

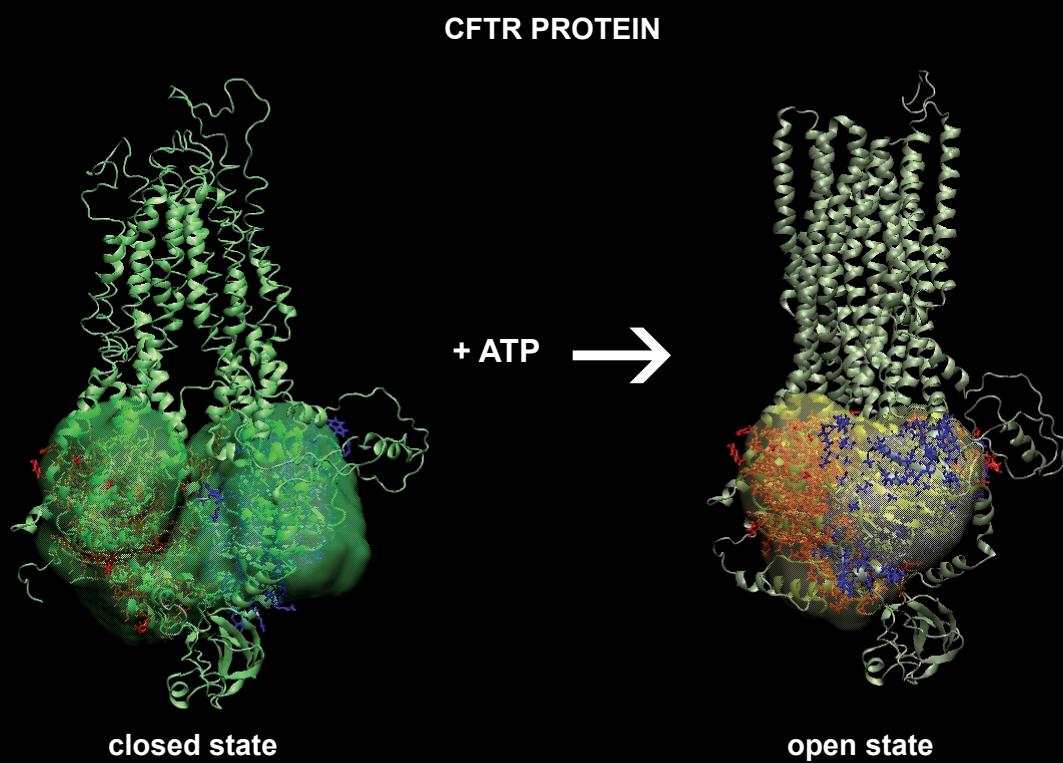


*fondazione per la ricerca  
sulla fibrosi cistica - onlus*  
*Italian Cystic Fibrosis Research Foundation*

# X CONVENTION D'AUTUNNO DEI RICERCATORI IN FIBROSI CISTICA

## Convention of Investigators in Cystic Fibrosis

Verona, 29 novembre • 1 dicembre 2012



In copertina/*Front cover*:

La proteina CFTR secondo un modello ricostituito da Oscar Moran, Istituto di Biofisica CNR di Genova, con una tecnica molto sofisticata.

*CFTR protein according to a model elaborated by Oscar Moran (Istitute of Biophysics, CNR Genova) through a sophisticated technique.*

Al modello molecolare teorico della CFTR è stato sovrapposto il volume dei domini che legano nucleotidi (NBD), risolti mediante la tecnica di dispersione di raggi-X (SAXS).

I volumi mostrano i cambiamenti strutturali risultanti dal legame con l'ATP, che determina lo stato funzionale del canale della CFTR (permeabile o impermeabile agli ioni).

*Over the theoretical CFTR molecular model, has been draw the body shape of the nucleotide binding domain (NBD), as obtained from small angle X-ray scattering ( SAXS) experiments. The bodies show the structural changes due to ATP binding, determining the functional state of the CFTR channel (permeant or impermeable to ions).*

# **X Italian Convention of Investigators in Cystic Fibrosis**

## **X Convention d'Autunno dei Ricercatori in Fibrosi Cistica**

Palazzo Erbisti, Accademia di Agricoltura, Scienze e Lettere  
via Leoncino 6, Verona

November 29 – December 1, 2012

*Work progress of projects funded by FFC (2010-2012)*

Presentazione dello stato di avanzamento  
dei progetti finanziati dalla Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica  
2010-2012

*Therapy of the basic defect*



*Treatment of pulmonary infection*



*Treatment of inflammation*



*Carrier and neonatal screening*



*Clinicians meet investigators*



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

# Program at a glance

## Thursday, November 29

- 11:00-13:00 - *Registration and Poster set-up*  
13:15-15:30 - **Plenary Session 1:** Innovatory antimicrobial therapies  
15:30-16:00 - *Afternoon snack*  
16:00-18:15 - **Plenary Session 2:** Monitoring pharmacological treatments: novel criteria.  
CFTR-DF508 correction. Looking at stem cell therapy.  
18:15-19:45 - **Pearranged group meetings** (on previous reservation).

## Friday, November 30

- 08:10-10:15 - **Plenary Session 3:** Experimental basis for antimicrobial and antiinflammatory treatments.  
Treatment of mucociliary clearance defect. CF Carrier screening.  
10:35-11:00 - *Coffee break*  
11:00-13:00 - **Plenary Session 4:** Clinicians meet investigators 1  
Basic defect and new drugs. Infection and antimicrobial strategies  
13:00-14:00 - *Lunch*  
14:00-16:00 - **Plenary Session 5:** Clinicians meet investigators 2  
Genetics and screening. Inflammation and antiinflammatory strategies.  
16:00-16:30 - *Coffee break*  
16:30-18:30 - **Twin Poster Session 1**  
Subsession 1A: CFTR function/dysfunction//correction  
Subsession 1B: New targets for antiinflammatory therapies  
18:30-19:30 - **Plenary Session 6:** New FFC facility presentation  
20:30-23:00 - *Wellcome Dinner*

## Saturday, December 1

- 08:45-10:45 - **Twin Poster Session 2**  
Subsession 2A: Basic and applied genetics. Monitoring disease course and therapy.  
New aspects of CF lung infection.  
Subsession 2B: Towards novel antimicrobial strategies.  
10:45-11:15 - *Coffee break*  
11:15-13:30 - **Plenary Session 7:** Other antiinfectious and antiinflammatory proposals.

# Index • Indice

## □ ABSTRACTS

9

Thursday November 29 - Afternoon

### PLENARY SESSION 1: *Innovatory antimicrobial therapies*

Chairman: Döring G

8

#### 1. Molinaro A, Bernardini ML, Döring G

8

Development of new therapeutic approaches against microbial infection in cystic fibrosis patients: biochemical analysis of cell wall fragments (FFC project#11/2010)

#### 2. Visca P, Leoni L

9

Non-conventional strategies against *Pseudomonas aeruginosa* infection: interference with iron homeostasis and quorum sensing (FFC Project#14/2010)

#### 3. Leoni L, Imperi F

9

Identification and characterization of novel drugs suppressing *Pseudomonas aeruginosa* virulence in chronic infection (FFC Project#13/2011)

#### 4. Pizzo E, Varcamonti M

10

Development, production and characterization of antibacterial peptides (CAMPs) active on the sessile form of the opportunistic human pathogens *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cenocepacia* (FFC Project#15/2011)

#### 5. Quattrucci S, Trancassini M, Schippa S, Nicoletti M

11

*Achromobacter xylosoxidans* an emerging pathogen in Cystic Fibrosis patients: from molecular characterization to development of innovative therapeutic strategies based on the antibacterial activities of *Bdellovibrio* predator bacteria (FFC Project#16/2011)

#### 6. Pini A

12

Preclinical development of the antimicrobial peptide M33. Efficacy against *P. aeruginosa* lung infections and pharmacokinetic studies in animals (FFC Project#24/2011)

### PLENARY SESSION 2:

Chairman: Cabrini G

13

### *Monitoring pharmacological treatments: novel criteria*

13

#### 7. Melotti P, Sorio C

13

Novel biomarkers for evaluation of efficacy of new therapies in cystic fibrosis (FFC Project#6/2010)

#### 8. 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)

#### 9. Aiello M, Sala A, Clini E, Pisi G

15

Docosahexaenoic acid-derived anti-inflammatory mediators in exhaled breath condensate and sputum of adults with cystic fibrosis (FFC Project#17/2011)

### *CFTR-DF508 correction*

16

#### 10. Mazzei M, Fossa P, Turco MC

16

The search of HSP70/HSC70 complex inhibitors useful to correct the F508-CFTR (FFC Project#5/2010)

#### 11. Moran O

17

Structural features of the intracellular domains of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (FFC Project#7/2010)

### *Looking at stem cell therapy*

18

#### 12. Loi R

18

An induced pluripotent stem cell (iPS)-based approach for the repopulation and phenotypic correction of cystic fibrosis airway epithelium (FFC Project#3/2010)

*Friday, November 30 - Morning*

<b>PLENARY SESSION 3</b>	
<i>Chairman: Berton G</i>	<b>19</b>
<b>Experimental basis for antimicrobial and antiinflammatory treatments</b>	<b>19</b>
<b>13. Cirillo DM, Bragonzi A, Kahl B,</b>	<b>19</b>
Pathogenicity of Staphylococcus aureus and its role in the progression of Pseudomonas aeruginosa chronic lung infection (FFC Project#9/2010)	
<b>14. Pinton P</b>	<b>20</b>
Calcium signal and PKC as targets of Pseudomonas aeruginosa infection (FFC Project#12/2010)	
<b>15. Romani L</b>	<b>21</b>
Th17 responses in Cystic fibrosis: paving the way for novel anti-inflammatory strategies and immunogenetic screening (FFC Project#21/2010)	
<b>16. Romano M, Evangelista V</b>	<b>22</b>
Platelet-leukocyte interactions in cystic fibrosis inflammation: a window for therapeutical opportunities (FFC Project#22/2010)	
<b>Treatment of mucociliary clearance defect</b>	<b>23</b>
<b>17. Naggi A, Yates E, Shute J</b>	<b>23</b>
Identification of agents with multiple favourable activities as potential treatments for cystic fibrosis (FFC Project#20/2010)	
<b>CF Carrier screening</b>	<b>25</b>
<b>18. Mosconi P, Castellani C</b>	<b>25</b>
Cystic fibrosis: to screen or not to screen? Involving citizens' jury in decision on carrier screening (FFC Project#9/2011) (20')	

**PLENARY SESSION 4 (No abstracts available)**

<b>Clinicians meet investigators 1</b>	<b>26</b>
<b>Basic defect and new drugs</b>	
Moderator: Colombo C	
Clinician: Braggion C	
Investigator: Galietta L	
<b>Infection and antimicrobial strategies</b>	
Moderator: Messore B	
Clinician: Costantini D	
Investigator: Leoni L	

**PLENARY SESSION 5 (No abstracts available)**

<b>Clinicians meet investigators 2</b>	<b>26</b>
<b>Genetics and screening</b>	
Moderator: Borgo G	
Clinician: Castellani C	
Investigator: Castaldo G	
<b>Inflammation and antiinflammatory strategies</b>	
Moderator: Magazzù G	
Clinician: Minicucci L	
Investigator: Maiuri L	

**TWIN POSTER SESSION 1**

**Subsession 1A - CFTR function/dysfunction//correction**

<i>Chairman: Conese M</i>	<b>26</b>
---------------------------	-----------

<b>19. Casavola V</b>	26
Properties of trimethylangelicin in F508del CFTR rescue (FFC Project#1/2011)	
<b>20. Di Leonardo A</b>	27
PTC124 derivatives as a novel approach to improve the readthrough of premature stop codons in the CFTR gene (FFC Project#2/2011)	
<b>21. Pinna L</b>	28
Subverted signalling by protein kinase CK2 in ΔF508 CFTR expressing cells. Functional aspects and prospects in therapy (FFC Project#3/2011)	
<b>22. Reshkin S</b>	29
Role of spatial cAMP/PKA compartmentalization and activity in regulating CFTR function (FFC Project#4/2011)	
<b>23. Borgatti M, Altamura N</b>	30
The read-through approach for the treatment of cystic fibrosis caused by premature termination codons (FFC Project#1/2012)	
<b>24. Moran O</b>	31
The molecular structure and the folding of the whole Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) (FFC Project#4/2012)	
<b>25. Pedemonte N</b>	31
Modulation of post-translational modification and quality control system as a novel therapeutic strategy for Cystic Fibrosis (FFC Project#5/2012)	
<b>26. Pagani F</b>	32
CFTR splicing correction mediated by Exon-Specific U1 small nuclear RNAs (ExSpe U1) (FFC Project#6/2012)	
<b>27. Galietta L, Millo E</b>	33
Development of novel strategies to correct the chloride transport defect in cystic fibrosis (FFC Project#2/2012)	
<b>28. Lucarelli M, Bombieri C, Conese M</b>	34
Study of the pathogenetic and therapeutic role of the Epithelial Na <sup>+</sup> channel (ENaC) in CF and CF-like disease (FFC Project#3/2012)	

## ***Subsession 1B - New targets for antiinflammatory therapies***

<i>Chairman: Berton G</i>	35
<b>29. Bernardini L, Molinaro A, Garlanda C, Allaoui A</b>	35
Inflammasome activation and IL-1 mediated inflammation triggered by Pseudomonas aeruginosa: a rationale for novel therapeutic approaches in cystic fibrosis patients (FFC Project#18/2011)	
<b>30. Cabrini G, Pinton P</b>	36
Phospholipase C beta (PLCB) as candidate therapeutic target in CF lung proinflammatory signaling (FFC Project#19/2011)	
<b>31. Evangelista V, Romano M</b>	36
Phosphodiesterases type-4 (PDE4) as a novel target to reduce neutrophilic lung inflammation in cystic fibrosis (FFC Project#21/2011)	
<b>32. Ghidoni R</b>	37
Targeting ceramide metabolism as a pharmacological strategy in cystic fibrosis (FFC Project#22/2011)	
<b>33. Quaglia F, Carnuccio R</b>	38
Polyethylenimine-engineered respirable particles delivering a decoy oligonucleotide to NF-κB: a novel combination therapy for cystic fibrosis? (FFC Project#23/2011)	
<b>34. Dechechchi MC, Beck F</b>	39
Structure-activity relationships (SAR) of neoglycoconjugates derived from deoxynojirimycin as possible therapeutic agents for cystic fibrosis lung disease, by modulating the metabolism of sphingolipids (FFC Project#14/2012)	
<b>35. Raia V, Bruscia E</b>	40
The Heme-oxygenase 1 (HO-1) as modulator of Cystic Fibrosis lung disease (FFC Project#15/2012)	
<b>36. Romani L</b>	41
Targeting pathogenic pathways leading to inflammatory Th17 responses in cystic fibrosis: a drug discovery approach (FFC Project#16/2012)	
<b>37. Romano M, Totani L, Marchisio M, Moretti P</b>	42
The role of vascular endothelium in cystic fibrosis inflammation (FFC Project#17/2012)	
<b>38. Strazzabosco M</b>	43
Cystic Fibrosis liver disease: the role of CFTR as regulator of epithelial innate immunity (FFC Project#18/2012)	

