata da mutazioni del gene che codifica per una proteina canale del cloro, normalmente localizzato sulla superficie cellulare, detta Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator (CFTR). In circa il 70% dei casi di malattia, la mutazione è una delezione della fenilalanina in posizione 508 (Delta 508), la quale causa uno scorretta struttura della proteina e la sua conseguente ritenzione nel reticolo endoplasmico (il sito di sintesi), dove viene degradata. Di conseguenza, la proteina è assente dalla superficie cellulare. Questo conduce all'addensamento del muco che ricopre gli epitelii dei polmoni e di altri organi, ed a uno stato di infiammazione bronchiale cronica accompagnato da frequenti infezioni. Questa forma di fibrosi cistica è quindi dovuta ad una incapacità della CFTR-Delta-508 di uscire dal reticolo endoplasmico e di essere trasportata alla superficie cellulare. Lo scopo del nostro progetto è di correggere questo difetto di trasporto. Siamo partiti da due osservazioni pubblicate in letteratura: 1) il complesso proteico COPII, che è coinvolto nell'uscita dal reticolo endoplasmico, è necessario anche per la degradazione della CFTR nello stesso organello; 2) in alcune condizioni e tipi cellulari la CFTR è capace di seguire una via di trasporto diversa da quella normale (via non-convenzionale). Noi abbiamo ipotizzato che manipolando in modo specifico il complesso proteico COPII fosse possibile non solo ridurre la degradazione della proteina mutata, ma anche favorirne l'arrivo alla superficie cellulare mediante la via di trasporto non-convenzionale. Inoltre, abbiamo anche messo a punto una tecnica per sincronizzare il trasporto della CFTR allo scopo di seguirne il movimento verso la superficie. Gli esperimenti hanno confermato che in una parte delle cellule trattate con manipolazioni di COPII la proteina CFTR-Delta-508 è di fatto capace di raggiungere la superficie cellulare attraverso la via non-convenzionale. Stiamo ora studiando gli organelli intracellulari e i componenti molecolari coinvolti in questo tipo di trasporto, e cercando di identificare i trattamenti e farmaci che possano attivare tale via.



Lorenzo Pinna, secondo da sinistra, e il suo gruppo di ricerca

We have previously shown that the catalytic activity of the master kinase CK2, responsible for the generation of a large proportion of the human phosphoproteome, is altered by peptides reproducing the 500-518 CFTR sequence with the F508 deletion (ΔF), which is the commonest cause of cystic fibrosis (CF). In particular the activity of CK2 catalytic subunits is inhibited by these peptides, while that of the CK2 holoenzyme tends to be stimulated in a ΔF dependent manner. These data suggest that CK2 signaling is perturbed in cells expressing ΔF -CFTR, thus possibly accounting for some features of CF not directly related to shortage of functional CFTR. To assess the actual occurrence of such a perturbation, the targeting of endogenous CK2 substrates in wild type vs ΔF -CFTR expressing cells has been compared. To this aim advantage has been taken of cells not expressing endogenous CFTR which were transfected with either wild type or ΔF -CFTR. Lysates of these cells were analyzed by 2D gel electrophoresis for the number and intensity of phosphorylated proteins generated by endogenous CK2, whose level was shown to be the same regardless to expression of either wild type or ΔF -CFTR in them. To minimize the contribution of other kinases the selective phospho-donor GTP was used instead of ATP and to unambiguously dissect CK2 signaling a very specific CK2 inhibitor was exploited. The outcome of these experiments clearly shows that phosphorylation of several CK2 protein targets is substantially altered (generally increased) in the cytosol and, even more, in the membrane fraction of cells expressing the ΔF mutant as compared to those expressing wild type CFTR. Molecular docking provides a rationale for specific up-regulation of CK2 holoenzyme by the ΔF peptides through their binding to the N-terminal domain of the regulatory Δ -subunit. Next step will be the identification of CK2 targets whose phosphorylation is altered in cells expressing ΔF -CFTR. This will shed light on aspects of the CF pathology which are not directly related to lack of functional CFTR and in perspective may disclose new strategies to counteract some of the pleiotropic consequences of CF, notably those dealing with inflammation.

30. Signaling potential of the 508 CFTR mutation: a new paradigm to explain nonchannelopathy related aspects of cystic fibrosis

Pinna LA

Dip. di Chimica Biologica, Università di Padova
(FFC Project#4/2009, completed)

La mutazione delF508 di CFTR come sorgente di segnali cellulari: un nuovo concetto per spiegare alcuni aspetti della fibrosi cistica

Abbiamo mostrato in precedenza che l'attività di un enzima fondamentale, noto come CK2, responsabile della regolazione mediante fosforilazione delle funzioni di numerosissime proteine umane, è alterata da peptidi che riproducono una breve sequenza attorno alla fenilalanina 508 (F508) di CFTR, la cui delezione (ΔF) è la causa più frequente di fibrosi cistica (CF). In particolare l'attività delle subunità catalitiche di CK2 viene inibita da questi peptidi, mentre quella del complesso enzimatico intero (oloenzima) viene stimolata in un modo che dipende dalla delezione ΔF . Ciò suggerisce che i segnali che promanano da CK2 siano perturbati nelle cellule che esprimono CFTR con questa delezione, spiegando in tal modo alcuni aspetti della FC non giustificabili con la carenza di CFTR funzionale. Per verificare tale ipotesi abbiamo confrontato la fosforilazione di substrati proteici di CK2 in cellule che esprimono la forma normale o la forma mutata (ΔF) di CFTR. A tal fine abbiamo usato cellule che normalmente non esprimono CFTR, trasfettate in modo da esprimere in forma normale (funzionale) o mutata (con il difetto ΔF). I lisati di queste cellule venivano poi analizzati mediante elettroforesi bidimensionale per evidenziare il numero e l'intensità delle proteine fosforilate da CK2, il cui livello non è influenzato dall'espressione di CFTR, sia normale che mutato. Per minimizzare il contributo di chinasi diverse da CK2 si è ricorsi all'uso del GTP (un fosfo-donatore specifico per CK2) al posto di ATP e per identificare i target di CK2 si sono utilizzati inibitori molto selettivi di questa chinasi. Il quadro complessivo offerto da questi esperimenti mostra chiaramente che la fosforilazione di diversi substrati di CK2 è marcatamente alterata (in genere aumentata) nel citosol e, in misura ancor maggiore, nelle membrane delle cellule che esprimono il mutante ΔF . Esperimenti paralleli di "docking" molecolare offrono una base razionale per spiegare la regolazione positiva di CK2 da parte dei peptidi ΔF che si legano alla parte N-terminale della sua subunità regolatoria. Il prossimo passo sarà l'identificazione dei substrati di CK2 la cui fosforilazione è alterata in cellule che esprimono CFTR con la delezione patologica. Ciò potrà chiarire alcuni aspetti della patologia che non dipendono direttamente dalla mancanza del canale ionico CFTR funzionale e consentire in futuro strategie utili per ovviare ad alcune conseguenze della FC, in particolare quelle di natura infiammatoria.



Massimo Vassalli, a sinistra, con collaboratori

31. Direct visualization of CFTR conformation by atomic force microscopy imaging

Vassalli M

Istituto Biofisica, CNR, Genova
(FFC Project#6/2009, completed)

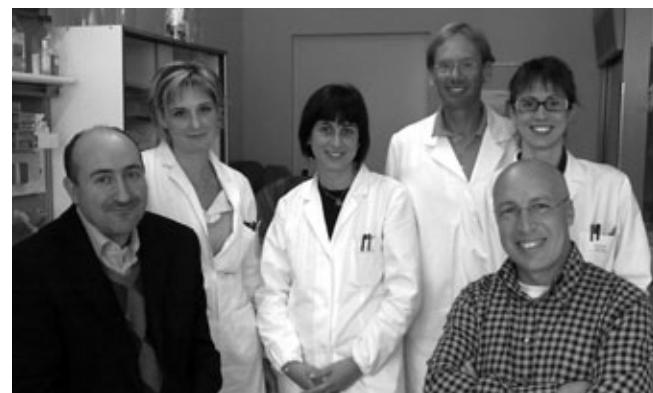
force microscopy (AFM) imaging to the study of Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) channels

The project, developed from September 2009 to August 2010, focused on the application of high resolution atomic

in cellular membranes. AFM is an advanced microscopy technique able to image biological systems in liquid environments with a resolution of a few nanometers, up to 100 times better than a standard optical microscope. This instrument does not use light to sense the sample, thus being able to overcome the intrinsic resolution limits associated to the radiation wavelength in a microscope, but it "touches" the sample through a mechanical probe, a cantilever with a very sharp tip on its top. This approach leads to a simple and reliable high resolution imaging technique, but the main limitation is that the AFM has to gain mechanical access to the sample surface. In the case of CFTR, the domains of interest (nucleotide binding domains and regulatory domain) are located on the cytosol side of the cellular membrane. This means that, in order to perform high resolution AFM imaging on CFTR channels, it is necessary to extract the membrane from the cell and fix it on a flat surface.

The main task of the project has been the definition of a reproducible and reliable protocol to isolate clean cellular membranes on a glass coverslip with the intracellular side facing up, ready for AFM investigation. The quality of the prepared samples has been deeply assessed using a combined approach based on optical microscopy, fluorescence imaging and AFM. Membranes extracted from cells over-expressing CFTR have thus been analyzed and compared to membranes without CFTR.

The achieved resolution was sufficient to have clear images of the membrane but it was impossible to discriminate between CFTR and other membrane proteins only on the base of the morphology of the protrusions on the membrane. To overcome this "identification issue", the samples were stained using small (10nm) gold spheres immunofunctionalised to specifically bind CFTR and the AFM analysis was repeated. In conclusion, gold labeled CFTR was identified in the cellular membrane and analyzed to verify the capability of the imaging system to resolve high resolution details of the protein structure.



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

Evaluation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) functional activity to assess new therapies and define diagnosis of cystic fibrosis (CF) is cumbersome, in part due to the relative inaccessibility of the lower respiratory tract. It is known that leukocytes express detectable levels of CFTR but the molecule has not been characterized in these cells. In this study we aimed at setting up and validating a blood test to evaluate CFTR expression and function in leukocytes.

Using various molecular techniques (western blot, PCR and cell membrane depolarization analysis by single-cell fluorescence imaging) we detected a cell membrane-localized \approx 140 kDa CFTR protein in monocytes. Functional assay using CFTR agonists induced membrane depolarization in monocytes isolated from non-CF donors (31 subjects) and, to a lesser extent,

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

Il progetto, sviluppato da settembre 2009 ad agosto 2010, è stato orientato all'applicazione di tecniche di visualizzazione ad alta risoluzione basate su microscopia a forza atomica (AFM) allo studio morfologico in membrana cellulare del canale transmembra regolatore della conduttanza nella fibrosi cistica (CFTR).

La microscopia AFM è una tecnica avanzata in grado di visualizzare campioni biologici in liquido con una risoluzione di pochi nanometri, fino a 100 volte migliore di un microscopio tradizionale. Questo strumento è in grado di superare il limite di risoluzione intrinseco di un microscopio ottico, associato alla lunghezza d'onda della radiazione, in quanto non utilizza la luce per sondare il campione, bensì "tocca" il campione con una sonda meccanica, una levetta con una punta acuminate al suo apice. Questo approccio dà luogo ad una tecnica di microscopia ad alta risoluzione semplice e affidabile, ma al tempo stesso il limite principale di un sistema AFM è che, per visualizzare il campione, deve poter accedere meccanicamente alla superficie dello stesso. Per quanto riguarda la CFTR, i domini di maggior interesse (il dominio regolatore ed i domini di legame dei nucleotidi) si trovano dal lato citosolico della membrana cellulare; ciò comporta che, per poter effettuare misure significative sui canali CFTR, è necessario estrarre le membrane dalle cellule e fissarle su una superficie piana.

Il principale obiettivo del progetto è stata la definizione di un protocollo affidabile e ripetibile per isolare membrane cellulari pulite su un vetrino coprioggetto, con il lato citosolico rivolto verso l'alto, pronte per l'indagine AFM. La qualità dei campioni ottenuti è stata attentamente verificata con un approccio integrato basato su microscopia ottica, fluorescenza e AFM. Membrane estratte da cellule sovra esperimenti CFTR sono quindi state analizzate e confrontate con membrane di cellule senza CFTR. La risoluzione raggiunta è stata sufficiente a ottenere immagini chiare delle membrane ma non è stato possibile discriminare tra CFTR e altre proteine di membrana basandosi esclusivamente su informazioni morfologiche. Per ovviare a questo "problema di identificazione", i campioni sono stati trattati con piccole (10nm) sferette d'oro funzionalizzate con anticorpi specifici per la CFTR e l'analisi AFM è stata ripetuta. In conclusione, CFTR etichettata con sfere d'oro è stata identificata nella membrana cellulare e analizzata per verificare la capacità del sistema di microscopia AFM di risolvere i dettagli della struttura proteica.

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

Sorio C¹, Melotti P², Buffelli MR³

¹ Dip. Patologia, Sez. Patologia generale, Università di Verona

² Centro Reg. FC, Azienda Ospedaliera Universitaria, Verona

³ Dipartimento di Scienze Neurologiche e della Visione, Università di Verona
(FFC Project#5/2009, in progress)

obligate CFTR heterozygous carriers (HTZ: 15 subjects), but it failed in monocytes from CF patients (44 subjects). As we could distinguish CF patients from HTZ and normal subjects on this basis we propose an index (named "CF index") capable to identify CF from both non-CF and HTZ and between non-CF and HTZ groups. Nasal Potential Difference (NPD), measured in selected subjects for validation, confirmed the results of monocytes assay.

In sumamry, we discovered that CFTR protein expressed in human monocytes display specific biochemical features distinct from those of epithelial cells. We have also shown that CFTR can be functionally evaluated in as little as 5 ml of peripheral blood and devise an index applicable for diagnostic and, potentially, for both basic and translational research ap-

plications: from drug development to evaluation of functional outcomes in clinical trials. This type of assay is much less invasive in comparison with other functional assays as it only requires a small blood drawing and can be repeated much more frequently and also on subjects with contraindications for NPD and rectal biopsies.

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

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

In questo studio ci siamo focalizzati sulla realizzazione e messa a punto di un test utilizzando sangue periferico in grado di valutare l'espressione e la funzione di CFTR nei leucociti.

Usando varie tecniche molecolari è stato possibile non solo rilevare la presenza della proteina CFTR localizzata sulla membrana cellulare dei leucociti, ma dimostrare che il suo stato funzionale

può essere valutato in laboratorio (ex vivo) in particolare nella popolazione cellulare dei monociti. Infatti, saggi funzionali effettuati utilizzando molecole attivanti CFTR hanno indotto un incremento nella depolarizzazione della membrana dei monociti isolati da 31 donatori sani (non-CF) e, in minor misura, da 15 soggetti portatori sani di una mutazione del gene CFTR. Tale induzione, però, non è presente nei monociti isolati da 44 soggetti affetti da fibrosi cistica (FC). Sulla base di questi dati è stato proposto un indice (chiamato "CF index") che è risultato essere capace di identificare correttamente tutti i soggetti FC da noi valutati. La differenza dei potenziali nasali (NPD), misurata sugli stessi soggetti selezionati per la valutazione dei monociti, concorda con i risultati ottenuti col nuovo test. I due metodi, applicando condizioni sperimentali simili, ottengono quindi risultati sovrapponibili in cellule respiratorie (epitelio nasale) ed in leucociti circolanti (monociti).

È stato dimostrato che CFTR può essere funzionalmente valutato nel sangue periferico ed è stato proposto un indice potenzialmente applicabile per uso diagnostico e di ricerca traslazionale. Questo tipo di saggio è meno invasivo, paragonato ad altri saggi funzionali, richiedendo solo un piccolo prelievo di sangue (5 mL). Inoltre, può essere ripetuto molto più frequentemente anche su pazienti che presentino controindicazioni per il test NPD (potenziali nasali) e le biopsie rettali per la misura di corrente intestinale (ICM).



Paola Melotti, prima in basso a destra, e Claudio Sorio, secondo in piedi da destra, con collaboratori di ricerca

Medical treatments currently available do not allow for definitive recovery. Quality of life as well as survival are affected by this disease. Recently several new drugs have been proposed for correction of the basic defect potentially capable of avoiding the development/progression of lung damage which is the major cause of death among patients. Advanced clinical trials are in progress. A common critical problem for these studies is the assessment of efficacy of new drugs in CF patients. Invasive and very sophisticated tests are available in a very limited number of centres worldwide. Currently Nasal Potential Differences (NPD) measurements and, less frequently, Intestinal Currents Measurements (ICM) in rectal biopsies are the only approaches available at this aim but they have relevant limits for application. In our Center a clinical trial for a new drug has started targeting "stop" mutations, representing about 10% of CFTR mutations in our country. This drug (PTC124) is tested in a multicenter phase 3 clinical trial for which our clinical research unit has enrolled a very relevant number of patients. We aim to set up and validate novel, minimally invasive approaches capable to evaluate the effects of a given treatment through the analysis of small blood samples. In support of these claims we provide several preliminary evidences, in particular it is evident that detection of a molecule involved in the immune- and inflammatory-response as sHLA-G could be helpful for assessing the effects of therapies already in use. Should the proposed assays succeed in identifying suitable biomarkers the process of evaluation of new drugs effective for therapy of CF could be better assessed in patients with minimal discomfort.

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

Melotti P¹, Sorio C²

¹ Centro Reg. FC, Azienda Ospedaliera Universitaria, Verona

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

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

I trattamenti medici per fibrosi cistica attualmente disponibili migliorano la qualità di vita ma non consentono la guarigione. La qualità e l'aspettativa di vita vengono influenzate da questa malattia. Recentemente numerosi nuovi farmaci sono stati proposti per la correzione del difetto di base della malattia. Tali molecole sono potenzialmente in grado di evitare lo sviluppo / progressione del danno polmonare, che è la principale causa di morte tra i pazienti. Sperimentazioni cliniche avanzate sono in corso. Un problema critico comune a questi studi è la valutazione di efficacia di nuovi farmaci in pazienti con fibrosi cistica. Test molto sofisticati ed invasivi sono disponibili in un numero molto limitato di centri in tutto il mondo. Attualmente la misura delle differenze dei potenziali nasali (NPD) e meno frequentemente, le misure delle correnti intestinali (ICM) in biopsie rettali sono i soli approcci disponibili a questo scopo, ma hanno evidenti limiti nell'applicazione.

Nel nostro Centro è iniziato lo studio clinico di un nuovo farmaco correttore del difetto associato a mutazioni di tipo "stop", che rappresentano nel nostro paese il 10% circa dei casi. Tale farmaco (PTC124) viene sperimentato in uno studio multicentrico di fase 3 per il quale il nostro gruppo di ricerca clinica ha arruolato uno dei più numerosi gruppi di pazienti a livello internazionale. Il nostro obiettivo è individuare e validare nuovi metodi, poco invasivi e in grado di valutare gli effetti di un dato trattamento attraverso l'analisi di campioni di sangue di modesta entità. A sostegno della fattibilità di tali approcci vi sono una serie di dati preliminari in nostro possesso, tra i quali l'osservazione che le

concentrazioni plasmatiche della molecola sHLA-G, coinvolta nella risposta immunitaria ed infiammazione, variano significativamente in seguito a terapie farmacologiche già in uso nei pazienti affetti da fibrosi cistica. Qualora i vari approcci proposti

riuscissero ad individuare uno o più indicatori biologici idonei, il processo di valutazione di farmaci nuovi o già in uso per la terapia della fibrosi cistica potrebbe essere più efficace e preciso con significativi vantaggi per i pazienti stessi.



Nicoletta Pedemonte, prima da destra, e il suo gruppo di ricerca

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. More than 1500 have been identified in CF patients, however the most frequent mutation (70-90% of patients) is the deletion of phenylalanine 508 (F508del). F508del mutation causes two distinct defects leading to a loss of function of the CFTR protein. The most severe defect is the mistrafficking of CFTR that remains trapped in the endoplasmic reticulum and is subsequently degraded. The trafficking defect can be rescued by molecules called correctors, that are able, in different cell models, to restore the function of the mutant CFTR protein. However, the efficacy of these compounds, on human bronchial cells derived from CF patients, is reduced. The development of new drugs requires a better understanding of the cellular processes responsible for the fate of the mutant protein and its possible rescue.

The primary objective of our project was the F508del mutant, in particular the molecular mechanisms through which F508del stops the synthesis and maturation of CFTR protein, in immortalized human bronchial cells bearing the F508del mutation. To this aim we made use of a new, potent technology, called RNA interference. Using this tool we have been 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 allowed us to identify new proteins and the cellular processes, whose modulation leads to an increased F508del rescue, and that could constitute the target of treatments with improved efficacy and selectivity.

34. Dissection by RNAi-mediated silencing of molecular mechanism leading to F508del-CFTR misprocessing

Pedemonte N

*Lab. Fisiopatologia Molecolare dei Canali Ionici, Centro Biotecnologie Avanzate, Genova
(FFC Project#3/2009, completed)*

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 del gene CFTR che provocano la perdita di funzione di una proteina di membrana (chiamata CFTR) che serve per il trasporto di ioni cloruro. Nei pazienti FC sono state trovate più di 1500 mutazioni, tuttavia esiste una mutazione principale, F508del, che è presente nel 70-90% dei pazienti (50% in Italia). La mutazione F508del, costituita dalla perdita di un residuo di fenilalanina in posizione 508, provoca la perdita di funzione della proteina CFTR attraverso due meccanismi diversi, il più grave dei quali è costituito da una perdita di stabilità della proteina appena sintetizzata. Di conseguenza la proteina CFTR con la mutazione F508del viene in gran parte degradata prima ancora che questa raggiunga la membrana cellulare. Il difetto di stabilità può essere trattato con molecole chiamate correttori, in grado di ripristinare, in diversi modelli cellulari, la funzione della proteina CFTR mutata. Tuttavia, l'efficacia di tali composti su cellule bronchiali umane, derivate da pazienti FC, è ridotta. 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 si è focalizzato sulla F508del, studiando i meccanismi molecolari che intervengono nell'arresto della maturazione e successiva degradazione della proteina in cellule bronchiali umane, con la mutazione F508del, immortalizzate. A questo scopo ci siamo avvalsi di una nuova tecnologia, molto potente, chiamata interferenza genica mediata da RNA. Con questo strumento è stato possibile spegnere selettivamente un gene (e la relativa proteina) per volta, valutandone gli effetti sulla maturazione della proteina CFTR mutata. Questo ci ha permesso di identificare le proteine ed i processi cellulari, la cui modulazione permette un maggior recupero della F508del, e che potranno costituire il bersaglio per trattamenti più efficaci e selettivi.

Population screening and clinical interventions

Moderator: Roberto Buzzetti

Introduction by Teresa Repetto



Maria Cristina Rosatelli, al centro, e il suo gruppo di ricerca

The aim of this project was to develop a pilot study for the molecular screening of cystic fibrosis (CF) carriers in Sardinia, using a panel of mutations with a test sensitivity of 94% in the Sardinian population. We offered CF carrier screening to 505 couples of Sardinian descent, with no family history for CF, selected among those people requesting voluntarily hematological screening of thalassemia at the Ospedale Regionale per le Microcitemie, in Cagliari. The participation rate was 99% (500 in 505 couples).

The success of the project is probably due to the educational programs run for several decades for the prevention of β -thalassemias. 32.8% of couples were in the early stages of pregnancy (within X week of gestation), while 67.2% were in preconceptional age.

Before collecting blood samples, couples were informed about the disease, the CF carrier screening, the risk to have an affected child and the consequences of a negative test result. A medical report and details of the genetic test were reported to all the participants during a post-genetic test counseling session.

The impact, understanding and satisfaction of the preconception CF screening was assessed by a self-administered questionnaire, returned by most of the participants. Among these, almost 50% never heard about CF, while the remaining individuals have learnt about the disease mainly by newspapers/ magazines, as well as general practitioner/gynecologists, or other reasons (occupational, school, university, acquaintance of a CF patient).

We detected one couple at risk in preconceptional age, and an asymptomatic female homozygote for T338I mutation. She was addressed to the Reference Centre of Cystic Fibrosis for further clinical investigations. Moreover 38 CF carriers were identified. The most frequent mutation detected was the T338I, a mild mutation distinctive of Sardinian population. The observed frequency of CF carrier was of 3.8%, i.e. 1 CF carrier in 26 individuals of Sardinian descent.

The study results lay the groundwork for the development of national preconception CF screening programs.

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

Rosatelli MC

Dip. Scienze Biomediche e Biotecnologie, Università degli Studi di Cagliari, Ospedale Regionale per le Microcitemie, ASL Cagliari

(FFC Project#5/2008, completed)

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

Il progetto si è proposto di sviluppare uno studio pilota di screening molecolare nella popolazione sarda per l'identificazione dei portatori di fibrosi cistica (FC) utilizzando un test molecolare in grado di diagnosticare il 94% dei portatori FC in Sardegna. Abbiamo proposto lo screening a 505 coppie di origine sarda, appartenenti alla popolazione generale e senza familiarità per FC. Le coppie sono state selezionate tra coloro che hanno richiesto volontariamente il test di screening per la talassemia presso l'Ospedale Regionale delle Microcitemie di Cagliari. Tra le coppie selezionate, 500 hanno aderito al progetto, pari al 99% delle coppie consultate. Questi dati dimostrano l'interesse della popolazione nei confronti dei programmi di prevenzione delle malattie genetiche. Il 32.8% delle coppie consultate era in gravidanza (entro la X settimana di gestazione) e il 67.2% era in epoca preconcezionale. A tutte le coppie, prima di essere sottoposte al prelievo di sangue per l'esecuzione del test molecolare, autorizzato attraverso la firma del consenso informato, sono state fornite informazioni sulla malattia, sul rischio di generare un figlio affetto da FC e sul significato del risultato negativo del test di screening. Il referto è stato consegnato e commentato durante una breve consulenza genetica post-test. Per poter valutare il grado di conoscenza della FC nella popolazione esaminata, è stata proposta la compilazione di un questionario anonimo, che è stato compilato dalla maggioranza dei partecipanti. Da questo è emerso che la FC è conosciuta soprattutto attraverso i mass media (spot televisivi, giornali, riviste), ma anche attraverso il medico di base/ginecologo, o per altri motivi (professione, studio, conoscimenti affetti da FC). Poco meno della metà dei partecipanti non conosceva la malattia prima di essere stato invitato allo screening. Questo progetto ci ha permesso di identificare una coppia a rischio non in gravidanza, e una donna con genotipo T338I omozigote che, pur riferendo di non avere sintomi, è stata comunque avviata presso il Centro Regionale di riferimento per la FC per gli approfondimenti clinici. Sono stati identificati inoltre 38 portatori sani e la mutazione più frequente è risultata essere la T338I, peculiare della popolazione sarda. Abbiamo potuto determinare che la frequenza del portatore CF in Sardegna è del 3.8%, ossia un portatore ogni 26 individui di origine sarda. I risultati ottenuti pongono le basi per lo sviluppo di programmi di screening CF della popolazione in età riproduttiva a livello nazionale.



Teresa Repetto

– Background

The Center for Disease Control (CDC) advocated for many years the birth of a working group of specialists and experts in Cystic Fibrosis newborn screening (CFNBS) which in turn determined the validity of each single step of the screening programs [1]. The Cystic Fibrosis Foundation (FFC) has issued directives for the implementation of CF newborn screening covering all phases of the process [2]. European best practice guidelines [3] have recently been published that deal mainly with the diagnostic phase and communication to families. In Italy there are different regional approaches to CF newborn screening and within the same region where multiple newborn screening centres or CF care centres coexist. Anyone concerned with CF, especially with CFNBS, knows about the extreme variability in diagnostic behaviour, communicating approach, organization, from the definition of affected child to take in charge and follow-up.

– Objectives

The primary objective is to describe the state of the art of CFNBS programs in Italy and to compare the current practices with CF NBS international guidelines, particularly in the technical, scientific, care, organizational, exploring areas of inconsistencies with current international recommendation. The secondary objective is to produce an overview of the main international recommendations about CF newborn screening. The authors intend to continue this study by implementing improving actions and evaluating their impact and effectiveness.

– Experimental Plan

This is a survey, descriptive, clinical audit study. A multiprofessional steering committee was instituted to follow every single phase of this study. It is composed by physicians, geneticists, biologists, nurses, physiotherapists, psychologists, social worker with CF expertise, screening program expert, epidemiologist and representatives of CF patients and families. Italian Society of Metabolic and Hereditary Diseases and Neonatal Screening (SIMMESN) and 15 CF Centres in regions implementing CFNBS are involved in the study. A questionnaire has been sent to screening laboratory and CF centres with questions in order to gather data on technical-scientific, organizational and clinical aspects of the screening program. About 40 outcomes will be elaborated. Three research assistants trained in audit visits will check the accuracy of information provided by respondents. At the end of the survey, the steering committee will publish an overview of the most important recommendations about CF NBS.

36. *The cystic fibrosis newborn screening in Italy. Survey for assessment of technical-scientific and organizational issues*

Repetto T

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

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

– Background

Il Center for Disease Control (CDC USA) sostiene da molti anni un gruppo di lavoro composto da esperti dello screening neonatale per la Fibrosi Cistica (FC), che si occupano di validare ogni singolo step dei programmi di screening neonatale. La Cystic Fibrosis Foundation (CFF) ha recentemente pubblicato delle direttive per l'implementazione dello screening neonatale, esaminando le varie fasi del processo. Sono inoltre state pubblicate di recente le Linee Guida Europee che sottolineano la miglior pratica soprattutto nella fase di diagnosi e di comunicazione alle famiglie.

In Italia ci sono al riguardo approcci differenti fra le varie regioni e anche all'interno della stessa regione dove coesistono più di un Centro Screening e più di un Centro per la Cura della FC. Chiunque si occupi di FC, in particolare di screening neonatale, conosce l'estrema variabilità nel comportamento organizzativo, diagnostico, comunicativo, di presa in carico e follow up.

– Obiettivi

L'obiettivo primario dello studio è quello di descrivere lo stato dell'arte dei programmi di screening in Italia e di confrontare le pratiche correnti con le linee guida internazionali, in particolare per gli aspetti tecnici, organizzativi, di presa in carico e follow up, rilevando le eventuali disomogeneità tra diverse sedi e incongruenze rispetto alle attuali linee guida internazionali. L'obiettivo secondario è di produrre una overview delle raccomandazioni internazionali relative ai programmi di screening. Gli autori intendono continuare lo studio con le necessarie azioni di miglioramento, tra cui l'implementazione delle raccomandazioni internazionali. E con la valutazione a distanza dei risultati.

– Piano sperimentale

Si tratta di uno studio descrittivo di audit.

È stato istituito uno steering committee multi professionale composto da medici, genetisti, biologi, infermieri, fisioterapisti, psicologi ed assistenti sociali esperti in FC, un epidemiologo, un esperto di programmi di screening, un rappresentante dei pazienti e delle famiglie. Lo studio è svolto in collaborazione con la Società Italiana per lo studio delle Malattie Metaboliche Ereditarie e lo Screening Neonatale (SIMMESN). Hanno aderito allo studio 15 Centri FC su 20 regioni in cui viene praticato lo screening.

La prima fase prevede la preparazione e l'invio di un questionario, ai centri screening e ai direttori dei Centri FC, con lo scopo di raccogliere dati relativi agli aspetti tecnici, organizzativi, clinici, di presa in carico e follow-up. La seconda fase prevede l'invio di monitor, opportunamente addestrati, presso i centri che effettuino un controllo secondo una check-list precostituita.

Saranno misurati outcomes attinenti l'area tecnica, organizzativa, comunicativa, di presa in carico. Verranno a questo proposito prodotti circa 40 indicatori.

Si provvederà anche alla pubblicazione di una overview delle più importanti raccomandazioni sulla gestione dei programmi di screening neonatale per la FC.