## PLENARY SESSION 3: *New FFC facility presentation*

Chairman: **Mastella G**

44

– **Galietta L**

Primary Cell Cultures (PCC)

– **Buzzetti R**

Cystic Fibrosis Database (CFDB)

Saturday, December 1 – Morning

## TWIN POSTER SESSION 2

### Subsession 2A

Chairman: **Buzzetti R**

#### **Basic and applied genetics**

44

39. Castellani C, Picci L

44

A field study in an area of extensive carrier screening for cystic fibrosis (FFC Project#8/2011)

40. Corvol H, Cabrini G

45

European Cystic Fibrosis Modifier Gene Study (FFC Project#5/2011)

41. Duga S

46

CFTR mRNA analysis as a key step to understand the role of CFTR gene mutations in cystic fibrosis disease expression (FFC Project#6/2011)

42. Ferrari M, Cretich M

46

New strategies for clinical application of noninvasive prenatal diagnosis of cystic fibrosis based on the analysis of fetal mutated alleles in maternal plasma (FFC Project#7/2011)

#### **Monitoring disease course and therapy**

47

43. Morana G

47

DWI (Diffusion weighted Imaging) a new tool to assess inflammation in CF population with pulmonary exacerbation (FFC Project#25/2011)

44. Sorio C

48

Testing human monocytes as a new tool for clinical and preclinical research in CF (FFC Project#26/2011)

45. Repetto T

49

Risk factors for poor outcomes in Cystic Fibrosis newborns diagnosed by neonatal screening in Italy: years 2009-2011 (FFC Project#19/2012)

#### **New aspects of CF lung infection**

50

46. Cigana C, Colombo C

50

Host Response to Pseudomonas aeruginosa adaptation during airway chronic infection (FFC Project#20/2011)

47. Bevilino A, Mengoni A, Taccetti G, Fiscarelli E, Manno G

51

Investigation of cystic fibrosis airway microbiome in patients showing a severe decline in lung function and not responding to conventional antimicrobial therapy (FFC Project#8/2012)

48. Battistoni A

52

Role of high affinity zinc transporters in Pseudomonas aeruginosa ability to colonize the inflamed cystic fibrosis lung (FFC Project#13/2012)

### Subsession 2B

Chairman: **Bruni P**

#### **Towards novel antimicrobial strategies**

53

49. Bragonzi A, Obrecht D

53

Pulmonary delivery of inhaled peptidomimetic as novel antibiotics to control Pseudomonas aeruginosa infection in murine models (FFC Project#10/2011)

50. Cocuzza CE, Cariani L, Giacomini D

54

Design, synthesis, in vitro biological evaluation and anti-biofilm activity of new beta-lactam and linezolid-like compounds as potential antibacterial agents against *Staphylococcus aureus* infections in cystic fibrosis patients (FFC Project#11/2011)

51. Fani R, Tutino ML, Rovero P

55

New drugs for *Burkholderia cepacia* from Antarctic bacteria (FFC Project#12/2011)

<b>52. Mangoni ML, Yechiel S</b>	<b>56</b>
Development of new host-defence like peptides and lipopeptides against lung pathogens: in vitro and in vivo studies (FFC Project#14/2011)	
<b>53. Bergamini G, Melotti P</b>	<b>56</b>
Metalloproteases released by <i>Pseudomonas aeruginosa</i> clinical strains as virulent factors in CF: clinical correlations and chemical modulators (FFC Project#7/2012)	
<b>54. Pizzo E, Varcamonti M</b>	<b>57</b>
Development, production and characterization of antibacterial peptides (CAMPs) active on the sessile form of the opportunistic human pathogens <i>Pseudomonas aeruginosa</i> and <i>Burkholderia cenocepacia</i> (FFC Project#9/2012)	
<b>55. Riccardi G, Fani R</b>	<b>58</b>
A very promising drug against <i>Burkholderia cenocepacia</i> (FFC Project#10/2012)	
<b>56. Scocchi M, Di Bonaventura G, Costantino ML</b>	<b>59</b>
Development of optimized anti-infective peptides and exploration of a novel drug delivery system for the respiratory infection therapy in an animal model (FFC Project#11/2012)	
<b>57. Silipo A, Di Bonaventura G</b>	<b>60</b>
Naturally occurring antimicrobials to counteract lung infections in cystic fibrosis patients: Cecropin A-Melittin (CA-M) hybrid peptides and polymixins (FFC Project#12/2012)	
<b>58. Taccetti G, Costantini D, Collura M, Magazzù G, Raia V</b>	<b>61</b>
Early antibiotic treatment for MRSA eradication in cystic fibrosis patients: a randomised multicentre study (FFC Project#20/2012)	

## PLenary Session 7: *Other antiinfectious and antiinflammatory proposals*

<b>Chairman: Doering G</b>	<b>62</b>
<b>59. Battistoni A</b>	<b>62</b>
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)	
<b>60. Manco A, Andrenacci D</b>	<b>63</b>
Exploring thermostable quorum quenching lactonases to counteract bacterial infections in cystic fibrosis (FFC Project#10/2010)	
<b>61. Polissi A, Bolognesi M, Dehò G, Peri F, De Castro C, De Gioia L</b>	<b>64</b>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> lipopolysaccharide cell surface transport is a target process for developing new antimicrobials (FFC Project#13/2010)	
<b>62. Dechechchi MC, Gambari R</b>	<b>65</b>
Modulation of sphingolipid metabolism as a strategy for the treatment of CF lung inflammation (FFC Project#16/2010)	
<b>63. Gambari R, Dall'Acqua F</b>	<b>66</b>
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)	
<b>64. Garlanda C, Bragonzi A</b>	<b>67</b>
Infections in cystic fibrosis: role of the long pentraxin PTX3 in host resistance and as therapeutic agent (FFC Project#18/2010)	

## APPENDICES

<b>1. Publications and congress communications 2002 - 2012</b>	<b>68</b>
Pubblicazioni e comunicazioni congressuali 2002-2012	
<b>2. Projects funded 2002-2012, publications and impact factor</b>	<b>92</b>
Progetti finanziati da FFC dal 2002 al 2012, pubblicazioni e impact factor	
<b>3. FFC Institute and Laboratory Network</b>	<b>93</b>
La rete FFC di Istituti e Laboratori di ricerca	
<b>4. International reviewers of FFC projects</b>	<b>96</b>
Revisori internazionali dei progetti FFC	
<b>5. FFC Research Funding</b>	<b>98</b>
Finanziamento della ricerca FFC 2002-2012	
<b>6. FFC Projects 2010-2012 Adopted by Supporters</b>	<b>99</b>
Progetti FFC 2010-2012 adottati dai sostenitori	

## ABSTRACTS OF PRESENTATIONS

### PLENARY SESSION 1

#### Innovatory antimicrobial therapies

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

Molinaro A<sup>1</sup>, Bernardini ML<sup>2</sup>, Döring G<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Chimica Organica e Biochimica, Università di Napoli "Federico II", Italia, <sup>2</sup>Dipartimento di Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Sapienza-Università di Roma, Italia,

<sup>3</sup>Institut for General and Environmental Hygiene – University of Tübingen (FFC Project# 11/2010)



Antonio Molinaro, al centro, con il suo gruppo di ricerca

**Background** CF chronic bacterial lung infections significantly increase lung inflammation and contribute to tissue destruction, leading to a largely reduced life expectancy. The bacterial factors and the molecular mechanisms which provoke full blown inflammation in CF upon host-pathogen interaction at the CF respiratory epithelium interface are mostly unclear. We have recently demonstrated by molecular studies that during chronic pulmonary infection *P. aeruginosa* clones genotypically and phenotypically adapt to the CF niche.

**Objectives** The overall aim of this project is to contribute to the understanding of the molecular mechanisms underlining the immune evasion strategies by CF pathogens, such as *Burkholderia cepacia* and the new emerging anaerobe *Prevotella intermedia* based on the plasticity of their main molecular elements, allowing them to stably colonize the airways. The study at multiple levels of the action of these factors is the main frame of this project.

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

**Main results** In this project we have thoroughly investigated the structure, function and immunostimulatory activity of the cell wall components lipopolysaccharide the CF pathogens *B. cepacia* and *P. intermedia*. As for *Burkholderia LPS* we have extensively characterised it by chemical and also immunological point of view; we have additionally ascertained its biosynthesis and its transport.

**Comments & Conclusions** We have fully characterised the lipopolysaccharide from *B. cepacia* and started the characterisation of the same molecule from the anaerobe bacterium *Prevotella intermedia*, a powerful pathogen, not equipped with virulence traits, often isolated from lungs of CF patients or from their sputum.

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

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

**Ragioni dello Studio** Nonostante i progressi nel trattamento delle malattie infettive correlate alla Fibrosi Cistica, i microrganismi patogeni rimangono i più pericolosi agenti per la salute dei pazienti. I meccanismi molecolari che provocano lo scoppio dell'infiammazione a seguito dell'interazione patogeno-ospite sono poco chiari. Studi precedenti da noi condotti e finanziati dalla FFC hanno chiarito che *Pseudomonas aeruginosa* durante il cambio da infezione acuta a infezione cronica si adatta da un punto di vista chimico, cioè cambia la chimica degli elementi della parete cellulare.

**Obiettivi** In questo particolare progetto noi abbiamo definito a livello molecolare la struttura, la funzione e l'attività biologica dei componenti della parete cellulare come i lipopolisaccaridi da patogeni opportunisti più importanti come *Burkholderia cepacia* e l'anaerobio emergente *Prevotella intermedia* e che rappresentano un problema clinico molto rilevante.

**Metodi** L'interazione tra diverse discipline e diversi gruppi di ricerca è cruciale nell'affrontare complesse problematiche scientifiche. L'isolamento dei componenti della parete cellulare e la determinazione della loro struttura è stato ottenuto attraverso una combinazione di metodologie chimiche e biochimiche, nella seconda parte del progetto questi nuovi componenti sono stati testati per la loro attività immunostimolatoria.

**Principali Risultati** Abbiamo contribuito in maniera sostanziale a chiarire quali sono i fattori di virulenza del batterio *B. cepacia* e quale è il meccanismo di biosintesi e trasporto sulla parete cellulare di tali molecole. Abbiamo poi intrapreso l'isolamento e la purificazione dei principali componenti di membrana di *P. intermedia*, un batterio anaerobio. Abbiamo scoperto che essi hanno scarso potere infiammatorio, così infatti il batterio tende a camuffare la sua presenza.

**Commenti e conclusioni** È stato definitivamente chiarito il ruolo cruciale delle molecole di membrana del complesso *B. cepacia* e inoltre è stato iniziata l'analisi immunologica dei componenti di membrana di un nuovo emergente patogeno, *P. intermedia*, a cui seguiranno studi chimici.

**Possibili ricadute per ricerca e clinica** Cruciale nel trattamento FC è la riduzione dell'infezione polmonare. La possibile ricaduta di questo studio è lo sviluppo di nuovi selettivi inibitori della sintesi della parete cellulare con lo scopo di ridurre l'infiammazione nelle vie aeree FC e radicare i patogeni con nuove strategie di trattamento.

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

**Visca P<sup>1</sup>, Leoni L<sup>2</sup>**

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



Paolo Visca, primo da destra, e Livia Leoni, al centro, con il gruppo di ricerca

**Background** A promising approach to suppress bacterial infection is the use of drugs which target the pathogenic potential rather than growth. In *P. aeruginosa*, iron uptake and metabolism, as well as quorum sensing (QS) are critical for the establishment of the infection, thus representing ideal targets for the development of such drugs.

**Hypothesis and objectives** Gallium (Ga) and iron are two elements sharing very unique subatomic feature. Thus, Ga is able to exert a bactericidal effect, by interfering with iron-dependent redox processes. The Ga-nitrate is already approved by the US Food and Drug Administration (FDA).

The efflux pumps inhibitors (EPI) are used in clinical trials as antibiotic therapy adjuvants. Preliminary results suggested that EPI might have unpredictable side-effects on *P. aeruginosa* QS and pathogenesis.

This project has two main objectives: 1) characterization of *P. aeruginosa* key factors involved in iron uptake and QS in the lung environment; 2) assessment of the activity of Ga and EPI in the treatment of *P. aeruginosa* infections.

**Methods** *P. aeruginosa* mutants in iron uptake systems and in QS regulatory factors have been generated and their pathogenicity evaluated in a mouse model of pulmonary infection. The anti-*Pseudomonas* activities of Ga-nitrate (either alone or complexed with metal chelators) and of phenyl-arginine  $\beta$ -naphthyl-amide hydrochloride (Pa $\beta$ N), an EPI model compound, have been evaluated *in vitro*.

**Preliminary results** Results indicate that each iron uptake system and the RsaL QS regulator, albeit with different outcomes, positively contributes to *P. aeruginosa* chronic lung infection in mice. Ga-nitrate inhibits *P. aeruginosa* growth *in vitro*. Moreover, Ga supplied in combination with the endogenous *P. aeruginosa* siderophore pyochelin was more effective than when supplied alone. Finally, Pa $\beta$ N, can suppress the *P. aeruginosa* virulence process *in vitro* and in a simple animal infection model.

**Spin-off for research & clinical purposes** Our data reveal the crucial role of iron uptake systems and QS regulators in *P. aeruginosa* pathogenicity, and support their suitability as potential drug targets. Moreover, further studies concerning the use of pyochelin as a potential Ga-delivery tool and the development of EPI, not only as antibiotic adjuvants, but also as anti-virulence drugs, are strongly encouraged.

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

**Ragioni dello studio** Le terapie antibiotiche tradizionali sono inefficaci nell'eradicare l'infezione cronica polmonare da *Pseudomonas aeruginosa*.

**Ipotesi e obiettivi** In *P. aeruginosa* i meccanismi che controllano il metabolismo del ferro ed il processo del quorum sensing (QS) sono necessari per l'instaurarsi dell'infezione e rappresentano dei promettenti bersagli per lo sviluppo di nuovi farmaci. Gli obiettivi di questo progetto sono stati: 1) determinare il ruolo svolto da processi coinvolti nel trasporto del ferro e nel quorum sensing *in vivo*; 2) verificare l'efficacia di composti a base di gallio e di composti adiuvanti agli antibiotici (gli inibitori delle pompe d'efflusso; EPI) contro l'infezione polmonare da *P. aeruginosa*.

**Metodi** 1) Sono stati originati dei ceppi di *P. aeruginosa* mutati in specifici geni. Tali mutanti sono stati confrontati con il ceppo parentale in un modello di infezione polmonare cronica nel topo. 2) L'effetto esercitato dal gallio, elemento analogo al ferro, e da un composto EPI su *P. aeruginosa* è stato valutato *in vitro*.

**Risultati preliminari.** I risultati ottenuti hanno dimostrato che tutti i sistemi di acquisizione del ferro e la proteina RsaL, che regola quorum sensing, giocano un ruolo cruciale nello stabilirsi dell'infezione polmonare cronica nel topo.

Gli studi svolti con il gallio hanno dimostrato che tale metallo è in grado di inibire la crescita di *P. aeruginosa* *in vitro*, a concentrazioni compatibili con l'uso clinico. È stato osservato che l'attività antibatterica del gallio è aumentata in seguito a complessazione con la piocelina, un sideroforo prodotto da *P. aeruginosa* che probabilmente facilita l'entrata del gallio nel batterio. Gli studi riguardanti gli EPI hanno evidenziato che tali composti, oltre ad aumentare l'efficacia degli antibiotici, possono inibire la virulenza.

**Possibili ricadute per ricerca e clinica** I nostri dati indicano che l'inibizione del metabolismo del ferro è un valido bersaglio per lo sviluppo di farmaci anti-*Pseudomonas* e incoraggiano ricerche future volte allo sviluppo di molecole capaci di veicolare in modo specifico i farmaci all'interno della cellula batterica. Inoltre, fattori che regolano il meccanismo del quorum sensing potrebbero costituire un bersaglio per farmaci in grado di sopprimere o ritardare l'instaurarsi dell'infezione cronica. Infine, i nostri risultati sugli EPI incoraggiano lo sviluppo di questa classe di farmaci.

## **3. Identification and characterization of novel drugs suppressing *Pseudomonas aeruginosa* virulence in chronic infection**

**Leoni L<sup>1</sup>, Imperi F<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Lab. Microbiologia molecolare e Biotecnologie dei microrganismi, Dip. Biologia, Università "Roma 3", <sup>2</sup>Dip. Biologia e Biotecnologie, Università "La Sapienza", Roma (FFC Project#13/2011)

**Background** Eradication of chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in cystic fibrosis through traditional antibiotics is currently impossible. An innovative approach is to use drugs able to specifically inhibit the pathogen capability to establish the infection rather than its growth (antivirulence drugs). Targeting the bacterial pathogenic potential has the advantage of reducing the severity of the infection without creating the selective pressure generally caused by conventional antibiotics, with no adverse effects on the host microbiota.



Livia Leoni, prima a destra, con il suo gruppo di ricerca

**Hypothesis and objectives** The aim of the present project has been to identify, in drugs already used in humans for different purposes, secondary activities against quorum sensing (QS) and pyoverdine signalling, two processes playing a key role in *P. aeruginosa* pathogenicity.

**Methods** A library of 1,120 compounds (approved by the US Food and Drug Administration) has been screened by using two screening systems specifically designed for identifying QS and pyoverdine inhibitors. The suitability of these drugs as antivirulence compounds against *P. aeruginosa* has been assessed using specific *in vitro* assays and different animal models of infection.

**Main results** We identified and characterized a potent anti-QS and anti-pyoverdine activity in an anthelmintic drug (niclosamide) and in an antimycotic drug (flucytosine), respectively. Both drugs proved to be effective in repressing the expression of major *P. aeruginosa* virulence factors *in vitro* and in preventing *P. aeruginosa* infection in simple animal models. The desirable pharmacological properties of flucytosine made it also possible to demonstrate the antivirulence efficacy of this drug in a mouse model of *P. aeruginosa* lung infection.

**Spin-off for research & clinical purposes** The above results, obtained in only one year, strongly support the efficacy of this research line, and demonstrate that a new antivirulence activity can be detected in "old" drugs, that could be hopefully delivered to patients in shorter times with respect to "brand new" active compounds. The results obtained with flucytosine are particularly relevant and encourage the testing of this drug in clinical trials.

## Identificazione e caratterizzazione di nuovi farmaci contro l'infezione cronica da *Pseudomonas aeruginosa*

**Ragioni dello studio** Le terapie antibiotiche tradizionali sono inefficaci contro l'infezione cronica polmonare da *Pseudomonas aeruginosa*, soprattutto a causa dell'insorgenza di resistenza agli antibiotici e della formazione di biofilm. Una possibile soluzione è lo sviluppo di farmaci "antivirulenza", in grado di inibire il processo infettivo piuttosto che la crescita batterica. L'uso di questi farmaci conferirebbe al sistema immunitario ottime possibilità di risolvere spontaneamente l'infezione senza causare effetti collaterali sulla normale flora batterica, rendendo inoltre meno probabile l'insorgenza di ceppi resistenti.

**Ipotesi e obiettivi** I farmaci in commercio, oltre alla loro attività principale, possono avere insospettabili attività secondarie. L'uso di tali farmaci consentirebbe un rapido passaggio alla verifica di efficacia clinica, riducendo il tempo e gli investimenti necessari allo sviluppo di un farmaco *ex novo*. L'obiettivo del presente progetto è stato dimostrare che un'attività secondaria anti-*P. aeruginosa* può essere identificata in un farmaco già approvato per l'uso nell'uomo per il trattamento di patologie diverse dall'infezione da *P. aeruginosa*.

**Metodi** Due diversi sistemi di screening sono stati utilizzati per la ricerca di attività antivirulenza in 1120 farmaci. Sono stati identificati due composti molto promettenti, la cui attività antivirulenza è stata caratterizzata *in vitro* e in modelli animali di infezione.

**Risultati** Abbiamo dimostrato che un farmaco anti-tenia (la niclosamide) e un farmaco antimicotico (la flucitosina) sono efficaci nel reprimere l'espressione della virulenza di *P. aeruginosa* *in vitro* e *in vivo*, in semplici modelli animali d'infezione. Inoltre, le ottimali proprietà farmacologiche della flucitosina hanno permesso di dimostrare l'efficacia di tale farmaco anche in un modello di infezione polmonare in topo.

**Possibili ricadute per ricerca e clinica** Questo studio dimostra per la prima volta che un'attività secondaria anti-*Pseudomonas* può essere identificata in farmaci già esistenti, con elevata probabilità di giungere alla pratica clinica in tempi più brevi rispetto a sostanze attive totalmente nuove, incoraggiando pertanto il proseguimento di questa linea di ricerca. I risultati ottenuti con la flucitosina sono particolarmente rilevanti in quanto questo farmaco potrebbe essere in breve tempo testato in studi clinici, in combinazione con le terapie già in uso.

## 4. Development, production and characterization of antibacterial peptides (CAMPs) active on the sessile form of the opportunistic human pathogens *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cenocepacia*

**Pizzo E<sup>1</sup>, Varcamonti M<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Dip. Biologia Strutturale e Funzionale, Università "Federico II", Napoli, <sup>2</sup>Dip. Biologia Strutturale e Funzionale, Università di Napoli "Federico" (FFC Project#15/2011)



Eliodoro Pizzo, primo da sinistra, e il suo gruppo di ricerca

**Background** Chronic infection of the lung in patients affected by Cystic Fibrosis is characterized by a progressive increase in the number of antibiotic resistant opportunistic pathogens. For this reason there is a pressing need to find new alternative agents to fight specifically these multi drug resistance (MDR) pathogens. At this regard, an attractive area of research deals with Cationic Antimicrobial Peptides (CAMPs). CAMPs are an essential component of innate immunity of multicellular eukaryotes. They are small peptides (usually 10-30 residues) with broad spectrum of antimicrobial activity, secreted as mature peptides or as large proteins cleaved by host and/or microbial proteases. They share the ability to adopt an amphipathic conformation which allows their insertion into the cell membrane. CAMPs alter the fluidity, the thickness and even the curvature of the membrane opening pores and caus-

ing the leakage of both actively dividing and resting cells.

**Objectives** The primary aim of our study was to identify, select and optimize the production of recombinant human CAMPs and human CAMP-releasing proteins active on microbial pathogens isolated from Cystic Fibrosis patients.

**Methods.** Human CAMPs and human CAMPs releasing protein have been produced through recombinant DNA technology. Corresponding heterologous molecules, isolated from inclusion bodies of *E.coli* strain-BL21DE3 have been chemically modified on key residues and tested on CF *P. aeruginosa* strains. These agents have been also tested, to evaluate toxic effects, on murine cells and on two different types of human cells: umbilical endothelial cells and bronchial epithelial cells from FC patients.

**Main results** During the course of this project our group has developed a panel of chemically modified human CAMPs active on several CF hypermutable and mucoid *P. aeruginosa* strains and not toxic on murine and human cell cultures. Moreover we have developed strain-dependent scoring functions which identify cryptic CAMP-like sequences contained inside large proteins. The scores are roughly proportional to the MIC values, thus our strategy allows to establish a ranking of the most promising sequences for the treatment of the desired bacterial strains. The method can be automated to screen human proteome as well as any other eukaryotic proteome.

**Comments & Conclusions** Our studies are still ongoing (FFC#9/2012) nevertheless our first results indicate that several *P. aeruginosa* strains show great susceptibility to recombinant chemically modified human CAMPs. These CAMPs have not shown toxic effects on three different types of eukaryotic cell lines. Next step will be to assay biochemical and functional properties of these effectors *in vitro* on human bronchial epithelium from CF patients and *in vivo* on different CF mouse models.

**Spin-off for research & clinical purposes** The present project is part of a larger program whose final aim is to produce "bactericidal drugs" for the treatment of pathogenic multi-drug resistant biofilm forming bacteria, active alone or in combination with traditional antibiotics.

## Sviluppo, produzione e caratterizzazione di peptidi antimicrobici (CAMPs) attivi sulla forma sessile dei patogeni opportunisti *Pseudomonas aeruginosae* *Burkholderia cenocepaciae*.

**Ragioni dello studio** Le infezioni croniche nei polmoni dei pazienti affetti da Fibrosi Cistica (FC) è caratterizzata da un progressivo aumento del numero di patogeni opportunisti resistenti agli antibiotici. Per tale motivo è pressante la necessità di trovare nuovi agenti alternativi per combattere in maniera specifica questi patogeni multi resistenti (MDR). A tal proposito, un'area di ricerca estremamente promettente riguarda i peptidi cationici antimicrobici (CAMP). I CAMP sono componenti essenziali dell'immunità innata degli organismi eucarioti multicellulari. Essi sono piccoli peptidi (di solito 10-30 residui) con un ampio spettro di attività antimicrobica, secreti come peptidi maturi o come il risultato di proteolisi indotta da proteasi dell'ospite e/o dei batteri. Essi presentano l'abilità di adottare una conformazione anfipatica che permette il loro inserimento nella membrana cellulare. I CAMP alterano la fluidità, lo spessore e infine l'incurvamento della membrana, apendo pori sia in cellule in attiva divisione che a riposo.

**Obiettivi** Lo scopo principale del nostro studio era identificare, selezionare e ottimizzare la produzione di CAMP umani recombinanti e proteine contenenti CAMP attive sui batteri patogeni isolati da pazienti FC.

**Metodi** I CAMP umani e le proteine contenenti CAMP sono stati prodotti attraverso la tecnologia del DNA ricom-

binante. Le corrispondenti molecole eterologhe, isolate dai corpi inclusi di cellule di *E.coli* ceppo BL21DE3 sono state chimicamente modificate su residui chiave e testate su ceppi di *P. aeruginosa* FC. Questi agenti sono stati anche testati, per valutarne effetti tossici, su cellule murine e su due differenti tipi di cellule umane: cellule endoteliali ombelicali e cellule epiteliali bronchiali, queste ultime da pazienti FC.

**Principali risultati** Durante questo progetto il nostro gruppo ha sviluppato CAMP umani chimicamente modificati attivi su numerosi ceppi di *P. aeruginosa* FC mucoidi e ipermutanti e non tossici su colture cellulari umane e murine. Inoltre abbiamo sviluppato funzioni che permettono l'identificazione di sequenze CAMP-like criptiche contenute all'interno di proteine. I punteggi sono molto proporzionali ai valori di MIC rilevati sperimentalmente, cosicché la nostra strategia permette di stabilire un ranking delle sequenze più promettenti per il trattamento dei ceppi batterici desiderati. Il metodo può essere automatizzato per lo screening di qualsiasi proteoma.

**Commenti e Conclusioni** I nostri studi sono tuttora in corso (FFC#9/2012) tuttavia i nostri primi risultato indicano che numerosi ceppi di *P. aeruginosa* mostrano una grande suscettibilità a CAMP umani ricombinanti chimicamente modificati. Questi CAMP non hanno effetti tossici su tre differenti tipi di cellule eucariotiche. Il prossimo obiettivo sarà saggiare le proprietà biochimiche e funzionali di questi effettori *in vitro* su epitelii bronchiali da pazienti FC e *in vivo* su differenti modelli murini FC.

**Possibili ricadute per ricerca e clinica** Il presente progetto è parte di un programma il cui scopo finale è la produzione di farmaci battericidi per il trattamento di batteri multi resistenti, attivi da soli o in combinazione con gli antibiotici tradizionali.