Alberto Dal Molin

37. A prospective study about complications of totally implantable central venous access ports in people with CF

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

¹Dipartimento di Pediatria, Università di Firenze

²Centro Fibrosi Cistica, Azienda Ospedaliera Universitaria Meyer, Firenze

³Centro Reg. FC, 2^a Unità Pediatria Osp. dei Bambini "G. Di Cristina", Palermo

⁴Serv. di Supporto FC, Osp. Bambin Gesù, Roma

⁵Centro Fibrosi Cistica, Azienda Ospedaliera Universitaria, Verona

⁶Centro Regionale Fibrosi Cistica, Cerignola (Foggia)

(FFC Project#16/2008, completed)

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 and to peripheral venous access, but some important complications can occur. This is an observational multicenter study with the main aim to calculate the incidence of TIVADs' late complications in CF people. This study was conducted in 11 Italian CF Centers. We have recruited 80 patients: 18 (22.5%) males and 62 (77.5%) females. Mean age 27.2 years ($ds \pm 8.6$). At the moment of recruitment, the majority of patients had pancreatic insufficiency (87.5%) and 41.6% had the CFRD. The median BMI was 20.08 kg/m². A majority of patients have PORT with single reservoir in the thoracic area. At the moment of positioning, the mean age of patient was 25.8 years ($ds \pm 8.4$). Before the recruitment, the PORT were in use for a mean of 532.11 days (range: 0 – 3913). The most frequent reason for positioning the PORT is the "lack of superficial veins" (93.75%), but other reasons were indicated: "Need to carry out home therapy" (27.5%), "repeat access to hospital" (8.75%), "infusion of hypertonic medications" (1.25%) and "list for lung transplantation" (1.25%). About PORT management: Our data indicate that there are not standardized behaviors regarding the PORT management in the CF Centers. Antiseptics used for skin are povidone-iodine, chlorhexidine and amukine. Dressing used to fix Huber needles are varied, such as plaster and gauze or trasparent dressing. In one Center when port is not in use, flushing was performed every 90 days.

About complications: the rate of late complications registered is 22.5% (N=18) (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 length of observation is 235 days (range 1 – 618). The incidence of complications is 0.96/1000 days of port use and the incidence of removal is 0.16/1000 days of port observation. In conclusion, the lack of superficial veins is the most common reason for positioning a TIVAD. Our preliminary results show that some important late complications can occur. Our incidence data is higher than that observed in other 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. È stato condotto, in 11 Centri italiani FC, uno studio osservazionale multicentrico in cui l'obiettivo principale è quello di calcolare l'incidenza di complicanze tardive dei TIVAD nelle persone con FC. Abbiamo reclutato 80 pazienti: 18 (22,5%) maschi e 62 (77,5%) femmine. Età media 27,2 anni (DS ± 8,6). Al momento del reclutamento, la maggior parte dei pazienti presentava insufficienza pancreatică (87,5%) e 41,6% aveva il diabete correlato alla FC. La mediana del BMI era 20,08 kg/m².

Una gran parte dei pazienti ha un TIVAD con un unico serbatoio nella zona toracica. Al momento del posizionamento, l'età media dei pazienti era 25,8 anni (DS ± 8,4). Prima del reclutamento i dispositivi sono stati utilizzati per 532,11 giorni (range: 0-3.913). La causa più frequentemente indicata per il posizionamento è "la mancanza di vene superficiali" (93,75%), ma anche altre motivazioni sono state segnalate, quali la "necessità di effettuare la terapia domiciliare" (27,5%), "ripetuti accessi in ospedale" (8,75%), "l'infusione di farmaci ipertonici" (1,25%) e "in lista per trapianto polmonare" (1,25%).

In merito alla gestione dei dispositivi, i nostri dati indicano che non ci sono comportamenti standardizzati per quanto riguarda la loro gestione. Gli antisettici utilizzati per la cute sono iodio - povidone, clorexidina e amukina; anche le medicazioni utilizzate per fissare gli aghi di Huber sono diversi, come ad esempio il cerotto con la garza o la medicazione trasparente. In un centro quando il presidio non è in uso il lavaggio è effettuato ogni 90 giorni.

Il tasso di complicanze tardive registrato è stato del 22,5% (N = 18) (vedi tabella 1). In 3 casi il dispositivo è stato rimosso (in 2 casi a causa di infezione e in 1 caso a causa della rottura del catetere). La media dei giorni di osservazione è 235 (range 1-618).

L'incidenza di complicanze è 0,96/1000 giorni di osservazione e l'incidenza di rimozione è 0,16/1000 giorni di osservazione

Table 1. Late complications - Complicanze tardive

	N (rate)	Incidence (per 1000 days of port use) Incidenza (per 1000 gg di osservazione)	95% CI IC 95%
	N (%)		
<i>Infection*/ Infekzioni *</i>	7 (8.75%)	0.37	0.26 to 0.48
<i>Trombosis / Trombosi</i>	3 (3.75%)	0.16	0.08 to 0.24
<i>Occlusion / Occlusioni</i>	3 (3.75%)	0.16	0.08 to 0.24
<i>Other complications / Altre complicazioni</i>	5 (6.25%)	0.27	0.17 to 1.14
<i>Total / Totale</i>	18 (22.5%)	0.96	0.92 to 1.00

* in one case the infection was not symptomatic - *in un caso l'infezione era asintomatica



Giovanni Taccetti e Lisa Cariani

Chronic *P. aeruginosa* (*Pa*) infection is considered an unfavorable event for the prognosis of cystic fibrosis (CF) patients. Eradication of *Pa* at first/new isolation could be a simple and efficacious way to improve prognosis. A limited number of studies on the possibility of early eradication of *Pa* have presented encouraging results but there are still no publications on large numbers of patients comparing the efficacy and costs 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 (arm A) versus inhalatory tobramycin/oral ciprofloxacin (arm B) for 28 days in a sizeable number of CF patients. Patients who were *P. aeruginosa*-free (never colonized or *Pa*-free with at least three cultures negative in the last 6 months) and older than 1 year were considered eligible to participate in this trial. The treatment was considered efficacious if patients were infection-free with at least three cultures negative for *Pa* over 6 months (UK CF Trust definition).

Thirteen Italian clinical centers participated in this trial and 216 patients (105 females, 111 males) were randomized. *Pa* first/new infection occurred in patients aged 1-5 years (36.1%); in patients aged 5-12 years (38.2%) and in patients older than 12 years (25.7%). The culture was performed on sputum in 36.2% of patients, on throat swab in 25.8%, and on laryngeal suction in 31.6% (missing data in 6.4%). 47.9% of patients were treated with inhalatory colistin /oral ciprofloxacin; 52.1% of patients were treated with inhalatory tobramycin /oral ciprofloxacin. 13.4% of patients dropped out. Four patients were misidentified for *Pa*. 98 patients, free from *Pa* infection and eligible for the study, were previously infected by *Pa*, whereas it was the first ever infection for the remaining 114 patients. Mean age at first *Pa* infection was 8.2 ± 7 yrs. We did not observe any differences (Mann-Whitney $p=0.8$) in age at first colonization between F508del homozygotes or F508del compound heterozygotes with stop mutations (median 7 years, range 1-32) and patients with another genotype (median 5 years, range 1-36).

At present a total of 163/212 (76.8%) patients have completed the 6-month follow-up, 77 patients in arm A and 86 in arm B. 13 patients in arm A and 16 in arm B withdrew from the study.

According to the intention-to-treat analysis, *Pa* eradication was achieved in 48/77 patients in arm A and in 57/86 patients in arm B with the use of one single cycle of antibiotic treatment. No statistically significant difference was observed between the two arms of the study and boundaries (calculated according to O'Brian-Fleming's method) were not exceeded.

We have analyzed the demographic characteristics of a large

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

Taccetti G¹, Cariani L²

¹Dip. di Pediatria, Centro Regionale FC, Azienda Ospedaliera Universitaria Meyer, Firenze

²Lab. Microbiologia, Centro Regionale FC, Milano
(FFC Project#17/2007, completed)

group of patients with first/new *Pa* infections as part of a multicenter, randomized, controlled trial investigating the efficacy of two eradicating treatment protocols.

Using one single cycle of antibiotic treatment for 28 days we have not demonstrated any statistically significant difference between the two types of treatment.

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. 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 è comparare in un trial multacentrico randomizzato l'efficacia di 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 è giudicato efficace se 3 colture risultino negative per PA in 6 mesi. Sono stati randomizzati 216 pazienti (105 F e 111M), età media 9.3 ± 7 , mediana 8, range 1-37) in 13 centri.

Al momento dell'isolamento del germe il 36,1% dei pazienti avevano un'età un'inferiore a 5 anni, il 38,2% un'età fra 5 e 12 anni e il 25,7% un'età oltre i 12 anni. Nel 36,2% dei soggetti l'esame culturale è stato eseguito su espettorato, nel 25,8% su tampone, nel 31,6% su aspirato e nel 6,4% la metodica non è precisata. Il 47,9% dei pazienti ha ricevuto colistina inalatoria/ciprofloxacin per os. Il 52,1% dei pazienti ha ricevuto tobramicina inalatoria/ciprofloxacin per os. In 98 pazienti veniva riferita pregressa colonizzazione da PA, in 114 primo isolamento del germe nelle vie aeree. In 4 casi il germe è stato erroneamente identificato. L'età media al primi isolamento di Pa è stata 8.2 ± 7 anni e non abbiamo osservato alcuna influenza del genotipo dei pazienti sull'età di prima colonizzazione dei pazienti. 102 pazienti sono stati assegnati al braccio A e 110 al braccio B. In 163/212 pazienti sono stati completati 6 mesi di follow up dalla fine del trattamento. Su 102 pazienti trattati con l'associazione colistina inalatoria/ciprofloxacin per os 13 (12,8%) sono usciti dallo studio, in 48 (47,1%) il trattamento ha avuto successo e in 29 (28,4%) la terapia non è stata efficace. Il follow-up deve essere completato in 12 (11,7%) soggetti. Su 110 pazienti trattati con l'associazione tobramicina inalatoria/ciprofloxacin per os 16 (14,5%) sono usciti dallo studio, in 57 (51,9%) il trattamento ha avuto successo e in 29 (26,3%) la terapia non è stata efficace. Il follow-up deve essere completato in 8 (7,3%) soggetti.

A conclusione dello studio, l'efficacia del trattamento eradicante precoce viene confermata e l'analisi statistica non ha dimostrato differenze significative nell'efficacia dei due trattamenti messi a confronto.



Vito Marco Ranieri

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

Ranieri VM

Dip. Discipline Medico Chirurgiche, Sez. Anestesia e Rianimazione, Università di Torino
(FFC Project#17/2008, completed)

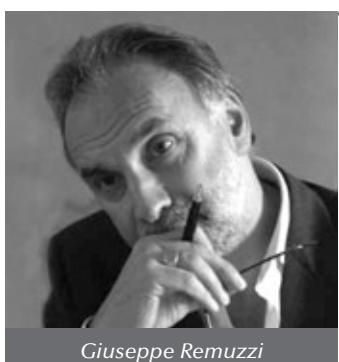
Our project aimed at studying in patients with CF on the transplantation waiting list who develop severe respiratory failure and hypercapnia the efficacy of the novel extracorporeal carbon dioxide removal techniques, which supports respiratory function by removing excess carbon dioxide directly from the circulatory system, in reducing the need of intubation and the use of invasive mechanical ventilation. Consequently, these actions will attempt to increase the number of CF patients with end-stage lung disease that are eligible for lung transplantation and thereby decrease the mortality rate on the waiting list.

Seven patients with cystic fibrosis (average age 29.3) 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 4 to 15 days. Invasive mechanical ventilation was eventually initiated in all 7 patients. The extracorporeal carbon dioxide removal was efficacious in reducing hypercapnia in all patients initially by 30%, and by 15% after 10 days, to stabilize arterial pH levels and to assist in the maintenance of arterial oxygenation. The SOFA score calculated during the stay in the respirology department does not differ between patients who had undergone extracorporeal carbon dioxide removal and selected historical controls. However, the study patients were discharged to the ICU to start the extracorporeal carbon dioxide removal treatment, whereas the historical controls were not admitted to the ICU but cared with comfort measures till death for futility. Therefore, these data suggest that the treatment with extracorporeal carbon dioxide removal techniques represents a valid alternative to the palliative care measures for patients with end stage hypercapnic respiratory failure. In fact, its application allows the maintainance to the lung transplant eligibility prolonging this period of time by an average of 7.12 (3÷15) days. In this period of time 2 out of seven patients (28.6%) received the lung transplant and survived post transplantation. Only one of the historical controls was transplanted but died the day after the transplantation for septic shock. Therefore, the treatment with extracorporeal carbon dioxide removal techniques may be considered as bridge strategies to lung transplantation for this patient population.

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

Il nostro progetto aveva l'obiettivo di valutare l'efficacia di nuove tecniche 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 e diminuire la mortalità dei pazienti con fibrosi cistica in lista d'attesa per trapianto polmonare.

Sette pazienti con fibrosi cistica (età media 29,3 anni) sono stati ricoverati in terapia intensiva per insufficienza respiratoria ipercapnica refrattaria e reclutati nello studio. Tutti e sette i pazienti sono stati trattati con la tecnica di decapneinizzazione extracorporea per un periodo di tempo che è variato da 4 a 15 giorni. È stato necessario, inoltre, trattare tutti i pazienti con ventilazione meccanica invasiva. I risultati dimostrano che la rimozione extracorporea di anidride carbonica ha consentito la significativa riduzione dell'ipercapnia e il mantenimento di una adeguata ossigenazione in tutti i pazienti. Inoltre, un indice d'insufficienza d'organo, il SOFA, calcolato durante la degenza in pneumologia, è risultato sovrapponibile nei pazienti dello studio successivamente sottoposti a decapneinizzazione e in controlli storici. Tuttavia, è da notare che i pazienti dello studio venivano trasferiti in terapia intensiva per iniziare la decapneinizzazione extracorporea, mentre i pazienti storici di controllo venivano curati palliativamente per futilità. Pertanto, la decapnizzazione extracorporea rappresenta un'alternativa valida alle cure palliative per i pazienti con fibrosi cistica e insufficienza respiratoria ipercapnica terminale. Infatti, essa consente il prolungamento dell'eleggibilità al trapianto di polmone per un periodo medio di 7.12 (3÷15) giorni dopo il fallimento delle cure nel reparto ordinario. In questo lasso di tempo due dei sette pazienti decapneizzati sono stati trapiantati con successo. Solo uno dei pazienti di controllo invece è stato sottoposto a trapianto, ma è deceduto il giorno seguente per shock settico. In conclusione, il trattamento con tecniche di decapneinizzazione extracorporea può essere considerato una promettente strategia “bridge” al trapianto di polmone nei pazienti con fibrosi cistica.



Giuseppe Remuzzi

40. Prevention of reperfusion injury in human lung transplantation for cystic fibrosis by targeting IL-8 activity

Remuzzi G

Dip. Immunologia e Clinica dei Trapianti, Ospedali Riuniti di Bergamo, Istituto Farmacologico "Mario Negri"
(FFC Project#24/2009, in progress)

The study was aimed to assess the effect of Reparixin, an inhibitor of interleukin 8 (IL-8) in preventing reperfusion injury

in lung transplantation. IL-8 is a chemokine involved in recruitment of macrophages after reperfusion, which, on its turn, may

promote delayed graft function recovery. The primary objective of the study was to assess whether Reparixin improved short-term respiratory function of patients with cystic fibrosis who received a lung transplant. In light of the exploratory nature of the study and of the limited funding available, however, the primary objective has been modified with the effect of Reparixin on the recruitment of macrophages in bronchoalveolar lavage fluid. This will allow to assess the efficacy of Reparixin with a lower sample size. Data on clinical outcomes will be taken in any case and will further support the laboratory ones.

We amended the protocol, which has been submitted to the Ethical Committee (EC) of our hospital. In the meantime, we received the study medication so we can start with the study as soon as we receive a formal approval by the EC.

It must be emphasized that none of patients with cystic fibrosis who received a lung transplant during the last year had the criteria for inclusion in the study. The amendment to the protocol, therefore, did not create delays compared to the expected timing of the study if the protocol had not been amended.

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

Lo studio si proponeva di valutare l'effetto di Reparixin, un inibitore dell'interleuchina 8 (IL-8), nel prevenire il danno da riperfusione nel trapianto di polmone. IL-8 è infatti una chemochina implicata nel reclutamento a livello del graft dei macrofagi dopo riperfusione. Questo fenomeno, a sua volta, è coinvolto nella ritardata ripresa della funzione del graft. Obiettivo primario dello studio era quello di valutare se Reparixin migliorava la funzione respiratoria a breve termine di pazienti affetti da fibrosi cistica trapiantati di polmone. Alla luce della natura esplorativa dello studio e in considerazione delle limitate risorse rese disponibili, tuttavia, si è modificato l'obiettivo primario dello studio che è diventato l'effetto del Reparixin sul reclutamento dei macrofagi nel liquido di lavaggio bronco-alveolare. Questo outcome surrogato permetterà di valutare l'efficacia del farmaco riducendo il numero di pazienti necessari per lo studio. I dati sugli outcome clinici verranno comunque raccolti e potranno fornire un ulteriore supporto a quelli di natura laboratoristica.

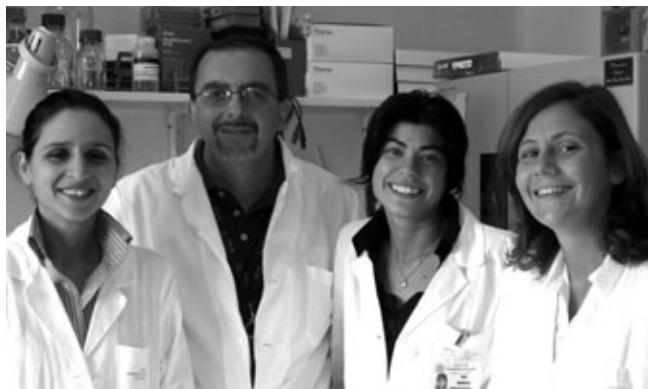
Abbiamo emendato il protocollo, che è già stato sottomesso al Comitato Etico (CE) del nostro ospedale. Nel frattempo, si è reso disponibile il farmaco di studio e quindi potremo partire con la parte operativa non appena avremo l'approvazione da parte del CE. Va inoltre sottolineato che nessuno dei pazienti affetti da fibrosi cistica trapiantati di polmone nel corso dello scorso anno possedeva i criteri di inclusione nello studio. L'emendamento al protocollo, quindi, non ha creato ritardi rispetto a quelle che sarebbero state le tempistiche dello studio qualora il protocollo non fosse stato emendato.

CFTR structure/function and its rehabilitation

Novel approaches to restoring CFTR function

Moderator: **Antonio Cao**

Introduction by **JV Luis Galietta**



Luis Galietta e il suo gruppo di ricerca

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

The average lifetime of CF patients has significantly increased in the last years because of improved ways to prevent and fight the presence of bacteria in the airways. However, correction of the basic FC defect, i.e. the impaired chloride transport, is considered as the next main goal to improve the treatment of CF patients. In our project, we have considered two different targets to develop possible drugs: CFTR and the TMEM16A protein. Regarding CFTR, we have studied a group of chemical compounds belonging to the aminoarylthiazole (AAT) family. We have found that AATs are able to target the defects caused by different types of mutations. In particular, such compounds ameliorate the activity and the maturation of CFTR with deltaF508, the most frequent mutation among CF patients. Therefore, AATs may represent a class of compounds particularly interesting, because of their dual effect as potentiators of CFTR activity and correctors of CFTR maturation.

Regarding TMEM16A, it is a protein different from CFTR but also able to transport chloride. Pharmacological stimulation of TMEM16A could represent an alternative strategy to correct the basic defect in CF. We have studied the TMEM16A protein in human bronchial epithelial cells. We have found that there are two isoforms of TMEM16A that show different sensitivity to activation by intracellular calcium. The elucidation of TMEM16A structure and regulation in bronchial epithelial cells will help in the design of novel pharmacological approaches to stimulate chloride transport in the airways of CF patients.

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

Galietta JLV¹, Millo E², Mazzei M³

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

²Dip. Medicina Sperimentale, Lab. Biochimica, Università di Genova

³Dip. di Scienze Farmaceutiche, Università di Genova

(FFC Project#2/2009, in progress)

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

La fibrosi cistica (FC) è causata da mutazioni a carico della proteina CFTR, la cui funzione nelle cellule epiteliali è quella di trasportare ioni cloruro. Nei polmoni, la perdita di funzione della proteina CFTR causa la disidratazione della superficie delle vie aeree con conseguente colonizzazione da parte di batteri resistenti al trattamento con antibiotici. Esistono varie classi di mutazioni FC che provocano la perdita di funzione della proteina CFTR con meccanismi diversi. La vita media dei pazienti FC è aumentata in maniera significativa negli ultimi anni grazie a migliori trattamenti che mirano a prevenire e a combattere la presenza dei batteri nelle vie aeree. Comunque, si pensa che la correzione del difetto di base nella FC, e cioè il ripristino del trasporto di cloruro, sia l'obiettivo più importante da raggiungere per migliorare ulteriormente la qualità del trattamento dei pazienti. Nel nostro progetto abbiamo considerato due bersagli diversi per lo sviluppo di possibili farmaci: la proteina CFTR stessa e la proteina TMEM16A. Per la proteina CFTR abbiamo studiato un gruppo di composti chimici appartenenti alla famiglia degli aminoariltiliazoli (AAT). Abbiamo scoperto che alcuni AAT sono in grado di correggere il difetto associato a diversi tipi di mutazioni. In particolare, questi composti correggono, anche se parzialmente, sia il difetto di maturazione sia il difetto di attività associati alla mutazione deltaF508, la più frequente tra i pazienti FC. Pertanto gli AAT potrebbero rappresentare una classe di composti particolarmente interessante, in grado di funzionare sia da potenziatori dell'attività della proteina CFTR sia da correttori della sua maturazione. Per quanto riguarda TMEM16A, questa è una proteina diversa da CFTR ma anch'essa in grado di trasportare cloruro. La sua stimolazione farmacologica potrebbe rappresentare una strategia alternativa per correggere il difetto di base nella FC. Abbiamo studiato la proteina TMEM16A in cellule epiteliali bronchiali umane. Abbiamo scoperto che esistono due isoforme della stessa proteina che mostrano diversa sensibilità allo stimolo attivante costituito dal calcio intracellulare. La comprensione della struttura e della regolazione di TMEM16A nelle cellule bronchiali ci potrà aiutare a progettare nuovi tipi di farmaci per stimolare il trasporto di cloruro nelle vie aeree dei pazienti FC.



Mauro Mazzei, primo da destra, e il suo gruppo di ricerca

The presence of $\Delta F508$ mutation in CFTR is the major cause for morbidity and mortality in Cystic Fibrosis. In this case, patients do not have the CFTR in the plasma membrane as that protein remains entrapped in the endoplasmic reticulum (ER). At this level, $\Delta F508$ -CFTR cannot move towards the Golgi, but it is targeted to degradation by a complex of chaperones, namely proteins devoted to the correct folding or degradation of CFTR. Therefore, our goal is the finding of molecules (Correctors) favouring the correct folding and the maturation of $\Delta F508$ -CFTR to get the plasma membrane, where we know it maintains sufficient activity. The present project is directed to inhibit (better to say, to modulate), by rationally designed molecules, the activity of those chaperones more involved in the degradation of CFTR. As the number of chaperones interacting with the CFTR is very high, we used data from literature to recognize the right hierarchy in this process. From this investigation, it is clear that the more important chaperones are those of complex 70 (HSP70/HSC70, CHIP, BAG1). In particular, it was demonstrated that the downregulation of HSC70, CHIP and BAG1 may favour the moving of $\Delta F508$ -CFTR from the ER to the plasma membrane and increase the persistence of the mutant protein in the membrane. Unfortunately, these tests are made with siRNA, namely biochemical tools that cannot be utilized as drugs. Our research will start from the *in silico* study of the possible binding sites among cited chaperones and mutant CFTR to design molecules interfering with those bonds. We know that a prolonged interaction between HSC70 and $\Delta F508$ -CFTR is the first step to the degradation pathway. This approach may be interesting as it is quite specific for the CFTR and, therefore, advantageous from the point of view of the toxicity. Other strategies will make use of the partial inhibition of HSC70 (and/or the cited co-chaperones) or the partial block of HSC70 mRNA. Such block may take place with substances already utilized for the hepatitis B and C. Then, the designed molecules will be synthesized, analyzed and sent to enzymatic assays to prove their ability to downregulate the cited chaperones. The best molecules will be tested to evaluate their effectiveness on human epithelial cells coming from CF patients.



Oscar Moran, a sinistra, con collaboratrici

After the proposal to use drugs that potentiate the CFTR-chloride transport as a part of the cystic fibrosis therapy, a

42. The search of HSP70/HSC70 complex inhibitors useful to correct the $\Delta F508$ -CFTR

Mazzei M¹, Fossa P¹, Turco C²

¹Dip. di Scienze Farmaceutiche, Università di Genova

²Dip. Scienze Farmaceutiche, Università di Salerno

(FFC Project#5/2010, new)

Ricerca di inibitori di chaperoni del complesso HSP70/HSC70 utili per correggere la $\Delta F508$ -CFTR

Quando nella CFTR è presente la mutazione $\Delta F508$ ($\Delta F508$ -CFTR), che rappresenta la maggiore causa di morbilità e mortalità in Fibrosi Cistica, il paziente non ha in membrana la proteina CFTR in quanto essa rimane intrappolata nel reticolo endoplasmatico (RE). A questo livello, invece di proseguire verso il Golgi, la $\Delta F508$ -CFTR viene avviata alla demolizione ad opera di un sistema di chaperoni, cioè proteine che favoriscono o il corretto ripiegamento o la degradazione della CFTR. Il nostro intento è quindi di trovare delle molecole (Correttori) che possano far sfuggire la $\Delta F508$ -CFTR al destino di degradazione facendola maturare e raggiungere la membrana plasmatica dove sappiamo che è parzialmente attiva. Il presente progetto è quindi diretto a spegnere (o meglio modulare), con molecole razionalmente disegnate, l'attività dei chaperoni più coinvolti nella degradazione della $\Delta F508$ -CFTR. Poiché il numero dei chaperoni che interagisce con la CFTR è estremamente grande, ci siamo serviti dei dati della letteratura per individuarne la gerarchia. Da questo studio è emerso che i chaperoni più importanti sono quelli del complesso 70 (HSP70/HSC70, CHIP, BAG1). In particolare è stato dimostrato che la downregolazione di HSC70, CHIP e BAG1 riesce a favorire il passaggio della $\Delta F508$ -CFTR dal RE alla membrana plasmatica ed inoltre ne aumenta il tempo di permanenza in membrana. Questo tipo di prove biochimiche viene effettuato con RNA antiseno che non possono essere usati quali farmaci. La ricerca prenderà avvio dallo studio *in silico* dei possibili siti di legame dei citati chaperoni con la CFTR mutata per costruire molecole che possano interferire con questi legami. Sappiamo infatti che una interazione prolungata nel tempo tra HSC70 e la $\Delta F508$ -CFTR è il primo passo della proteina mutata verso la via degradativa. Questo approccio ci pare interessante in quanto specifico per la CFTR e quindi vantaggioso dal punto di vista della tossicità. Un'altra strategia prevederà la parziale inibizione di HSC70 (e/o degli altri co-chaperoni) o il parziale blocco del mRNA di HSC70. Tale blocco si può realizzare con sostanze già utilizzate in caso di epatite B e C. Le molecole progettate saranno quindi sintetizzate e, dopo le normali procedure analitiche, saranno avviate ai test enzimatici per saggiare la loro capacità di sottoregolare i citati chaperoni. Le molecole migliori saranno quindi provate su cellule di epitelio bronchiale umano FC per valutare la loro effettiva attività.

43. Functional and structural basis of the molecular mechanism of CFTR potentiators

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

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

¹Istituto di Biofisica CNR, Genova

²Laboratorio di Genetica Molecolare, Istituto G. Gaslini, Genova

(FFC Project#2/2008, completed; FFC Project#7/2010, extension)

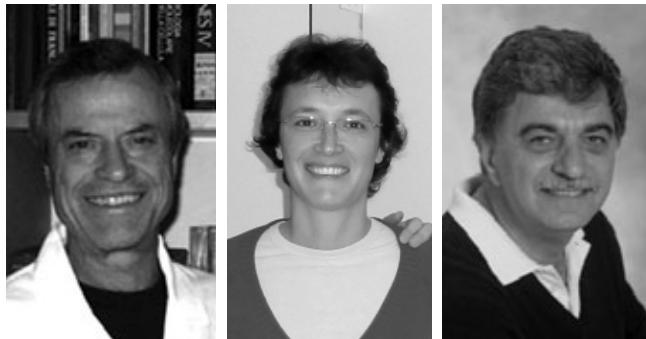
great effort has been done to identify substances that are potentially suitable for human use. Indeed, at least one of

these substances, VX-770, has been already included in the drug development pipeline, and has arrived to the phase 3 of clinical testing. However, very few is actually known on the molecular mechanisms by which these class of substances favours the chloride transport of normal or mutant CFTR. This lack of detailed information is limiting the possibility to improve the properties of the discovered substances, and impedes an appropriate rational-based drug discovery program. We have concentrated our efforts in studying functional CFTR site-specific mutations, not only to confirm the putative binding site of potentiators hypothesis, but also to analyse in detail the nature of the interaction (electrostatic or hydrophobic) between the drugs 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 set-up a protocol to obtain and purify some CFTR domains, which has been used to determine the molecular structure of these protein regions by small angle X-rays scattering at the synchrotron. We have obtained the first physical evidences of the molecular conformation transitions related with the gating of the chloride transport.

The continuation of the project (FFC#7/2010) is focussed to extend the studies to other domains, to better understand the structural basis of the CFTR function. Studying normal proteins and proteins carrying CF-mutations, we will obtain information to better understand the physiopathology of the disease. Analysing the effect of a series of potentiators on the structure of CFTR we expect to better comprehend their mechanism of action, and get information to improve the therapeutic potential of CFTR potentiators, and also to design drugs specific for individual mutations.

Basi funzionali e strutturali del meccanismo molecolare dei potenziatori della CFTR

In seguito alla proposta di utilizzare farmaci che potenziano il trasporto di cloruro da parte della CFTR per la terapia della fibrosi cistica, è stato compiuto un grande sforzo per identificare sostanze potenzialmente idonee per uso umano. In effetti, almeno una di queste sostanze, VX-770, è già stata inclusa nella pipeline di sviluppo dei farmaci, ed è arrivata alla fase 3 della sperimentazione clinica. Tuttavia, si conosce molto poco sui meccanismi molecolari attraverso i quali questi farmaci potenziano il trasporto di cloruro nella CFTR normale o mutante. Questa mancanza d'informazioni dettagliate limita le possibilità di migliorare le proprietà delle sostanze finora trovate ed impedisce un adeguato programma per il disegno razionale di nuovi farmaci. Noi abbiamo concentrato i nostri sforzi nello studio funzionale di mutazioni sito-specifiche della CFTR, non solo per confermare il sito di legame putativo per i potenziatori, ma anche per analizzare in dettaglio la natura dell'interazione (eletrostatica o idrofobica) tra il farmaco e la proteina. L'analisi della cinetica di singolo canale e la sua modifica da parte di potenziatori hanno contribuito a capire meglio i meccanismi d'azione dei farmaci sulla singola molecola. D'altra parte, abbiamo messo a punto un protocollo per ottenere e purificare alcuni domini della proteina CFTR, che è stato utilizzato per determinare la struttura molecolare di queste regioni della proteina con il metodo di dispersione di raggi-X a basso angolo con luce di sincrotrone. Abbiamo ottenuto le prime evidenze fisiche delle transizioni conformazionali connesse con l'inizio (gating) del trasporto del cloro. La continuazione del Progetto (FFC#7/2010) è focalizzata a estendere questi studi ad altri domini, per meglio comprendere le basi strutturali del meccanismo di funzione di CFTR. Mediante lo studio di proteine normali e proteine con mutazioni CF, otterremo le informazioni per comprendere la fisiopatologia della malattia. Analizzando l'effetto di una serie di potenziatori sulla struttura della proteina CFTR ci aspettiamo di capire meglio il loro meccanismo d'azione e di ottenere informazioni per migliorare il potenziale terapeutico dei potenziatori della CFTR, anche mediante la progettazione di farmaci specifici per le mutazioni individuali.