## 5. *Achromobacter xylosoxidans* an emerging pathogen in Cystic Fibrosis patients: from molecular characterization to development of innovative therapeutic strategies based on the antibacterial activities of *Bdellovibrio* predator bacteria

Quattrucci S<sup>1</sup>, Trancassini M<sup>2</sup>, Schippa S<sup>3</sup>, Nicoletti M<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Dip. Pediatria e Neuropsichiatria Inf., Univ. "La Sapienza", Polycl. Umberto I, Centro fibrosi cistica, Roma, <sup>2</sup>Dip. Salute Pubblica e Malattie Infettive, Università "La Sapienza" Roma,

<sup>3</sup>Dip. Salute pubblica e Malattie Infettive, Univ. La Sapienza, Roma, <sup>4</sup>Dip. Scienze Biomediche, Università "G. D'Annunzio", Chieti (FFC Project#16/2011)



Serena Quattrucci, prima a sinistra, con il gruppo di ricerca

**Background.** Chronic microbial colonization that progressively extends to the lower airways is a common feature in

cystic fibrosis (CF) patients, and the incidence of recurrent infections is frequent in these cases. Infections at these sites are known to be caused by mixed biofilms. The antibiotics resistance phenomena makes the availability of innovative therapies highly attractive. *Bdellovibrio bacteriovorus* is a bacterial species known to predate and kill a number of other bacteria, mostly Gram-negative. These predators are ubiquitous in terrestrial and aquatic environments, and can be commonly detected from feces of mammals.

**Hypothesis and objectives.** The objective of this project was that *B. bacteriovorus*, or its purified bacteriolytic enzymes, could prove to be useful as innovative therapeutic agents to control the development of bacterial biofilms formed at the surface of airway mucosae in CF patients.

**Methods.** We assessed the activity of *Bdellovibrio* and its enzymes on diverse bacterial strains (*Pseudomonas aeruginosa*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Staphylococcus aureus*) isolated from sputum samples of intermittent or chronic CF patients.

**Results.** We showed: i) the *Bdellovibrio* ability in stabilizing bacterial growth; ii) its predatory ability versus the Gram-positive *Staphylococcus aureus*; iii) its strong anti-biofilm activity, independently from the bacterial species tested; iv) its non-toxicity on the A549 pulmonary cell line, consequently proving to be safe also in the in vivo use.

**Spin-off for research & clinical purposes.** In conclusion, the results of the study are indicative of the possibility to use *B. bacteriovorus* as a biological equilibrator, able to significantly reduce bacterial loads in vivo, even in the presence of infections sustained by bacterial biofilms. Further studies on a synergistic action among *B. bacteriovorus* (or its enzymes) and drugs already in use, would be necessary prior to plan any technology transfer and clinical application. It will be also useful to plan studies in animal models, using *Bdellovibrio* alone and in combination with other antibacterial compounds.

### ***Achromobacter xylosoxidans*, patogeno emergente in pazienti affetti da fibrosi cistica: dalla caratterizzazione molecolare allo sviluppo di strategie terapeutiche basate sull'attività del batterio predatore *Bdellovibrio***

**Ragioni dello studio.** Una comune caratteristica in fibrosi cistica (FC) è la colonizzazione microbica cronica, la frequente incidenza di infezioni ricorrenti e la formazione di biofilm microbici misti. I ceppi associati a queste infezioni sono comunemente resistenti a diversi farmaci, anche a causa della formazione dei biofilm. I fenomeni di resistenza antibiotica, che portano inevitabilmente al fallimento delle terapie farmacologiche, rende necessaria la ricerca di nuovi schemi terapeutici. *Bdellovibrio bacteriovorus* è una specie batterica che ha la capacità di predare altre specie batteriche Gram-negative.

**Ipotesi e obiettivi.** L'obiettivo dello studio è stato quello di valutare se *B. bacteriovorus*, o i suoi enzimi batteriolitici purificati, possano rivelarsi utili come agenti terapeutici innovativi per controllare la crescita batterica e lo sviluppo di biofilm batterici.

**Metodi.** Abbiamo testato l'attività predatoria di *B. bacteriovorus* e dei suoi enzimi su diversi ceppi batterici (*Pseudomonas aeruginosa*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Staphylococcus aureus*) isolati da pazienti FC con malattia cronica e intermittente.

**Risultati.** Abbiamo evidenziato: i) il potenziale ruolo biologico di *B. bacteriovorus* come equilibratore ecologico, in grado di stabilizzare la crescita batterica; ii) l'attività predatoria del *B. bacteriovorus* rispetto al Gram-positivo *Staphylococcus aureus*; iii) una forte attività anti-biofilm, indipendentemente dalla specie batteriche testate; iv) la non tossicità sulla linea cellulare polmonare A549.

**Possibili ricadute per ricerca e clinica.** In conclusione i risultati dello studio suggeriscono la possibilità di utilizzare *B. bacteriovorus* come equilibratore biologico in grado di ridurre significativamente la carica batterica in vivo, anche in presenza di infezioni sostenute da biofilm batterici. Inoltre, combinando l'uso di *B. bacteriovorus* con farmaci già in uso (ma limitatamente efficaci per i fenomeni di resistenza), potrebbe avere attività sinergiche e migliorare i risultati terapeutici. Prima di pianificare qualsiasi trasferimento di tecnologie e applicazioni cliniche, sono chiaramente necessari ulteriori studi per confermare i risultati ottenuti, e raccogliere le informazioni essenziali sulle attività *B. bacteriovorus*, anche rispetto alle possibili associazioni sinergiche con altri farmaci. Inoltre, sarà utile pianificare studi in modelli animali, utilizzando *B. bacteriovorus* come farmaco biologico alternativo.

## **6. Preclinical development of the antimicrobial peptide M33. Efficacy against *P. aeruginosa* lung infections and pharmacokinetic studies in animals**

**Pini A<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Dipartimento di Biotecnologie, Università di Siena (FFC Project#24/2011)



Alessandro Pini, secondo da sinistra, e il gruppo di ricerca

**Background** The project FFC#24/2011 is the extension of a project previously financed by Italian Foundation for Cystic Fibrosis in 2009. The present project is aimed to the animal experimentation of a novel antimicrobial peptide, termed M33, which was discovered by proposers some years ago and then optimized for antimicrobial activity, toxicity and production processes with the aim to develop a new drug for lung infections.

**Hypothesis and objectives** M33 peptide is active against many Gram-negative bacteria including *Pseudomonas aeruginosa*, a microbe importantly involved in Cystic Fibrosis. The present project was aimed to test in animals M33 for lung infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*.

**Methods** Animal models of lung infections were set up using animals with defective immune system infected with lethal amount of *P. aeruginosa* bacteria. Treatment was provided by intravenous administration of M33 in clinically compatible doses.

**Results** This was a single year project. We obtained a strong efficacy in reducing signs of infection, with a 66% survival in animal treated with M33. A second and important achievement regarded the toxicity of M33 which resulted 4 fold lower than that showed by colistin a drug already used in patients with Cystic Fibrosis.

**Spin-off for research & clinical purposes** Peptide M33 is a new antibacterial agent protected by three international patents filed by the proposers in the last years. Project FFC#24/2011 was part of a larger program where peptide M33 is under evaluation for pharmacodynamic, pharmacokinetic, bio-distribution and toxicity studies. Results obtained up to now, along with a desirable new financing useful to conclude the preclinical program, will bring M33 to clinical phases in short-medium time.

### Sviluppo preclinico del peptide antimicrobico M33. Efficacia contro le infezioni polmonari da *Pseudomonas aeruginosa*

**Ragioni dello studio** Il progetto FFC#24/2011 è la continuazione di un progetto finanziato dalla Fondazione Fibrosi Cistica nel 2009. Questo progetto ha riguardato una parte di sperimentazione preclinica di una nuova molecola antimicrobica (peptide M33). Questa molecola è stata isolata nel laboratorio proponente alcuni anni fa, ed è stata ottimizzata in termini di attività antimicrobica, tossicità e sistemi di produzione, con l'obbiettivo di sviluppare un nuovo farmaco da usare nelle infezioni sistemiche e polmonari.

**Ipotesi e obiettivi** Il peptide M33 è efficace contro molte specie batteriche Gram-negative con una elevata attività nei confronti di *Pseudomonas aeruginosa*, uno degli agenti batterici maggiormente coinvolti nelle infezioni polmonari di pazienti di Fibrosi Cistica. Il peptide M33 è stato sperimentato

in modelli animali di infezione polmonare da *Pseudomonas* attraverso somministrazioni intravenose e/o aerosoliche.

**Metodi** Per la sperimentazione dell'efficacia del peptide M33 sono stati messi a punto dei modelli animali di infezione polmonare ottenute mediante animali infettati con dosi letali di *P. aeruginosa*. Il trattamento è stato effettuato mediante somministrazioni intravenose di peptide a dosaggi compatibili con l'uso clinico.

**Risultati** Il progetto FFC#24/2011 è stato finanziato per un singolo anno. La messa a punto dell'appropriato modello animale e il trattamento degli animali infettati con il peptide M33 sono stati i principali obbiettivi raggiunti. La molecola somministrata per via endovenosa ha consentito la sopravvivenza del 66% degli animali infettati per via polmonare. Un secondo e importantissimo risultato ha riguardato la tossicità del peptide M33 che è risultata assolutamente compatibile con l'uso clinico, addirittura inferiore di circa 4 volte a molecole, come la colistina, già utilizzate in clinica.

**Possibili ricadute per ricerca clinica** Il peptide M33 è protetto da 3 brevetti internazionali depositati dai ricercatori coinvolti in questo progetto. Il progetto FFC#24/2011 è parte di un programma di sperimentazione più ampio, quasi interamente al di fuori del finanziamento della Fondazione Fibrosi Cistica, che comprende la completa caratterizzazione farmacocinetica e tossicologica negli animali. I risultati ottenuti fino ad ora, ed un auspicabile ulteriore finanziamento per concludere la fase preclinica, potrebbero portare il peptide M33 alla sperimentazione clinica in un tempo ragionevolmente breve.

## PLENARY SESSION 2

### Monitoring pharmacological treatments: novel criteria

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

Melotti P<sup>1</sup>, Sorio C<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro Reg. FC - AOU Integrata Verona, <sup>2</sup>Dip. Patologia - Sez. Patologia generale - Università di Verona (FFC Project#6/2010)



Paola Melotti, prima a destra, con le colleghi del laboratorio

**Background:** Several molecules are proposed for correction of the CF basic defect. A common critical problem is the assessment of their efficacy in CF patients. Invasive and very sophisticated tests are available for this aim in a very limited number of centres worldwide. At the Cystic Fibrosis Center

of Verona is running a clinical trial for a new drug (PTC124 or Ataluren) capable of correcting the "nonsense" mutations; they are present in about 10% of CF patients in Italy.

**Hypothesis and objectives:** We achieved our goal of detecting the CF basic defect correction following treatment in the laboratory of fresh cells purified from patient's blood samples called monocytes with new drugs, including PTC124. The results are surely encouraging. Using our specifically set-up method we identified the correction of the CF basic defect in about 65% of samples treated in the laboratory. It means that not all patients had cells sensitive to correction by the new drug following treatment on the bench. About this issue we have a hypothesis which is shared by other researchers on this field.

**Methods:** We also utilized small amount of blood acquired when drawing was already scheduled for routine clinical follow-up for investigating the effects of conventional treatments as iv antibiotic therapy during hospitalization. Our approach was consistent with the aim to achieve relevant information with minimal discomfort for the patients.

**Preliminary results:** Following treatment we found increased amounts of HIA-G molecule which has never been previously described to play a role in CF while it is well known as strong anti-inflammatory agent. It has been described to be lacking in particular in several chronic inflammatory diseases. In our study its trend is consistent with the improvement of lung function detectable by spirometry in single patients. Other 27 molecules involved in inflammation were analyzed using very sophisticated technologies. We found changes of some of them following iv antibiotic treatment.

**Spin-off for research & clinical purposes:** Beyond providing a better timing and more precise monitoring of the effects of treatments, our findings allow to discover the actors playing in the inflammatory process taking place in CF. This is the rational premise for affecting them more successfully. For the clinical study PTC124 our method is surely innovative with advantages for both patients and researchers in comparison with procedures actually available.

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

**Ragioni dello studio** Numerose molecole vengono proposte per la correzione del difetto di base della malattia. Un problema critico comune è la valutazione della loro efficacia in pazienti FC. A tale scopo tests molto sofisticati ed invasivi sono disponibili in pochi centri.

Presso il nostro Centro è in corso lo studio clinico internazionale del possibile nuovo farmaco PTC124 (Ataluren) attivo su mutazioni "nonsense", presenti nel 10% circa dei pazienti FC italiani.

**Ipotesi e obiettivi** Il nostro obiettivo di individuare la correzione del difetto di base FC di nuovi farmaci utilizzati in laboratorio in cellule purificate dal sangue dei pazienti è stato raggiunto, incluso per il farmaco della sperimentazione clinica PTC124 ed i risultati ottenuti sono stati sicuramente incoraggianti.

**Metodi** Il metodo appositamente messo a punto è stato in grado di cogliere in cellule del sangue (monociti) la correzione del trasporto di cloro, difettoso in FC, in circa il 65% dei campioni trattati in laboratorio con PTC124. Non tutti i campioni hanno beneficiato del trattamento. Un'ipotesi, condivisa da altri gruppi di ricerca, per spiegare tale fenomeno viene prospettata.

Anche per verificare gli effetti di terapie convenzionali, quali il trattamento antibiotico ev durante il ricovero, abbiamo utilizzato campioni di sangue di piccole dimensioni ottenuti in occasione di prelievi già programmati per routine clinica, coerenti con l'obiettivo di questo studio di mettere a punto analisi minimamente invasive per il paziente.

**Risultati preliminari** In seguito alla terapia abbiamo identificato un aumento della molecola HLA-G di cui non risultano disponibili riscontri in merito a FC; essa contrasta l'infiammazione e si assenta in varie malattie infiammatorie croniche. Nei singoli pazienti il suo aumento corrisponde al miglioramento della funzione polmonare riscontrato con spirometria. Altre 27 molecole coinvolte nell'infiammazione sono state analizzate con tecniche molto sofisticate e costose: alcune di esse risultano sensibili al trattamento.

**Possibili ricadute per ricerca e clinica** Oltre a migliorare il monitoraggio dell'effetto della terapia antibiotica ev, tali riscontri permettono di "smascherare i colpevoli" dell'infiammazione in FC, razionale premessa per poterli aggredire con maggior successo. Per il nuovo potenziale farmaco PTC124 il nostro metodo risulta sicuramente innovativo con vantaggi per pazienti e ricercatori rispetto a quanto attualmente disponibile.

## 8. 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 P<sup>1</sup>, Lucidi V<sup>2</sup>, Motta A<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Ist. di Farmacologia, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università Cattolica del Sacro Cuore e Unità Operativa di Farmaco-

logia, Policlinico Universitario Agostino Gemelli, Roma; <sup>2</sup>Dip. Pediatria, Unità Operativa Fibrosi Cistica, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma; <sup>3</sup>Ist. di Chimica Biomolecolare, CNR, Pozzuoli (Napoli) (FFC Project#19/2010)



Paolo Montuschi, responsabile del progetto

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

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

**Methods** A parallel group interventional study azithromycin (250 mg (weight  $\leq$  40 kg) or 500 mg (weight  $\geq$  40 kg) once daily plus vitamin E (400 UI/day) (group A) or vitamin E alone (group B) was undertaken in stable cystic fibrosis patients who were on a constant dose of vitamin E (200 UI/day). The study included 4 visits: screening, baseline, after 8 week treatment, and 2 weeks after treatment withdrawal. EBC sampling for metabolomics and 8-isoprostane measurement, blood sampling for 8-isoprostane and C reactive protein (CRP) measurement, and spirometry were performed.

**Main results** Forty-five patients (24 in group A and 21 in group B) completed the study. Compared with vitamin E alone, azithromycin plus vitamin E did not reduce EBC 8-isoprostane, the primary outcome measure. In both groups, there was no effect of treatment or treatment withdrawal on EBC or serum 8-isoprostane, serum CRP, and spirometry. Suspension of both treatments had a striking effect on EBC metabolite profiles, being ethanol and acetoin/acetone mostly discriminating. Add-on therapy with azithromycin was not associated with EBC metabolite changes, but metabolite distribution after treatment and two weeks after treatment suspension in the two treatment groups was different, suggesting a possible effect of azithromycin.

**Comments & Conclusions** In cystic fibrosis patients on a constant dose of vitamin E, doubling the dose of vitamin E with or without azithromycin for 8 weeks has no effect on oxidative stress as reflected by EBC and serum 8-isoprostane, but azithromycin suspension is associated with EBC metabolite changes which deserve further research.

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

**Analisi metabolomica mediante spettrometria in risonanza magnetica nucleare: un nuovo ap-**

## Approccio alla comprensione dell'infiammazione ed al monitoraggio della terapia farmacologica in bambini e giovani adulti con fibrosi cistica

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

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

**Metodi** Due gruppi di pazienti, in terapia con 200 UI al giorno di vitamina E, sono stati trattati con una dose doppia di vitamina E ed azitromicina (gruppo A) o con sola vitamina E (gruppo B). Lo studio comprendeva 4 visite: screening, preterapia, dopo 8 settimane di terapia dopo 2 settimane dalla sospensione della terapia. Sono stati raccolti campioni di EBC e siero ed eseguite spirometrie.

**Principali risultati** Quarantacinque pazienti (24 nel gruppo A, 21 nel gruppo B) hanno completato lo studio. In confronto alla sola vitamina E, la terapia con azitromicina e vitamina E non ha ridotto 8-isoprostano nell'EBC che era la misura principale dello studio. In entrambi i gruppi, non è stato osservato effetto del trattamento o della sospensione su 8-isoprostano nel siero o EBC, proteina C reattiva nel siero e spirometria. La sospensione di entrambi i trattamenti era associata con evidenti alterazioni nel profilo di metaboliti nell'EBC. Etanolo ed acetone/acetoina erano maggiormente responsabili delle differenze osservate. L'aggiunta di azitromicina non era associata ad alterazioni metaboliche nell'EBC, ma la distribuzione dei metaboliti dopo trattamento e a 2 settimane dalla sospensione nei due gruppi era diversa, indicando un possibile effetto dell'azitromicina.

**Commenti e conclusioni** In pazienti con fibrosi cistica, il raddoppio della dose di vitamina E con o senza azitromicina per 8 settimane non ha effetto sullo stress ossidativo valutato mediante 8-isoprostano nell'EBC, ma la sospensione dell'azitromicina è associata ad alterazioni metaboliche che richiedono ulteriori studi.

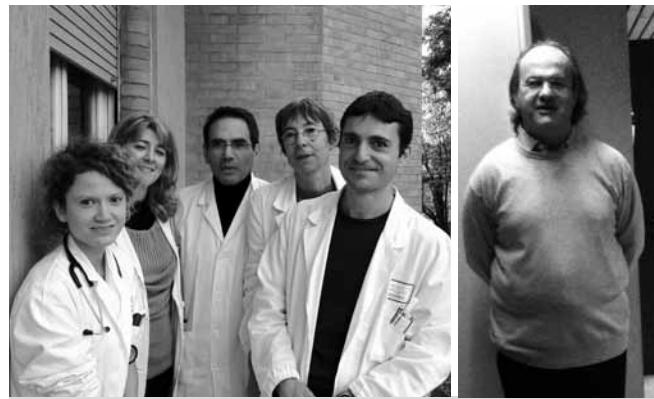
**Possibili ricadute per ricerca e clinica** Un nuovo approccio alla comprensione e monitoraggio dell'infiammazione e nuove conoscenze su possibili terapie antiossidanti.

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

Aiello M<sup>1</sup>, Sala A<sup>2</sup>, Clini E<sup>3</sup>, Pisi G<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Dip. Scienze cliniche, Università di Parma, <sup>2</sup>Dip. Scienze Farmacologiche, Università di Milano, <sup>3</sup>Dip. Oncologia, Ematologia e Malattie respiratorie, Università di Modena, <sup>4</sup>Dip. Pediatria, Università di Parma (FFC Project#17/2011)

**Background** Several reports have shown in CF patients a significantly reduction of the levels of docosahexaenoic acid (DHA), involved in the antioxydans response and in the production of mediators, such as resolvins and protectins, identified as important factors during the resolution phase of inflammatory reaction. The deficit of DHA may play a role in the inflammatory cascade of the pulmonary disease in CF patients.



Marina Aiello, seconda da sinistra, con il gruppo di ricerca parmense. Nella foto a destra, il partner di progetto Angelo Sala

**Aim** The aim of the study was:

- to determine the levels of the arachidonic acid (AA) metabolites and DHA in the sputum of adults with CF subjects, as compared to patients with COPD;
- to ascertain whether or not DHA supplementation may affect the fatty acid pattern in CF subjects.

**Subjects & Methods** We studied 15 CF subjects and 10 COPD patients. CF patients (age range 20 to 40) were recruited at the Cystic Fibrosis Unit of Parma Hospital and the control group of COPD patients were recruited at the University Hospitals of Modena-Reggio Emilia and Parma. At baseline all subjects performed: nutritional status evaluation, spirometry, exhaled NO measurement, exhaled breath condensate (EBC), sputum induction (SI) to evaluate leukotriene B4 (LTB4), prostaglandin E2 (PGE2), 15-hydroxyeicosatetraenoic acid (15-HETE), 17-hydroxydocosahexaenoic acid (17OH-DHA), 15-HETE/17OH-DHA ratio, and blood sample to evaluate DHA/AA ratio and HUFA index in the red cells (first phase). In second phase, CF patients performed all evaluations after two weeks of systemic antibiotic therapy or/and after ten weeks with DHA-supplementation and after ten weeks without DHA-supplementation.

**Results** The clinical and functional characteristics of the 15 CF patients are listed in table 1. All CF patients showed a neutrophilic inflammation in the sputum, as reported in table 2. The baseline values (mean  $\pm$  SD) of LTB4, PGE2, 15-HETE, and 17OH-DHA in the sputum of CF subjects and in subjects with COPD are reported in figure 1. As compared to COPD patients, CF subjects showed increased concentrations of LTB4, PGE2, 15-HETE. The concentrations of the DHA derived were not different in the two groups. 9 out of 15 CF patients (5 female) were clinically stable and completed second phase of the study. After ten weeks of DHA supplementation, CF subjects showed a tendency to decrease in LTB4 and PGE2 and to increase in 17OH-DHA, and a significantly reduction in levels. At the end of the washout period, LTB4, PGE2, 15-HETE, and 17OH-DHA tended to recover baseline values (figure 2). After supplementation DHA/AA ratio and HUFA index were significantly increased (figure 3). As compared to baseline, 15-HETE/17OH-DHA ratio significantly changed after supplementation (figure 4).

**Spin-off for research and clinical purposes** Our preliminary results showed that in CF patients an impairment in fatty acid metabolism, characterized by increase in AA metabolites and decrease in DHA, partially corrected by DHA supplementation. A better understanding of these metabolic changes could provide new insights into disease pathophysiology and potentially could identify new biomarkers of disease severity.

**Table 1. Demographic, anthropometric and functional characteristics of CF patients at baseline**  
Caratteristiche demografiche, antropometriche e funzionali dei pazienti all'inizio dello studio

No	Patients	BMI (kg/m <sup>2</sup> )	Age (years)	Gender (F/M)	FEV <sub>1</sub> (%)	FEV <sub>1</sub> /FVC (%)
1	B.A.	20	32	F	46	62
2	C.D.	22.3	36	F	46	67
3	C.E.	20.4	27	F	81	87
4	F.G.	21.7	37	M	85	73
5	I.M.	24	40	M	71	78
6	L.L.	20	26	M	65	87
7	M.L.	20.4	23	F	53	58
8	M.E.	22.2	31	M	99	93
9	P.S.	19.2	29	F	28	52
10	P.A.	19	30	F	68	83
11	R.S.	19.9	32	F	74	67
12	R.A.	22.5	23	M	72	89
13	V.M.	19.8	15	F	93	86
14	V.L.	20	29	F	72	80
15	Z.C.	21.4	29	M	94	98
	<b>Mean</b>	20.9	29.3		69.8	77.3
	<b>SD</b>	± 1.4	± 6.2		± 19.9	± 13.6
	<b>Ratio (F/M)</b>			9/6		

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

**Ragioni dello studio** Numerosi studi hanno documentato nella Fibrosi Cistica (FC) una significativa riduzione dei livelli di *Acido Docosaeanoico* (DHA), coinvolto nella risposta antiossidante e nella generazione di metaboliti, quali le resolvine e le protectine, identificati come importanti fattori nella fase di risoluzione del processo infiammatorio. Tale deficit potrebbe pertanto svolgere un ruolo fondamentale nella progressione della cascata infiammatoria e della malattia polmonare.

**Ipotesi e obiettivi dello studio** In questa fase preliminare ci siamo proposti di:

- determinare il contenuto dei derivati dell'acido arachidonico (AA) e del DHA nello sputo di soggetti adulti affetti da FC;
- verificare se la supplementazione con DHA sia in grado di migliorare il profilo degli acidi grassi.

I risultati nei pazienti FC sono stati confrontati con quelli ottenuti in pazienti con bronco-pneumopatia cronica ostruttiva (BPCO).

**Metodi** Lo studio ha coinvolto 15 soggetti affetti da FC reclutati presso la Struttura Semplice di FC dell'azienda

Ospedaliera Universitaria di Parma e 10 soggetti affetti da BPCO reclutati presso la Clinica Pneumologica dell'Università di Parma e di Modena-Reggio. Il protocollo dello studio è articolato in due fasi. Nella *prima fase* sono stati valutati nello sputo i mediatori leucotriene B4 (LTB4), prostaglandina E2 (PGE2), acido 15-idrossieicosatetraenoico (15-HETE), acido 17-idrossidocoexainoico (17OH-DHA), il rapporto 15-HETE/17OH-DHA e negli eritrociti il rapporto DHA/AA e l'indice degli acidi grassi polinsaturi n-3 (HUFA index). Nella *seconda fase* sono state valutate le variazioni dei medesimi mediatori dopo due settimane di trattamento con antibiotico-terapia ev e/o dopo dieci settimane di supplementazione di DHA nella dieta alla dose di 3 g/die e dopo dieci settimane senza supplementazione.

**Risultati** Le caratteristiche cliniche e funzionali dei pazienti affetti da FC sono riassunte nella tabella 1. L'esame citologico dello sputo in condizioni basali ha dimostrato la presenza di una infiammazione di tipo neutrofilico in tutti i pazienti FC (tabella 2). Nella figura 1 sono riportati i valori basali ( $X \pm DS$ ) di LTB4, PGE2, 15-HETE e 17OH-DHA nello sputo dei pazienti affetti da FC e dei pazienti con BPCO. Rispetto ai soggetti BPCO, i pazienti affetti da FC presentano una aumentata concentrazione di LTB4, PGE2 e 15-HETE. Non sono emerse differenze tra i due gruppi per la concentrazione del 17OH-DHA. 9/15 pazienti FC (5 donne) erano in fase di stabilità clinica e hanno ripetuto la valutazione nutrizionale e funzionale e dei mediatori lipidici dopo dieci settimane di supplementazione di DHA nella dieta e dopo dieci settimane senza supplementazione. Dopo dieci settimane di supplementazione con DHA nei soggetti FC abbiamo osservato nello sputo una riduzione ( $X \pm DS$ ) di LTB4, PGE2 e 15-HETE, che per quest'ultimo raggiunge la significatività statistica. Al contrario, il 17OH-DHA aumenta alla fine della supplementazione. Al termine del periodo di wash-out, LTB4, PGE2 e 15-HETE aumentano senza raggiungere i valori basali; il 17OH-DHA è sostanzialmente invariato (figura 2). Inoltre dopo supplementazione l'analisi di composizione degli acidi grassi negli eritrociti ha evidenziato un aumento statisticamente significativo del rapporto DHA/AA e dell'HUFA index (figura 3). Nella figura 4 sono riportate le variazioni del rapporto 15-HETE/17OH-DHA: dopo supplementazione con DHA tale rapporto si riduce in modo statisticamente significativo rispetto al basale.

**Possibili ricadute per ricerca e clinica** Questi risultati preliminari dimostrano che nei soggetti FC esiste uno squilibrio del metabolismo degli acidi grassi con aumento dei mediatori derivati dall'AA e riduzione del DHA, parzialmente corretto dalla supplementazione con DHA. La conoscenza dettagliata di queste alterazioni metaboliche potrebbe contribuire a sviluppare specifiche terapie personalizzate sul profilo infiammatorio di ogni paziente.

## CFTR-DF508 correction

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

**Mazzei M<sup>1</sup>, Fossa P<sup>1</sup>, Turco MC<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Dip. Scienze Farmaceutiche, Università di Genova, <sup>2</sup>Dip. Scienze Farmaceutiche, Univ. Salerno (FFC Project#5/2010)

**Background** Cystic Fibrosis (CF) is a genetic disease caused by mutations in CFTR, a membrane protein allowing the transit of anions. Among the numerous mutations found in CFTR, the DF508 is responsible for the more extensive and dangerous form of the pathology. Patients carrying such mutation do not have the CFTR into their plasma membrane since

the quality control system (QCS) of the cell recognizes, at the level of endoplasmic reticulum, the DF508-CFTR as defective and conveys this mutant protein to a degradation pathway.