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

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

Borgatti M¹, Altamura N², Baasov T³, Breveglieri G¹, Finotti A¹, Salvatori F¹, Zuccato C¹, Castaldo R², Belakhov V³

¹Dip. di Biochimica e Biologia Molecolare, Università di Ferrara

²Istituto di Biomembrane e Biogenetica, CNR, Bari

³Schulich Faculty of Chemistry, Technion, Israel Institute of Technology, Haifa, Israel

(FFC Project#2/2010, new)

Many human genetic diseases, including cystic fibrosis (CF), are caused by nonsense mutations, single point alterations in DNA that give rise to UAA, UGA and UAG premature translation termination codons (PTCs) within the mRNA coding regions, leading to premature termination of translation and eventually to truncated, nonfunctional proteins. In the case of CF, 5-10% of the CF alleles carry a nonsense mutation, e.g. G542X, R553X, R1162X, W1282X. The functional consequences of these stop mutations are minimized by the nonsense-mediated RNA decay pathway (NMD), a cellular mechanism, aimed to detect and degrade PTCs containing mRNA. In the last few years, it has been demonstrated that drugs, like aminoglycoside antibiotics, can read-through PTCs, permitting translation of full length proteins. The general aim of this project is to optimize the activity of read-through molecules, leading to restoration of CFTR production in CF caused by PTCs. Particularly, this aim will be achieved by a multidisciplinary approach including: (a) development of *in vitro* cel-

lular model systems (for instance CF cell lines carrying green fluorescence protein (GFP) gene with stop codon mutations and *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains with a read-through reporter system based on Renilla and Firefly luciferase open reading frames separated by nonsense codons); (b) development of biochemical screening systems to quantify NMD activity; (c) synthesis of novel drugs exhibiting read-through effects on CFTR mRNA carrying stop codon mutations; (d) development of experimental strategies to reduce NMD of the CFTR mRNA using siRNA or antisense DNA; (e) development of biological assays to analyze the CFTR production on CF cells treated with aminoglycosides and novel read-through drugs. The milestones and key results of this project will be: (a) production of cell lines mimicking CF stop codon mutations and yeast strains for highthrough screening; (b) identification of the best strategy to decrease the cellular content of the NMD-regulating proteins UPF1 and SMG1; (c) identification of the optimal cocktail (using read-through molecules

and NMD inhibitors) sustaining the maximal levels of CFTR protein in CF cells carrying CFTR containing stop codons. This study may introduce new hopes for the development of a pharmacologic approach to the CF treatment based on read-through drugs and novel cellular models.

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

Molte malattie genetiche umane, come la fibrosi cistica (FC), sono causate da mutazioni non senso, che determinano l'inserimento di codoni di termine prematuro della traduzione (PTCs) UAA, UGA e UAG a livello delle regioni codificanti dell'mRNA. Ciò provoca un termine prematuro della traduzione e l'eventuale produzione di proteine troncate, non funzionali. Nel caso della FC, il 5-10% degli alleli reca mutazioni non senso, come per esempio G542X, R553X, R1162X, W1282X. Le conseguenze funzionali di queste mutazioni di stop sono minimizzate mediante il meccanismo cellulare di nonsense-mediated RNA decay (NMD), che provvede a identificare e degradare gli mRNA contenenti PTCs. Negli ultimi anni, farmaci, come gli antibiotici amminoglicosidici, sono stati utilizzati per sopprimere questa interruzione prematura della traduzione mediante un meccanismo di *read-through* ribosomale

che prevede di mascherare il segnale di stop permettendo la traduzione e la produzione dell'intera proteina CFTR e il ripristino della funzione CFTR in pazienti FC. Lo scopo di questo progetto è di ottimizzare l'attività di molecole che agiscono con meccanismo di *read-through* ribosomale per ripristinare la produzione di CFTR in FC causata da PTCs, impiegando un approccio multidisciplinare che prevederà: (a) lo sviluppo di nuovi modelli cellulari in vitro (ad esempio linee cellulari FC recanti il gene per proteine fluorescenti (GFP) con mutazioni stop e ceppi di lieviti *Saccharomyces cerevisiae* utilizzabili per lo screening di farmaci con attività *read-through*); (b) lo sviluppo di saggi biologici per determinare l'attività NMD; (c) la sintesi di nuovi farmaci con attività *read-through*; (d) lo sviluppo di strategie sperimentali come siRNA e DNA antisenso per ridurre l'attività NMD; (e) lo sviluppo di saggi biologici per analizzare la produzione della proteina CFTR in cellule FC trattate con molecole ad attività *read-through*. I principali risultati attesi sono: (a) la produzione di linee cellulari che mimano le mutazioni di stop FC e di ceppi di lieviti per analisi *highthrough*; (b) l'identificazione della migliore strategia per ridurre le proteine regolatorie del processo NMD come UPF1 e SMG1; (c) l'identificazione della combinazione ottimale di molecole con azione *read-through* e di inibitori del meccanismo NMD per ottenere elevati livelli di proteina CFTR in cellule CF con gene CFTR recante codoni di stop. Questo studio potrà essere utile per lo sviluppo di un approccio farmacologico per la cura della FC basata su farmaci *read-through* e in nuovi modelli cellulari.



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

Cystic Fibrosis (CF) is a still life-threatening disease, although therapies have augmented the life span of CF individuals. Mutated or absent CFTR alters muco-ciliary clearance which ultimately increases infection of the airways by a few opportunistic bacteria species, including *Pseudomonas aeruginosa* (Pa). This chronic infection and inflammation represents a key pathogenetic event of lung damage and respiratory insufficiency. Restoration of Cl transport by increasing the export of F508delCFTR from the ER or activating defective protein, thereby increasing CFTR apical membrane function, will reinstate mucociliary clearance and eradicate Pa from the CF airway.

However, Pa infections of the host airway cell have been shown to decrease apical expression of both wild-type (wt) and F508del CFTR through the inhibition of apical endocytic recycling, thus potentially impairing the efficacy of the potentiator/corrector therapies.

The host cell intracellular molecular mechanism(s) underlying this Pa infection-dependent inhibition of CFTR membrane recycling is still unknown. CFTR endocytic recycling is regulated by its interaction with PDZ domain containing proteins and by actin cytoskeleton organization and recent work has shown that the PDZ domain adaptor protein, NHERF1, finely regulates both wt and F508delCFTR membrane recycling through its association with the C-terminal PDZ-binding motif (DTRL) of CFTR.

The molecular identification of the pathological mechanisms responsible for the effect of Pa or its bacterial products on the

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

Tamanini A¹, Reskin S²

¹Lab. Patol. Molecolare, Lab. Analisi Cliniche ed Ematologiche, Azienda Ospedaliera Universitaria, Verona

²Dip. Fisiol. Generale ed Ambientale, Università di Bari (FFC Project#8/2010, new)

phosphorylation of NHERF1 and reduction of CFTR expression could identify novel targets to block this process and also block the Pa interference with the efficacy of drugs capable of increasing CFTR apical membrane expression.

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

La fibrosi cistica è ancora una grave malattia che inesorabilmente porta al progressivo danno polmonare del paziente nonostante numerose terapie abbiano portato ad un aumento della vita media dei soggetti affetti. La proteina mutata, o assente, altera la clearance mucociliare con conseguente aumentata infezione delle vie aeree da parte di specie batteriche opportuniste come *Pseudomonas aeruginosa* (Pa).

L'esagerata infezione delle vie respiratorie rappresenta un evento patogenetico chiave del progressivo declino della funzione respiratoria in questi pazienti. La ricostituzione del trasporto del Cl attraverso l'induzione del passaggio della F508del-CFTR dal reticolo endoplasmatico alla membrana apicale riporta ad una corretta clearance mucociliare e alla eliminazione di Pa dalle vie aeree. Numerosi studi dimostrano che l'infezione delle cellule epiteliali bronchiali induce la diminuzione dell'espressione apicale, sia della CFTR normale, che di quella mutata, portando così ad una riduzione dell'efficacia di composti potenziatori/correttori. I meccanismi molecolari intracellulari che stanno alla base di questa inibizione, Pa dipendente, dell'espressione della CFTR sulla membrana apicale sono sconosciuti. Il trasferimento della CFTR

in membrana è regolato attraverso l'interazione dei domini PDZ contenuti nelle proteine e attraverso l'organizzazione dell'actina citoscheletrica. Recenti lavori hanno dimostrato che domini PDZ contenuti nella proteina adattatrice, NHERF1, finemente regolano il trasporto in membrana sia della CFTR normale, che della F508del-CFTR attraverso la sua associazione con siti specifici di legame del dominio PDZ della porzione C-terminale della CFTR. I risultati preliminari di questo progetto dimostrano che Pa indu-

ce la riduzione dell'espressione della CFTR e allo stesso tempo la iper-fosforilazione di NHERF1.

Questo studio è volto alla comprensione dei meccanismi molecolari intracellulari responsabili degli effetti di Pa sulla espressione di CFTR e iperfosforilazione di NHERF1 che potrebbero bloccare o ridurre l'efficacia di farmaci in grado di aumentare l'espressione della CFTR in membrana, e all'identificazione di nuovi bersagli terapeutici.



Olga Zegarra-Moran, seconda da sinistra, e il suo gruppo di ricerca

The most serious problem experienced by CF patients is the airway disease, characterised by increased viscosity of mucus that leads to bacterial 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. 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 short interference RNA (siRNA) complementary to ENaC subunits, finding that this approach reduced sodium absorption in vitro. These siRNA are small molecules that enter the cell and cause a reduction in the expression specifically of the ENaC subunits, therefore reducing sodium and water absorption. In spite of the positive result that we obtained, that are proof of principle of the possibility to increase the hydration of the airways by using siRNA, the reduction of ENaC was partial and we had problems while trying to make siRNA entering the epithelium. In this project we have proposed to use different strategies to increase the inhibition of ENaC and of other proteins involved in water absorption, to extend the work to CF cells, and to make an effort for finding the conditions to succeed in transferring siRNAs into the epithelium. In this year we have performed a detailed analysis of ENaC characteristics in H441 cells. We have established i) that the expression of α, β, γ and δ ENaC subunits is similar in H441 cells and in the primary human bronchial epithelium, and ii) that H441 epithelium displays classical ENaC currents with high affinity for amiloride, and also cationic currents that are insensitive to amiloride and to Evans blue.

The results obtained are useful to interpret correctly the silencing experiments. We have compared the silencing obtained with ENaC subunit siRNAs with different sequences, from different sources, single or in pools, identifying sequences that are effective at low concentrations. We have started the functional evaluation of silencing prostasin, one of the serine proteases involved in ENaC activation. Finally, we have set up a protocol to measure the height of the ASL with a confocal microscope.

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

Zegarra-Moran O, Melani R, Gianotti A, Caci E, Galietta LJV
Laboratorio di Genetica Molecolare, Istituto Giannina Gaslini, Genova

(FFC Project#7/2009, in progress)

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

Il maggiore problema dei pazienti colpiti da fibrosi cistica (FC) riguarda la compromissione delle vie aeree, dove un'aumentata viscosità del muco promuove la colonizzazione batterica del polmone. Questa condizione risulta da una idratazione insufficiente delle vie aeree come conseguenza di uno sbilanciamento tra la secrezione di cloruro, che risulta molto ridotta a causa delle mutazioni CFTR, e l'assorbimento di sodio, e acqua, attraverso il canale ENaC che quindi diventa predominante nell'epitelio. Per risolvere questo problema è necessario quindi aumentare la secrezione di cloruro o ridurre l'assorbimento di sodio. Recentemente abbiamo usato del RNA d'interferenza (siRNA), piccole molecole che riducono l'espressione delle subunità dell'ENaC, e abbiamo trovato che questo trattamento riduce l'assorbimento d'acqua nell'epitelio in vitro. Sebbene i risultati ottenuti siano importanti perché dimostrano come sia possibile migliorare l'idratazione delle vie aeree tramite siRNA, la riduzione dell'ENaC risulta parziale e riscontriamo seri problemi nel cercare di fare entrare i siRNA dentro l'epitelio già formato. Nel presente progetto abbiamo proposto di usare diverse strategie per accentuare l'inibizione dell'ENaC e di altre proteine coinvolte nell'assorbimento di sodio, di estendere lo studio alle cellule FC, e cercare d'identificare le condizioni che permettano di trasferire i siRNA all'epitelio già formato. In questo primo anno abbiamo fatto un'analisi dettagliata delle caratteristiche dell'ENaC nelle cellule H441. Abbiamo stabilito i) che l'espressione delle subunità α, β, γ e δ dell'ENaC è simile in queste cellule e nell'epitelio primario bronchiale umano, e ii) che le cellule H441 hanno correnti ENaC classiche con alta affinità per l'amiloride, e anche correnti cationiche poco sensibili ad amiloride e a Evans blue.

I risultati ottenuti sono utili per interpretare correttamente gli esperimenti di silenziamento. Abbiamo confrontato il silenziamento ottenuto usando singoli o gruppi di siRNA con sequenze diverse e da fonti diverse. Questo ci ha permesso d'identificare delle sequenze che funzionano bene e a basse concentrazioni. Abbiamo iniziato la valutazione funzionale del silenziamento della prostasin, una delle serine proteasi coinvolta nell'attivazione dell'ENaC. Infine, abbiamo messo a punto un protocollo per misurare l'altezza del fluido periciliare con un microscopio confocale.



Roberto Loi e il suo gruppo di ricerca

In cystic fibrosis, the repopulation of diseased airway epithelium with cells expressing functional CFTR represents an option that may be available in the future to reduce morbidity and mortality of this disease. The recently developed induced pluripotent stem cells (iPS) have allowed the generation of patient-specific stem cells that may be useful for cell therapy approaches. iPS cells have characteristics similar to other pluripotent stem cells, including embryonic stem cells. Pluripotent stem cells are capable of differentiating into multiple tissues, including lung epithelium.

Therefore, in cystic fibrosis, diseased lung epithelium could potentially be replaced by functional epithelial cells derived from iPS. iPS could be generated from somatic cells of the patient, and the gene defect could be corrected in vitro. Then, iPS could be induced to differentiate in vitro into airway epithelial cells and this cell preparation could be administered to the same patient, thus avoiding immune rejection, to repopulate the diseased airway epithelium with normal cells. This is a very ambitious goal, and many issues need to be solved before this approach becomes applicable to human treatment in the future. The most relevant problem relates to the safety of the cells that are being administered to the patient. Another critical issue is represented by our still limited capability to specifically direct the differentiation of the iPS towards the cell type of interest. In this respect, we speculated that iPS derived from airway epithelial cells, retaining an epigenetic memory of the somatic cell of origin, may be more amenable to differentiation into airway epithelium.

Within this project we propose to derive iPS cells from airway epithelial cells, either normal or isolated from patients affected by cystic fibrosis. We will then try to induce the differentiation of the iPS cells into airway epithelial cells. In parallel, similar experiments will be conducted in vivo on murine models expressing either normal or mutated CFTR, in order to analyze the engraftment of normal, iPS-derived epithelial cells in the diseased epithelium.

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

Loi R

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

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

Nella fibrosi cistica, il ripopolamento dell'epitelio malato delle vie aeree con cellule normali esprimenti la proteina CFTR funzionale rappresenta una possibile opzione per ridurre la morbilità e la mortalità di questa malattia. Il recente sviluppo delle cellule staminali pluripotenti indotte (iPS) ha permesso la generazione di cellule staminali specifiche per il paziente che potrebbero essere utili in approcci di terapia cellulare. Ad esempio, nella fibrosi cistica, l'epitelio malato delle vie aeree potrebbe essere potenzialmente ripopolato con cellule epiteliali funzionali derivate da cellule iPS. Le iPS potrebbero essere generate a partire da cellule somatiche del paziente ed il difetto genico corretto in vitro. In seguito, si potrebbe indurre il differenziamento delle cellule iPS in cellule epiteliali delle vie aeree e somministrare queste cellule allo stesso paziente, evitando così il loro rigetto immunitario, per ripopolare l'epitelio polmonare malato con cellule normali.

Questo è un obiettivo molto ambizioso, e molti ostacoli devono essere superati affinché questo approccio possa in futuro diventare applicabile all'uomo. I problemi più rilevanti riguardano attualmente la sicurezza delle cellule che vengono somministrate al paziente. Un altro elemento di criticità è costituito dalla nostra ancora limitata capacità di guidare selettivamente il differenziamento delle cellule iPS verso il tipo cellulare di nostro interesse. A questo proposito riteniamo che cellule iPS derivate da cellule epiteliali delle vie aeree, mantenendo esse una memoria epigenetica della cellula somatica di partenza, possano essere più facilmente indotte a differenziarsi in cellule epiteliali polmonari.

Nell'ambito di questo progetto ci proponiamo di derivare cellule iPS a partire da cellule epiteliali delle vie aeree, sia normali che isolate da pazienti affetti da fibrosi cistica. Successivamente cercheremo di indurre il differenziamento delle cellule iPS in cellule dell'epitelio polmonare. Parallelamente, analoghi esperimenti verranno condotti in vivo su modelli murini esprimenti CFTR funzionale o mutata, con lo scopo di analizzare l'attecchimento delle cellule epiteliali normali derivate da iPS nell'epitelio polmonare malato.

Short reports on FFC Facilities

Moderator: Antonio Cao



Alessandra Bragonzi

49. CFaCore: Cystic Fibrosis Animal Core Facility

Bragonzi A

Divisione di Immunologia, Trapianti e Malattie infettive,
Infections and Cystic Fibrosis Unit, 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. In the last years, 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 conduct 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. Negli ultimi anni, 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, 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.



Elena Nicolis e Valentino Bezzetti

The QuantiGENE facility offers to the FFC research groups the ability to implement and strengthen their experimental plan by performing the qualitative and quantitative analysis of gene expression at very low costs and with very short response times. The instrument can measure from 1 to 384 genes in a sample in one operating session, lasting about half a working day. QuantiGene is proposed as a full service collection and processing of samples which can be sent by the Centers and cared for by Dr. Elena Nicolis, chief operating officer and Dr. Valentino Bezzetti, financed by FFC. The offer is for studies in the field of inflammation, microbiology but also in all expression studies in vitro and in vivo, versatile to receive new proposals for research and development. In recent months the QuantiGENE facility has been enriched by a new acquisition, by macroarray approach it is now feasible to quantify approximately 100 murine genes involved in immunity. The experiment on mice in vivo is in fact an important step in research in cystic fibrosis and the positive feedbacks for CFaCore Facility show that certain groups are just working and investing accordingly. QuantiGene is therefore proposed as a service on completion of testing in vivo, in order to deepen on the basis of molecular genetics and the effect of compound treatment.

50. QuantiGENE: CF Research Facility for the Analysis of Gene Expression

Nicolis E, Bezzetti V, Cabrini G

Lab. Patologia Molecolare, Azienda Ospedaliera Universitaria, Verona

QuantiGENE: servizio di quantificazione dell'espressione genica

Il Servizio QuantiGENE offre ai gruppi di ricerca FFC la possibilità di implementare e rafforzare il proprio piano sperimentale effettuando l'analisi qualitativa e quantitativa della espressione genica, a costi estremamente contenuti e con tempi di risposta molto ristretti. Lo strumento permette di quantificare da 1 a 384 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 Bezzetti, borsista finanziato da FFC. L'offerta è rivolta a studi nel campo dell'infiammazione ma anche della microbiologia, in tutti gli studi di espressione condotti in vitro e in vivo, versatile a ricevere nuove proposte di studio e sviluppo. Negli ultimi mesi il Servizio QuantiGENE si è arricchito con una nuova acquisizione: mediante approccio macroarray è ora concretamente possibile quantificare circa 100 geni murini, coinvolti nell'immunità. La sperimentazione in vivo su topo è infatti una passaggio importante nella ricerca in fibrosi cistica e i riscontri positivi alla CFaCore Facility dimostrano che alcuni gruppi stanno proprio lavorando e investendo in tal senso. QuantiGENE si propone quindi come servizio di completamento sulla sperimentazione in vivo, con lo scopo di approfondire su basi di genetica molecolare l'effetto di composti e trattamenti.

Emerging aspects of CF genetics

Moderator: **Maria Cristina Rosatelli**
Introduction by **Maria Cristina Rosatelli**



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

We showed that several types of mutation, either in the exon or in the intron can induce exon skipping. Focusing on CFTR exon 12, we are currently evaluating sequences that when targeted by oligonucleotides or by particular modified components of the splicing machinery (U1 snRNAs) are involved in the pathological exon skipping.

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

Pagani F
ICGEB, Trieste

(FFC Project#9/2009, extension of several FFC projects, in progress)

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

Numerose mutazioni identificate nei pazienti con Fibrosi Cistica possono indurre un difetto di "splicing". Questo difetto avviene a livello nucleare nella cellula e può compromettere la sintesi dell'RNA, che non è più in grado di codificare per una proteina CFTR funzionale. Uno degli eventi più comuni delle mutazioni di splicing è rappresentato dal salto dell'esone, nel quale parte della sequenza del CFTR corrispondente ad un "esone" non è correttamente inserita nel trascritto maturo. Nei nostri studi precedenti abbiamo mostrato che diversi tipi di mutazioni localizzate o nell'esone stesso o nelle regioni vicine sono in grado di indurre salto dell'esone. La nostra ricerca si è concentrata sull'esone 12 del CFTR, dove sono state identificate delle sequenze introniche che potrebbero rappresentare il bersaglio terapeutico di oligonucleotidi o di molecole modificate. In particolare alcune molecole modificate appartenenti al macchinario dello splicing (gli U1 snRNAs) hanno mostrato una efficiente attività in vitro su diversi mutanti di splicing dell'esone 12.



52. Influence of genetic factors in the progression of lung disease in cystic fibrosis (CF)

Gasparini P¹, Cabrini G²

¹Dip. Scienze dello Sviluppo e Riproduttive, Università di Trieste
²Lab. Patologia Molecolare, Azienda Ospedaliera Universitaria, Verona

(FFC Project#8/2009, completed, extension of previous FFC projects)

The identification of cystic fibrosis (CF) patients at greater risk of lung damage could be clinically valuable. Thus we attempted to replicate previous findings and verify the possible association between three polymorphisms (SNPs c.-52G>A, c.-44C>G and c.-20G>A) in the 5'UTR of the DEFB1 gene and the CF pulmonary phenotype.

Genomic DNAs of 92 Italian CF patients enrolled in different regional CF centres were extracted from peripheral blood

and genotyped for DEFB1 SNPs with Taqman allele specific probes. In order to possibly avoid genetic confounding causes that can account for CF phenotype variability, all patients were homozygous for the F508del CFTR mutation and were then classified, on the basis of clinical and functional data, as mild lung phenotype (Mp, n = 50) and severe lung phenotype patients (Sp, n = 42).

For the c.-20G>A SNP, the frequency of the A allele, as well as

the AA genotype, were significantly more frequent in Mp than in Sp patients, thus they were associated with a protective effect toward severe pulmonary disease (OR = 0.48 and 0.28 respectively). The effect of the c.-20G>A A allele is consistent with a recessive model, and the protective effect against Sp is exerted only when it is present in homozygosity. For the other two SNPs no differences were observed as allelic and genotypic frequency in the two subgroups of CF patients.

Our results, although to be confirmed on larger and multi-ethnic populations, reinforce DEFB1 as a candidate modifier gene of CF pulmonary phenotype.

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

Al fine di verificare gli effetti di variazioni nucleotidiche a carico del gene DEFB1, codificante per la beta defensina 1 nell'uomo, sulla modulazione del fenotipo polmonare dei pazienti affetti da Fibrosi Cistica (FC), abbiamo analizzato 3 polimorfismi localizzati nella regione 5'UTR (SNPs c.-52G>A, c.-44C>G and c.-20G>A) di DEFB1.

tro introdurne nuovi per proteine non previste, che possono dar luogo alla malattia. Per questo motivo un approccio di proteomica funzionale è stato impiegato per identificare proteine che legano una specifica regione del promotore di cftr. Un oligonucleotide biotinilato con sequenza corrispondente alla regione -222/+97 del promotore cftr è stato usato come esca per isolare le proteine

che legano in maniera specifica tale porzione di DNA. Le proteine così isolate sono state frazionate mediante SDS-PAGE ed identificate attraverso l'impiego di metodologie di spettrometria di massa. L'identificazione di alcuni fattori coinvolti nella regolazione trascrizionale ha consentito di formulare ipotesi relative al loro coinvolgimento nella regolazione dell'espressione del gene cftr.



Cristina Bombieri, a sinistra, con collaboratrici di ricerca

Despite the increasing number of CFTR gene variants identified, several cystic fibrosis (CF) patients still remain with unidentified mutations. The possible involvement of genes different from CFTR in the definition of CF phenotype is potentially quite relevant for research on Cystic Fibrosis.

Decreased chloride secretion and increased Na⁺ absorption are characteristic abnormalities of CF airways. The first is a direct consequence of a defective CFTR, while the increased salt absorption is probably a consequence of an abnormal interaction between CFTR and ENaC. The contribution of epithelial Na⁺ channel (ENaC) gene mutations to CF disease, in presence of either a wild-type or mutated CFTR, is presently unknown. Recent evidences suggested that the 3 genes (SCNN1A, SCNN1B, and SCNN1G) encoding for the 3 ENaC subunits could be involved in CF: mutations in ENaC genes have been found in CF or CF-like patients, upregulated expression of ENaC subunits was shown in CF nasal epithelium. Moreover, experimental evidences suggest that DNA methylation would control transcription of ENaC genes.

This project wants to improve our knowledge on the role of ENaC in CF development. Our aim is to explore whether molecular defects and transcriptional alterations in the SCNN1A, SCNN1B, and SCNN1G genes, associated to CFTR gene mutations, could be the cause of the CF disease. To this purpose, we have merged the expertise of three different research groups with a specific background on CF and on molecular and functional studies, to analyse mutations, including their biological and functional characterisation, and transcription control of the ENaC subunit encoding genes. The results of this study could lead to the identification of ENaC mutations having an higher incidence in CF patients than controls, and of anomalous methylation patterns of transcription control regions of these genes.

The identification of these factors is fundamental in order to comprise some molecular mechanisms leading to CF disease, and it can be useful to develop new pharmacological therapies.

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

Bombieri C¹, Seia M², Lucarelli M³, Ascenzi F³, Conese M⁴, Belpinati F¹, Lo Presti A¹, Paracchini V², Ceci F³, Ferraguti G³, Pierandrei S³, Bruno SM³, Cifani N³

¹Sez. Biologia e Genetica, Dip. Scienze della Vita e della Riproduzione, Università di Verona; ²Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico; ³Sez. Biochimica Clinica, Dip. Biotecnologie Cellulari ed Ematologia, Sapienza Università di Roma, Azienda Policlinico Umberto I; ⁴Dip. Scienze Biomediche, Laboratorio di Patologia Generale, Università di Foggia
(FFC Project#1/2010, new)

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

Nonostante l'elevato numero di variazioni di sequenza identificate nel gene CFTR, in vari pazienti con fibrosi cistica (FC) non è stato possibile identificare le mutazioni causalì. Il coinvolgimento di geni diversi dal CFTR nell'insorgenza della malattia è potenzialmente rilevante per la ricerca sulla fibrosi cistica.

La diminuzione della secrezione di cloro e l'aumento del riassorbimento di sodio sono anomalie caratteristiche dell'epitelio FC. La prima è conseguenza diretta di CFTR difettosa, mentre l'aumento di riassorbimento di sodio è probabilmente da imputare ad una anomala interazione tra CFTR e il canale epiteliale del sodio (ENaC). Attualmente non è noto quale sia il contributo, per l'insorgenza o la progressione della FC, di mutazioni dei 3 geni SCNN1A, SCNN1B e SCNN1G, che codificano per le subunità di ENaC, in presenza del gene CFTR normale o mutato. Dati recenti suggeriscono che anche questi geni possano essere coinvolti nella FC: mutazioni nei geni per ENaC sono state identificate in pazienti con FC o FC-atipiche e iper-espressione delle subunità ENaC sono state identificate nell'epitelio nasale in FC. Inoltre, dati sperimentali suggeriscono che la metilazione del DNA potrebbe controllare la trascrizione dei geni per ENaC.

Questo progetto vuole approfondire le conoscenze sul ruolo di ENaC nell'insorgenza della FC. L'obiettivo è quello di studiare se difetti molecolari e/o alterazioni della trascrizione nei geni SCNN1A, SCNN1B e SCNN1G, associati a mutazioni del gene CFTR, possano condurre a FC. A tale scopo abbiamo riunito le esperienze di tre diversi gruppi di ricerca, con conoscenze specifiche sulla Fibrosi Cistica e sugli studi molecolari e funzionali. I risultati dello studio permetteranno di identificare e caratterizzare biologicamente e funzionalmente le mutazioni dei geni codificant per ENaC, presenti nei pazienti FC rispetto ai controlli e i pattern anomali di metilazione delle regioni che controllano la trascrizione di questi geni.

L'identificazione di questi fattori è di fondamentale importanza per comprendere alcuni meccanismi molecolari che conducono alla fibrosi cistica, offrendo anche nuovi spunti per lo sviluppo di terapie farmacologiche adeguate.

Basic science of and therapeutic approaches for bacterial airway infection

Bacterial cell wall components as therapeutic targets

Moderator: Gerd Döring

Introduction by Antonio Molinaro



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

In a previous project ((FFC Project#8/2007) we showed that lipopolysaccharide (LPS) and peptidoglycan (PGN) are modified in *Pseudomonas aeruginosa* (PA) strains isolated during chronic infection of lungs of CF patients, with respect to those analyzed in strains found at early stages of the disease and that these structures displayed a decreased inflammatory potential. In this new project, we addressed the question of whether the decreased ability to trigger inflammation through innate immune system recognition could be associated with virulence variation in chronic strains. In particular, we investigated on the ability of PA strains to induce pyroptosis, an inflammatory cell death, triggered by the interaction of bacterial molecules with the family of proteins NLRs, which includes NOD1 and NOD2, the receptors of bacterial PGN. IPAF is the NLR protein that seems to mediate this process following contact with PA flagellin or components of the type 3 secretion system, T3SS, (likely Psc1). Pyroptosis is associated with caspase-1 activation and Interleukin-1 beta (IL-1beta) release. Concerning PGN, during this year, we continued to investigate on the inflammatory potential of PGN in vitro and in vivo. Our results show that: PA strains from chronic infection are more able (i) to induce cell death in different cell lines included CF bronchial cells, (ii) to elicit the release of IL-1beta in macrophages and (iii) to interact with IPAF to trigger caspase-1 maturation. Concerning the molecular elicitors of IPAF we demonstrate that (i) flagellin wasn't produced by the PA clinical strains; (ii) the T3SS was particularly active in the chronic strains along with the increased expression of genes encoding the secreted proteins. Finally, sequence analysis of T3SS genes and Psc1 in PA strains under examination and in other strains isolated from chronic and initial infection showed the consensus-mutations in functional domains. Concerning PGN, by analyzing the immunopotential of the individual muropeptides we found synergy and antagonism among them. Furthermore, we are setting up a new murine model to examine the impact of this purified structure in lungs. Preliminary results reveal that intranasal administration of PGN stimulate the presence of cell populations such monocytes or neutrophils depending on the dose and the presence/absence of a transfectant agent.

55. Immune evasion strategies underlining the adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients

Bernardini ML¹, Molinaro A², Alloui A³

¹Dip. di Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Sapienza-Università di Roma

²Dip. di Chimica Organica e Biochimica, Università "Federico II", Napoli

³Lab. de Bactériologie Moléculaire ULB, Faculté de Médecine, Bruxelles, Belgium

(FFC Project#17/2009, completed)

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

In un precedente progetto (FFC Project#8/2007), abbiamo dimostrato che il polisaccaride (LPS) ed il peptidoglicano (PGN) isolato da due ceppi di *Pseudomonas aeruginosa* (PA) provenienti dalle vie aeree di un malato di FC durante la fase cronica dell'infezione mostravano un immunopotenziale ridotto rispetto alle stesse strutture isolate da un ceppo della fase iniziale. In questo nuovo progetto abbiamo valutato se questi fenotipi potessero essere associati ad una variazione dei livelli di virulenza. In particolare, abbiamo analizzato la capacità di PA di indurre una morte "infiammatoria" mediante piroptosi, un processo mediato dall'attivazione della caspasi-1 ed il rilascio dell'interleuchina-1-beta. È stato riportato che PA attiva la piroptosi attraverso l'interazione di alcuni componenti, la flagellina e la proteina Psc1 del sistema di secrezione di tipo 3, T3SS, con la proteina IPAF, della famiglia NLR a cui appartengono le proteine NOD1 e NOD2, che riconoscono il PGN. In questo progetto, inoltre, abbiamo continuato ad indagare tanto in vitro quanto in vivo sull'immunopotenziale del PGN di ceppi clinici di PA. I nostri risultati mostrano che (1) ceppi provenienti dalla fase cronica dell'infezione hanno una maggiore capacità di indurre la morte cellulare in varie linee cellulari, comprese cellule CF; (2) che il processo di morte è accompagnato nei macrofagi da un conspicuo rilascio di IL-1beta; (3) che i ceppi tardivi, ed in particolare uno di questi, sono in grado di interagire specificamente con IPAF. Nessuno dei tre ceppi clinici di PA esprime o produce la flagellina, mentre il T3SS risulta particolarmente attivato nei ceppi dell'infezione tardiva. L'analisi delle sequenze dei geni codificanti per le tossine secrete dal T3SS e di Psc1 dei tre ceppi in esame e di altri ceppi provenienti da infezioni croniche e epidemiche ha rivelato la presenza di mutazioni-consenso in domini funzionali delle proteine. Tutti questi risultati indicano che la diminuzione della capacità infiammatoria, dovuta alla minore immunogenicità dei PAMPs, è bilanciata nei ceppi cronici da modificazioni in particolari fattori di virulenza. Per quanto riguarda il PGN i risultati preliminari suggeriscono sinergie ed antagonismi fra gli individuali componenti del PGN, i muropeptidi, mentre lo sviluppo di un modello murino per valutare la risposta dei polmoni al PGN ha messo in evidenza la capacità di questa struttura batterica di stimolare differenti popolazioni cellulari.



Antonio Molinaro, terzo da sinistra, con la sua unità di ricerca

*In the vast majority of cystic fibrosis patients chronic bacterial lung infections become established which significantly increase lung inflammation and contribute to tissue destruction, leading to a largely reduced life expectancy of the affected CF patients. The bacterial factors and the molecular mechanisms which provoke full blown inflammation in CF upon host-pathogen interaction at the CF respiratory epithelium interface are mostly unclear. Here we investigate the structure, function and immunostimulatory activity of the cell wall components lipopolysaccharide and peptidoglycan from the CF pathogens *Pseudomonas aeruginosa* and *Prevotella intermedia*. Molecular studies indicate that during chronic pulmonary infection, particularly *P. aeruginosa* clones genotypically and phenotypically adapt to the CF niche. This results in a highly diverse bacterial community which is difficult to eradicate due to rapidly acquired antibiotic resistance and structural changes in cell wall components. This study will enable us to develop novel inhibitors of bacterial cell wall synthesis with the aim to reduce lung inflammation in CF airways and to eradicate the pathogens with novel treatment strategies.*

Sviluppo di nuovi approcci terapeutici contro le infezioni微生物 nei pazienti con fibrosi



Alba Silipo, seconda da sinistra, con alcuni collaboratori

*This project is aimed to elucidate the in vitro and in vivo antimicrobial activity of novel bacterial cytoskeleton inhibitors on clinically derived opportunistic pathogens, as Bcc (Burkholderia cepacia complex) and *Pseudomonas* strains from patients undergoing lung transplantation. Treatment of CF infections is difficult due to the inherent bacterial multidrug resistance; there is a pressing need to find new bacterial targets for antimicrobials that provide functions essential for cell growth and replication. A major component of the bacterial cytoskeleton is the actin homolog MreB that maintains bacterial cell shape*

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

Molinaro A¹, Bernardini ML², Doering G³

¹Dip. di Chimica Organica e Biochimica, Università di Napoli "Federico II"

²Dip. di Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Sapienza-Università di Roma

³Institut for General and Environmental Hygiene, University of Tübingen

(FFC Project#11/2010, extension FFC Project#8/2007)

cistica: analisi biochimica di frammenti di parete cellulare

Nonostante i progressi nel trattamento delle malattie infettive, i microrganismi patogeni rimangono i principali e più importanti agenti pericolosi per la salute umana. Le infezioni del tratto respiratorio con malfunzionamento polmonare e mortalità associata sono la causa maggiore di morte in fibrosi cistica (FC). La suscettibilità dei pazienti è correlata ad una attività antimicrobica molto bassa nelle vie aeree, loro disidratazione ed ipersecrezione di muco. I fattori batterici ed i meccanismi a livello chimico che provocano lo scoppio dell'infiammazione in FC a seguito dell'interazione patogenoospite sono essenzialmente poco chiari. In questo progetto noi chiariamo la struttura, la funzione e l'attività immunostimolatoria dei componenti della parete cellulare dei microbi patogeni opportunisti FC più importanti come *Pseudomonas aeruginosa* (PA) e l'anaerobio emergente *Prevotella intermedia*, che rappresentano un problema clinico molto rilevante per i pazienti FC. Studi a livello molecolare condotti dal nostro gruppo e nell'ambito del progetto precedente hanno chiarito che PA, durante il cambio da infezione acuta a infezione cronica, si adatta biochimicamente, cioè cambia la struttura chimica degli elementi della parete cellulare. Questo implica una comunità batterica nei polmoni altamente eterogenea difficile da sradicare, a causa dei cambi continui in strutture chimiche che mistificano la loro presenza. Questo studio permetterà di sviluppare nuovi inibitori della sintesi della parete cellulare con lo scopo di ridurre l'infiammazione nelle vie aeree FC e sradicare i patogeni con nuove strategie di trattamento.

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

Silipo A¹, De Soya A²

¹Dip. Chimica organica e Biochimica, Università di Napoli

²Dep. of Respiratory Medicine Freeman Hospital, Applied Immunobiology and Transplantation Group, Institute for Cellular Medicine, The Medical School University of Newcastle – UK

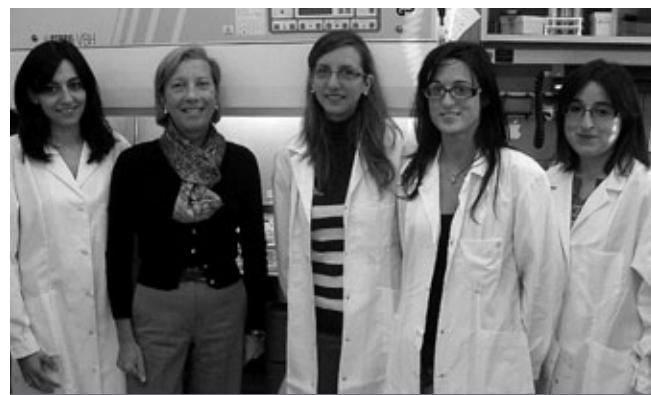
(FFC Project#16/2009, in progress)

and has emerged as an attractive new target for antimicrobials. In this frame, A22 is a cell permeable compound that disrupts MreB, destabilizing the bacterial cytoskeleton and altering the bacterial shape. We have tested a synthetic library of A22-related compounds and identified compound Q22 as a potential antimicrobial of interest against opportunistic CF pathogen. Extensive characterization of the phenotype of clinically relevant strains has been conducted after treatment of over 30 clinically important CF strains with the novel antibiotics A22 and Q22 which demonstrated to be effective against

all Bcc, Pseudomonas and also S. maltophilia strains, inhibiting growth and reducing growth rate. Bcc bacteria grown in the presence of Q22 showed a number of phenotypic (cell morphology) changes associated with disruption of the MreB cytoskeleton. Furthermore, we are also analyzing secondary effects of these cytoskeleton inhibitors on bacterial membrane including changes in virulence factors as lipopolysaccharides (LPS). The LPS of selected strains of Bcc bacteria grown in the presence of Q22 showed profile differences when compared to untreated bacteria. We are now extracting and characterizing such LPS; as for the first analyzed, the LPS from B. cenocepacia, the main structural changes respect to the epidemic and virulent B. cenocepacia ET12 were found in the different distribution of the lipid A species with an overall higher level of acylation and substitution by Ara4N following A22/Q22 therapy. The LPS structure from other A22/Q22 treated strains is going to be defined and their immunostimulatory activity will be analyzed to establish how induced changes in LPS could influence the immunostimulatory properties. The assessment of the in vivo antimicrobial activity and host toxicity of such novel cytoskeleton inhibitors will be performed 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 dal *Burkholderia cepacia complex* (Bcc)

L'obiettivo del presente progetto è la delucidazione della attività antimicrobica in vitro e in vivo di nuovi inibitori del citoscheletro batterico su strain di isolati clinici di patogeni opportunisti del genere *Pseudomonas* ed appartenenti al Bcc (*Burkholderia cepacia complex*) isolati da pazienti con fibrosi cistica. Le infe-



Alessandra Polissi, seconda da sinistra, e il suo gruppo di ricerca

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

zioni da FC sono difficili da trattare e sradicare a causa dell'intrinseca resistenza agli antibiotici dei batteri infettanti, da cui la crescente necessità di trovare nuovi target batterici indispensabili per crescita e replicazione che siano oggetto dell'azione di nuovi antibiotici.

Uno dei componenti principali del citoscheletro batterico è l'omologo dell'actina MreB, che garantisce la forma cellulare e sta emergendo come interessante target per nuove classi di antibiotici tra cui A22, un composto permeabile che distrugge MreB, destabilizzando il citoscheletro batterico e alterando la forma cellulare. Abbiamo testato una libreria sintetica di composti correlati ad A22 e abbiamo identificato Q22 come potenziale antibiotico rivolto contro i patogeni opportunisti coinvolti nella FC. Abbiamo quindi condotto una estensiva caratterizzazione del fenotipo di strain clinicamente rilevanti dopo il loro trattamento con Q22 e A22, che si sono effettivamente dimostrati efficaci contro tutto il Bcc, *Pseudomonas* e anche *S. maltophilia*, riducendone e inibendone la velocità di crescita. Inoltre abbiamo anche seguito i cambi fenotipici (morfologia cellulare) associati in batteri Bcc alla distruzione del citoscheletro e stiamo analizzando gli effetti secondari causati da tali inibitori del citoscheletro sulla membrana batterica, incluse variazioni in fattori di virulenza quali i lipopolisaccaridi (LPS). Gli LPS da strain del Bcc cresciuti in presenza di Q22 mostravano differenze in confronto agli strain non trattati. Attualmente stiamo estraendo e caratterizzando tali LPS: il primo analizzato è stato l'LPS da uno strain di *B. cenocepacia*; le principali variazioni evidenziate rispetto allo strain di riferimento sono state rinvenute nella differente distribuzione delle specie di lipide A, che evidenziavano un aumento nel livello di acilazione e nella quantità di Ara4N presente in seguito alla terapia con A22/Q22. È in corso di definizione la caratterizzazione strutturale di LPS estratti da altri strain di Bcc e *Pseudomonas* trattati con inibitori del citoscheletro, al fine di capire quali siano le variazioni indotte da tali antibiotici sui fattori di virulenza batterica. Inoltre sarà testata in vivo l'attività antimicrobica e la tossicità per l'ospite di Q22/A22 al fine di aprire la strada al design di nuovi classi di antibiotici.

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

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

¹Dip. Biotecnologie e Bioscienze, Università Bicocca Milano

²Dip. Scienze Biomolecolari e Biotecnologie, Università di Milano

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

(FFC Project#10/2008, completed)

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 proposed to study KdsD an essential protein implicated in LPS biosynthesis. We performed a detailed

study on KdsD to define the structure-function relationship and we solved its three dimensional structure. Moreover we performed NMR (Nuclear Magnetic Resonance) studies to define the structural requirements necessary for KdsD substrate's recognition. Based on the results obtained we designed and synthesized several putative inhibitors that will be 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 antimicobici innovativi

Le infezioni polmonari causate da *Pseudomonas aeruginosa* sono una delle principali cause di malattia e morte di pazienti affetti da fibrosi cistica. *P. aeruginosa* è un patogeno resistente alla maggior parte dei farmaci convenzionali e ciò rende difficile il trattamento delle infezioni. È 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 e capire come questa molecola venga trasportata dal sito in cui

avviene la sintesi verso la membrana esterna, 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 inhibire 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 è concentrato su KdsD, una proteina essenziale ed altamente conservata nei batteri Gram-negativi, che controlla un punto chiave della biosintesi del LPS. Infatti KdsD è un enzima implicato nella biosintesi di un residuo essenziale e presente in tutti i LPS analizzati finora e rappresenta quindi un ottimo bersaglio farmacologico, dal momento che è sufficientemente conservato tra diversi e clinicamente rilevanti ceppi batterici ma non è presente nell'uomo.

Durante questo progetto abbiamo analizzato, tramite tecniche biofisiche e di genetica molecolare, la relazione struttura-funzione di KdsD, abbiamo risolto la sua struttura cristallografica e abbiamo determinato via NMR (Risonanza Magentica Nucleare) i requisiti di legame ai substrati naturali e loro analoghi. In base ai risultati strutturali che abbiamo ottenuto, abbiamo progettato e sintetizzato una serie di inibitori potenziali che saranno saggiate per la loro attività antibatterica.



Alessandra Polissi

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

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

¹Dip. Biotecnologie e Bioscienze, Università Bicocca Milano

²Dip. Scienze Biomolecolari e Biotecnologie, Università di Milano

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

(FFC Project#13/2010, new)

One of the major causes of morbidity and mortality in Cystic Fibrosis patients is lung infection by the opportunistic Gram-negative bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. Intrinsic and acquired resistance of this pathogen to most conventional drugs makes the treatment of such infections very difficult. New and specific antibacterials are thus deeply needed.

Lipopolysaccharide is an essential main component of the outer membrane, the external structure of Gram-negative bacteria that mediates a variety of interactions with the environment and the infected organism, including the high intrinsic antibiotic resistance of these bacteria. Significant advances have been made in the last few years in understanding how this molecule travels from the site of synthesis to its final destination in the outer membrane. The time is thus mature to exploit lipopolysaccharide biogenesis as a target for the development of novel therapeutics by rational drug design.

Rational drug design is one of the most used approaches to obtain new chemicals capable to inhibit biological functions. By knowing the molecular structure of a suitable target (e.g. a protein) it is possible to identify, firstly *in silico* then *in vitro*, molecules that may specifically interact with the target. This approach can be extended to hamper essential protein-protein interactions through the identification of small interfering peptides. These molecules/peptides can thus be tested as inhibitors of

the target function and may serve as leads for further modifications aimed at improving their drug properties.

This research project focuses on two essential proteins (*LptA* and *LptC*) highly conserved in Gram-negative bacteria that control lipopolysaccharide transport to the cell surface (its final destination), which is a key step in lipopolysaccharide biogenesis. Such proteins are ideal drug targets since they are sufficiently conserved among diverse, clinically-relevant bacteria, and no homologues or analogue counterparts are present in humans.

We propose first a detailed study (via molecular genetics and biophysical techniques) to confirm the role of these proteins in *P. aeruginosa* and to investigate features that have not been fully, or at all, characterised to date, including their crystallographic structures. Secondly, based on the structure of these proteins and their substrates, we will design and synthesize potential inhibitors that will be tested for their antibacterial activity.

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

Le infezioni polmonari causate da *Pseudomonas aeruginosa* sono una delle principali cause di malattia e morte di pazienti affetti da

fibrosi cistica. *P. aeruginosa* è un patogeno resistente alla maggior parte dei farmaci convenzionali e ciò rende difficile il trattamento delle infezioni. È quindi urgente ideare e saggiare farmaci antibatterici nuovi e specifici.

Il lipopolisaccaride è un componente essenziale della membrana esterna, la struttura di rivestimento dei batteri Gram-negativi. Esso media diverse interazioni con l'ambiente e l'organismo ospite ed è responsabile dell'elevata resistenza intrinseca agli antibiotici. In questi ultimi anni sono stati fatti molti progressi per comprendere come questa molecola venga trasportata dal sito di sintesi (citoplasma e membrana interna) verso la membrana esterna, sua destinazione finale. Pensiamo quindi che la biogenesi del lipopolisaccaride rappresenti un bersaglio ideale per sviluppare farmaci innovativi tramite progettazione razionale.

La "progettazione razionale" di farmaci è uno degli approcci più utilizzati per ottenere nuove molecole capaci di inibire funzioni biologiche. Conoscendo la struttura molecolare di un possibile bersaglio (es. una proteina) è possibile, utilizzando sofisticati programmi bioinformatici, identificare molecole che interagi-

scano in modo specifico con il bersaglio stesso. Questo approccio può essere esteso alla progettazione di piccoli peptidi che inibiscano interazioni tra proteine, indispensabili per formare complessi proteici essenziali. Il progetto di ricerca si concentra su due proteine, da noi scoperte, che sono componenti della macchina per il trasporto del lipopolisaccaride nella membrana esterna, un processo essenziale per la sopravvivenza dei batteri Gram negativi. Le due proteine, che legano il lipopolisaccaride ed interagiscono tra di loro, rappresentano quindi ottimi bersagli farmacologici dal momento che sono presenti in molti ceppi batterici clinicamente rilevanti ma sono assenti nell'uomo. Proponiamo innanzitutto uno studio dettagliato (tramite tecniche biofisiche e di genetica molecolare) per confermare il ruolo di queste proteine in *P. aeruginosa* e per analizzarne caratteristiche che non sono tuttora state definite, compresa la loro struttura cristallografica. Quindi, basandoci sulla struttura di queste proteine e del loro substrato, progetteremo e sintetizzeremo inibitori potenziali (piccole molecole o peptidi) che saranno saggiati per la loro attività antibatterica.



Alessandra Bragonzi, prima a destra, e il suo gruppo di ricerca

*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. A Genome-derived *P. aeruginosa* Antigens (GPA) database has been developed having identified novel vaccine candidates on the basis of their putative localization on the cell surface by "reverse vaccinology" and by a combination of advanced genomic approaches. All listed targets in GDA have been grouped by ranking score after their validation by an homology search of seven *P. aeruginosa* database. Targets with homology with human genome were excluded. Vaccination protocols have been established in murine models of *P. aeruginosa* acute and chronic infection. According to our murine models, protection against lethal doses of *P. aeruginosa* and reduction in bacterial load is currently under evaluation in mice immunized with purified antigens.*

*The results of the project may contribute to settle the basis of a novel immunotherapy to contrast *P. aeruginosa* lung infections in CF patients.*

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

Bragonzi A¹, Bertoni G², Bianconi I¹

¹Divisione di Immunologia, Trapianti e Malattie infettive – Infections and Cystic Fibrosis Unit, Istituto San Raffaele, Milano

²Dipartimento di Scienze Biomolecolari e Biotecnologie, Università degli studi di Milano

(FFC Project#10/2009, in progress)

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. In questo progetto abbiamo generato una lista di tutti gli antigeni proteici di *P. aeruginosa* che hanno la maggior probabilità di essere buoni candidati vaccini. La lista di candidati vaccini (Genome-derived *P. aeruginosa* Antigens (GPA)) è stata generata applicando una combinazione di avanzati approcci genomici e sulla base della presunta localizzazione sulla superficie cellulare. Tutti i candidati vaccini elencati nel GDA sono stati validati per analisi comparativa con sette genomi di *P. aeruginosa*. In questa fase, abbiamo escluso proteine con epitopi simili ad antigeni umani. Stiamo valutando l'immunogenicità di alcuni di questi candidati vaccini in protocolli di vaccinazione messi a punto in modelli murini di infezione acuta e cronica da *P. aeruginosa* durante questo ultimo anno. Questi modelli permettono di valutare la protezione di antigeni purificati contro dosi letali di *P. aeruginosa* in modelli di infezione acuta e la riduzione della carica batterica in modelli di infezione cronica. I risultati del progetto potranno contribuire a disegnare nuove strategie di intervento e trattamenti terapeutici per contrastare le infezioni polmonari *P. aeruginosa* in pazienti con FC.

Antibacterial peptides, bacterial interactions and microbial epidemiology

Moderator: Gerd Döring

Introduction by Giovanni Taccetti



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

Physicians treating patients with CF are increasingly faced with pulmonary infections caused by multidrug-resistant (MDR) strains. In addition, efforts to treat these infections are hampered by the conditions present in the patients' airway surface liquid, which could inhibit antibiotic therapy. For all these reasons, it is mandatory to develop novel anti-infective therapeutic strategies.

Host-defence antimicrobial peptides (AMPs) are natural molecules present in all living organisms, from plants to humans. They are endowed with a rapid and broad-spectrum antibiotic activity and have been indicated as lead compounds for the development of novel antibiotics with a mode of action different from those in use.

The aim of this project is to investigate the potential of AMPs for treatment of CF lung MDR infections. Although the antimicrobial activity of AMPs has been extensively reported in the literature, scant data have been published with respect to CF pathogens. Hence, in an attempt to evaluate the therapeutic potential of AMPs in the management of CF lung infections, we tested the mammalian, cathelicidin-derived antimicrobial peptides BMAP-27 and BMAP-28 against selected *P. aeruginosa* and *S. maltophilia* CF isolates. These two peptides were selected from a panel of natural and designed AMPs after preliminary studies of antibacterial activity against CF isolates.

The antibacterial and anti-biofilm activity of the BMAPs was evaluated against planktonic forms of 41 (25 *P. aeruginosa* and 16 *S. maltophilia*), non-duplicated MDR strains isolated from CF patients. In order to mimic the physical-chemical properties of CF lung environment, all assays were performed in a chemically defined synthetic CF sputum medium.

The results show that BMAP-27 and -28 are both active against the 41 strains tested and indicate a higher susceptibility of *S. maltophilia* compared to *P. aeruginosa*. The time-killing assays show that the bactericidal activity of both AMPs is rapid and dose- and concentration-dependent. In addition, the two peptides, tested at sub-inhibitory concentrations, comparably and significantly reduce the amount of biofilm formed on polystyrene by *S. maltophilia* and *P. aeruginosa* strains.

Taken together, the results confirm that BMAP-27 and BMAP-28 may represent a potential therapeutic option for CF lung infections caused by *P. aeruginosa* and *S. maltophilia* strains, thus warranting additional studies, particularly *in vivo* in animal models of FC lung infection.

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

Gennaro R¹, Di Bonaventura G², Fiscarelli E³

¹Dip. di Scienze della Vita, Università di Trieste

²Dip. di Scienze Biomediche, Università di Chieti-Pescara

³Lab. di Microbiologia della Fibrosi Cistica, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma

(FFC Project#12/2009, in progress)

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

Le infezioni respiratorie da batteri multiresistenti ai farmaci (MDR) rappresentano la principale causa di mortalità nei pazienti con fibrosi cistica (FC). Gli sforzi per curare queste infezioni sono ostacolati anche dalle condizioni presenti nel liquido che bagna la superficie delle vie respiratorie, condizioni che possono inibire l'attività degli antibiotici. Per questo è necessario individuare strategie terapeutiche alternative.

I peptidi antimicrobici (AMP) di difesa sono molecole naturali presenti in tutti gli organismi, dalle piante all'uomo. Essi sono dotati di un'attività antibiotica rapida e ad ampio spettro e sono stati indicati come "composti guida" per lo sviluppo di nuovi antibiotici con meccanismo d'azione diverso da quelli in uso.

L'obiettivo della ricerca è quello di valutare l'attività di AMP verso isolati da pazienti CF per un loro sviluppo come agenti terapeutici. Tra i tanti AMP a disposizione, naturali e progettati razionalmente, studi preliminari *in vitro* hanno permesso di identificare come molto promettenti i peptidi di mammifero ad α -elica BMAP-27 e BMAP-28, appartenenti alla famiglia delle catelicidine. Questi peptidi sono stati saggiati contro *Pseudomonas aeruginosa* e *Stenotrophomonas maltophilia* isolati da pazienti FC. In particolare, l'attività antibatterica dei peptidi è stata saggia contro 41 ceppi MDR di origine clonale diversa (25 di *P. aeruginosa* e 16 di *S. maltophilia*) da pazienti FC. È stato inoltre saggia il loro effetto sulla formazione di biofilm. Tutti i saggi sono stati condotti utilizzando un terreno sintetico con caratteristiche chimico-fisiche rappresentative dell'escreato fibrocistico. I risultati ottenuti indicano che BMAP-27 e -28 sono attivi verso i 41 ceppi saggiai con una maggiore sensibilità di *S. maltophilia* rispetto a *P. aeruginosa*.

Le analisi cinematiche evidenziano una rapida azione battericida di tipo dose- e tempo-dipendente. Inoltre, concentrazioni sub-inibenti dei due peptidi riducono in modo significativo la quantità di biofilm formato da *S. maltophilia* e *P. aeruginosa*.

In conclusione, i due AMP saggiai sono dotati *in vitro* di spiccata attività antibatterica ed anti-biofilm verso *P. aeruginosa* e *S. maltophilia*. Pertanto, potrebbero rappresentare un'attraente alternativa terapeutica per la malattia polmonare dei pazienti FC. Ulteriori studi saranno necessari per confermare il potenziale terapeutico di queste catelicidine, in particolare in modello animale di infezioni polmonari FC.



Alessandro Pini, in basso a sinistra, e il suo gruppo di ricerca

The project FFC#14/2009 is dedicated to the development of the antimicrobial peptide M33 for its use as a new agent against lung infection due to *Pseudomonas aeruginosa*. The first year of work has been carried out in collaboration between the proposer group, at the University of Siena, and the CFaCore Facility based in San Raffaele, Milan. The aim of the collaboration was the evaluation of M33 efficacy in lung infection animal models obtained by the instillation of bacteria through mouse trachea. During the development of this work we had the possibility to understand some aspects that complicated the evaluation of M33 efficacy. The first important point regarded the unexpected toxicity of peptide M33. We realized that the synthesis strategy we used since many years did not allow to obtain a purity of M33 suitable for the use in lungs. Practically, an essential reagent used in one of the production steps was not completely eliminated during purification. Nuclear magnetic resonance studies let us understand which reagent was to render M33 toxic. We set up a new procedure to manufacture M33 and now the toxic molecule is almost completely eliminated from the preparation we use *in vivo*. This strategy allowed to improve our efficacy test. New preparations of M33 slowed down the onset of lung infection signs in mice infected with lethal doses of *Pseudomonas*. Confirmation of such results are currently in progress. During the first year of work we also realized that the administration route we used to deliver M33 in mice was not perfectly suitable to our infection model. Alternative administration routes are currently under study, and very preliminary results confirmed the potent antibacterial activity of M33 in the lungs.

Concluding, the first year of project FFC#14/2009 let us understand some molecular and experimental aspects that impaired the efficacy of M33 in first *in vivo* studies. The optimization of production strategy of M33 along with the improvement of M33 delivery will let us to better investigate *in vivo* the efficacy of M33 and to understand if a new antibacterial agent will be available in the next years for the lung infections encountered in Cystic Fibrosis.



Annamaria Bevivino, a sinistra, con una collaboratrice

Bacterial infection in human 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 among

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

Pini A

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

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 è incentrato sullo sviluppo della molecola antimicrobica M33, scoperta all'Università di Siena, e potenzialmente utile per contrastare le infezioni polmonari da *Pseudomonas aeruginosa*. Il primo anno di lavoro è stato essenzialmente svolto attraverso la collaborazione del gruppo di ricerca proponente dell'Università di Siena e il CFaCore Facility del San Raffaele di Milano. Il lavoro è stato principalmente dedicato alla valutazione dell'efficacia del peptide M33 contro infezioni da *Pseudomonas* nel polmone di animali da esperimento. I test effettuati hanno dato la possibilità di capire alcuni aspetti di natura molecolare e di strategia sperimentale che avevano fornito inizialmente dei risultati contrastanti. In particolare è stato evidenziato che la sintesi del peptide effettuata nei laboratori del gruppo proponente, veniva effettuata attraverso una procedura standard non adattabile all'uso *in vivo*. In pratica il peptide M33 risultava tossico *in vivo*, a causa di un reagente di sintesi non perfettamente eliminato nelle procedure di purificazione. Studi di risonanza magnetica nucleare hanno permesso di identificare il reagente tossico e di modificare la strategia di purificazione. La nuova strategia permette oggi di eliminare il reagente indesiderato. Questa nuova procedura ha permesso di produrre il peptide M33 in una forma che ha fornito i primi dati positivi di efficacia *in vivo* rallentando la comparsa dei sintomi di infezione polmonare da *Pseudomonas*. Questi promettenti risultati dovranno essere confermati da studi più ampi da effettuarsi durante il secondo anno. Un ulteriore passo avanti nell'utilizzo di M33 è stato fatto evidenziando che la via di somministrazione del peptide usata nei primi esperimenti non era perfettamente adattabile al modello in studio. Sono quindi state analizzate vie di somministrazione alternative che hanno dato risultati particolarmente promettenti, indicando una potente attività antimicrobica di M33 a livello polmonare. Anche in questo caso è certamente necessario un approfondimento sperimentale per confermare i risultati ottenuti in via preliminare.

In conclusione il primo anno di lavoro del progetto FFC#14/2009 ha permesso di ottimizzare le metodologie di produzione della molecola e di strategia sperimentale, confermando la potente attività antimicrobica di M33 *in vivo* e lasciando ipotizzare il possibile sviluppo di una nuovo agente antibatterico per la Fibrosi Cistica.

63. *Burkholderia cenocepacia pathogenicity: synergistic interactions with *Pseudomonas aeruginosa* and adaptation to CF host*

Bevivino A¹, Ascenzi F², Bragonzi A³

¹Dip. Bioteecn. Agroalimentari e protezione della salute, ENEA Casaccia
²Dip. Biol. Cellulare e dello Sviluppo, Università "La Sapienza", Roma

³Divisione di Immunologia, Trapianti e Malattie infettive, Istituto San Raffaele, Milano

(FFC Project#7/2008, completed)

pathogenic microorganisms and between these latter and the resident microflora. Since *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cenocepacia* inhabit the same environmental niches

and can form mixed biofilms in the lung 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. Our main aim was 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. Our study showed that the interaction of *B. cenocepacia* with *P. aeruginosa* positively affected biofilm formation and highlighted the inadequacy of planktonic system to mimic the behaviour of bacteria in biofilms. Replacement of each strain by its cell-free culture supernatant revealed the contribute of extracellular *B. cenocepacia* compounds in enhancement of *P. aeruginosa* biofilm production, suggesting that both species-specific physical interactions between cells and extracellular secreted factors contribute to dual-species biofilm formation. In-vivo experiments revealed that both pathogens induced bacteremia in non-CF and CF mice with a similar bacterial load. Although only *P. aeruginosa* was able to persist within the airways of co-infected mice, the lung inflammation in both non-CF and CF mice was altered by the co-presence of two bacterial species. The results obtained provided a highly interesting example of interspecies communication and pointed out the dynamic interactions between immune response and different bacteria with significant impact on disease outcomes. To clarify the role of the host on *B. cenocepacia* virulence, we focused our attention on the environmental *B. cenocepacia* Mex1 strain which was able to adapt to the "local environmental" conditions of the murine lung tissues, revealing an increased ability to cause chronic lung infection following serial passages in mice. Interestingly, by using *Caenorhabditis elegans* and *Galleria mellonella* models, two Mex1-derived clones with a virulence degree similar to the clinical *B. cenocepacia* LMG16656 strain were obtained. Based on these observations, we speculate that Mex1-derived clones acquired virulent factors typical of virulent *B. cenocepacia* clinical strains, probably due to acquisition of adaptive mutations. The conversion of environmental *B. cenocepacia* to CF-lung niche specialists might result from a complex adaptation process characterized by the selection of subclonal variants that carry advantageous mutations. A better understanding of the microevolution of *B. cenocepacia* towards niche specialists according to the selective pressure in the CF lung is a prerequisite for the development of new treatment strategies against *B. cenocepacia*.