**Hypothesis and objectives** The major players acting in the QCS are the chaperones. Although such system is essential for the cell, it was speculated that a modulation in the concentration of some chaperones may be useful in rescuing the DF508-CFTR from the degradation, without a significant cellular damage. Since many chaperones are working in the QCS, it is not easy to evaluate what chaperones must be modulated for the DF508-CFTR rescue.

**Methods** A chaperone system hierarchically important is the HSP70/HSC70 complex. In particular, the downregulation of HSC70 favours the rescue of the DF508-CFTR, whereas



Mauro Mazzei, primo da destra, assieme alle sue collaboratrici

*an overexpression of HSP70 helps the proper folding of the DF508-CFTR. So, HSC70 was selected as target.*

*To fulfil our aim, we directed our interest to the natural compound Matrine (MTR), an alkaloid solely present in plants of the Sophora genus (e. g. S. japonica). MTR lowers the mRNA levels of HSC70.*

**Preliminary results** When MTR was given to A549 cells transfected with DF508-CFTR, the minor concentration of HSC70 resulted in the appearance of the mutant protein into the plasma membrane. Concerning a possible quick use of MTR as a CF drug, it is interesting to note that the MTR is present in Chinese traditional medicine, especially for its antiviral/anti-inflammatory activity. In this connection, a preliminary assay has been done using IB3-1 cells infected with *P. aeruginosa*. The results matched those obtained by the more established anti-inflammatory drugs employed in the treatment of CF. Moreover, some chemical derivatives of the MTR scaffold were produced, but regarding these new compounds we do not possess the biological results.

With regard to the more traditional correctors (indeed, MTR may be defined a pre-corrector), many derivatives of the corrector RDR1 were synthesized: some of them (e. g. SM5) revealed an activity greater than the parent compound. We are now verifying whether the combined *in vitro* administration of MTR and SM5 could show a synergistic effect in rescuing the DF508-CFTR.

### Ricerca di inibitori dei chaperoni (complesso HSP70/HSC7) utili per correggere la DF508-CFTR

**Ragioni dello studio** La Fibrosi Cistica (FC) è causata da mutazioni della CFTR, proteina di membrana che favorisce il passaggio di cloruro e bicarbonato. Tra le numerose mutazioni della CFTR, è noto che la DF508 porta alla più diffusa e dannosa forma della patologia. Gli omozigoti per tale mutazione non possiedono la proteina CFTR in quanto il sistema di controllo di qualità cellulare riconosce la proteina mutata come imperfetta e la avvia alla degradazione.

**Ipotesi e obiettivi** Il sistema di proteine che attua questo controllo è quello dei chaperoni. Sebbene tale sistema sia essenziale per un buon funzionamento della cellula, è stato ipotizzato che una modulazione di taluni chaperoni possa aiutare a salvare la DF508-CFTR dalla degradazione senza peraltro determinare una marcata tossicità cellulare. I chaperoni che operano il controllo di qualità sono numerosi e quindi non è semplice sapere a priori quale o quali chaperoni modulare.

**Metodi** Un chaperone gerarchicamente importante è il complesso HSP70/HSC70. In particolare una minore conc. di HSC70 favorisce il salvataggio della DF508-CFTR, mentre una overespressione di HSP70 è ritenuta positiva per il corretto folding della DF508-CFTR. Un primo target è quindi l'inibizione di HSC70.

Per questo il nostro interesse si è rivolto alla Matrina (MTR), alcaloide presente solamente in piante del genere *Sophora* (ad es. *S. japonica*), che ha la caratteristica di abbassare la conc. del messaggero di HSC70.

**Risultati preliminari** Quando la MTR viene data a cellule A549 trasfettate con la DF508-CFTR, la minore conc. di HSC70 ha come risultato la comparsa della proteina mutata sulla membrana plasmatica. Per quanto riguarda possibili applicazioni della MTR in FC, è interessante notare che la MTR fa parte della Medicina Tradizionale Cinese dove trova impiego soprattutto quale antivirale e antiinfiammatorio. A questo proposito, è stata fatta una prova preliminare dell'attività anti-infiammatoria della MTR in FC. Così utilizzando cellule IB3-1 infettate con *P. aeruginosa* si hanno dei risultati comparabili con quelli degli antiinfiammatori più usati in FC. Sono anche stati prodotti derivati della Matrina, ma su questi ultimi non si hanno ancora dati sperimentali biologici.

Sul versante dei correttori più tradizionali (la MTR infatti può essere definita un pre-correttore) sono stati sintetizzati dei derivati del correttore RDR1 ed alcuni di essi (ad es. SM5) si sono rivelati più attivi del capostipite. Stiamo adesso verificando se l'uso accoppiato di MTR e SM5 possa fornire un effetto sinergico.

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

**Moran O<sup>1</sup>, Galeno L<sup>1</sup>, Marasini C<sup>1</sup>**

Istituto di Biofisica CNR, Genova (FFC Project#7/2010)



Oscar Moran assieme alle collaboratrici del laboratorio

**Background.** Cystic fibrosis (CF) is caused by mutations in the CFTR, a membrane protein responsible for the anion transport in epithelia. The functional regulation of CFTR occurs in the intracellular domains, where is the putative binding site of drugs that has been used successfully to potentiate the activity of CFTR with a class of mutations that cause CF. Unfortunately, the optimization of such drugs is limited by lack of knowledge of the details of the mechanism of activation of CFTR and the way in which the potentiators can modify it, preventing the rational design of substances with more efficient pharmacological properties. We studied the properties of the CFTR intracellular domains, the regulatory domain (RD), which when phosphorylated as a result of humoral signals to the cell is responsible of the activation of CFTR, and the two nucleotide binding domains (NBD1 and NBD2), which determine the opening and closure of the ion channel upon the binding of ATP and its hydrolysis.

**Hypothesis and objectives.** We have prepared these recombinant protein domains and do a series of measurements

using biochemical and spectroscopic techniques to analyze the conformational changes of each of the domains in their different functional states (phosphorylation or binding with ATP), and the perturbations of their properties produced by CFTR potentiators. These studies were compared with the results obtained from studies of small angle X-ray scattering (SAXS) at the synchrotron and molecular dynamics simulations in a super-computer.

**Methods.** Application of a potentiator induces conformational changes of the NBD1/NBD2 dimer in solution. The potentiator does not change the binding constant of ATP, but reduces the activity of ATP hydrolysis by the NBD1/NBD2 dimer. Fluorescence measurements indicate that, in the presence and in the absence of ATP, the potentiator induces distinct conformational changes on the NBD1/NBD2 dimer, which have been structurally characterised by means of SAXS. The RD is an intrinsically disordered polypeptide, making structural analysis difficult. The native RD has a gyration radius ( $R_g$ ) larger than expected for a globular protein of the same molecular mass. The phosphorylation causes a compaction of the structure, thus resulting in a reduction of the  $R_g$ . Using an ensemble optimization method based on SAXS data, we got the first experiment-based three-dimensional model of the native and phosphorylated RD.

**Spin-off for research & clinical purposes.** This study will allow us to better understand the physiology of CFTR and its alteration in pathological conditions, as well as the molecular mechanism of drugs, which allow us to plan the development of more targeted drugs for the CF treatment.

## Proprietà strutturali delle componenti intracellulari della proteina CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator)

**Ragioni dello studio.** La fibrosi cistica (CF) è causata da mutazioni della CFTR, una proteina di membrana responsabile del trasporto di anioni negli epitelii. La regolazione funzionale della CFTR a luogo nei domini intracellulari, dove anche si trova il sito putativo di legame di farmaci che si utilizzano con successo per potenziare l'attività dell'CFTR con una classe di mutazioni che causano la FC. Purtroppo, l'ottimizzazione dei farmaci utilizzati per il trattamento dell'FC è

limitato dalla scarsa conoscenza dei dettagli del meccanismo di attivazione della CFTR e del modo in cui i potenziatori possano regolarlo, impedendo uno sviluppo razionale di sostanze con proprietà farmacologica più efficente.

**Ipotesi e obiettivi.** Abbiamo studiato le proprietà dei domini intracellulari, il dominio regolatorio (RD), che quando viene fosforilato a seguito di segnali umorali alla cellula è coinvolto con la attivazione della CFTR, e i due domini leganti nucleotidi (NBD1 e NBD2), che determinano la apertura e chiusura del passaggio di ioni a seguito del legame di ATP e la sua idrolisi.

**Metodi.** Abbiamo preparato in modo ricombinante questi domini proteici e abbiamo realizzato una serie di misure utilizzando tecniche spettroscopiche e biochimiche per analizzare i cambiamenti conformazionali di ciascuno dei domini nei loro diversi stati funzionali (fosforilazione o legame con l'ATP), le perturbazioni delle proprietà di questi domini prodotti dalla applicazione di potenziatori della CFTR. Questi studi sono confrontati con i risultati ottenuti da studi di dispersione di raggi-X (SAXS) al sincrotrone e simulazioni di dinamica molecolare in un super-calcolatore.

**Risultati.** L'applicazione di un potenziatore induce cambiamenti conformazionali del dимерo NBD1/NBD2 in soluzione. Il potenziatore non modifica la costante di legame del ATP, ma riduce l'attività di idrolisi di ATP da parte del dимерo NBD1/NBD2. Misure di fluorescenza indicano che, in presenza ed in assenza di ATP, il potenziatore induce distinti cambiamenti conformazionali sul dимерo NBD1/NBD2, che sono stati caratterizzati strutturalmente mediante misure di SAXS. Il RD è intrinsecamente disordinata, rendendo l'analisi strutturale difficile. Il RD nativo ha un raggio di girazione ( $R_g$ ) più grande del previsto per una proteina globulare della stessa massa molecolare. La fosforilazione provoca una compattazione della struttura, ottenendo una riduzione del  $R_g$ . Mediante l'utilizzo di un metodo di ottimizzazione sulla base delle misure di SAXS abbiamo abbiammo ottenuto il primo un modello tridimensionale del RD nativo e fosforilato su basi esperimentali.

**Possibili ricadute per ricerca e clinica.** Questo studio ci permetterà capire meglio la fisiologia della CFTR e la sua alterazione in condizioni patologiche, così come il meccanismo molecolare di farmaci, che permetterà di pianificare uno sviluppo più mirato di farmaci indirizzati alla terapia della CF.

## Looking at stem cell therapy

### 12. 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)

**Background** In cystic fibrosis, the repopulation of diseased airway epithelium with cells expressing functional CFTR may represent a future option to reduce morbidity and mortality of this disease. The recently developed induced pluripotent stem cells (iPSC) allowed the generation of patient-specific stem cells that may be useful for cell therapy approaches. This is a very ambitious goal, and many issues need to be solved before this approach becomes applicable to the human pathology. Notably, for lung diseases, one of the main obstacles has been so far the inability to convert with high efficiency the iPS cells into mature, differentiated lung epithelial

cell lineages. In this respect, recent studies suggest that iPS cells derived from airway epithelial cells may possess a stronger differentiation potential towards airway epithelial lineages than iPS cells derived from other cell types.



Roberto Loi

**Hypothesis and objectives** We therefore proposed to derive iPS cells from airway epithelial cells, either normal or isolated from patients affected by cystic fibrosis.

**Methods** Primary human airway epithelial cells, normal or CF ( $\Delta F508/\Delta F508$ ), were transfected with plasmid vectors to drive the expression of the four reprogramming factors, L-Myc, Klf4, Oct3/4 and Sox2. iPS cells, both normal and CF were then subjected to a multi-step differentiation protocol to generate lung epithelium progenitors.

**Results** We derived, for the first time to our knowledge, iPS cells from human primary bronchial epithelial cells, normal and CF, demonstrating the feasibility of this novel approach. Furthermore we report, for the first time, the derivation of iPS cells from CF patients without employing viral vectors and DNA-integrating methods, potentially harmful in the perspective of cell therapy approaches. By applying a multi-step differentiation protocol, we were then able to drive the differentiation of both iPS cell types, normal or CF, in lung progenitor cells expressing the marker TTF-1.

**Spin-off for research and clinical purposes** iPS cells derived from airway epithelial cells, compared to conventional iPS cells derived from skin fibroblasts, may represent a most effective option for future approaches of cell therapy for the pulmonary manifestations of cystic fibrosis. Furthermore, iPS cells isolated from cystic fibrosis patients may be useful as a model to study the clinical variability of the disease and to facilitate the screening of novel drugs directed towards mutated CFTR protein.

### Un approccio basato sulle cellule staminali pluripotenti indotte (iPS) per rigenerare l'epitelio polmonare affetto da fibrosi cistica

**Ragioni dello studio.** Nella fibrosi cistica il ripopolamento dell'epitelio delle vie aeree con cellule esprimenti la proteina CFTR funzionale potrebbe rappresentare in futuro una possibile opzione per ridurre la morbidità e la mortalità di questa

malattia. Recentemente, lo sviluppo delle cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC) ha permesso la generazione di cellule staminali specifiche per il paziente, potenzialmente utili in approcci di terapia cellulare. Tuttavia, sono ancora numerosi gli ostacoli da superare prima che si arrivi in futuro ad una applicazione delle cellule iPS alla fibrosi cistica, tra cui la difficoltà nel determinarne il differenziamento in cellule mature dell'epitelio delle vie aeree. Al riguardo, recenti studi suggeriscono che cellule iPS derivate da cellule dell'epitelio bronchiale avrebbero una maggiore propensione a re-differenziarsi nel tessuto di origine, cioè l'epitelio delle vie aeree.

**Ipotesi e obiettivi** Abbiamo perciò proposto di derivare cellule iPS a partire da cellule epiteliali bronchiali delle vie aeree, sia normali che isolate da pazienti affetti da fibrosi cistica.

**Metodi** Abbiamo indotto cellule umane dell'epitelio bronchiale, normali o CF, a sintetizzare i fattori che determinano la loro riprogrammazione in cellule iPS. Esse sono poi state sottoposte ad un protocollo sperimentale che ne determina il differenziamento in cellule progenitrici delle vie aeree.

**Risultati** Abbiamo derivato cellule iPS a partire da cellule umane dell'epitelio bronchiale, sia normali che CF, dimostrando la efficacia di questo nuovo approccio. Inoltre abbiamo derivato, per la prima volta, cellule iPS da un paziente CF utilizzando vettori non-virali e che non si integrano nel DNA della cellula ospite, ritenuti più sicuri per un ipotetico futuro approccio di terapia cellulare. Abbiamo successivamente determinato il differenziamento di entrambi i tipi di iPS, normali e CF, in cellule progenitrici dell'epitelio delle vie aeree.

**Possibili ricadute per ricerca e clinica** Cellule iPS derivate dall'epitelio bronchiale, rispetto a cellule iPS classicamente ottenute da fibroblasti della cute, possono rappresentare una opzione più efficace per futuri approcci di terapia cellulare per le manifestazioni polmonari della fibrosi cistica. Inoltre, cellule iPS isolate da singoli pazienti CF possono essere utilizzate per lo studio della variabilità clinica di questa malattia, e per facilitare lo screening di farmaci mirati alla proteina CFTR mutata.

## PLENARY SESSION 3

### Experimental basis for antimicrobial and antiinflammatory treatments

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

Cirillo DM<sup>1</sup>, Bragonzi A<sup>2</sup>, Kahl B<sup>3</sup>

<sup>1</sup>EBPU-S. Raffaele Scientific Institute, Milano Italy, <sup>2</sup>Infections and CF, S. Raffaele Scientific Institute, Milano Italy, <sup>3</sup>UniversitätsKlinikum, Institute für Medizinische Mikrobiologie, Münster, Germany (FFC Project#9/2010)

**Background.** Despite the increasing prevalence of *S. aureus*(SA) and the serious potential morbidity from methicillin sensitive (MSSA) and methicillin-resistant SA (MRSA) in patients with CF, very little is known about its role in the progression of lung disease.

**Objectives.** It is unclear whether SA is an independent contributor to decline in lung function or increases susceptibility to *P. aeruginosa* (PA) superinfection and chronicity and the benefit to treat the first isolation of SA or its persistence in

the airways of asymptomatic CF patients is still debated.

**Results.** We established a mouse model for SA chronic lung infection and we used this model to evaluate the virulence of early and late clinical SA strains isolated from CF



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

patients: all the strains were very efficient to induce chronic infections in mice, ranging from 71% to 100% and no significant difference between early and late isolates was evident. In vitro growth competition experiments showed that PA reference strain and early clinical isolates were able to inhibit SA growth. These results were also confirmed in in vivo competition in a murine model of acute lung infection. The absence of inhibition of SA strains was significantly associated with late PA strains. We set up an in vitro dual species biofilm model: all utilized PA strains, including early and late isolates, were able to significantly inhibit both biofilm and planktonic SA growth. SA moderately inhibited the biofilm growth of PA late strains. In vitro internalization assay in CF cells showed that the presence of PA reduces the ability of SA to invade but not its survival curve, while the co-presence of SA reduces the invasiveness of PA late strains. We established a mouse model of co-infection by pre-infecting mice with SA for 7 days and subsequently with PA for 14 days. SA pre-infection reduced the mortality induced by PA and increased the capacity to establish chronic infection of PA strains. Bacterial load and percentage of infection by PA and SA remained stable up to 2 months after superinfection. The inflammatory response in vivo, measured as leukocytes recruitment and cytokines/chemokines production, seemed to be mostly driven by PA infection. We performed SA eradication with amoxicillin/clavulanic acid to study the effects of anti-SA treatment on PA superinfection.

**Conclusion.** The results of the project up to date support an active role of SA infection in the progression of lung disease in CF patients. Further evaluation of the impact of the anti-SA treatment in the established mouse model will confirm these findings.

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

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

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

**Metodi** L'interazione tra le due specie viene studiata in vitro con saggi di inibizione reciproca della crescita libera e in biofilm, di invasione di cellule epiteliali, ed in un modello murino di infezione cronica.

**Risultati** Abbiamo allestito un modello murino di infezione polmonare cronica da SA per valutare la virulenza di isolati clinici precoci e tardivi di SA da pazienti FC: tutti i ceppi hanno indotto infezione cronica. Esperimenti in vitro di coltura competitiva hanno evidenziato la capacità di ceppi di PA di riferimento e clinici precoci, ma non tardivi, di inibire la crescita di SA. Questi dati sono stati confermati in un modello murino di infezione polmonare acuta. L'assenza di inibizione dei ceppi di SA è significativamente associata agli isolati tardivi di PA. Abbiamo allestito in vitro un modello di biofilm misto: tutti i ceppi di PA (precoci e tardivi) inibiscono la crescita planctonica e in biofilm di SA. SA inibisce moderatamente la crescita in biofilm dei ceppi tardivi di PA. Il saggio di invasione in cellule epiteliali (derivate da paziente CF) ha evidenziato che la presenza di PA riduce la capacità di SA di invadere le cellule epiteliali ma non sopravvivere al loro interno, mentre la presenza di SA riduce la capacità di

invasione dei ceppi tardivi di PA. Abbiamo messo a punto un modello murino di co-infezione: la pre-infezione con SA seguita dalla somministrazione di PA è associata a una riduzione della mortalità indotta da PA e all'aumento della capacità di PA di stabilire infezione cronica; la risposta infiammatoria in vivo è risultata essere ascrivibile all'infezione da PA. Abbiamo allestito un modello di terapia anti-SA per valutarne l'impatto sull'infezione da PA nel modello murino.

**Ricadute per ricerca e clinica** Il progetto ha permesso di confermare una interazione dinamica tra le due specie durante la coinfezione sottolineando un diverso comportamento dei ceppi tardivi di PA rispetto ai precoci. Il modello animale di coinfezione verrà utilizzato per valutare gli effetti della terapia antistafilococcica sul danno polmonare indotto da infezione cronica da PA.

---

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

**Pinton P**

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



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

**Background** The major cause of morbidity and mortality of Cystic Fibrosis (CF) patients is chronic lung disease, which is associated with an excessive inflammatory response characterized by the accumulation of large amounts of the polymorphonuclear leukocyte (PMN) and chemokine IL-8. The excessive neutrophilic inflammation is initially orchestrated by bronchial epithelial cells and amplified by chronic bacterial infection with *Pseudomonas aeruginosa* (PAO), leading to progressive tissue destruction. In a series of recent works appears to become central the role of Ca<sup>2+</sup> and Protein Kinase C (PKC) in controlling activation of innate immune responses.

**Hypothesis and objectives** The final result of this research is the identification of a "functional module" acting on Ca<sup>2+</sup>, mitochondria and PKC signalling in the airway pro-inflammatory pathways, promoted by PAO infection. The identification of novel molecular route in the proinflammatory signalling is presently of paramount importance, opening at new possibilities of therapeutic and diagnostic approaches.

**Methods** Mediating aequorin-based Ca<sup>2+</sup> measurements and single cell imaging experiments with fluorescent recombinant PKC, we have monitored [Ca<sup>2+</sup>] changes in specific intracellular compartments during PAO infection, useful to PAO-dependent activation of PKC during proinflammatory response.

**Results** The final results of this research have shed light on the "molecular functional module" presents in CF airway

*epithelia cells, that through the Ca<sup>2+</sup> signaling, mitochondria and PKC, responds to PAO infection, triggering the inflammatory response. We summarize all pivotal results that permit to design the molecular mechanism involved in PAO-dependent inflammatory response: - The down-regulation of CFTR, in IB3-1 cells, implicates an increase in intracellular Ca<sup>2+</sup> content. - A higher intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration increase the mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake, predisposing the organelle a major responsivity at pro-inflammatory signals. - The inflammatory response is sustained by Ca<sup>2+</sup>-mediated mitochondrial damage. - The preformed bacterial constituent flagellin triggers the PAO-dependent inflammatory response, potentiating the mitochondrial Ca<sup>2+</sup>-uptake. This could favour the mitochondrial ATP release and the activation of inflammasome. - Extracellular nucleotides, released upon interaction of PAO, lead to the expression and secretion of IL-8, via Ca<sup>2+</sup> signaling and Protein Kinase C. - PAO-infection active conventional PKC, isoforms  $\alpha$  and  $\beta$ , in Ca<sup>2+</sup>-dependent manner. - PLC $\beta$ -3 participates in modulation of amplitude of the PAO-dependent inflammatory response.*

**Spin-off for research & clinical purposes** Our study identifies new potential site for pharmacological therapy. PKC, mitochondria and intracellular calcium will be targets of pharmacological intervention to modulate the PAO-dependent pro-inflammatory response.

### Segnali intracellulari dell'infezione da *Pseudomonas aeruginosa* come bersaglio di nuovi farmaci

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

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

**Metodi** Tramite misure di calcio effettuate con l'utilizzo di sonde ricombinanti basate sulla sonda calcio-sensibile equorina e esperimenti di imaging mediante PKC ricombinanti e fluorescenti, abbiamo identificato variazioni della concentrazione intracellulare di calcio durante l'infezione di PAO, fenomeno necessario per l'attivazione delle PKC (mediata da *Pseudomonas aeruginosa*) durante l'innesto della risposta pro-infiammatoria.

**Risultati** I risultati finali di questa ricerca hanno fatto luce sul "modulo funzionale molecolare" presente in cellule epiteliali bronchiali patologiche, che attraverso la perturbazione del segnale Ca<sup>2+</sup>, i mitocondri e le PKC, risponde all'infezione a PAO scatenando la risposta infiammatoria. Elenchiamo i nostri principali risultati che permettono di stabilire il meccanismo molecolare coinvolto durante la risposta infiammatoria promossa da PAO: - L'inalterata espressione di CFTR in cellule patologiche implica un aumento dei contenuti di Ca<sup>2+</sup> intracellulare. - Una più alta concentrazione Ca<sup>2+</sup> intracellulare determina un aumento della quota di Ca<sup>2+</sup> accumulate in matrice mitocondriale, predisponendo l'organello ad una maggiore responsività a segnali pro-infiammatori. - La

risposta infiammatoria scatenata da PAO è sostenuta da disfunzioni mitocondriali Ca<sup>2+</sup>-dipendenti. - Il costituente batterico flagellina innesca la risposta infiammatoria mediata da PAO, potenziando l'accumulo di Ca<sup>2+</sup> alla matrice mitocondriale. Questo potrebbe favorire rilasci di ATP e successiva attivazione dell'inflammasoma. - Nucleotidi extracellulari rilasciati dall'interazione con PAO, conducono all'espressione e rilascio di IL-8, attraverso una via Ca<sup>2+</sup>-e PKC dipendente. - L'infezione mediata da PAO attiva PKC convenzionali, le isoforme  $\alpha$  e  $\beta$ , in modo Ca<sup>2+</sup>-dipendente. - PLC $\beta$ -3 partecipa nella modulazione dell'ampiezza della risposta infiammatoria PAO dipendente.

**Possibili ricadute per ricerca e clinica** I nostri studi identificano potenziali siti di target per un nuovo approccio terapeutico. Le PKC, i mitocondri e il calcio intracellulare potrebbero essere colpiti farmacologicamente in modo da modulare la risposta infiammatoria indotta dal batterio *Pseudomonas aeruginosa*.

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

**Romani L<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Dipartimento di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche/Microbiologia, Perugia (FFC Project#21/2010)



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

**Background** In cystic fibrosis (CF), progressive pulmonary diseases, including *Aspergillus* spp infections and complications, are the most dominant clinical features, characterized by chronic airway infection and inflammation. Recently, it has been shown that the T-cell-derived products IL17 and IL17F are markedly elevated in bronchoalveolar lavage fluid or sputum of CF patients undergoing pulmonary exacerbation. Moreover, IL-23, a critical regulator of Th17 cells, is also elevated in the sputum. Th17 cells are characterized as preferential producers of IL-17A, IL-17F, IL-21, and IL-22 and are in balance with the regulatory T cell (Treg) subset. Although Th17 cells and their effector cytokines mediate host defensive mechanisms to extracellular bacterial infections, they are also involved in the pathogenesis of many inflammatory and autoimmune diseases.

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

**Methods** For our experiments we used genetically engineered CF mice, *Cftr*<sup>-/-</sup> that recapitulate many features of human CF. Our study is aimed at: 1. Identifying key players that

contribute to chronic Th17-driven, inflammation. 2. Evaluating the effectiveness of novel anti-inflammatory strategies targeting the Th17/Treg balance, including a vaccination approach. 3. Assessing by SNPs screening the potential associations between SNPs in genes associated with the Th17 signaling pathway and susceptibility to inflammatory/infectious diseases in CF patients.

**Preliminary results** IDO and tryptophan catabolites contribute to a homeostatic condition by providing the host with immune defense mechanisms adequate for protection, without necessarily eliminating fungal pathogens. IDO and kynurenins are defective in CF mice during *Aspergillus fumigatus* infection and correlated with an imbalanced Th17/Treg cell responses in the lungs. IDO deficiency in DCs may contribute to the dysfunctional Th cell reactivity described in CF. As a proof of concept, treatments with IL-17A antagonists or IDO-promoting agents restored immunocompetence, antimicrobial resistance, reversed tissue inflammation and read-dressed the Th17/Th2/Treg cell balance in experimental CF. These findings expand upon our previous data showing the effective treatment of experimental lung inflammation with IDO inducers and reveal a novel mechanism of action targeting pathogenic lung inflammation in CF and offer therapeutic and immunorestoration potential in CF.

**Spin-off for research & clinical purposes** Data in experimental models of CF indicate that an unchecked Th17 cell activity is associated with the chronicity of the pulmonary infection with the fungus *Aspergillus fumigatus*, a frequent colonizer of the respiratory tract in CF patients. Should a causal association between an ongoing Th17 cell responses and susceptibility to lung disease and complication by a respiratory pathogen proven to be true, this will pave the way for the development of novel anti-inflammatory strategies targeting the Th17/Treg balance, as well as a better screening of CF patients for risk of susceptibility to inflammatory/infectious diseases.