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



Silvia Campana, prima a destra, e il suo gruppo di ricerca

The prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection in cystic fibrosis patients (CF) has increased. Recently, it has been demonstrated that persistent infection with

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 dalla capacità dei microrganismi patogeni di comunicare tra loro e con la microflora indigena. Poiché *Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia cenocepacia* colonizzano le stesse nicchie ambientali e sono in grado di formare biofilm misti 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 microbico. Il nostro principale obiettivo è stato 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 della fibrosi cistica.

Il nostro studio ha dimostrato che l'interazione di *B. cenocepacia* con *P. aeruginosa* ha avuto un'influenza positiva sulla formazione di biofilm e ha messo in evidenza come il sistema di crescita planctonica sia inadeguato a simulare il comportamento dei batteri nel biofilm. La sostituzione di un ceppo con il supernatante ottenuto dalla stessa coltura cellulare ha dimostrato il contributo di composti extracellulari di *B. cenocepacia* nell'aumento della formazione di biofilm di *P. aeruginosa*, suggerendo che sia le interazioni specie-specifiche tra le cellule batteriche che i fattori extracellulari contribuiscono alla formazione del biofilm misto. Gli esperimenti in vivo hanno rivelato che entrambi i patogeni inducono batteremia sia nei topi non FC che nei topi FC, con una simile carica batterica. Inoltre, anche se soltanto *P. aeruginosa* si è rivelato in grado di persistere dopo 14 giorni di infezione cronica nelle vie aeree di topi FC e non-FC coinfettati con entrambi i patogeni, la co-presenza delle due specie batteriche ha causato un'alterazione dell'infiammazione polmonare dell'ospite. I risultati ottenuti forniscono un esempio molto interessante della comunicazione tra le diverse specie e hanno sottolineato l'esistenza di interazioni dinamiche tra la risposta immunitaria e le diverse specie batteriche, che hanno un impatto significativo sugli esiti della malattia. Per chiarire il ruolo dell'ospite sulla virulenza di *B. cenocepacia*, abbiamo focalizzato la nostra attenzione sul ceppo ambientale Mex1 di *B. cenocepacia* che aveva dimostrato la capacità di adattarsi alle condizioni "locali" del tessuto polmonare murino, con un aumento della virulenza in seguito a successivi passaggi di infezione in un modello murino di infezione cronica. È interessante notare che, utilizzando come modelli *Caenorhabditis elegans* e *Galleria mellonella*, sono stati ottenuti due cloni di Mex1 con una virulenza simile a quella del ceppo clinico *B. cenocepacia* LMG16656. Sulla base di queste osservazioni, possiamo ipotizzare che varianti clonali di Mex1 abbiano acquisito fattori di virulenza tipici dei ceppi clinici, probabilmente in seguito all'acquisizione di mutazioni adattative. L'adattamento di un ceppo di *B. cenocepacia* ambientale ad una particolare nicchia deriva da un processo complesso caratterizzato dalla selezione di varianti subclonali. Una migliore comprensione della microevoluzione di *B. cenocepacia* verso una specializzazione di nicchia, legata alla pressione selettiva presente nel polmone FC, è un prerequisito necessario allo sviluppo di nuove strategie di trattamento contro *B. cenocepacia*.

64. 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

Campana S

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

(FFC Project#11/2009, completed, extension FFC project#11/2007)

MRSA affects the rate of decline in lung function and survival of CF patients, but there is no consensus about MRSA infection treatment strategies. 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 strains. HA-MRSA and CA-MRSA are characterized by different structures of the genetic element (SCCmec) carrying methicillin-resistance. The goal of this project is to analyze the impact on clinical status of persistent MRSA infections in CF patients. MRSA strains (one strain/patient/year) are collected from persistently colonized patients attending 10 Italian CF centers over a period of four years. All strains are characterized to evaluate whether they represent HA-MRSA or CA-MRSA (SCCmec typing), and genotyped with Multi-Locus-Sequence-Typing (MLST) in order to assess whether they belong to epidemic lineages. The impact of persistent infections with CA-MRSA and HA-MRSA on the clinical status of CF patients is investigated. During the first year of the project, 153 MRSA strains were collected from 153 patients. Molecular characterization of these strains indicated that 40% were CA-MRSA whereas 60% were HA-MRSA. Over a 3-year period (2008-2010), the yearly presence of CA-MRSA remained stable at about 40%. Other 50 MRSA strains were isolated from 14 CF patients persistently colonized (mean colonization period: 3.5 years). SCCmec cassette typing and MLST analysis of these MRSA strains indicated that 26 out of 50 isolates belonged to known epidemic clones; two patients were persistently colonized with epidemic clones of CA-MRSA and four patients were persistently colonized with known lineages of HA-MRSA. Preliminary clinical data regarding 13 patients (6 infected with CA-MRSA and 7 with HA-MRSA) showed an annual mean decrease in FEV1 of 1.033 in the CA-MRSA colonized patients and of 2.77 in those colonized by HA-MRSA. These results show that MRSA clones responsible for epidemics worldwide cause persistent infections in CF patients. Furthermore, the persistent colonization with HA-MRSA seems to cause greater damage to respiratory function compared to CA-MRSA. The result of this project has important implications for the management of MRSA infections in CF patients. Identification of dangerous MRSA strains and clarification of their role in the pathogenesis of pulmonary damage in CF patients will lead to improved segregation strategies. Monitoring and treatment of MRSA infections in CF patients could be optimized by carrying out specific eradication treatment against pathogenic MRSA strains.

Impatto dell'infezione persistente da *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente di acquisizione comunitaria (CA-MRSA) e di acquisizione ospedaliera (HA-MRSA) sullo



Daniela Maria Cirillo, prima a destra, con collaboratrici di progetto

Despite the increase in prevalence of *S. aureus* (SA) and the serious potential morbidity from methicillin sensitive (MSSA) and methicillin resistant SA (MRSA) in CF patients, little is

stato clinico dei pazienti con fibrosi cistica: uno studio 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. L'infezione persistente da MRSA può incidere in maniera significativa sul decremento della funzionalità polmonare e sulla sopravvivenza. Ad oggi non vi è una strategia terapeutica approvata per il trattamento di tali patogeni polmonari. Classicamente le infezioni in ambito nosocomiale sono dovute a ceppi di MRSA denominati "di acquisizione ospedaliera" (HA-MRSA), tuttavia un'altra tipologia di MRSA nota per causare infezioni comunitarie (CA-MRSA) sta attualmente rimpiazzando i ceppi HA-MRSA. CA-MRSA sono attualmente causa di gravi infezioni a causa del loro alto grado di patogenicità. I ceppi di CA-MRSA e HA-MRSA si distinguono grazie ad una diversa struttura dell'elemento genetico responsabile della meticillino-resistenza (SCCmec). Lo scopo di questo progetto è di valutare l'impatto clinico dell'infezione persistente da CA-MRSA e HA-MRSA sui pazienti con fibrosi cistica. I ceppi di MRSA e i dati clinici vengono raccolti, per un periodo di 4 anni, dai pazienti seguiti da 10 centri di cura sul territorio nazionale che presentano una infezione persistente da MRSA. Tutti i ceppi raccolti sono sottoposti alla caratterizzazione della cassetta SCCmec, e analizzati con Multi-Locus-Sequence-Typing (MLST) per valutare la loro appartenenza a cloni epidemici noti. Durante il primo anno del progetto sono stati raccolti 153 ceppi di MRSA da altrettanti pazienti. La caratterizzazione molecolare ha permesso di stabilire che 40% rappresentano CA-MRSA mentre 60% rappresentano HA-MRSA. La prevalenza annuale media di CA-MRSA e HA-MRSA in un periodo di tre anni (2008-2010) si mantiene stabile (40% e 60% rispettivamente). Altri 50 ceppi di MRSA sono stati isolati da 14 pazienti colonizzati persistentemente (periodo medio di colonizzazione 3,5 anni). La tipizzazione della cassetta SCCmec e l'analisi con MLST ha permesso di evidenziare che molti isolati appartengono a cloni epidemici noti, in particolare 2 pazienti risultano colonizzati persistentemente da noti cloni di CA-MRSA, mentre 4 pazienti sono infettati persistentemente da cloni epidemici di HA-MRSA. L'analisi preliminare dei dati clinici relativi a 13 pazienti (6 pazienti infettati cronicamente da CA-MRSA e 7 da HA-MRSA) ha evidenziato che il decremento annuale medio di FEV1 è 1,033 nei pazienti colonizzati da CA-MRSA e 2,77 in quelli colonizzati da HA-MRSA. Questi risultati preliminari, hanno evidenziato che noti cloni epidemici di MRSA causano infezioni persistenti in pazienti FC. Inoltre la colonizzazione persistente con HA-MRSA sembra causare un maggior decremento della funzionalità respiratoria rispetto a CA-MRSA. Tale studio può avere importanti conseguenze per il monitoraggio delle infezioni da MRSA, infatti la caratterizzazione dei ceppi che hanno un potenziale patogenetico può migliorare le norme di prevenzione di tali infezioni. L'identificazione precoce delle tipologie potenzialmente patogene può portare ad una ottimizzazione delle strategie terapeutiche effettuando un trattamento eradicante tempestivo e mirato verso questi ceppi di MRSA.

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

Cirillo DM¹, Baldan R¹, Testa F¹, Bragonzi A², Bianconi I², Cigana C², Farulla I², Kahl B³

¹EBPU S. Raffaele Scientific Institute, Milano, Italy

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

³UniversitätsKlinikum, Institute für Medizinische Mikrobiologie, Münster, Germany

(FFC Project#9/2010, new)

known about its role in the progression of lung disease. SA appears early in the disease, later MRSA and other phenotypic variants (SCVs) are isolated in co-infection with *P. aeruginosa*

(PA). It is unclear whether SA is an independent contributor to decline in lung function or increases susceptibility to PA damage.

The objectives of this study are:

- i) To determine virulence of early and late isolates of SA including MSSA, MRSA and SCVs
 - ii) To explore the interactions between SA and PA strains *in vitro* and *in vivo*
 - iii) To establish the impact of anti-SA treatment and PA superinfection in the progression of chronic lung disease
- SA clonal variants from CF patients, including MRSA and thymidine-dependent SCVs, will be characterized and used to test virulence in a mouse model of chronic infection. As read-outs of virulence we will test mortality induced by bacteremia versus survival of the mice and SA persistence versus clearance. SA and MRSA well characterized strains will be used (Newman, SH1000, USA300). Clinical thymidine-dependent SCVs will also be investigated.

Interaction between selected pairs of PA/SA strains will be studied by growth inhibition assays and *in a biofilm model*. Invasion, cytotoxicity and cytokine production will be performed on CF epithelial cells. Murine model of chronic infection will be used to study superinfection with PA after SA infection. Mortality, persistence, inflammatory response and histopathology will be compared in animals infected with PA or SA alone to animals infected first with SA and later with PA.

Selected antibiotics, which are used to treat MSSA and MRSA infections in CF patients, will be used to treat SA infected mice. Next, the capacity to modulate virulence of PA will be tested after PA superinfection. Progression of chronic infection in the presence or absence of treatment will be compared. Furthermore, special culture conditions will be applied to be able to culture also SCVs which may be induced by antibiotic treatment. Results from the project will increase the knowledge on the role of SA colonization and infection in the progression of PA lung disease and guide the use of anti-SA antibiotic treatment for preventing of PA lung disease.

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

L'incidenza di infezioni da *S. aureus* sia meticillino-sensibile (MSSA) che resistente (MRSA) risulta in aumento nella popolazione generale ed in pazienti con fibrosi cistica (FC). Pazienti con FC sono colonizzati con MSSA precocemente nella malattia mentre MRSA viene isolato in una fase tardiva e in co-infezione con *P. aeruginosa*. Non è chiaro il ruolo di *S. aureus* nell'infezione cronica da *P. aeruginosa*. Non esiste un consenso generale sull'utilità del trattamento con antibiotici antistafilococcico nel caso di primo isolamento oppure di persistenza del germe nelle vie aeree di pazienti asintomatici. Il progetto propone di: i) caratterizzare i fattori di virulenza associati a diversi isolati di *S. aureus*, clinici e di laboratorio, ii) valutare le interazioni tra ceppi di *S. aureus* e di *P. aeruginosa* *in vitro* ed *in vivo*, iii) stabilire l'impatto del trattamento antibiotico anti- *S. aureus* e della superinfezione da *P. aeruginosa* nella progressione della malattia polmonare cronica. Le variazioni genomiche e fenotipiche e la virulenza saranno studiate in ceppi clonali di *S. aureus* isolati nell'arco di anni da pazienti FC. È stato recentemente osservato che bambini FC co-infetti con *S. aureus* e *P. aeruginosa* hanno nelle secrezioni respiratorie un tasso di citochine proinfiammatorie più elevato rispetto alla popolazione di controllo non infetta da *S. aureus*. Risultati preliminari ottenuti nel modello murino confermano che l'infezione da *S. aureus* modula la progressione ad infezione polmonare cronica di *P. aeruginosa*. L'interazione tra le due specie verrà studiata con saggi di inibizione della crescita ed *in biofilm*, in cellule epiteliali FC e in una linea macrofagica per valutare invasione, citotossicità e risposta infiammatoria ed in modelli di infezione cronica *in vivo*, inclusi topi FC. I risultati saranno confrontati con quelli ottenuti dopo trattamento antistafilococcico. Il progetto permetterà di capire il contributo dell'infezione da *S. aureus* nel deterioramento della funzionalità polmonare del paziente FC. Inoltre la comprensione del ruolo di *S. aureus* nella progressione dell'infezione cronica polmonare da *P. aeruginosa* potrà essere utile a stabilire l'eventuale necessità di un trattamento (profilattico) e/o eradicante di *S. aureus* e, di conseguenza, a migliorare le strategie terapeutiche in pazienti FC.

Publications and congress communications of the studies funded by the Italian CF Research Foundation from 2002 to 2010

Pubblicazioni e comunicazioni congressuali di studi finanziati dalla fondazione FFC dal 2002 al 2010

1. CFTR PATHOPHYSIOLOGY AND THERAPY

OF THE BASIC DEFECT

Fisiopatologia CFTR e terapie del difetto di base

■ FFC Project#1/2002 "Mini-chromosomes: a new approach for cystic fibrosis gene therapy"

Fiorentina Ascenzioni (Dipart. Biologia cellulare e dello sviluppo – Univ. La Sapienza Roma), Massimo Conese (Ist. per il Trattamento sperimentale della FC - Osp. San Raffaele – Milano), Olga Zegarra (Lab. Gen. Molec. – Ist. Gaslini – Genova)

Publications

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

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

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

Publications

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

Abstracts

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- Copreni E. et al. "Trasferimento genico mediato da un vettore lentivirale in modelli di epitelio respiratorio in vitro e in vivo: efficienza e ruolo dell'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 Zaccolo (Ist. Veneto Med. Molecolare, Padova)

Publications

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

Abstracts

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

■ 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 Modula-

tion 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 Rafaele – Milano)

Publications

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

Abstracts

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

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

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

Publications

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

Abstracts

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

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

Lisa Bambara (Medicina Interna B, Policlinico, Univ. di Verona)

Publications

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

■ FFC Project#2/2004 "Chemoreceptor mechanism in CFTR expressing cells: molecular bases and role in control of secretion"

Francesco Osculati (Dipart. Scienze Morfologico Biomediche – Università di Verona)

Publications

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

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

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

Abstracts

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

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

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

Publications

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

Abstracts

- Tamanini A. et al. "Adenovirus Vector Receptor Interactions and Early Pro-Inflammatory Signalling" 2005 – European Cystic Fibrosis Conference – New Frontiers in Basic Science of Cystic Fibrosis – 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 16HBE14o – cells and rescues ΔF508 CFTR functional expression in Cystic Fibrosis cells" *The Journal of Biological Chemistry* vol. 280, No. 49, pp. 40925-40933, December 9, 2005.
- Favia M. et al. "NHE3 inhibits PKA-dependent functional expression of CFTR by NHERF2 PDZ interactions" *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2006 Aug 25;347(2):452-9.
- Pantano S. et al. "Molecular basis of the allosteric mechanism of cAMP in the regulatory PKA subunit" *FEBS Letters* 579 (2005) 2679-2685;
- Fanelli T. et al. "Beta-estradiol rescues Delta-F508 CFTR functional expression in human cystic fibrosis airway CFBE 41 o-cells through the up-regulation of NHRF1". *Biol Cell* 2008 Jan 9

Abstracts

- Fanelli T. et al. "β-estradiol rescues ΔF508-CFTR functional expression in CFBE41o-cells via NHRF1 up-regulation" *Workshop Transporters 2006*, Parma 6-9 September 2006.
- Guerra L et al. "Rescue of deltaF508 CFTR in CFBE41O-cells is dependent on actin cytoskeleton interaction with ezrin and NHERF1" *European CF Conference, Belek, Turkey, 13-16 June 2007; J. of Cystic Fibrosis June 2007*, vol. 6, suppl. 1:S7
- Riccardi S.M. et al. "Rescue of deltaF508 CFTR in CFBE41O-cells is dependent on actin cytoskeleton interaction with ezrin and NHERF1" *58th National Congress of the Italian Physiological Society, Lecce 19-21 Sept. 2007; Acta Physiologica*, vol. 191, suppl. 657

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

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

Abstracts

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

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

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

Abstracts

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

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

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

Publications

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

Abstracts

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

■ 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 Galietta (Lab. Gen. Molec. - Ist. Gaslini – Genova), Mauro Mazzei (Dipart. Scienze Farmaceutiche - Univ. Genova), Oscar Moran, (Istituto di Biofisica CNR – Genova)

Publications

- Pedemonte N. et al. "Structure-Activity relationship of 1,4-Dihydropyridines as potentiators of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel" Molecular Pharmacology, Vol. 72, N. 1, pp. 197-207
- Caputo A. et al. "TMEM16A, A Membrane Protein Associated with Calcium-Dependent Chloride Channel Activity" Science Express, DOI: 10.1126/science.1163518, 4 Sept. 2008.
- Caputo A. et al. "Mutation-specific potency and efficacy of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel potentiators" J Pharmacol Exp Ther (2009) 330: 783-91.
- Cateni F. et al. "Synthesis of 4-thiophen-2'-yl-1,4-dihydropyridines as potentiators of the CFTR chloride channel" Bioorg Med Chem (2009) 17: 7894-903
- Ferrera L. et al. "Regulation of TMEM16A chloride channel properties by alternative splicing" J Biol Chem (2009) 284: 33360-33368

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

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

Publications

- Zegarra Moran O. et al. "Functional analysis of mutations in the putative binding site for CFTR potentiators: interaction between activation and inhibition" The Journal of Biological Chemistry Vol. 282, No. 12 pp. 9098-9104, 2007
- Ferrera L. et al. "Characterization of a 7,8-Benzoflavone Doublet Effect on CFTR Cl⁻ Channel Activity" J. Membrane Biol. (2007) DOI 10.1007/s00232-007-9066-4
- Moran O. et al. "On the measurement of the functional properties of the CFTR" Journal of Cystic Fibrosis, 7 (2008) 483-494
- Moran O. "Model of the cAMP activation of chloride transport by CFTR channel and the mechanism of potentiators" J. Theor. Biol. (2010) 262:73-79.
- Bisignano P. et al. "Molecular dynamics analysis of the wild type and dF508 mutant structures of the human CFTR-nucleotide binding domain 1" Biochimie (2010) 92:51-57.
- Melani R. et al. "Analysis of ion transport in the airway epithelium using RNA interference" Current Opinion in Molecular Therapeutics, 11 (3): 282-291, 2009

- Melani R et al. "Modulation of Cystic Fibrosis transmembrane conductance regulator activity and genistein binding by cytosolic pH" (2010) doi: 10.1074/jbc.M110.166850

- 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" 2009 ECFS Basic Science Conference, New Frontiers in Basic Science of Cystic Fibrosis, April 15-19, Tavira, Portugal.z<<

- 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 works?" 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. "Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor 1 overexpression-dependent increase of cytoskeleton organization is fundamental in the rescue of F508del cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in human airway CFBE41o- Cells" Molec Biol of the Cell (2010), Vol. 21: 73-86

Abstracts

- Favia M. et al "Ezrin phosphorylation and activation of RHOA play a role in the rescue of ΔF508 un CFBE41O-cells by NHERF1" XIII Congresso italiano della Fibrosi cistica, III Congresso nazionale SIFC, Milano, 30 novembre – 2 dicembre 2007

- Favia M. et al. "Ezrin phosphorylation and activation of RhoA play a role in the NHERF1 overexpression-dependent rescue of F508del CFTR in human airway CFBE41o- cells" IV Congresso Nazionale della Società Italiana Fibrosi Cistica, Torino, 27-29 novembre 2008

- Monterisi S. et al. "Ezrin and cAMP/PKA have different compartmentalization in CFBE41o- and 16HBE14o- cells" 31st European Cystic Fibrosis Conference, Prague 11-14 June 2008

- Favia M. et al. "Rescue of F508del-CFTR in CFBE41o- cells is dependent on actin cytoskeleton interaction with Ezrin and NHERF1" ECFS Basic Science Conference, Regua, Douro, Portugal, 9-13 April 2008

■ FFC Project#3/2007 "Pharmacological chaperones as correctors of ΔF508-CFTR"

Mauro Mazzei (Dipart. Scienze Farmaceutiche - Univ. Genova), Melloni E. (Dip. Medicina Sper., Genova), Moro S. (Dip. Scienze Farmaceutiche Padova), Luis JV Galietta (Lab. Gen. Molec. - Ist. Gaslini – Genova)

Publications

- Cateni F. et al. "Synthesis of 4-thiophen-2'-yl-1,4-dihydropyridines as potentiators of the CFTR chloride channel" Bioorganic & Medici. Chem. 17 (2009) 7894-7903

■ FFC Project#4/2007 "Assessing the implication of protein kinase CK2 in cystic fibrosis pathogenesis"

Lorenzo A. Pinna (Dipart. Chimica Biologica – Università di Padova)

Publications

- Pagano M. et al. "Modulation of protein kinase CK2 activity by fragments of CFTR encompassing F508 may reflect functional links with cystic fibrosis pathogenesis" Biochemistry 2008, 47, 7925-7936
- Pagano M. et al. "CFTR fragments with the F508 deletion exert a dual allosteric control over the master kinase CK2" Biochem. J. In press.
- Pagano M. et al. "La sorprendente diffusione del gene della fibrosi cistica: indizi per una nuova ipotesi" Atti dell'Istituto Veneto

di Scienze, Lettere ed Arti, Tomo CLXVII (2008-2009) – Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali, Padova
- Pagano M. et al. "Cystic fibrosis trans membrane regulator fragments with the Phe508 deletion exert a dual allosteric control over the master kinase CK2" Biochem. J. (2010) 426, 19-29

■ FFC Project#1/2009 **"Role of the scaffolding protein NHERF in the PKA-mediated regulation of CFTR sorting and activity"**

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

Abstracts

Mancini MC et al. "Phosphorylation of ezrin on threonine t567 plays a crucial role in the rescue of f508del cftr functional expression" Congresso SIFC Rimini, 18-21 novembre 2010

■ FFC Project#2/2009 **"Development of small molecules to correct the defective chloride transport in cystic fibrosis"**

Luis JVL Galletta (Lab. Gen. Molec. - Ist. Gaslini - Genova), Enrico Millo (Dip. Medicina Sperimentale – Lab. Biochimica – Univ. di Genova), Mauro Mazzei (Dipart. Scienze Farmaceutiche - Univ. Genova)

Publications

- Ferrera L et al. "Regulation of TMEM16A chloride channel properties by alternative Splicing" J Biol Chem 284:33360-33368, 2009
- Pedemonte N et al. "Influence of cell background on pharmacological rescue of mutant CFTR" Am J Physiol 298:C866-C874, 2010

■ FFC Project#3/2009 **"Dissection by RNAi-mediated silencing of molecular mechanisms leading to f508del-cftr misprocessing"**

Nicoletta Pedemonte (Lab. Gen. Molec. - Ist. Gaslini – Genova)

Abstracts

Pedemonte N et al "Dissection by RNAi-mediated silencing of molecular mechanisms involved in DF508del-CFTR misprocessing" North America Cystic Fibrosis Conference, Baltimore, October 2010

■ FFC Project#4/2009 **"Signaling potential of the DF508 CFTR mutation: a new paradigm to explain nonchannelopathy related aspects of cystic fibrosis"**

Lorenzo A. Pinna (Dipart. Chimica Biologica – Univ. di Padova)

Publications

- Ruzzene M et al. "Assessment of CK2 Constitutive Activity in Cancer Cells" Methods in Enzymology, 484. in press
- Salvi M "Variable contribution of protein kinases to the generation of the human phosphoproteome: a global weblogo analysis" BioMol Concepts 2010 Aug; 1(2): 185-195.
- Salvi M et al. "Motif analysis of phosphosites discloses a potential prominent role of the Golgi casein kinase (GCK) in the generation of human plasma phospho-proteome" J Proteome Res. 2010 Jun; 9(6): 3335-3338.
- Ruzzene M et al. "Addiction to protein kinase CK2: a common denominator of diverse cancer cells?" Biochim Biophys Acta 2010 Mar; 1804(3): 499-504.
- Pagano MA et al. "Cystic fibrosis transmembrane regulator fragments with the Phe508 deletion exert a dual allosteric control over the master kinase CK2" Biochem J. 2010 Jan; 426(1):19-29.

Abstracts

- Pagano MA et al. "CK2 as a novel player in the modulation of phosphorylation-dependent events in cystic fibrosis" 6th International Conference on Protein Kinase CK2, Cologne (Germany), September 7-10, 2010.

■ FFC Project#18/2009 **"Mapping IL-8 gene transcription machinery in bronchial epithelial cells"**

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

Abstracts

- Gambari R. et al. "Pharmacological modulation of chemotactic signalling in respiratory models" 2010 ECFS Conference – April 7-10, Carcavelos (Portugal)
- Bezzerra V et al. "Genetic regulatory network of Interleukin-8" 3rd European CF Young Investigator Meeting, Lille, France, 2009

2 GENETICS

Genetica

■ FFC Project#4/2003 **"Identification of CF modifier genes by family studies and microarray analysis"**

Giuseppe Novelli (Dipart. Biopatologia e Diagnostica per imm. - Univ. Tor Vergata RM), Pierfranco Pignatti (Ist. Biol. Genetica – Dip. Materno Infantile - Univ. Verona), Francesco Salvatore (Dipart. Bioch. e Biotec. Mediche – Univ. Federico II – Napoli)

Publications

- Groman J. D. et al. "Variation in a Repeat Sequence Determines Whether a Common Variant of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene is Pathogenic or Benign" Am. J. Hum. Genet. 74:176-179, 2004

- Sangiuliano F. et al. "Toward the pharmacogenomics of Cystic Fibrosis – an update" Future Medicine – Pharmacogenomics, 2004 Oct, 5 (7), pp. 861-878

- 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. "Differentiati genotipi CFTR causano un diverso adattamento dell'espressione genica in linee cellulari FC" VIII Congresso Nazionale S.I.G.U. – Domus de Maria (CA) 28-30 settembre 2005;

- Groman J. D. et al. "Length of a variable TG repeat predicts whether the IVS8-5T mutation in the CFTR gene is pathogenic or benign" VI Congresso Nazionale S.I.G.U. – Verona 24-27 settembre 2003;

- Belpinati F. et al. "Geni modificatori in fibrosi cistica" V Congresso Nazionale S.I.G.U. – 5° Congresso Nazionale S.I.G.U. Verona 24-27 settembre 2002;

- Belpinati F. et al. "Geni modificatori del fenotipo polmonare in Fibrosi Cistica" 6° Congresso Nazionale S.I.G.U. Verona 24-27 settembre 2003;

- Gambardella S. et al. "CAP70: nuovo gene modificatore del fenotipo nella Fibrosi Cistica?" 7° Congresso Nazionale S.I.G.U. 2004

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

Franco Pagani (ICGBE – Trieste)

Publications

- Buratti E. et al. "Nuclear factor TDP-43 Ninds to the Polymorphic TG Repeats in CFTR Intron 8 and Causes Skipping of Exon: A Functional Link with Disease Penetrance" Am. J. Hum. Genet. 74:1322-1325, 2004

- Amaral M.D. et al. "Quantitative methods for the analysis of CFTR transcripts/splicing variants" Journal of Cystic Fibrosis 3 (2004) 17-23;

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

- Pagani F. et al. "Synonymys mutations in CFTR exon 12 affect splicing and are not neutral in evolution" Proc Natl Acad Sci USA 2005, 102 (18), 6368-72.

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

Pierfranco Pignatti (Ist. Biol. Genetica, Dip. Materno Infantile, Univ. Verona), Carlo Castellani (Centro FC, Osp. Civile Maggiore - Verona), Guido Modiano (Dip. Biologia "E. Calet" Univ. di Roma, Tor Vergata)

Publications

- Pompei F. et al. "Haplotype block structure study of the CFTR gene. Most variants are associated with the M470 allele in several European populations" European Journal of Human Genetics 2006 Jan;14(1):85-93.

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

Abstracts

- Pignatti P. F. et al. "Assessing the possible utilization of CFTR-M470V genotyping for CF risk determination" Congresso ASHG 26-30 ottobre 2004;

- Pompei F. et al. "Determinazione del possibile utilizzo del polimorfismo CFTR-M470V per la determinazione del rischio di Fibrosi Cistica" Congresso SIGU 13-16 ottobre 2004;

■ FFC Project#5/2004 **"Screening of CFTR gene rearrangements in Italian CF patients"**

Giuseppe Castaldo (CEINGE - Biotec. Avanzate s.c.a.r.l. - Univ. Federico II Napoli), Carlo Castellani (Centro FC – Ospedale Civile Maggiore – Verona), Cristina Bombieri (Ist. Biol. Genetica – Dip. Materno Infantile – Univ. Verona), Federica Sangiuliano (Dipart. Biopatologia e Diagnostica per Immagini - Univ. Tor Vergata Roma)

Publications

- Bombieri C. et al. "Frequency of large CFTR gene rearrangements in Italian CF patients" European Journal of Human Genetics (2005) 13, 687-689;

- Salvatore D. et al. "Cystic fibrosis presenting as metabolic alka-

losis 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, Toronto, Canada, October 26-30, 2004*;
- Tomaiuolo R. et al. "Screening di macrodelezioni del gene CFTR in pazienti CF originari del sud Italia" 37° Congresso Nazionale 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)

Publications

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

Abstracts

- Riccardino F. et al. "Geografia (e storia) delle mutazioni della Fibrosi Cistica: l'Italia in un contesto europeo" 8° Congresso Nazionale S.I.G.U. – Cagliari 28-30 Settembre 2005.

■ FFC Project# 8/2004 "CF: characterization of the unknown mutations in Italian patients and assessment of their pathogenic role"

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

Publications

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

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

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

Publications

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

■ FFC Project#14/2005 "New approaches for noninvasive prenatal diagnosis of cystic fibrosis by fetal DNA analysis in maternal plasma"

Laura Cremonesi (Unità di Genomica per diagnosi di patologie umane - Fond. Centro San Raffaele del Monte Tabor, Milano), Gabriella Restagno (S.S. di Diagnostica Molecolare e Test genetici integrati - Dip. Patologia Clinica dell' A.O.O.I.R.M. – S. Anna, Torino), Manuela Seia (Istituti Clinici di Perfez. – Lab. Genetica Molecolare, Milano), Carlo Castellani (Centro Reg. Fibrosi Cistica – Osp. Civile Maggiore, Verona)

Publications

- Bruno F. et al. "High- sensitive microarrays substrates specifically designed to improve sensitivity for the identification of fetal paternally inherited sequences in maternal plasma" *Clin Chem Lab Med* 2009, 47:818-823
- Mari C. et al. "Application of pyrosequencing to the identification of sequence variations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene." *Clin Chem Lab Med* 2009; 47:1051-4

■ FFC Project#15/2005 "Splicing Affecting Genomic Variants in CFTR: Diagnostic and Therapeutic Aspects"

Franco Pagani (ICGEB, Trieste)

Publications

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

■ FFC Project#24/2006 "Characterization of the unknown mutations in Italian patients and assessment of their pathogenic role: a prerequisite for prevention of Cystic Fibrosis by carrier screening and prenatal diagnosis"

Maria Cristina Rosatelli, (Dipart. Scienze Biom. e Biotecn. Lab. Genetica Molecolare - Univ. Cagliari), M. Baffico (Ospedali Galliera, Laboratorio di Genetica, Genova), Carlo Castellani (Centro FC – Ospedale Civile Maggiore – Verona), Manuela Seia (Lab. Genetica Molecolare ICP – Milano)

Publications

- Faa V. et al. "A Synonymous Mutation in the CFTR Gene Causes an Aberrant Splicing in an Italian Affected by a Mild Form of Cystic Fibrosis" doi: 10.2353/jmoldx.2010.090126

■ 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#20/2007 "Evaluation of disease causing mutations in CFTR co-transcriptional splicing units: diagnostic and therapeutic aspects"

Franco Pagani (ICGEB – Trieste)

Publications

- Baralle M. et al. "Influence of Friedrich Ataxia GAA noncoding repeat expansion on Pre-mRNA processing" *Am J Hum Genet* 83, 77-88, July 2008.
- Goina E. et al. "Binding of DAZAP1 and hnRNPA1/A2 to an exonic splicing silencer in a natural BRCA1 exon 18 mutant" *Mol Cell Biol*, 28, June 2008, 3850-3860.
- Pinotti M. et al. "U1-snRNA-mediated rescue of mRNA processing in severe factor VII deficiency" *Blood*, 111, 5, 2681-4.

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

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

Abstracts

- Cozzolino F. et al. "Identification of novel CFTR promoter regulatory elements" Italian Proteomics Association, 4th Annual National Conference, Milano, June 22-25, 2009.
- Lo Presti A et al "Ricerca di mutazioni nel promotore del gene CFTR in soggetti affetti da Fibrosi Cistica" XII Congresso Nazionale di Genetica Umana: SIGU – Torino, 8th -11th November 2009
- Iannone C et al. "Identification of novel CFTR expression regulatory elements" ITPA 2010 - Florence, 9 th -12 th June 2010
- Giordano S et al. "Il ruolo del promotore del gene CFTR: da elemento regolativo a possibile protagonista della patogenesi della malattia" 42° Congresso Nazionale SIBIOC. Riassunti Poster Biochimica Clinica, 2010, vol. 34, n. 5, pag 419, n°061 - Rome, 5th -8th October 2010

■ FFC Project# 5/2008 "Feasibility of a screening program for the preconceptional identification of Cystic Fibrosis carriers in Sardinian population"

Maria Cristina Rosatelli, (Dipart. Scienze Biom. e Biotecn. Lab. Genetica Molecolare - Univ. Cagliari)

Publications

- Faa V. et al. "A Synonymous Mutation in the CFTR Gene Causes Aberrant Splicing in an Italian Patient Affected by a Mild Form of Cystic Fibrosis" *J. Mol Diagn.* 2010 May; 12(3):380-383

3. MICROBIOLOGY

Microbiologia

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

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

Publications

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

Abstracts

- G. Golini et al. "Distribution of Burkholderia Cepacia complex isolates from patients with cystic fibrosis" 12th ECCMID, Milan, 24-27 April 2002. *Clinical Microbiology and Infection* 2002; 8 Suppl. 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 Suppl. 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 Suppl. 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 genovars in routine clinical analysis involving CF patients"

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

Publications

- Tabacchioni S. et al. "Use of the gyrB gene to discriminate among species of the Burkholderia cepacia complex" *FEMS Microbiol. Lett.* (2008) 1-8
- Papaleo M.C. et al. "Structural, evolutionary and genetic analysis of the histidine biosynthetic "core" in the genus *Burkholderia*" *Gene* 448 (2009) 16-28
- Perrin E. et al. "Exploring the HME and HAE1 efflux systems in the

genus *Burkholderia*" *BMC Evol Biology* (2010), 10:164

- Ferri L. et al. "Application of multiplex single nucleotide primer extension (mSNuPE) to the identification of bacteria: The *Burkholderia cepacia* complex case" *J. of Microbiol. Methods* (2010) In press

Abstracts

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

■ FFC Project#10/2003 "The quorum sensing of the emerging fibro-cystic pathogen *B. cepacia*"

Vittorio Venturi (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" 25th 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 multi-centre study regarding antibiotic susceptibility, epidemiology, natural history and clinical relevance"

Silvia Campana (Dipart. Pediatria – Centro Fibrosi Cistica - Ospedale Meyer – Firenze)

Publications

- Campana S. et al. "Emergence of an epidemic clone of community-associated methicillin-resistant Panton-Valentine leukocidin negative *Staphylococcus aureus* in Cystic Fibrosis patients populations" – Journal of Clinical Microbiology, Sept. 2007; vol. 45, No 9:3146-47
- Taccetti G. et al. "Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Cystic Fibrosis", European Infectious Diseases, 2008, vol. 2, issue 2.
- Taccetti G. et al. "Staphylococcus aureus meticillino-resistente comunitario e nosocomiale in fibrosi cistica: uno studio di epidemiologia molecolare" Medico e Bambino (2010)

Abstracts

- Piluso A. et al. "A national overview of MRSA epidemiology: emergence of an epidemic clone" NACFC 2006.
- Cocchi P. et al. "Epidemiology of Community acquired MRSA and hospital acquired MRSA in cystic fibrosis patients: a national overview" North American CF Conference, Anaheim, California, Oct. 3-6, 2007
- Cocchi P. et al. "Emergence of an epidemic clone of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) Panton-Valentine leukocidin (PVL) negative in Cystic Fibrosis patients" 30th European CF Conference, Belek, Turkey, 13-16 June 2007
- Cocchi P. et al. "Epidemiologia italiana di staphylococcus aureus meticillino-resistente: risultati di uno studio multicentrico" XII Congresso Italiano Fibrosi Cistica, Firenze, 23-25 Nov. 2006
- Taccetti G. et al. "Methicillin-resistant *S. Aureus* (MRSA) in cystic fibrosis patients: prevalence and clinical findings" Pediatric 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. "SCCMEC 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 Sanguineti (Ist. Microbiologia - Univ. Sacro Cuore – Roma), Mauro Nicoletti (Dipart. Scienze Sanità Pubbli. – Sez. Microbiologia - Univ. La Sapienza – Roma), Mariassunta Casalino (Dipart. Microbiologia – Univ. Roma 3), Ersilia Fiscarelli (Dipart. Medicina Pediatrica - Osped. Pediatrico "Bambini 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. Rossetto 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 Moxifloxacina su Stenotrophomonas Maltophilia isolati da fibrosi cistica" Congresso Società Italiana di Microbiologia (SIM), Genova 15-18 ottobre 2006.

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

Graziana Manno (Dipart. Pediatria - Osp. "G. Gaslini" - Genova), Roberto Biassoni (Lab. Medicina Molecolare - Ist. Gaslini – Genova), Eugenio Agenore Debbia (DISCAT - Sez. Microbiologia "C.A. Romanzi" – Genova), Angela Sangiuliano (ARPAL – Dipart. 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
- Devescovi G. et al. "Involvement of a Quorum-Sensing-Regulated Lipase Secreted by a Clinical Isolate of *Burkholderia glumae* in Severe Disease Symptoms in Rice" Applied and Environmental Microbiology, (2007); 73 (15): 4950-8
- Licciardello G. et al. "Pseudomonas corrugata contains a conserved N-acyl homoserine lactone quorum sensing system; its role in tomato pathogenicity and tobacco hypersensitivity response" FEMS Microbiol. Ecol. (2007); 61 (2): 222-34
- Rampioni G. et al. "The *Pseudomonas* quorum sensing regulator RsaL belongs to the tetrahelical superclass of H-T-H proteins" Journal of Bacteriology, 2007, Vol. 189, No. 5, pp. 1922-1930
- Massa C. et al. "Isolation, heterologous and characterization of an endo-polygalacturonase produced by the phytopathogen *Burkholderia cepacia*". Protein Expression and Purification 2007; 54(2): 300-308
- Steindler L. et al. "Detection of quorum sensing N-acyl homoserine lactone signal molecules by bacterial biosensors" FEMS Microbiol. Lett. 266 (2007)

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

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

Abstracts

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

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

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

Publications

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

Abstracts

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

- 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

■ 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 pathogenecity within clonal strains from patients with cystic fibrosis" 13th Italian Cystic Fibrosis Conference, Milan, 30 Nov. – 2 Dec. 2007, J. Cyst Fibrosis 2008; 7, suppl. 3: S17
- 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. 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
- DeSoyza 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" 37th Congresso Nazionale di Microbiologia, Torino11, 14 Ottobre 2009
 - Rizzo R. et al. "Aggregation properties of cepacian. A model for biofilm formation" 15th European Carbohydrate Symposium - Vienna Luglio 19 - 24, 2009
 - Cescutti P. et al. "Identification of the gene involved in the transfer of cepacian repeating unit to the periplasmic space. Determination of the biological repeating unit of cepacian" 15th European Carbohydrate Symposium - Vienna Luglio 19-24, 2009
 - Rizzo R. et al. "Aggregation properties of cepacian. A model for biofilm formation" 13th Annual Meeting of the International *Burkholderia cepacia* working group, 2009, April 23-26 University of Toronto - Canada
 - Cescutti P. "Determination of the biological repeating unit of cepacian translocated to the periplasmic space by a flippase coded by the bceq gene" 13th Annual Meeting of the International *Burkholderia cepacia* working group, 2009, April 23-26 University of Toronto - Canada
 - Molinaro A. "Analysis of endotoxin from *B. cepacia*" XI Convegno-Scuola sulla Chimica dei Carboidrati, Pontignano (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. Ieranò, "Analysis of endotoxins from *B. cepacia* complex" European CF Young Investigator Meeting, Lille (France), August 27-29, 2008
 - T. Ieranò "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*" 36th 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), Giannmaria Rossolini (Dipart. Biologia Molecolare – Policlinico "Le Scotte" - Siena)
- Abstracts
- Campana S. et al. "Pseudomonas aeruginosa e metallo beta-lattamasi in pazienti affetti da fibrosi cistica: prevalenza e persistenza nel tempo" XII Congresso Italiano della Fibrosi Cistica, Firenze 23-25 Nov. 2006
 - Campana S. et al. "Persistence of metalloβ-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients" 30th European CF Conference, Belek, Turkey; 13-16 June 2007
 - Pollini S. et al. "Pseudomonas aeruginosa e metallo-β-lattamasi in pazienti con fibrosi cistica: prevalenza e persistenza" XXXVI Congresso Nazionale – Associazione Microbiologi Clinici Italiani, Rimini; 2-5 Ottobre 2007.
 - Mugnaioli C. et al. "Meccanismi di resistenza acquisita in *Pseudomonas Aeruginosa* da pazienti con fibrosi cistica cronicamente colonizzati" XXXVII AMCLI, 2008, Stresa (VB), 5-8 Ottobre; NACFC, 2008, Orlando (Florida, USA), 23-25 October
 - Mugnaioli C. et al. "Evolution of acquired resistance mechanism in *Pseudomonas Aeruginosa* isolated from chronically-infected cystic fibrosis patients" XXXVII AMCLI, 2008, Stresa (VB), 5-8 Ottobre; NACFC, 2008, Orlando (Florida, USA), 23-25 October

■ 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 di Milano), Giovanni Bertoni (Dipartimento di Scienze Biomolecolari e Biotecnologie, Università di Milano)

Abstracts

- Milani A. et al. "Analysis of a novel membrane protein in the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*" Poster ed abstract: 28th National Meeting Società Italiana di Microbiologia generale e Biotecnologie microbiche, Spoleto, June 11-13, 2009.
- Milani A. et al. "Analysis of a novel membrane protein in the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*" Poster: 10th Convegno FISV – Federazione italiana scienze della vita, Riva del Garda (Trento), 24-27 settembre 2009.
- Iametti S. et al. "A fluorescence-based assay for bacterial transglutaminase activity" Poster: VII European Symposium of the Protein Society, Zurich (Switzerland), June 14-18, 2009.

■ FFC Project#7/2007 "Stenotrophomonas maltophilia, a multidrug resistant emergent pathogen associated to cystic fibrosis: a post-genomic approach to identify new immunological and therapeutic targets"

Bianca Colonna (Dipart. Biologia Cellulare e dello Sviluppo - Lab. Microbiologia Molecolare - Univ. La Sapienza - Roma), Maurizio Sanguineti (Ist. Microbiologia - Univ. Sacro Cuore - Roma), Mauro Nicoletti (Dipart. Scienze Sanità Pubblica - 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)
- Rocco F. et al. "Stenotrophomonas maltophilia genomes: a start-up comparison" Int. J. of Med Microbiol 299 (2009) 535-546
- Pompilio A. et al. "Adhesion to and biofilm formation on IB3-1 bronchial cells by *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from cystic fibrosis patients" BMC Microbiology 2010, 10:102
- Di Bonaventura G. et al. "Role of Excessive Inflammatory Response to *Stenotrophomonas maltophilia* Lung Infection in DBA/2 Mice and Implications for Cystic Fibrosis" Infection and Immunity June 2010, Vol. 78, (6):2466-76

Abstracts

- Di Bonaventura G. et al. "Effetto di concentrazioni subinibenti di moxifloxacina su *Stenotrophomonas maltophilia* isolati da fibrosi cistica" 34th 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" 9th 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" 9th 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" 35th Congresso nazionale della Società Italiana di Microbiologia, Catania 30 settembre - 3 ottobre 2007
- Fiscarelli 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
- Fiscarelli E. et al. "Caratterizzazione molecolare di ceppi di *Stenotrophomonas maltophilia* isolati da pazienti con fibrosi cistica" 36th 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" 36th Congresso nazionale della Società Italiana di Microbiologia, Roma 12-15 ottobre 2008.
- Di Bonaventura G. et al. "Patogenesi micobatica in fibrosi cistica: clearance di *Stenotrophomonas maltophilia* ed infiammazione in un modello murino di infezione polmonare" 36th Congresso

nazionale della Società Italiana di Microbiologia, Roma 12-15 ottobre 2008.

- Michelacci V. et al. "Identification of genes expressed at the host temperature in *S. maltophilia*, an emergent pathogen in CF patients" 7th Louis Pasteur Conference on Infectious Disease, 11-13 Novembre 2008, Paris, France.

- Cipresso R. et al. "Epidemiology of health care-associated *Stenotrophomonas maltophilia* infections in CF and ICU patients: role of biofilm formation" Clinical Microbiology and Infection" 2009; 15(s4):S401. Proceedings of the 19th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID), Helsinki, Finland.
- Iacobino A. et al. "Analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* virulence factors" SIMGBM 11-13 giugno 2009, Spoleto.
- Barchitta M. et al. "Ruolo epidemiologico del biofilm in isolati di *Stenotrophomonas maltophilia* da pazienti con fibrosi cistica e da pazienti ricoverati in unità di terapia intensiva" XIth Conferenza Nazionale di Sanità Pubblica, Napoli 2009
- Iacobino A. et al. "Virulence factors of *Stenotrophomonas maltophilia*: an opportunistic pathogen" FISV2009 11th Annual Congress Riva del Garda, 23-25 Sept.2009.
- Ciavardelli D. et al. "Alterazione dei livelli tessutali di ioni metallici in un modello murino di infezione polmonare da *Stenotrophomonas maltophilia*" XXXVII Congresso Nazionale della Società Italiana di Microbiologia, Torino 11-14 Ottobre 2009.
- Picciani C et al. "Analisi proteomica del biofilm formato da un ceppo di *Stenotrophomonas maltophilia* isolato da fibrosi cistica" XXXVII Congresso Nazionale della Società Italiana di Microbiologia, Torino 11-14 Ottobre 2009.
- Nicoletti M. et al. "Analisi genotipica e caratterizzazione molecolare di determinanti di virulenza espressi da ceppi di *Stenotrophomonas maltophilia* isolati da pazienti affetti da fibrosi cistica" XXXVII Congresso Nazionale della Società Italiana di Microbiologia, Torino 11-14 Ottobre 2009.
- De Carolis E. et al. "Caratterizzazione e analisi molecolare dell'espressione dell'operone groESL di *Stenotrophomonas maltophilia*" XXXVII Congresso Nazionale della Società Italiana di Microbiologia, Torino 11-14 Ottobre 2009.

■ FFC Project#9/2007 "Burkholderia cepacia complex: closing down on the major virulence factors"

Vittorio Venturi (ICGB Trieste)

Publications

- Rampioni G. et al. "RsaL provides quorum sensing homeostasis and functions as a global regulator of gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*" Molec. Microbiol. (2007) 66 (6), 1557-1565
- Licciardello G. et al. "Pseudomonas corrugata contains a conserved N-acyl homoserine lactone quorum sensing system; its role in tomato pathogenicity and tobacco hypersensitivity response" FEMS Microbiol Ecol 61 (2007) 222-234.
- Steinbauer 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.
- Steinbauer L. et al. "LasI/R and RhI/R Quorum Sensing in a strain of *Pseudomonas aeruginosa* beneficial to plants" Appl. Environ. Microbiol., August 2009, p. 5131-5140.
- Netoeta S. et al. "A simple model for the early events of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*: modeling bacterial swarming as the movement of an "activation zone" Biology direct 2009, 4:6, <http://www.biology-direct.com/content/4/1/6>

■ FFC Project#8/2007 "The structure and immunological activity of lipopolysaccharide and peptidoglycan of Ps aeruginosa before and after the onset of chronic infection"

Antonio Molinaro (Dip. di Chimica Organica e Bioch. - Univ. di Napoli Federico II, Complesso Universitario Monte Sant'Angelo, Napoli), Maria Lina Bernardini (Dip. Biol. Cell. – Univ. La Sapienza, Roma)

Publications

- Cigana C. et al. "Pseudomonas aeruginosa Exploits Lipid A and Muropeptides Modification as a Strategy to Lower Innate Immunity during Cystic Fibrosis Lung Infection" PLoS ONE, December 2009, Vol. 4, Issue 12, e8439

■ FFC Project#10/2007 "Iron uptake and quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* virulence"

Paolo Visca (Dip. Biologia – Lab. Microbiologia Clinica e Virologia – Univ. Roma 3), Livia Leoni (Dip. Biologia – Lab. Microbiologia Molecolare e Biotecnologie dei Microorganismi – Univ. Roma 3)

Publications

- Gaines J. M. et al. "Regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* *toxA*, *regA* and *ptxR* genes by the iron-starvation sigma factor *PvdS* under reduced levels of oxygen" Microbiology (2007) Vol 153: 4219-33

- Tiburzi F. et al. "Intracellular levels and activity of PvdS, the major iron starvation sigma factor of *Pseudomonas aeruginosa*" Mol. Microbiol. (2008) Vol. 67: 213-227
- Rampioni G. et al. "RsaL provides quorum sensing homeostasis and functions as a global regulator of gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*" Mol. Microbiol. (2007) Vol. 66: 1557-1565
- Imperi F. et al. "Membrane-association determinants of the 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
- Imperi F. et al. "Transcriptional control of the *pvdS* iron starvation sigma factor gene by the masterregulator of sulphur metabolism CysB in *Pseudomonas aeruginosa*" Environ. Microbiol. (2010) Vol. 12(6): 1630-1642
- Imperi F. et al. "Molecular basis of pyoverdine siderophore recycling in *Pseudomonas aeruginosa*" Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Dec 1;106(48):20440-5

Abstracts

- Rampioni G. et al. "RsaL is a global regulator controlling quorum sensing homeostasis and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*" ASM Conference Pseudomonas 2007, Seattle, Washington, 26-30 August 2007, pp. 15-16.
- Rampioni G. et al. "RsaL, a quorum sensing homeostatic effector controlling virulence and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*" 9° Convegno Nazionale FISV, Riva del Garda (TN), 26-29 Sett. 2007
- Rampioni G. et al. "RsaL is a global regulator controlling quorum sensing homeostasis and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*" ASM Conference Cell-Cell Communication in Bacteria, Austin, Texas, 7-10 October 2007, p. 41
- Tiburzi F. et al. "A new regulator involved in the control of pyoverdine synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: the role of the LysR-type transcriptional regulator CysB" 28th National Meeting Società Italiana di Microbiologia generale e Biotecnologie microbiche, Spoleto, June 11-13, 2009.

■ FFC Project#7/2008 "Burkholderia cenocepacia pathogenicity: synergistic interactions with *Pseudomonas aeruginosa* and adaptation to CF host"

Annamaria Bevvino (ENEA C.R. Casaccia - Biotecn. Agroindustriale e Protezione della Salute), Fiorentina Ascenzi (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 2009, Soverato, Squillace, (CZ)
- Paroni M. et al. "Pseudomonas aeruginosa and Burkholderia cenocepacia polymicrobial interactions in biofilm and murine model of chronic infection" XXVIII Convegno nazionale SIMGBM, Società Italiana di Microbiologia generale e Biotecnologie microbiche, Spoleto, 11/13 Giugno 2009
- Paroni M. et al. "Pseudomonas aeruginosa and Burkholderia cenocepacia polymicrobial interactions in biofilm and murine model of chronic infection" 23rd Annual North American Cystic Fibrosis Congress, Minneapolis, Minnesota, 15-17 October 2009.
- Farulla I et al. "Clinical and environmental *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cenocepacia* strains: dual-species interactions in biofilm and in a mouse model of chronic infection" Environmental Microbiology Meeting (BMMA) 2010, 21-22 May, Bertinoro (FC), Italy
- Paroni M et al. "Pseudomonas aeruginosa and Burkholderia cenocepacia polymicrobial interactions in biofilm and in a murine model of chronic infection" Pseudomonas 2010, Pseudomonas in the Test Tube and in the Environment, 28-29 January 2010, Milan, Italy

■ FFC Project#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, Univ. "Roma Tre")

Publications

- Rampioni G. et al. "Contribution of the RsaL global regulator to *Pseudomonas aeruginosa* virulence and biofilm formation" FEMS Microbiol Lett 301 (2009): 210-217
- Imperi F et al "Molecular basis of pyoverdine siderophore recycling in *Pseudomonas aeruginosa*" Proc Natl Acad Sci U S A. 2009. 48:20440-5.
- Imperi F et al. "Transcriptional control of the *pvdS* iron starvation sigma factor gene by the master regulator of sulfur metabolism CysB in *Pseudomonas aeruginosa*" Environ Microbiol. 2010. 6:1630-42.
- Massai F et al "A multitask biosensor for micro-volumetric detection of N-3-oxo-dodecanoyl-homoserin lactone quorum sensing signal" Biosensors and Bioelectronics. 2010. Submitted.

Abstracts

- Rampioni G. et al. "Role of the RsaL quorum sensing regulator in *Pseudomonas aeruginosa* pathogenic potential" 28th National Meeting Società Italiana di Microbiologia generale e Biotecnologie 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 2009, Hannover, Germany
- Rampioni G. et al. "The RsaL quorum sensing regulator controls surface motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*" Eurobiofilms, Rome, 2-5 September 2009
- Longo F. et al. "Picking up *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing regulators" 28th National Meeting Società Italiana di Microbiologia generale e Biotecnologie 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

■ FFC Project#11/2009 "Community-acquired MRSA and hospital-acquired MRSA in cystic fibrosis patients: a multicentre study regarding antibiotic susceptibility, epidemiology, natural history and clinical relevance"

Silvia Campana (Dipart. Pediatria – Centro Fibrosi Cistica - Ospedale Meyer – Firenze)

Abstracts

- Cocchi P et al. "Molecular characterization of MRSA involved in persistent lung infections in cystic fibrosis patients: emergence of

epidemic clones" XXXIII ECFS Conference, Valencia, Spain 2010
-Cocchi P et al. "Diffusion of MRSA strains in the Italian CF population: a multicenter study" XXIV NACFC Conference Baltimore 2010

■ FFC Project#12/2009 "Novel strategies for respiratory infection therapy in CF. Use of natural and designed antibacterial peptides"

Renato Gennaro (Dipart. Scienze della Vita, Università di Trieste), Giovanni Di Bonaventura (Dip. Scienze Biomediche – Univ. "G. D'Annunzio" Pescara), Ersilia Fiscarelli (Osp. Pediatrico "Bambin Gesù", Roma)

Abstracts

Di Bonaventura G et al. "Attività antibatterica ed anti-biofilm di bmap-27 e bmap-28 verso ceppi multiresistenti isolati da pazienti affetti da fibrosi cistica" VI Congresso Nazionale della Società Italiana per lo studio della Fibrosi Cistica; Rimini, 18-21 novembre 2010.

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

Alessandro Pini (Dipart. di Biologia Molecolare, Sezione di Chimica Biologica, Università di Siena)

Publications

- Pini A. et al. "A novel tetrabranched antimicrobial peptide that neutralizes bacterial lipopolysaccharide and prevents septic shock *in vivo*" The FASEB J. 2010 24:1015-22

Abstracts

Pini A et al. "A novel tetrabranched antimicrobial peptide that neutralizes bacterial lipopolysaccharide and prevents septic shock *in vivo*" Gordon Research Conference on Chemistry and Biology of Peptides February 28-March5 2010, Ventura, CA, USA

Pini A et al. "A novel tetrabranched antimicrobial peptide that neutralizes bacterial lipopolysaccharide and prevents septic shock *in vivo*" 12th Naples Workshop on bioactive peptides-2nd Italy-Korea Symposium on antimicrobial peptides. 4-7 June 2010, Naples, Italy

Pini A et al. "A novel tetrabranched antimicrobial peptide that neutralizes bacterial lipopolysaccharide and prevents septic shock *in vivo*" 31st European Peptide Symposium, 5-7 September 2010, Copenhagen, DK

■ FFC Project#15/2009 "The role of RND transporters in Burkholderia cenocepacia life by microarray analysis"

Giovanna Riccardi (Dipart. Genetica e microbiologia – Università degli Studi di Pavia)

Publications

- Perrin E. et al. "Exploring the HME and HAE1 efflux systems in the genus Burkholderia" BMC Evolutionary Biol (2010), 10:164

4. INFLAMMATION Infiammazione

■ Progetti FFC#3/2002, FFC#10/2005 e FFC#17/2006 "Roles of azithromycin other than bactericidal: relevance for therapy of cystic fibrosis"

Paola Melotti (Lab. Patologia Molecolare - Centro FC – Ospedale Civile Maggiore – Verona)

Publications

- Cigana C. et al. "Azithromycin selectively reduces tumour necrosis factor alpha levels in Cystic Fibrosis airway epithelial cells" Antimicrobial agents and chemotherapy, Mar. 2007, vol. 51, No. 3, p. 975-981

- Cigana C. et al. "Anti-inflammatory effects of azithromycin in cystic fibrosis airway epithelial cells" Elsevier, Biochemical and Biophysical Research Communications 350 (2006) 977-982

- Nicolis E. et al. "The GCC repeat length in the 5'UTR of MRP1 gene is polymorphic: a functional characterization of its relevance for cystic fibrosis" BMC Med Genet. 2006 Feb 7;7:7.

- Cigana C. et al. "Effects of Azithromycin on the Expression of ATP Binding Cassette Transporters in Epithelial Cells from the Airways of Cystic Fibrosis Patients" J. of Chemotherapy (2007) 19; 643:649

- Bergamini G. et al. "Effects of Azithromycin (AZM) on Glutathione-S-Transferases (GST)s in cystic fibrosis airways cells" Am J Respir Cell Mol Biol, 2009 Aug;41(2):199-206

Abstracts

- Cigana C. et al. "Azythromycin reduces tumour necrosis factor alpha expression in CF airway epithelial cells" The 20th Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Denver, Colorado, Nov. 2-5, 2006

- Bergamini G. et al. "Azithromycin (AZM) decreases Glutathione-S-Transferase (GST)-T1 expression and activity in CF airway epithelial cells" 30th European Cystic Fibrosis Conference, Belek, Turkey, 13-16 June 2007

- Cigana C. et al. "Possible mechanisms of action of azithromycin in cystic fibrosis" 15th ERS Annual Congress. Copenhagen, Denmark – September 17-21 2005.

- Cigana C. et al. "Anti-inflammatory effects of azithromycin in cystic fibrosis airway epithelial cells" 16th European Congress of Immunology. Paris, 6-9 September 2006.

- Cigana C. et al. "Reduction of tumour necrosis factor alpha (TNF) expression by azithromycin (AZM) in CF airway epithelial cells" Journal of Cystic Fibrosis, 29th European Cystic Fibrosis Conference. Copenhagen, 15-18 June 2006.

- Nicolis E. et al. "Analisi della ripetizione GCC nel promotore del gene Multidrug Resistance-Associated Protein 1 (MRP1) in pazienti con Fibrosi Cistica (FC) 6^o 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^o 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

- 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
- 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 cf – A role for secreted γ -glutamyl-transferase?" 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 cenocepacia*" Int J Immunopathol Pharmacol., 2008 Jan-Mar;21(1):51-9

■ FFC Project# 16/2006 "Effect of correctors of defective CFTR on the *Pseudomonas aeruginosa*-dependent inflammatory response in respiratory epithelial cells"

Maria Cristina Dechechci (Lab. Patologia Molecolare – Centro

FC – Ospedale Civile Maggiore – Verona), Frederic Becq (Inst. De Physiologie Biologie Cellulaires - Poitiers (France)), Roberto Gambari (Dip. di Biochimica e Biologia Molecolare - Univ. di Ferrara)

Publications

- Dechechci 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
- Dechechci M. C. et al. "Anti-inflammatory effect of miglustat in bronchial epithelial cells" Journal of Cystic Fibrosis, 7 (2008) pp. 555-565.

Abstracts

- Dechechci 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
- Dechechci 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
- Dechechci 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.
- 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, 2006, Firenze, November 23-25.
- Dechechci 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
- Dechechci 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" 49th Simposio AFL, 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" 8th 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" 34th National Congress of the Italian Pharmacology Society, Rimini, October 14-17, 2009
- Govino C. et al. "A new approach for cystic fibrosis treatment: large porous particles for local and prolonged delivery of an oligonucleotide decoy to Nuclear Factor-kB in the lung" AAPA 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

- Gambari R. et al. "Decoy oligodeoxyribonucleotides and peptide nucleic acids-DNA chimeras targeting nuclear factor kappa-B: inhibition of IL-8 gene expression in Cystic Fibrosis cells infected with *Pseudomonas aeruginosa*" Biochem. Pharmacol. (2010), doi: 10.1016/j.bcp.2010.06.047

Abstracts

- Bezzetti V. et al. "Transcription factor (TF) decoy strategy to silence expression of pro-inflammatory genes in cystic fibrosis (CF) bronchial epithelial cell line" 2nd European CF Young Investigator Meeting, 2008, Lille, France

- Cabrini G. et al. "Decoy" molecules for nuclear transcription factors and regulation of expression of proinflammatory genes" 13th Italian Cystic Fibrosis Conference, Milan, 30 Nov. – 2 Dec. 2007, J. Cyst Fibrosis 2008; 7, suppl. 3: pp. S18.

- Nicolis E. et al. "Isolation of active anti-inflammatory compounds from medicinal plant extracts" Pediatric pulmonology, Suppl. 31, 2008. 22nd Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Orlando, Florida, 22-25 October 2008, p. 259.

- Tamanini A. et al. "Effect of furocoumarin derivatives on *P. aeruginosa*-dependent pro-inflammatory response in bronchial epithelial cells" Pediatric pulmonology, Suppl. 31, 2008. 22nd Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Orlando, Florida, 22-25 October 2008, pp. 260-261.

- Nicolis E. et al. "Does anti-inflammatory treatment have any effect on PAO1 dependent induction of the antimicrobial genes?" Pediatric pulmonology, Suppl. 31, 2008. 22nd Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Orlando, Florida, 22-25 October 2008, pp. 261-262.

- Piccagli L. et al. "Anti-inflammatory molecules obtained from virtual screening of a furocoumarin database against NF- κ B" 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 #14/2007 "Influence of CFTR mutations in bactericidal activity of human macrophages"

Paola Del Porto (Dipart. di Biologia Cellulare e dello Sviluppo – Università "La Sapienza", Roma), Fiorentina Ascenzioni (Dipart. di Biologia Cellulare e dello Sviluppo – Università "La Sapienza", Roma), Serena Quattrucci (Centro Regionale FC – Policlinico "Umberto I", Roma)

Abstracts

- Socci V. et al. "Influence of CFTR mutations on bactericidal activity of human macrophages" 32nd European Cystic Fibrosis Conference, Brest, France 10-13 June 2009 (awarded as best poster in "Inflammation")

- Socci V. et al. "Espressione del CFTR ed attività battericida dei macrofagi umani" XV Congresso Italiano della Fibrosi Cistica, V Congresso Nazionale SIFC, 1-4 Ottobre 2009 Soverato, Italia (Premio Annalisa Marzotto)

■ FFC Project #15/2007 "Mechanisms of inflammation resolution in cystic fibrosis"

Mario Romano (Dip. Scienze Biomediche - CeSI – Univ. "G. D'Annunzio" di Chieti)

Publications

- Mattoscio D. et al. "Cystic Fibrosis Transmembrane conductance regulator (CFTR) expression in human platelets: impacts on mediators and mechanisms of the inflammatory response" The Faseb J., 2010 June, doi: 10.1096/fj.10-159921

- Pieroni L et al. "Proteomics investigation of human platelets in healthy donors and cystic fibrosis patients by shotgun nUPLC-MSE and 2DE: a comparative study" Mol BioSystems 12 Nov 2010 doi:10.1039/COMB00135J

■ FFC Project# 11/2008 "Effect of glutathione and lactoferrin on redox regulation, metal homeostasis and inflammatory responses of Cystic Fibrosis bronchial cells upon infection with Burkholderia cenocepacia"

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

Publications

- Valenti P et al. "Lactoferrin decreases inflammatory response in cystic fibrosis bronchial cells invaded by iron modulated biofilm of Burkholderia cenocepacia strains" Submitted to Microbes and Infections (Manuscript Number: MICINF-D-10-00030).

Abstracts

- Berluti F. et al. "Lactoferrin modulates gene expression of cystic fibrosis bronchial cells invaded by iron and zinc modulated biofilm of Burkholderia cenocepacia clinical isolates" IXth International Lactoferrin Conference, Beijing, China, October 18-22, 2009.
Ammendolia M.G et al. "Bovine lactoferrin interacts with cable pili of Burkholderia cenocepacia" IXth International Lactoferrin Conference, Beijing, China, October 18-22, 2009.

■ FFC Project#12/2008 "Anti-inflammatory effect of miglustat: sphingolipid ceramide metabolism as a therapeutic target for CF lung disease"

Maria Cristina Dechechchi (Lab. di Patologia Molecolare, Lab. Analisi Chimico-Cliniche ed Ematologiche, Università di Verona), Roberto Gambari (Dipart. di Biochimica e Biologia Molecolare, Università di Ferrara)

Publications

Dechechchi MC, Nicolis E, Norez C, Bezzetti V, Borgatti M, Mancini I, Rizzotti P, Ribeiro CM, Gambari R, Becq F, Cabrini G. Anti-inflammatory effect of miglustat in bronchial epithelial cells. J Cyst Fibros. 2008 Nov;7(6):555-65

Abstracts

- Dechechchi M.C. et al. "Anti-inflammatory effect of miglustat: sphingolipid metabolism as a therapeutic target for CF lung inflammation" 23rd Annual North American Cystic Fibrosis Congress, Minneapolis, Minnesota, 15-17 October 2009

- Dechechchi M.C. et al. "Lack of efficacy of dexamethasone in reducing the inflammatory response to *P. aeruginosa* in a cell line derived from bronchial epithelium of a CF patient" 23rd Annual North American Cystic Fibrosis Congress, Minneapolis, Minnesota, 15-17 October 2009

- Dechechchi M.C. et al. "Modulation of sphingolipids metabolism reduces the neutrophil chemotaxis in human and murine respiratory models in vivo and in vitro" 2010 ECFS Basic Science Conference "New frontiers in Basic Science in Cystic Fibrosis" 7-10 April 2010, Carcavelos, Portugal

- Dechechchi M.C. et al. "Down modulation of neutrophil chemotactic signalling by targeting the metabolism of sphingolipids" Pediatr Pulmonol. 2010 44th Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Baltimore, MD, U.S.A., 2010

- Dechechchi MC et al. "Modulation of sphingolipids metabolism reduces the neutrophil chemotaxis in human and murine respiratory models in vitro and in vivo" 1a Conferenza Aziendale sulla Ricerca: La patologia Polmonare - Verona, 25 maggio 2010

■ FFC Project#13/2008 "Pre-clinical evaluation of new vitamin E-based anti-inflammatory agents in CF"

Francesco Galli (Dipart. Med. Interna - Sez. Bioch. Appl. e Scienze Nutrizionali – Univ. Perugia), Luigi Iuliano (Dipart. Med. Interna e vascolare – Univ. La Sapienza Roma), Claudia Bettina Schock (Queen's University Belfast, Respiratory Medicine Research Group), 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

- Galli F. et al. "La supplementazione umana con vitamina E" Progress in Nutrition, Vol. 12, N. 3, 00-00, 2010

- Mazzini F. et al. "Anticancer Activity of Vitamin E-Derived Compounds in Murine C6 Glioma Cells" Chem. Med. Chem, 2010, 5, 540-543.

■ FFC Project#14/2008 "Infections in cystic fibrosis: role of the long pentraxin PTX3 in host resistance and as therapeutic agent"

Cecilia Garlanda (Fondazione Humanitas per la Ricerca, Rozzano, Milano), Alessandra Bragonzi (Divisione di Immunologia, Trapianti e Malattie infettive – Istituto San Raffaele, Milano)

Publications

- Bragonzi A. et al. "*Pseudomonas aeruginosa* microevolution during cystic fibrosis lung infection establishes clones with adapted virulence" Am J Respir Crit Care Med, 2009 Jul 15; 180 (2): 138-45

- Bottazzi B. et al. "The long pentraxin PTX3 as a prototypic humoral pattern recognition receptor: interplay with cellular innate immunity" Immunol Rev. 2009 Jan;227(1):9-18

- Bottazzi B. et al. "An Integrated View of Humoral Innate Immunity: Pentraxins as a Paradigm" Annu Rev Immunol. 2010 Mar;28:157-83.

- Moalli F. et al. "Role of Complement and Fc γ R in the protective activity of the long pentraxin PTX3 against *Aspergillus fumigatus*" Blood, 2010 Sep 9. [Epub ahead of print]

- Bragonzi A. et al. "Therapeutic potential of the humoral pattern recognition receptor PTX3 in chronic lung infection by *Pseudomonas aeruginosa*" J. Immunol. 2010, under revision.

Abstracts

- Moalli F. et al. "Role of the long pentraxin PTX3 in chronic lung infection by *Pseudomonas aeruginosa*", SIICA annual Meeting (Società Italiana di Immunologia, Immunologia Clinica e Allergologia), Bari, 24-27 Maggio 2010
- Moalli F et al. "The opsonic activity of the long pentraxin PTX3 for *Aspergillus fumigatus* conidia is complement-dependent and mediated by Fc γ R-dependent CR3 integrin activation" 2nd European Congress of Immunology ECI", Berlin , Germany , September 13-16, 2009
- Moalli F et al. "Therapeutic potential of the humoral pattern recognition receptor PTX3 in chronic lung infection by *Pseudomonas aeruginosa*" Innovative Chemokine-based Therapeutic Strategies for Autoimmunity and Chronic Inflammation (INNOCHEM). Course for modelling chronic inflammatory diseases in animals and INNOCHEM annual meeting", Orleans , Paris , France , April 20-25, 2009
- Moalli F et al. "Therapeutic potential of the humoral pattern recognition receptor PTX3 in chronic lung infection by *Pseudomonas aeruginosa*" 6th National Conference of SIICA Clinical Immunology and Allergy Italian Society", Rome, Italy , June 11-14, 2008
- Moalli F et al "Potenziale terapeutico della pentrassina lunga PTX3 nelle infezioni croniche indotte da *Pseudomonas aeruginosa*" International Congress on Cytokines in Innate regulation and Disease", Florence, Italy , 4-6 December 2008.
- Moalli F et al. "Role of the long pentraxin PTX3 in chronic lung infection by *Pseudomonas aeruginosa*" ENII summer school 2010, Capo Caccia
- Moalli F. et al. "Role of complement and Fc γ R in the protective activity of the long pentraxin PTX3 against *Aspergillus fumigatus*" 4 th Advances Against Aspergillosis " Rome , 4-6 February 2010.
- Moalli F. "Therapeutic potential role of the humoral pattern recognition receptor PTX3 in chronic lung infection by *Pseudomonas*" 22nd EMDS Annual Meeting "Diversity and Plasticity of the Innate Immune Response", Brescia , Italy , September 18-20, 2008
- Paroni M. et al. "Therapeutic potential of the humoral pattern recognition protein PTX3 in a murine model of *Pseudomonas aeruginosa* chronic infection" The 22nd Annual north American Cystic Fibrosis Conference" Orlando October 23-25 2008

■ FFC Project#15/2008 "Effects of azithromycin (AZM) on *Pseudomonas*-induced chronic lung inflammation in cystic fibrosis"

Teresinha Leal (Department of Clinical Chemistry, Université Catholique de Louvain, St. Luc University Hospital), Pierluigi Mauri (Ist. Tecnologie Biomediche CNR, Segrate Milano), Claudio Sorio (Dipart. Patologia, Patologia Generale, Università di Verona)

Publications

- Sorio C. et al. "The role of macrophages and their scavenger receptors in cystic fibrosis", 2009 J Leucok Biol. Sep;86 (3) 465-8.
- Bergamini G et al. "Pseudomonas aeruginosa released proteins: effects on cystic fibrosis airways and consequences of oxygen limitation in clinical and laboratory strains." (2010) Submitted

Abstracts

- Cigana C. et al. "Proteins released from *Pseudomonas aeruginosa* (*Pa*) referent and clinical strains under microaerobiosis and their effects on cystic fibrosis airways" 31st European Cystic Fibrosis Conference, 11-14 June 2008, Prague, Czech Republic, J Cystic Fibrosis, vol. 7 (2), June 2008.
- Cigana C et al. "MudPIT analysis of *Pseudomonas aeruginosa* secretome: consequences of oxygen limitation in clinical and laboratory strains" 31st European Cystic Fibrosis Conference, 11-14 June 2008, Prague, Czech Republic, J Cystic Fibrosis, vol. 7 (3), June 2008 pp. S16
- Bergamini G. et al. "Proteomic analysis of proteins released from *Pseudomonas aeruginosa* clinical and laboratory strains: effect of azithromycin" 23rd Annual North American Cystic Fibrosis Congress, Minneapolis, Minnesota, 15-17 October 2009
- Bergamini et al. "Proteomic analysis of proteins released from *Pseudomonas aeruginosa* clinical and laboratory strains: effects of azithromycin" New Frontiers in Basic Science of Cystic Fibrosis. Tavira (Portugal), April 15-19 (2009) Journal of Cystic Fibrosis, (2009) Vol 9, Supplement 1, p. S40
- Bergamini G et al. "Proteomic analysis of proteins released from *Pseudomonas aeruginosa* clinical and laboratory strains: effects of azithromycin." Pediatric Pulmonology, (2009)Vol 44, Supplement 32, p 242.

■ FFC Project#5/2009 "Functional evaluation of CFTR in blood leukocytes in human subjects as a new tool for diagnostic and clinical research applications"

Claudio Sorio (Dipart. Patologia, Patologia Generale, Università di Verona), Paola Melotti (Lab. Patologia Molecolare - Centro FC – Ospedale Civile Maggiore – Verona), Mario Rosario Buffelli

(Dipartimento di Scienze Neurologiche e della Visione- Sez. Fisiologia, Policlinico Verona)

Publications

- Melotti P et al. "Evaluation of Cystic Fibrosis Conductance Transmembrane Regulator (CFTR) expression and activity in human monocytes and possible clinical application" Submitted for publication

Abstracts

- Sorio C et al. "Defective CFTR expression and function are detectable in blood monocytes: development of a new blood test for cystic fibrosis" Young Investigators Meeting, Lille (France) August 2010
- Sorio C et al. "Analysis of CFTR function in human monocytes" European Respiratory Society Annual Congress held in Barcelona (Spain) in September 2010, abstract # 251869
- Sorio C. et al. "Functional evaluation of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) in human monocytes" J Cystic Fibrosis vol. 8, suppl. 2, June 2009: S22, abstract # 86.
- Sorio C et al. "Measurement of CFTR expression and function in human leukocytes: new assays for the management of Cystic Fibrosis" Pediatric Pulmonology suppl. 33, 2010: 287, abstract # 192

■ FFC Project#19/2009 "Role of CFTR-Connexin interaction on PGE2 signaling and inflammation: implication for cystic fibrosis"

Marc Chanson (Dip. Pediatria – Università di Ginevra), Maria Cristina Dechechchi (Lab. di Patologia Molecolare, Lab. Analisi Chimico-Cliniche ed Ematol., Azienda Ospedaliero Universitaria di Verona)

Publications

- Scheckenbach KE L. et al. "PGE2 Regulation of CFTR activity and air surface liquid volume requires Gap Junctional Communication" doi: 10.1165/rcms.2009-0361OC

■ FFC Project#22/2009 "Origin of lung fluid gamma-glutamyltransferase and its effects in modulation of antioxidant balance, inflammation and CF respiratory dysfunction"

Alfonso Pompei (Dipart. Patologia Sperimentale, Biotec. Mediche, Infettivologia ed Epidemiologia - Univ. Pisa)

Publications

- Bergamini G et al. "Effects of azithromycin (AZM) on glutathione-s-transferases (GST)s in cystic fibrosis airway cells" Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 41: 199-206, 2009.
- Bramanti E et al. "Exogenous vs. endogenous γ -glutamyltransferase activity: implications for the specific determination of S-nitroso-glutathione in biological samples" Arch. Biochem. Biophys. 487: 146-52, 2009.
- Bramanti E et al. "The determination of S-nitrosothiols in biological samples – procedures, problems and precautions" Life Sci. 2010 (in press)

5. EPIDEMIOLOGY AND CLINICAL RESEARCH Ricerca clinica

■ FFC Project 2005 "Infection Control"

Roberto Buzzetti (Componente del Comitato di Consulenza Scientifica della Fondazione per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica)

Publications

- Buzzetti R. et al. "Controllo e prevenzione delle infezioni respiratorie nel paziente affetto da fibrosi cistica" Edit. Fondazione per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica. Verona, 2005
- Festini F. et al. "Isolation measures for prevention of infection with respiratory pathogens in cystic fibrosis: a systematic review" Journal of Hospital Infection (2006) 64, 1-6

■ FFC Project#18/2004 "Early eradication of *P. aeruginosa* and subsequent colonization in cystic fibrosis patients"

Giovanni Taccetti (Dipart. di Pediatria, Centro Regionale FC, Azienda Ospedaliera Universitaria Meyer)

Publications

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

■ FFC Project# 19/2004 "Quality control and update of follow-up data in the Italian cystic fibrosis registry: a starting point for the analysis of clinical data and the dissemination of results"

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

Abstracts

- Bossi A. et al. "Cystic Fibrosis in adulthood: data from the Italian registry" 28th European CF Conference, Crete, Greece 22-25 June 2005;
- Piccinini P. et al. "Previsione a 5 anni del numero di pazienti adulti affetti da fibrosi cistica" III Congresso Nazionale SISMIC,

■ 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 2006 **“The CAIRO Project” (Analysis and review of the international scientific literature from the CF registries)**

Roberto Buzzetti (Componente del Comitato di Consulenza Scientifica della Fondazione per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica), Donatello Salvatore (U. O. Pediatria, Azienda Ospedaliera San Carlo, Potenza)

Publications

- Buzzetti R. et al. "An overview of international literature from cystic fibrosis registries: 1. Mortality and survival studies in cystic fibrosis", Journal of Cystic Fibrosis 9 (2010) 75-83
- Salvatore D. et al. "An overview of international literature from cystic fibrosis registries: 2. Neonatal screening and nutrition/growth", Journal of Cystic Fibrosis 9 (2010) 75-83

Abstracts

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

■ FFC Project#19/2006 **“Prolonging the duration on site of short peripheral venous catheters used to administer intravenous antibiotic courses in adult subjects with cystic fibrosis. A randomized controlled trial to evaluate the effect of different concentrations of antibiotic in normal saline solution”**

Filippo Festini (Dipart. Pediatria – Centro FC Ospedale Meyer-Firenze)

Abstracts

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

■ FFC Project#20/2006 **“Prevention of pulmonary exacerbations in children with Cystic Fibrosis, through the modification of intestinal microflora”**

Alfredo Guarino (Dipart. Pediatria - Univ. Federico II Napoli), Carla Colombo (Dipart. Pediatria - Centro FC - Fond. IRCCS Osp. Maggiore Polic. Mangiagalli e Regina Elena – Milano), Lorenzo Morelli (Tecnologie analitiche ed avanzate - Univ. Piacenza)

Publications

- Bruzzese E. et al. "Effect of Lactobacillus GG supplementation on pulmonary exacerbations in patients with cystic fibrosis: a pilot

study" Clin Nutr. 2007 Jun;26(3):322-8

Abstracts

- Guarino A. et al. "Probiotics in cystic fibrosis: help from old friends" Pediatric pulmonology, Suppl. 31, 2008. 22nd Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Orlando, Florida, 22-25 October 2008, pp. 130-131.

■ FFC Project#16/2007 **“Emission distance of Ps aeruginosa from the respiratory tract of infected persons”**

Cesare Braggion (Centro Reg. Toscano FC – Osp. Meyer – Firenze)

Publications

- Festini F. et al. "A 1-m distance is not safe for children with cystic fibrosis at risk for cross-infection with Pseudomonas aeruginosa" Am J Infect Control 2010, Apr;38(3):244-5.

■ FFC Project#17/2007 **“Early antibiotic treatment in Ps aeruginosa eradication”**

Giovanni Taccetti (Centro Reg. Toscano FC – Osp. Meyer Firenze), Cariani L. (Lab. Microbiol., Centro Reg. F.C. – Milano)

Abstracts

- Taccetti G. et al. "Early antibiotic treatment for Pseudomonas aeruginosa eradication in cystic fibrosis patients: a randomised multicenter study of two different protocols" 23rd Annual North American Cystic Fibrosis Congress, Minneapolis, Minnesota, 15-17 October 2009.

- Taccetti G. et al. "Pseudomonas aeruginosa eradication in cystic fibrosis: preliminary data from a randomized multi center study of two different early antibiotic treatment protocols" The 24th Annual North American CF Conference, October 21-23, 2010, Baltimore, Maryland

- Cocchi P et al. "Diffusion of MRSA strains in the Italian CF population: a multicenter study" The 24th Annual North American CF Conference, October 21-23, 2010, Baltimore, Maryland

- Dolce D et al. "Immunological monitoring of P. aeruginosa eradication in cystic fibrosis patients: comparison of methods" The 24th Annual North American CF Conference, October 21-23, 2010, Baltimore, Maryland

■ FFC Project#16/2008 **“A prospective study about complications of totally implantable central venous access ports in people with CF”**

Alberto Dal Molin (Ospedale Meyer - Dip.to Pediatria, Firenze), Cesare Braggion (Dip. Pediatria - Osp. Meyer – Firenze), Maria Lucia Furnari (Centro Reg. FC - Ospedale dei Bambini – Palermo), Vincenzina Lucidi (Servizio di Supporto FC Ospedale Bambini Gesù - Roma), Elena Rizzi (Centro Reg. FC – Verona), Pietro Cialdella (Centro Reg. FC – 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.

- Dal Molin A et al. "Multicenter prospective study about complications of totally implantable central venous access ports in Italian people with CF: preliminary results" J Cyst Fibros. 2009; 8 (Suppl.2):S95

▪▪▪▪

■ FFC Project#CFaCore 2009

Alessandra Bragonzi (Divisione di Immunologia, Trapianti e Malattie infettive – Istituto San Raffaele, Milano)

Publications

- Bragonzi A et al. "Murine models of acute and chronic lung infection with cystic fibrosis pathogens" IJMM 2010, in press

Institutes and laboratories involved in the 165 projects funded by Italian CF Research Foundation: 2002-2010

Istituti e laboratori coinvolti nei 165 Progetti di Ricerca finanziati dalla fondazione FFC dal 2002 al 2010

ABRUZZO

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

CALABRIA

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

CAMPANIA

- Dip. Biochimica e Biotecnologie Mediche, CEINGE Biotecnologie Avanzate s.c.a.r.l., Università Federico II, Napoli
- Dip. di Pediatria ,Università Federico II, Napoli
- Lab. Microbiologia Funzionale, Università Federico II, Napoli
- Dip. Chimica Tossicologica e Farmaceutica, Univ. Federico II, Napoli
- Dip. Farmacologia Sperimentale, Napoli
- Dip. Chimica e Biochimica organica, Univ. Federico II, Napoli
- TIGEM, Telethon, Napoli
- Dip. Scienze Farmaceutiche, Università di Salerno
- Istituto di Biochimica delle Proteine, CNR, Napoli
- Istituto di Genetica e Biofisica, CNR, Napoli
- Istituto di Chimica Molecolare, CNR, Napoli

EMILIA ROMAGNA

- Plesso Bio,Tecnologico Integrato,Università di Parma, Parma
- Dip. Pediatria, Parma
- Dip. di Biochimica e Biologia Molecolare ,Università di Ferrara, Ferrara
- Dip. Medicina Sperimentale e Diagnostica, Università di Ferrara
- Dip. Biochimica, Istituto Nazionale Ricerca Cardiovascolare,Università di Bologna e Cesena
- Dip. Tecnologie Analitiche Avanzate, Piacenza

FRIULI VENEZIA GIULIA

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

LAZIO

- Dip. Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Università La Sapienza, Roma
- Dip. di Biopatologia e Diagnostica per Immagini, Università Tor Vergata, Roma
- Dip. di Biologia ,Università Tor Vergata, Roma
- Dip. Biotecnologie Cellulari ed Ematologia, Università La Sapienza, Roma
- Istituto di Clinica Pediatrica, Centro Regionale FC, Università Roma 1, Roma
- Dip.di Fisiopatologia Medica, Univ. La Sapienza, Roma
- Dip. di Biotecnologie, Protezione della Salute e degli Ecosistemi, ENEA Casaccia, S. Maria di Galeria, Roma

- Lab. di Microbiologia,Ospedale Bambin Gesù,Roma
- Lab. Microbiologia Molecolare, Università "La Sapienza", Roma
- Istituto di Microbiologia,Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma
- Dip. Farmacologia, Facoltà di Medicina, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma
- Dip. Microbiologia, Università di Roma 3, Roma
- Dip. Salute Pubblica e Biologia Cellulare, Università Tor Vergata, Roma
- Dip. Neuroscienze 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, Genova
- Dip. Pediatria, Lab. Microbiologia, Istituto G. Gaslini, Genova
- Dip. Pediatria, Centro Fibrosi Cistica, Istituto G. Gaslini, Genova
- Sezione di Epidemiologia e Biostatistica, Istituto G. Gaslini, Genova
- Dip. Medicina Sperimentale, Istituto G. Gaslini, Genova
- Dip. Medicina Sperimentale, Università di Genova
- Lab. Fisiopatologia Molecolare dei Canali Ionici, Centro Biotecnologie Avanzate, Genova

LOMBARDIA

- Istituto Statistica e Biometria, Università di Milano, Milano
- Istituto per il Trattamento Sperimentale della Fibrosi Cistica,Ospedale S. Raffaele, Milano
- Dip. Medicina Specialistica e dei Trapianti, Ospedali Riuniti, Bergamo
- Dip. Immunologia e Clinica dei Trapianti, Ospedali Riuniti, Bergamo
- Lab. di Genetica Medica A. O. Istituti Clinici di Perfezionamento, Milano
- Dip. di Scienze Biomolecolari e Biotecnologie, Università degli Studi di Milano, Milano
- Dip. di Genetica e Microbiologia, Università di Pavia, Pavia

- Dip. di Pediatria, Centro Fibrosi Cistica ,Fondazione IRCCS, Policlinico Mangiagalli e Regina Elena, Milano
- Lab. di Microbiologia, Centro Fibrosi Cistica, Milano
- Unità di Genomica per Diagnosi di Patologie Umane, Fondazione Centro San Raffaele, Milano
- Istituto per le Tecnologie Biomediche, CNR, Segrate (MI)
- Lab. di Ricerca Clinica ,Istituto per la Ricerca Farmacologica "M. Negri", Milano
- Dip. Chimica Organica ed Industriale, Milano
- Dip. Scienze Molecolari Agroalimentari, Milano
- Dip. Biotecnologie e Bioscienze, Unive. Bicocca, Milano
- Fondazione Humanitas per la Ricerca, Rozzano (Milano)
- Div. Immunologia, Trapianti e Malattie infettive, Istituto "San Raffaele", Milano
- Istituto di Ricerche Chimiche e Biochimiche, Istituto "G. Ronzoni", Milano

MARCHE

- Centro Regionale Fibrosi Cistica, Ospedali Riuniti, Ancona

PIEMONTE

- Centro FC Adulti Divisione Malattie Respiratorie, Dip. di Scienze Biologiche e Cliniche, Università di Torino, Ospedale S. Luigi Gonzaga, Orbassano, Torino
- Dip. di Genetica, Biologia e Biochimica, Università di Torino, Torino
- Dip. di Patologia Clinica, S.S. di Diagnostica Molecolare e Test Genetici Integrati, Torino
- Dip. Discipline Medico Chirurgiche, Sez. Anestesia e Rianimazione, Univ. Torino
- Dip. di Scienza e Tecnologia del Farmaco, Univ. di Torino
- Dip. di Scienze Cliniche e Biologiche, Univ. di Torino
- Centro di Biotecnologia Molecolare, Univ. di Torino

PUGLIA

- Dip. Fisiologia Generale ed Ambientatale, Università di Bari, Bari
- Servizio di Supporto Fibrosi Cistica, Ospedale di Cerignola, Cerignola, Foggia
- Dip. Scienze Biomediche, Lab. Patologia Generale, Università di Foggia
- Dipartimento di Pediatria, Policlinico , Università di Bari
- Istituto Biomembrane e Bioenergetica, CNR, Bari

SARDEGNA

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

SICILIA

- Istituto di Biofisica,CNR, Palermo
- Centro Regionale Fibrosi Cistica, Policlinico, Messina,
- Centro Regionale Fibrosi Cistica, Ospedale dei Bambini "G. di Cristina", Palermo
- Istituto per lo Studio dei Materiali Nanostrutturati, CNR, Palermo

TOSCANA

- Dip. di Biologia Animale e Genetica, Università di Firenze, Firenze
- Lab. di Proteomica Funzionale, Dip. di Biologia Molecolare, Università di Pisa, Pisa
- Dip. di Pediatria,Centro Fibrosi Cistica, Ospedale Meyer, Firenze
- Servizio di supporto Fibrosi Cistica,Ospedale di Livorno, Livorno
- Dip. Patologia Sperimentale, Biotecnologie Mediche, Infettivologia ed Epidemiologia, Università di Pisa, Pisa
- Unità Bioinformatica, Centro di Ricerche Novartis, Siena
- Lab. Fisiologia Microbica e Biotecnologia, Dip. Biologia Molecolare, Policlinico "Santa Maria alle Scotte", Siena
- Dipartimento Diagnostica di Laboratorio Servizio di Diagnosi Genetica, Azienda Ospedaliera 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
- Dip. Medicina Sperimentale e Scienze Biomediche, Univ. di 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 Universitaria Integrata, Verona
- Centro Fibrosi Cistica, Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata, Verona
- Dip. Scienze della Vita e della Riproduzione, Sezione di Biologia e Genetica, Università di Verona,
- Dip. Scienze Biomediche e Chirurgiche, Divisione di Nefrologia, Università di Verona, Verona
- Dip. di Patologia, Patologia Generale, Università di Verona, Verona
- Lab. di Microbiologia, Istituti Ospitalieri, Verona
- Facoltà di Scienze della Formazione, Università di Verona, Verona
- Dip. Scienza e Tecnologia del Farmaco, Università di Verona, Verona
- Dip. Scienze Farmaceutiche, Università di Padova
- Dip. Chimica Biologica, Università di Padova
- Dip. Scienze Neurologiche e della Visione, Università di Verona

BELGIUM

- Department of Clinical Chemistry, Université Catholique de Louvain, St Luc University Hospital, Brussels
- Molecular Bacteriology Laboratory Faculty of Medecine, Free University of Brussels (Ulb)

CANADA

- Department of Microbiology and Immunology, University of Western Ontario, London, Ontario, Canada

FRANCE

- Institut de Physiologie et Biologie Cellulaires, Université de Poitiers, France

GERMANY

- Institute of Medical Microbiology and Hygiene, Eberhard-Karls University of Tübingen, Tübingen, Germany
- Institute fur Medizinische Mikrobiologie, Univeristats Klinikum, Munster

IRELAND

- Queen's University Belfast, Respiratory Medicine Research Group, Microbiology Building, Belfast, Northern Ireland

ISRAEL

- Schulich Faculty of Chemistry Technion, Israel Institute of Technology, Haifa

SWITZERLAND

- Dept. of Pediatrics, Geneva University Hospitals, Laboratory of Clinical Investigation III, Geneva, Switzerland

UNITED KINGDOM

- Dept of Respiratory Medicine, Freeman Hospital, Applied Immunobiology and Transplantation Group, Institute for Cellular Medicine, Level 4, The Medical School University of Newcastle, Newcastle Upon Tyne, United Kingdom
- School of Biological Science, University of Liverpool
- Division of Pharmacology, Pharmacy and Biomedical Science, University of Portsmouth

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

Referees internazionali che hanno collaborato con FFC per la valutazione dei progetti di ricerca

ASIA

Hong Kong
Dennis Lo Yuk Ming

India
Amit Misra

Israel
Batsheva Kerem

AUSTRALIA

Scott Bell
Tim Kidd
Manohar Garg
John Massie
John Mattick
David Reid
Cynthia Withchurch

CANADA

Adré Cantin
Tom Clandinin
Peter Durie
Hartmut Grasemann
Bob Hancock
Yeger Herman
Sheila Innis
Roger Levesque
Paul Linsdell
Gergerly Lukacs
Liu Mingyao
Robert Newton
Paul Pencharz
Felix Ratjen
Andrew Sandford
Molly Schmid
Aaron Shawn
Pamela Sokol
David Speert
Miguel Valvano
Michael Wheeler
Herman Yeger
Julian Zielensky

EUROPE

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

Denmark
Niels Hojby
Christian Koch
Marie Johannesson
Jette Elisabeth Kristiansen
Søren Molin

France

Frederic Becq
Christelle Coraux
Isabelle Durieu
Alexander Edelman
Brigitte Fauroux
Claude Ferec
Emanuelle Girodon
Vincent Goffin
Jacky Jaquot
Jean Paul Latgé
Patricia Lemarchand
Christine Linard
Anne Munck
Jean-Marc Rolain
Marie Catherine Romey
Juliet Royet
Isabelle Sermet

Germany

Robert Bals
Michael De Vreese
Jahn Dieter
Gerd Döring
Stephan Fischer
Christoph Freiberg
Matthias Griese
Erick Gulbins
Dominik Hartl
Jürgen Heesemann
Barbara Kahl
Winfried Kern
Wolfgang Kuebler
Karl Kunzelmann
Hermann Schillers
Ursula Seidler
Stefan Stamm
Gratiana Steinkamp
Burkhard Tuemmler
Christiane Wolz

Italy

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

Portugal

Margarida Amaral
Jorge Leitão

Spain

Raquel Barrio
Jaume Bertranpetti
Xavier Estivill

Sweden

Ute Romling
Birgitta Strandvik

Switzerland

Leo Eberl
Hans Peter Fisher
Bernard Rossier

The Netherlands

Touw Daan
Peter Klijn
Lidewij Henneman
Charlotte Robroeks
Bernt Van Der Blink

U.K. – Northern Ireland

Matthew Avison
James Birchall
Marina Botto
Andrew Bush
Philip Calder
Steven Conway
Jane Davies
Robert Dormer
Alistair Duff
Madeleine Ennis
Glenda Esmond
Alain Filloux
Claire Glasscoe
John Govan
Michael Gray
Andrew Greening
Uta Griesenbach
Maurice Hallett
Andrew Jones
Julian Parkhill
Tyrone Pitt
Daniela Riccardi
Martin Savage
David Sheppard
Maurice Super
John Widdicombe
Craig Winstanley

SUD AMERICA

Brasile
Margaret Cristina da Silva Boguszewski
Veralice Meireles Sales de Bruin

Costa Rica
Arturo Solis

Venezuela
Juan Bautista De Sanctis

U.S.A.

Alabama
Bakhrom K. Berdiev
John Paul Clancy
Lisa Schwiebert

California
Carroll Cross
Beate Illek
Ronald Kopito
Terry Machen
Richard Moss
Malla M. Reddy
Alan Verkman
Jeffrey Wine
Colorado
Frank Accurso

Brian Doctor	Sam Lai	James Chmiel
Jerry A. Nick	Gary Mansfield	Mitchell Drumm
Herbert Schweizer	Jonathan Orens	Dana S. Hardin
Connecticut	Harvey Pollard	Daniel Hassett
Nadia Ameen	Pamela Zeitlin	Scott Herness
Diane Krause		Lloyd Horrocks
Li Tianbo		Valerie Hudson
Florida	Massachusetts	Christopher Karp
Alexander Cole	Joyce Marty Brady	Michael Konstan
Alexandra Quittner	Steven Freedman	
	Robert Kolter	
Illinois	John Ladis	Oregon
John Christman	Stephen Lory	Xuheong Liu
Ann Harris	Gerald Pier	
Anver Kuliev	Gregory Sawiki	Pennsylvania
Le Shen	Charles Serhan	Robert Bucki
Lee Shulman	Michigan	Raymond Frizzell
Jerrold Turner	John Li Puma	Douglas Wilson
	Kathleen Stringer	
	Minnesota	
	Antoinette Moran	
Indiana	Missouri	Tennessee
Roman Dzierski	Carolyn Cannon	John Christman
Won Kyoo Cho		
Iowa	New Hampshire	Texas
Dwight C. Look	Dean Madden	Carolyn Cannon
Joseph Zabner		Philip Thomas
Kansas	New York	Utah
John Gatti	Isabel Aznarez	Valerie Hudson
	Nazzareno Ballatori	Guy Zimmerman
Kentucky	David Goldfarb	
Stefan Stamm	Alice Prince	Vermont
Jay Zwischenberger	Lisa Saiman	Daniel J. Weiss
Joseph Zwischenberger	Stefan Worgall	
	Tilla S. Worgall	Virginia
Louisiana	North Carolina	Joanna Goldberg
Jay K. Kolls	Michael Boyle	
Guoshun Wang	Charles Esther	Washington
	Andrew Ghio	Moira Aitken
Maine	Michael Knowles	Jane Burns
Robert Owens	John Riordan	E. Peter Greenberg
	Gabriel Sherif	Lucas Hoffmann
Maryland		Samuel I. Miller
Gary Cutting		Matt Parsek
Robert K. Ernst		Margaret Rosenfel
William Guggino		
	Ohio	Wisconsin
	Melvin Berger	Philip Farrel
	Maria Britto	

Here the list of the 241 international experts who cooperated with FFC to review and to evaluate the grant proposals. Through annual public announcements issued between 2002 and 2010, the Italian CF Research Foundation received 370 grant proposals. Among those 165 have been selected for funding. The scientists, coming from several countries, cooperated with the Scientific Committee of the FFC Foundation to review the projects submitted: each project was evaluated by at least two experts and some experts evaluated more than one project. To those scientists, who carried out such a precious job, the Foundation expresses its warmest thanks.

Attraverso bandi annuali di concorso pubblico, sono pervenuti alla Fondazione, dal 2002 al 2010, 370 progetti di ricerca CF, tra i quali 165 sono stati selezionati per un finanziamento. 241 scienziati di varie nazioni hanno collaborato con il Comitato Scientifico della Fondazione nel valutare i progetti pervenuti: ciascun progetto ha avuto l'intervento critico di almeno due esperti e alcuni esperti hanno valutato più progetti. Agli scienziati che hanno svolto questo prezioso servizio la Fondazione porge un particolare sentito ringraziamento.

FFC projects 2008-2010 adopted by donors

Progetti FFC 2008-2010 presentati alla Convention 2010 adottati da donatori

■ 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 #1/2008

Organizzazione e regolazione del traffico intracellulare della forma normale e mutata della proteina CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) coinvolta nella patogenesi della fibrosi cistica.

Responsabile: Alberto Luini (Dip. Biologia Cellulare ed Oncologica - Consorzio Mario Negri Sud - S. Maria Imbaro - CH)

Costo: € 100.000

Adottato totalmente dai **Donatori SMS solidale 2007** con il supporto di **Vodafone, Tim, Telecom Italia, Wind, Italia "3"**



■ FFC #2/2008

Basi funzionali e strutturali del meccanismo molecolare dei potenziatori della CFTR

Responsabile: Oscar Moran (CNR - Istituto di Biofisica - Genova)

Costo: € 95.000

Adottato totalmente da:

Mille Bambini di Via Margutta – Onlus (€ 20.000)

Blunotte (€ 25.000);

Lega Italiana FC - Associazione Toscana - Onlus con **Kiwanis Club, Prato** (€ 50.000)



■ FFC #3/2008

Influenza dei fattori genetici nella malattia polmonare in pazienti affetti da Fibrosi Cistica

Responsabile: Paolo Gasparini (Dip. Scienze dello Sviluppo e Riproduttive – Università di Trieste)

Costo: € 50.000

Adottato totalmente da:

Mille Bambini di Via Margutta – Onlus



■ FFC #4/2008

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

Responsabile: Pietro Pucci (CEINGE - Biotecnologie Avanzate s.c.a r.l. - Napoli)

Costo: € 85.000

Adottato totalmente da:

Andrea Concato Orologeria (€ 30.000);

Audemars Piguet Italia Spa (€ 30.000);

Lega Italiana FC - Associazione Lucana - Onlus (€ 25.000)

ANDREA CONCATO

**AP
AUDEMARS PIGUET**



■ FFC #5/2008

Fattibilità di un programma di screening per l'identificazione preconzionale 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 Automotoivecoli 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 Roccatori 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 Bevvino (ENEA C.R. Casaccia - Biotecn. Agroindustriale e Protez. della Salute)

Costo: € 65.000

Adottato totalmente da: **Lega Italiana FC - Associazione Siciliana - Onlus**

■ 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 FC - Associazione Toscana - Onlus con **Famiglia Papini di Prato** (€ 25.000)

■ FFC #10/2008

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

Responsabile: Alessandra Polissi (Dip. Biotecnologie e Bioscienze - Università Bicocca - Milano)

Costo: € 60.000

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Ferrara con Aziende di Ferrara e Bologna*, Gruppo di Sostegno di Comacchio e Delegazione di Bologna**, con contributo **Associazione Trentina FC Onlus (in ricordo di Enzo Moser)**



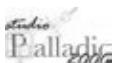
■ FFC#11/2008

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

Responsabile: Andrea Battistoni (Dip. Biologia - Università Tor Vergata - Roma)

Costo: € 65.000

Adottato totalmente da: **Studio Palladio 2000 Sandrigo VI**



ASSOCIAZIONE SERGIO VALENTE

Associazione Amici di Don Lucio



■ 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);

Delegazione FFC di Vicenza con le scuole vicentine ** (€ 40.000)

■ FFC#13/2008

Valutazione pre-clinica di analoghi ad azione anti-infiammatoria della vitamina E nella Fibrosi Cistica

Responsabile: Francesco Galli (Dip. Medicina Interna - Sez. Biochimica Appl. e Scienze Nutrizionali - Università Perugia)

Costo: € 75.000

Adottato totalmente da: **Jump Italia 2008**



■ FFC#14/2008

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

Responsabile: Cecilia Garlanda (Fondazione Humanitas per la Ricerca - Rozzano (MI))

Costo: € 75.000

Adottato totalmente con: **Festa 80° compleanno del Presidente Faganelli**

LOIFUR



■ 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 2008 Bassano del Grappa (€ 20.000); Loifur srl (€ 9.000); Medusa Film (€ 26.000)**

■ 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 Onlus (in ricordo di Marika Tomasi)**

■ FFC #17/2008

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

Responsabile: Vito Marco Ranieri (Dip. Discipline Medico Chirurgiche – Università degli Studi di Torino – sez. Anestesia e Rianimazione)

Costo: € 65.000



Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Belluno (con lascito Sig.ra Pia Antonia de Martin Fabbro in memoria di Franco Zandorella)**

■ Progetto FFC QUANTIGENE/2008

Allestimento del Servizio di quantificazione dell'espressione dei geni (QuantiGENE) a supporto della rete di ricerca italiana impegnata in studi innovativi per la fibrosi Cistica.



Responsabile: Giulio Cabrini – Laboratorio di Patologia Molecolare – Azienda Ospedaliera-Università 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 amici del Grest di Valmareno con Daniela Salton (€ 8.300);

40° compleanno Tiziana Lazzarin (€ 8.326);

Antonio Guadagnin e Figlio, Montebelluna (€ 8.000);

Latteria Montello SpA (€ 8.000);

Delegazione FFC Lago di Garda (€ 15.000);

Donatori SMS Solidale 2008 con Vodafone, Tim, Telecom Italia, Wind, Italia "3" (€ 53.077);

Bartolo Bonavoglia Group (€ 8.000);

Delegazione FFC Villa d'Almè Bergamo (€ 11.700);

Delegazione FFC di Avellino (€ 8.000);

Associazione VisVitae VR (€ 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 totalmente da:

Delegazione FFC Valdadige (€ 10.000);

Nicola Petrucci e Delegazione FFC di Molfetta (8.000);

Amici di Thomas con Delegazione FFC di Vibo Valentia (€ 8.000);

Delegazione FFC La Bottega delle Donne Montebelluna TV (€ 24.000)



■ FFC #2/2009

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

Responsabile: J. Luis V. Galietta (Laboratorio di Genetica Molecolare Istituto "G. Gaslini" - Genova)

Costo: € 125.000

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Vicenza** (con "La via dei Berici")



■ FFC #3/2009

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

Responsabile: Nicoletta Pedemonte (Laboratorio Fisiopatologia Molecolare delle Catene Ioniche Centro Biotecnologie Avanzate - Genova)

Costo: € 50.000

Adottato totalmente da: **Anna Iacomini** (€ 8.000); **Gruppo di Sostegno FFC "Rita" Verona** (€ 8.000); **Delegazione FFC di Como** (€ 34.000)



■ FFC #4/2009

La mutazione del F508 di CFTR come sorgente di segnali cellulari: un nuovo concetto per spiegare alcuni aspetti della Fibrosi Cistica

(Progetto di continuazione)

Responsabile: Lorenzo A. Pinna (Dipartimento Chimica Biologica - Università degli Studi di Padova)

Costo: € 30.000

Adottato totalmente da: **Loifur Srl** (€ 8.000); **"Amici per la Ricerca 2009" Bassano** (€ 22.000)



■ FFC #5/2009

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

Responsabile: Claudio Sorio (Dipartimento di Patologia Generale - Sez. Patologia generale Università degli Studi di Verona)

Costo: € 45.000

Adottato totalmente da: **Rotary Club Trentino Nord e Tomasi Gioielli TN** (€ 38.340);

Associazione Trentina FC Onlus (Gruppo di Sostegno FFC) (*in ricordo di Anita Furlini*) (€ 6.660)



■ FFC #6/2009

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

Responsabile: Massimo Vassalli (Istituto di Biofisica - Consiglio nazionale delle ricerche)

Costo: € 25.000

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC del Lago di Garda con i Gruppi di Sostegno di Chivasso e dell'Isola Bergamasca**



■ FFC #7/2009

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

Responsabile: Olga Zegarra (Laboratorio di Genetica Molecolare - Istituto "Giannina Gaslini" - Genova)

Costo: € 50.000

Adottato totalmente da:

Work in Progress Communication Srl (€ 13.000); **Brooks Brothers Retail Brand Alliance Europe Srl** (€ 37.000)

■ FFC #8/2009

Fattori genetici coinvolti nella progressione del fenotipo polmonare in pazienti affetti da fibrosi cistica (Progetto di continuazione)

Responsabile: Paolo Gasparini (Dipartimento di Scienze riproduttive e dello sviluppo - Università di Trieste)

Costo: € 60.000

Adottato totalmente da: **Galà di danza "Eleonora Ab-bagnato et ses amis"** (€ 35.000); **Delegazione FFC di Roma 2** (evento "Centro Infiniti") (€ 15.000); **White Gallery** (€ 10.000)



■ FFC #9/2009

Patologia molecolare del macchinario dello *splicing*: aspetti meccanistici ed approcci terapeutici

Responsabile: Franco Pagani (ICGEB - Trieste)

Costo: € 70.000

Adottato totalmente da:

CIV Campionato Italiano Velocità (€ 10.283); **DediKato 2009** (€ 26.860); **Delegazione FFC Lago di Garda** (€ 32.857)



■ FFC #10/2009

Validazione di nuovi candidati vaccini in Pseudomonas aeruginosa

Responsabile: Alessandra Bragonzi (Unità di Infezioni e fibrosi cistica - Div. di Immunologia, Trapianti e Malattie infettive - Istituto San Raffaele - Milano)

Costo: € 60.000

Adottato totalmente da: **Delegazioni FFC di Como, Catania, Vittoria Ragusa e Latina con il LIFC - Associazione Siciliana - Onlus** (*in ricordo di Simone*)



■ FFC #11/2009

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

Responsabile: Silvia Campana (Dipartimento di Pediatria - Centro regionale fibrosi cistica Azienda Ospedaliera Universitaria Meyer - Firenze)

Costo: € 50.000

Adottato totalmente da: **Angelini SpA con brand Azienda Corpotto** ("La Fibrosi cistica merita un occhio di riguardo")

■ FFC #12/2009

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

Responsabile: Renato Gennaro (Dip. di Scienze della vita - Università degli Studi di Trieste)

Costo: € 25.000

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Genova**



■ FFC #13/2009

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

Responsabile: Paolo Landini (Dipartimento Scienze Biomolecolari e Biotecnologia – Università degli Studi di Milano)

Costo: € 25.000

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Cosenza 2 con l'Agriturismo "La Locanda del Parco"** (€ 8.000); **Delegazione FFC di Novara (in ricordo di Andrea e Annalisa)** (€ 17.000)



■ FFC #14/2009

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

Responsabile: Alessandro Pini (Dip. di Biologia Molecolare – Sezione di Chimica Biologica – Università di Siena)

Costo: € 65.000

Adottato totalmente da: **"Un Natale da fiaba"** con Kiwanis Club, LIFC - Associazione Toscana - Onlus e Famiglia Papini di Prato



■ FFC #15/2009

Ruolo dei trasportatori RND in *Burkholderia cenocepacia* mediante analisi con microarrays (Progetto di continuazione)

Responsabile: Giovanna Riccardi (Dipartimento di Genetica e microbiologia – Università degli Studi di Pavia)

Costo: € 30.000

Adottato totalmente da: **Pastificio Rana SpA**



■ FFC #16/2009

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

Responsabile: Alba Silipo (Dipartimento di Chimica Organica e Biochimica – Università degli Studi "Federico II" – Napoli)

Costo: € 65.000

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Belluno**



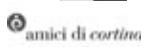
■ FFC #17/2009

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

Responsabile: Maria Lina Bernardini (Dipartimento di Biologia Cellulare e dello Sviluppo Università "La Sapienza" Roma)

Costo: € 60.000

Adottato totalmente da: **Antonio Guadagnin e Figlio, Montebelluna** (€ 8.000); **Delegazione FFC di Roma 2** (evento "Vorrei 2009", Roma e Potenza) (€ 35.000); **Associazione Amici di Cortina** (€ 17.000)



■ FFC #18/2009

Regolazione trascrizionale di interleuchina 8 in cellule epiteliali respiratorie

Responsabile: Giulio Cabrini (Laboratorio Patologia Molecolare – Laboratorio Chimica Clinica ed Ematologia OCM – Azienda Ospedaliera di Verona)

Costo: € 70.000

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Belluno (in ricordo di Silvia Sommavilla)**



■ FFC #19/2009

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

Responsabile: Marc Chanson (Dip. di Pediatria – Laboratorio indagini cliniche – Ospedale Universitario di Ginevra)

Costo: € 40.000

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC La Bottega delle Donne – Montebelluna TV**



■ FFC #20/2009

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

Responsabile: Virginia De Rose (Dip. Scienze Cliniche e Biologiche – Divisione Malattie Respiratorie – Università di Torino, AUO "S. Luigi")

Costo: € 80.000

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Torino**



■ FFC #21/2009

Meccanismi della attività battericida nei macrofagi umani ed influenza delle mutazioni CFTR

Responsabile: Paola Del Porto (Dip. di Biologia cellulare e dello Sviluppo – Università degli Studi "La Sapienza" – Roma)

Costo: € 25.000

Adottato totalmente da:

Delegazione FFC di Latina (€ 12.500);

Lega Italiana FC - Associazione Laziale - Onlus (€ 12.500)



■ FFC #22/2009

Origini della gamma-glutamiltransferasi del fluido polmonare e suoi effetti nella modulazione del bilancio redox, dell'infiammazione e della disfunzione respiratoria in corso di fibrosi cistica

Responsabile: Alfonso Pompella (Dip.to di Patologia sperimentale – Università degli Studi di Pisa)

Costo: € 20.000

Adottato totalmente da: **Associazione Trentina FC Onlus (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 riperfusione 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, Istituto Farmacologico "Mario Negri")

Costo: € 50.000

Adottato totalmente da: **Lega Italiana FC - Associazione Lucana - Onlus**



■ 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 (€ 39.000);

Star Management Srl (€ 10.000);

Credito Bergamasco SpA (€ 30.000);

Comitato Correggio (€ 70.000);

Fidenza Village Outlet (€ 10.000);

Delegazione FFC Villa d'Almè Bergamo (€ 12.000);

Delegazione di Bologna con Saima SpA (dedicato a Vanessa Savini) (€ 60.000);

Donatori Campagna SMS 2009 con Vodafone, Tim, Telecom Italia, Wind, Italia "3" (€ 40.978).

Donatori Campagna SMS 2010 con Vodafone, Tim, Telecom Italia, Wind, Italia "3" (€ 90.000, quota provvisoria)

Adottabile parzialmente per € 38.022



■ FFC #1/2010

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

Responsabile: Cristina Bombieri (Dip. Scienze della Vita e della Riproduzione – Sezione di Biologia e Genetica, Univ. di Verona)

Costo: € 60.000

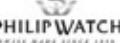
Adottato totalmente da:

Delegazione FFC di Imola (€ 10.000);

Delegazione FFC di Rovigo (€ 20.000);



"Amici per la Ricerca 2010" Bassano del Grappa e Loifur Srl (€ 30.000)



■ FFC #2/2010

Nuovi modelli cellulari e nuove molecole terapeutiche rivolte alle mutazioni "stop" del gene CFTR

Responsabile: Monica Borgatti (Dip. Biochimica e Biologia Molecolare. – Univ. Ferrara)

Costo: € 40.000

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Ferrara con Gruppo di Sostegno di Comacchio**



■ FFC #3/2010

Un approccio basato sulle cellule staminali pluripotenti indotte (iPS) per rigenerare l'epitelio polmonare affetto da fibrosi cistica.

Responsabile: Roberto Loi (Dip. Tossicologia – Sez. Oncologia e Patologia Molecolare – Università di Cagliari)

Costo: € 50.000



Adottato totalmente da: **Philip Watch – Morellato & Sector Group**

■ FFC #4/2010

Nuovi candidati terapeutici per correggere il traffico intracellulare della proteina CFTR-DF508 mutata

Responsabile: Alberto Luini (TIGEM, Napoli)

Costo: € 45.000

Adottato totalmente da: **Lega Italiana FC - Associazione Siciliana - Onlus**



■ FFC #5/2010

Ricerca di inibitori dei chaperoni (complesso HSP70/HSC7) utili per correggere la DF508-CFTR

Responsabile: Mauro Mazzei (Dip. Scienze Farmaceutiche, Università di Genova)

Costo: € 100.000

Adottato totalmente da: **Philip Watch – Morellato & Sector Group**



■ FFC #6/2010

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

Responsabile: Paola Melotti (Centro Regionale Fibrosi Cistica, OCM Verona)

Costo: € 55.000

Adottato totalmente da:

Delegazione FFC di Verbania (€ 8.000);

Associazione Trentina FC Onlus (in ricordo di Silvia Sommavilla) (€ 10.000);

Consorzio Promotre s.c.r.l. (€ 15.000);

Antonio Guadagnin e Figlio Montebelluna (€ 10.000);

Alessandra Bocanera (€ 12.000)



■ FFC #7/2010

Proprietà strutturali delle componenti intracellulari della proteina CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator)

Responsabile: Oscar Moran (Istituto di Biofisica, CNR, Genova)

Costo: € 90.000

Adottato parzialmente da:

Delegazione FFC di Cosenza 2 (€ 8.000);

Work in Progress Communication "Sapore di Sale 2010" (€ 12.000)

Adottabile parzialmente per € 70.000



■ FFC #8/2010

Interazione fra attività di CFTR e infezione da Pseudomonas nelle cellule epiteliali respiratorie e ruolo della proteina NHERF1

Responsabile: Anna Tamanini (Lab. Patologia Molecolare, Lab. Analisi Cliniche ed Ematologiche, Az. Ospedaliera Universitaria Integr., Verona)

Costo: € 30.000

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC "Bottega delle Donne" Montebelluna TV**



■ FFC #9/2010

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

Responsabile: Daniela Maria Cirillo (Emerging Bacterial Pathogens Unit, Div. of Immunology, Transplantation and Infectious Disease, Scientific Institute H. S. Raffaele, Milano)

Costo: € 70.000

Adottato totalmente da:

Delegazione FFC di Milano (€ 52.000);
Associazione "Gli Amici di Claudia" Onlus di Cerignola (€ 8.000);
Delegazione FFC di Bergamo Villa d'Almè (€ 10.000)



■ FFC #10/2010

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

Responsabile: Giuseppe Manco (Ist. Biochimica delle Proteine, CNR Napoli)

Costo: € 65.000

Adottabile

■ FFC #11/2010

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

Responsabile: Antonio Molinaro (Dip. Chimica Organica e Biochimica, Università Napoli)

Costo: € 80.000

Adottato totalmente da: **Pastificio Rana SpA**



■ FFC #12/2010

Segnali intracellulari dell'infezione da *Pseudomonas aeruginosa* come bersaglio di nuovi farmaci

Responsabile: Paolo Pinton (Dip. Medicina Sperimentale e Diagnostica, Univ. Ferrara)

Costo: € 60.000

Adottabile



■ FFC #13/2010

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

Responsabile: Alessandra Polissi (Dip. Biotecnologie e Bioscienze, Università Milano Bicocca)

Costo: € 70.000

Adottato totalmente dai **Donatori SMS solidale 2010** con **Vodafone, Tim, Telecom Italia, Wind, Italia "3"**



■ FFC #14/2010

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

Responsabile: Paolo Visca (Dipart. Biologia, Univ. Roma Tre, Roma)

Costo: € 50.000

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Vittoria Ragusa** (€ 30.000);

Delegazione FFC Lago di Garda con i Gruppi di Sostegno di Chivasso, Isola bergamasca e Valpolicella VR (€ 20.000)

■ FFC #15/2010

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

Responsabile: Andrea Battistoni (Dip. Biologia, Univ. di Roma Tor Vergata, Roma)

Costo: € 55.000

Adottabile



■ FFC #16/2010

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

Responsabile: Maria Cristina Dechechchi (Lab. Patologia Molecolare, Lab. Chimica Clinica ed Ematologica, Az. Ospedaliera Universitaria Integr., Verona)

Costo: € 60.000

Adottato totalmente da: **Assistgroup** (€ 30.000);

Latteria Montello SpA (€ 20.000)

Delegazione FFC di Imola (€ 10.000)



■ FFC #17/2010

Caratterizzazione molecolare della trimetilangelicina (TMA) e di analoghi strutturali in fibrosi cistica: effetti anti-infiammatori e potenziamento dell'attività biologica del CFTR

Responsabile: Roberto Gambari (Dip. Biochimica e Biologia Molecolare, Univ. Ferrara)

Costo: € 60.000

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Torino**



■ FFC #18/2010

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

Responsabile: Cecilia Garlanda (Fondazione Humanitas per la Ricerca, Milano)

Costo: € 80.000

Adottato totalmente da: **Coca Cola Light Tribute to Fashion, Milano**



■ FFC #19/2010

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

Responsabile: Paolo Montuschi (Dip. di Farmacologia, Facoltà Medicina, Univ. Sacro Cuore, Roma)

Costo: € 45.000

Adottato totalmente da: **Comune di Cernobbio "Festival Città di Cernobbio"** (€ 15.000);

Delegazione FFC di Lecce (€ 15.000);

Lega Italiana FC - Associazione Lucana - Onlus (€ 15.000)



■ FFC #20/2010

Identificazione di nuovi potenziali agenti terapeutici per la fibrosi cistica ad attività multipla selettiva

Responsabile: Annamaria Naggi (Ist. di Ricerche Chimiche e Biochimiche "G. Ronzoni", Milano)

Costo: € 45.000

Adottabile



■ FFC #21/2010

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

Responsabile: Luigina Romani (Dip. Medicina Sperimentale e Scienze Biomediche, Univ. Perugia)

Costo: € 80.000

Adottato parzialmente da:

Coca Cola Light Tribute to Fashion, Milano (€ 7.500);

Francesca Guadagnin (€ 8.000)

Delegazione FFC di Belluno (€ 64.500)

■ FFC #22/2010

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

Responsabile: Mario Romano (Dip. Scienze Biomediche, Univ. Chieti-Pescara, Chieti)

Costo: € 60.000

Adottabile

■ FFC #23/2010

Lo screening neonatale della fibrosi cistica in Italia. Indagine valutativa sugli aspetti tecnico-scientifici, organizzativi e psico-relazionali

Responsabile: Teresa Repetto (A.O.U. "A. Meyer", Centro Regionale Toscano Fibrosi Cistica, Firenze)

Costo: € 35.000

Adottato totalmente da:

"Familiari e Amici di Luisa" Alghero (€ 12.000);

Delegazione FFC di Latina (in ricordo di Alessandro Lombardi) (€ 23.000)

(*) 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 – Novanta Vicentina

Istituto Marzotto – Valdagno

Istituto Da Schio – Vicenza

Istituto Fusinieri – Vicenza

Istituto Lampertico – Vicenza

Istituto Pigafetta – Vicenza

Istituto Rossi – Vicenza

Liceo Quadri – Vicenza

CF research costs borne by FFC Foundation (€)										
Research area	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2002-2010
1. CFTR physiopathology & new therapy	263,000 2 proj.	178,000 4 proj.	76,000 4 proj.	180,000 5 proj.	200,000 5 proj.	220,000 5 proj.	195,000 2 proj.	375,000 7 proj.	470,000 8 proj.	2,157,000 41 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.	-	851,00 20 proj
3. Microbiology	18,000 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.	395,000 6 proj.	1,766,000 43 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 6 proj.	295,000 6 proj.	485,000 8 proj.	2,014,000 37 proj.
5. Epidemiology & Clinical Res	-	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.	35,000 1 proj.	604,000 22 proj.
Core facilities	-	-	-	-	-	-	200,000 QuantifiGENE	400,000 CFaCore	6,500 Primary Cult	606,500 3 proj.
Partial costs	492,000	508,000	500,000	614,000	700,000	904,000	1,280,000	1,600,000	1,391,500	7,998,500
Research projects	4 proj.	13 proj.	19 proj.	17 proj.	24 proj.	20 proj.	18 proj.+1	25 proj.+1	23 proj.+1	162 proj.+3 fac
General costs	21,500	32,000	46,000	54,000	61,000	65,000	76,000	82,000	85,000	523,000
Total costs	513,500	540,000	546,000	668,000	761,000	969,000	1,356,000	1,682,000	1,477,000	8,521,500

Research support at Verona CF centre 1997-2002: € 777,217

Total research investment 1997-2010: € **9,298,717**

Notes



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

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

Presidenza e Segreteria

Tel. 045 8123438 – fax 045 8123568
e-mail: fondazione.ricercafc@ospedaleuniverona.it
Codice fiscale 93100600233

Consiglio di Amministrazione

Presidente: Vittoriano Faganelli
Vicepresidente: Matteo Marzotto
Consiglieri: Eugenio Bertolotti
Andrea Bolla
Luigi Bozzini
Sandro Caffi
Paolo Del Debbio
Giuseppe Ferrari
Annamaria Giunta
Gianni Mastella
Michele Romano
Luciano Vettore

Direzione Scientifica

Tel. 045 8123567
Direttore Scientifico: Gianni Mastella
e-mail: gianni.mastella@ospedaleuniverona.it

Comitato di Consulenza Scientifica

Presidente: Antonio Cao
Consulenti: Giorgio Berton
Roberto Buzzetti
Gerd Döring
Lucio Luzzatto

Per donazioni:

- Conto corrente postale n. 18841379
- Bonifico Unicredit Banca
IT 03 N 02008 11718 000009465517
- Bonifico Banca Popolare Verona
IT 60 V 05188 11708 000000048829
- On-line sul sito: www.fibrosicisticaricerca.it
- 5 x mille dell'IRPEF

Grafica: Ada Frapporti

Stampato il 23 novembre 2010
Tipolitografia Artigiana
San Giovanni Lupatoto (VR)

www.fibrosicisticaricerca.it

In collaborazione con



Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata Verona

Con il contributo di