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

**Ragioni dello studio** La Fibrosi Cistica è la malattia genetica ad esito fatale più diffusa tra la popolazione caucasica. È una patologia autosomica recessiva e, nella sua forma più grave, colpisce pancreas, polmoni, fegato e intestino, provocando ostruzione dei dotti principali a causa della produzione di secrezioni molto viscose. Le vie respiratorie dei soggetti affetti da FC ospitano frequentemente numerosi microrganismi tra cui alcune specie di *Aspergillus*, in particolare *A. fumigatus*. Questo fungo, inalato in forma conidiale, genera una risposta immunitaria articolata dovuta all'attivazione di risposte specifiche da parte dei linfociti T. Questa complessa risposta immunitaria agli antigeni di *Aspergillus* può produrre danni a livello broncopolmonare inducendo infiammazione con comparsa di infiltrati polmonari eosinofili, bronchite e bronchiectasie. Tale complicanza è nota come "Aspergillosi Broncopolmonare Allergica", patologia che può far deteriorare il corso della malattia polmonare. La risposta infiammatoria è appannaggio del sistema immune innato ed è seguita dall'immunità adattativa, la quale a sua volta risponde e regola l'infiammazione stessa. Sebbene la risposta infiammatoria ai funghi possa servire a limitare l'infezione, una risposta esagerata può contribuire alla patogenicità e promuovere l'infezione.

**Ipotesi e obiettivi** IL-17A aumenta il potere infiammatorio dei neutrofili inibendo l'indoleamina 2,3 diossigenasi (IDO), l'enzima che degrada il triptofano attraverso la via metabolica delle chinurenine. IDO e gli enzimi coinvolti in questa via catabolica, a sua volta, inibiscono la risposta infiammatoria mediante attivazione delle cellule T regolatorie (Treg) che agiscono da freno immunologico sulle risposte infiammatorie tessutali. Dal momento che la neutralizzazione di IL-

17A riduce crescita fungina e infiammazione, una protezione ottimale nei riguardi del fungo richiede un fine controllo di qualità dell'infiammazione stessa.

**Metodi** Nella prima parte del lavoro è stata valutata la suscettibilità alle aspergillosi polmonari e la funzionalità dell'asse cellulare Th17/Treg in modelli murini di FC ed il possibile ruolo patogenetico di questo equilibrio immunologico.

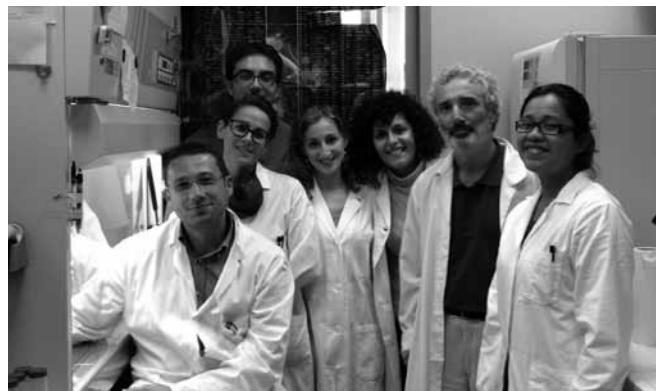
**Risultati preliminari** Abbiamo identificato meccanismi molecolari e/o metabolici quali possibili bersagli di strategie anti-infiammatorie mirate ed, infine, abbiamo iniziato lo screening genetico di soggetti affetti da FC nel tentativo di identificare SNPs che predispongano tali soggetti agli squilibri immunologici appena descritti.

**Possibili ricadute per ricerca e clinica** Questo studio ci ha permesso di identificare nuovi approcci terapeutici atti a limitare l'infiammazione patogenetica e l'identificazione di biomarkers genetici, utilizzabili per lo screening di pazienti con la FC.

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

**Romano M<sup>1</sup>, Evangelista V<sup>2</sup>, Collura M<sup>3</sup>**

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



Mario Romano, secondo da destra, e il gruppo di collaboratori

**Background** Neutrophilic lung inflammation is a trademark of cystic fibrosis (CF). Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) has been unveiled in platelets and leukocytes, indicating that these cells can be primarily affected by the molecular defect of CF, which may switch their phenotype to a pro-inflammatory profile. Platelets form complexes with leukocytes, regulating functions of pivotal relevance in inflammation and host defence. Increased platelet activation and circulating platelet/leukocyte complexes have been detected in CF, suggesting that aberrant interactions between platelets and leukocytes may be relevant in CF inflammation.

**Hypothesis and 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 signalling. 3. To evaluate pharmacological modulation of deranged platelet/leukocyte interactions and leukocyte intracellular signalling in CF.

**Methods** We employed a flow chamber to analyze interactions among platelet/leukocytes and endothelial cells. We also used bacterial killing assays *in vitro*, transwell inserts for

*monitoring leukocyte transepithelial migration, molecular biology techniques, flow cytometry and proteomics.*

**Results** Resting or activated platelets significantly enhanced PMN migration through CF airway cells. CFTR blockade triggered shrinking, blebbing and loss in endothelial monolayer integrity under flow. It also suppressed nitric oxide (NO) generation by endothelial cells. In PMN, CFTR inhibition up-regulated Mac-1 activity and p38 MAPK phosphorylation, whereas it inhibited Pyk and AKT phosphorylation. This is consistent with a pro-inflammatory phenotype of PMN. Remarkably, inhibitors of type IV phosphodiesterase (PDE4) corrected a variety of cellular responses to CFTR inhibition and reduced the release of neutrophil extracellular traps, in the presence or absence of platelets. Finally, we engineered cells to stably express the core promoter of the anti-inflammatory receptor FPR2/ALX, as screening tool for innovative anti-inflammatory drug discovery.

**Spin off research and clinical purposes** Our results suggest that PDE4 inhibitors may be regarded as potential anti-inflammatory agents in CF lung disease. Moreover, high throughput screening for stimulators of FPR2/ALX transcription may provide insights for the development of new anti-inflammatory drugs.

### **Interazione piastrine-leucociti nell'infiammazione in fibrosi cistica: una finestra per opportunità terapeutiche**

**Ragioni dello studio** 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, le cui origini non è completamente nota.

**Ipotesi e obiettivi** Ipotizziamo che il difetto genico della FC comprometta la capacità di cellule del sangue quali leuco-

ci e piastrine di interagire tra di loro e con la parete dei vasi sanguigni e quindi rispondere adeguatamente alle infezioni e le porti a produrre molecole che alimentano l'infiammazione e il danno dei tessuti. Ci siamo proposti quindi di studiare: 1. gli effetti del difetto genico della FC su: a) attività dei leucociti regolati dalle piastrine; b) meccanismi di funzionamento dei leucociti; 2. la possibilità di modulare farmacologicamente le alterazioni di leucociti, piastrine e loro interazioni nella FC.

**Metodi** Per studiare le interazioni tra le cellule del sangue e la parete dei vasi, abbiamo utilizzato attrezzature che permettono di riprodurre le condizioni del torrente circolatorio e di mimare il passaggio delle cellule infiammatorie dal sangue alle vie respiratorie. Abbiamo inoltre utilizzato metodiche di biologia molecolare.

**Risultati** Abbiamo osservato che le piastrine favoriscono la migrazione dei leucociti neutrofili attraverso l'epitelio FC e che riproducendo il difetto molecolare della FC, mediante un inibitore dell'attività della proteina CFTR, si manifestano alterazioni sia dei leucociti che delle cellule che rivestono i vasi sanguigni. La maggior parte di queste alterazioni viene corretta da una classe di farmaci denominata inibitori delle fosfodiesterasi di tipo IV (PDE4) che viene già impiegata con risultati incoraggianti per il trattamento della broncopatia cronica ostruttiva, una malattia respiratoria caratterizzata da una forte infiammazione. Abbiamo inoltre scoperto i meccanismi di regolazione della espressione di un gene anti-infiammatorio denominato FPR2/ALX che potrebbe essere rilevante nella infiammazione della fibrosi cistica.

**Possibili ricadute per ricerca e clinica** I nostri risultati suggeriscono che gli inibitori di PDE4 potrebbero avere effetti benefici sulla infiammazione della FC. Inoltre, l'avere scoperto i meccanismi di regolazione del gene FPR2/ALX ci potrà permettere in un prossimo futuro di individuare una nuova classe di farmaci anti-infiammatori che potrebbero essere efficaci per combattere la flogosi respiratoria nella F.

## **Treatment of mucociliary clearance defect**

### **17. Identification of agents with multiple favourable activities as potential treatments for cystic fibrosis**

**Naggi A<sup>1</sup>, Yates E<sup>2</sup>, Shute J<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Ist. di Ricerche Chimiche e Biochimiche "G. Ronzoni", Mila-

no, <sup>2</sup>School of Biological Science, Univ. Liverpool, <sup>3</sup>Div. Pharmacol. Pharmacy and Biom. Science, Univ. Portsmouth (FFC Project#20/2010)



In alto da sinistra, Annamaria Naggi e Edwin A. Yates,  
sotto da sinistra, Janis Shute e N. Veraldi

**Background** Chronic bacterial lung infection in CF leads to exaggerated, sustained and prolonged neutrophil dominated airway inflammation. Furthermore, a great amount of DNA is released by bacteria and dead neutrophils, overburdening DNases and triggering the immune response, bringing about damage of the lung tissue. The decrease in inflammation can possibly be obtained treating the patients with molecules able to exert multiple activities toward key regulators of the inflammatory process.

**Hypothesis and objectives** Heparin (MPH) is a polysaccharide clinically used as anticoagulant and able to inhibit human neutrophil elastase that in case of chronic inflammation is greatly responsible for the degradation of lung tissue. For this study we designed 3 series of derivatives differing in the sulfation degree and the presence of flexible residues and tested them for the ability to inhibit neutrophil elastase, to decrease IL8-mediated recruitment of neutrophils and to enhance the activity of DNase. Since in the previous step of this study we observed absence of direct interaction between heparin and DNase, we focused our attention on the other two targets.

**Methods** Anticoagulant assay: COATEST® Heparin (Chromogenix)

Elastase inhibition: digestion of a synthetic substrate and a natural one (elastin)

Interaction of the derivatives with IL8: competitive and sandwich ELISA

Inhibition of neutrophil chemotaxis: Dai Y. et al, Thorax, 1994, 49: 867-871.

**Results** Here are reported the characteristics of the modi-

series	compound	Mw (kDa)	% Acetyls	% gs	% FXa inhib.*	% HNE inhib (peptide)		% HNE. inhib. (elastin) ◇	% IL8 displacement*		%neutrophil migration inhib.
						1/6§	½§		1/36§	1/4§	
std	MPH	19,9	14,6	0	79	30	33	55	26#	35#	65
1	6	14	14	40	25	27	30	23	14	35	64
3	16,5	100	20	17	22	25	n.d	n.d	n.d	n.d	
22	21	45	0	24	19	33	39	23	67	58	
2	2	22	64	0	22	26	35	26	60	51	increase
23	n.d.	100	0	6	32	40	30	46	47	67	
20	17	27	27	n.d	n.d	n.d/	n.d	71	76	22	
14	14,2	40	29	n.d	38	33	n.d /	n.d	n.d	n.d	
3	13	13,3	42,3	32	n.d	28	28	n.d	34	34	n.d
19	15	64	25	11	24	31	73	53	51	36	
4	15,9	100	25	13	26	30	22	54	69	n.d.	

fied compounds and the results of the tests performed.

All the compounds showed diminished anticoagulant activity if compared to MPH as shown by the decrease of the % of FXa inhibition. Their inhibitory effect towards elastase (HNE) was proved both in the case of the digestion of a synthetic peptide or soluble elastin. Furthermore, heparin derivatives are able to directly interact with IL8 (as proven by the displacement of IL8) even if with different potency and some are able to inhibit its recruitment of neutrophils, even if the two activities don't seem to correlate.

**Spin-off for research & clinical purposes** The derivatives are able to inhibit elastase and limit the recruitment of neutrophils, therefore proving to be potentially capable of mitigating the excessive inflammatory response in CF patients. All the compounds tested derived from a clinically used molecule and have lost most of the anticoagulant activity peculiar of MPH, so they are potentially free of side effects and are to be considered candidates for therapeutic use. Some derivatives (c23, c22, c19) seem more promising than others and can be used in the future as lead compounds for the development of second generation series. Collaboration between our research group and HSR will start soon to confirm the absence of side effects and to prove the efficacy of our derivatives *in vivo* on infected mice.

#### Identificazione di nuovi potenziali agenti terapeutici per la fibrosi cistica ad attività multipla selettiva

**Ragioni dello studio** Una delle conseguenze dell'infezione batterica cronica tipica della fibrosi cistica è il reclutamento continuo e prolungato nelle vie respiratorie di cellule del sistema immunitario, specialmente neutrofili. Inoltre, un'elevata quantità di DNA è rilasciata da batteri e neutrofili morti, sovraccaricando gli enzimi preposti alla sua degradazione e portando infine alla degenerazione del tessuto polmonare. La diminuzione dell'infiammazione e di conseguenza del danno tissutale, potrebbe essere ottenuta utilizzando molecole in grado di agire su più punti chiave del processo infiammatorio.

**Ipotesi e obiettivi** L'eparina (MPH) è un polisaccaride utilizzato clinicamente come anti-coagulante ed in grado di intera-

gire con numerose proteine, tra cui l'enzima elastasi neutrofila, che in caso di infiammazione cronica è tra i responsabili del danno tissutale. Per questo studio abbiamo generato 3 serie di eparine modificate, che differiscono per grado di solfatazione e presenza di residui flessibili e le abbiamo testate per la loro capacità di inibire l'attività dell'elastasi neutrofila, limitare il reclutamento dei neutrofili da parte dell'IL8 e incrementare l'attività della DNasi. I primi due obiettivi sono stati raggiunti, mentre il lavoro sulla DNasi è stato interrotto in seguito all'evidenza che non vi è interazione diretta tra eparina e DNasi.

**Metodi** Determinazione dell'attività anticoagulante: kit COATEST® Heparin (Chromogenix). Inibizione elastasi: digestione di un peptide sintetico e un composto naturale (elastina). Interazione dei derivati con IL8: ELISA competitivo ed ELISA sandwich. Inibizione della chemiotassi neutrofila (Dai Y. et al, Thorax, 1994, 49: 867-871).

**Risultati** In tabella (tab. 1, vedi sopra) sono riportate le caratteristiche dei composti ottenuti da modificazione chimica dell'eparina e i risultati dei test di attività. Tutti i composti sono dotati di minore attività anticoagulante rispetto ad MPH come mostrato dalla minore percentuale di inibizione del fattore Xa e sono in grado di inibire l'attività dell'elastasi neutrofila (HNE), sia che venga utilizzato un substrato sintetico che un substrato naturale come l'elastina. Inoltre, i derivati sono in grado di legare direttamente IL8 (maggiore la % spiazzamento, maggiore l'interazione) anche se con diversa potenza e di inibire in alcuni casi la sua azione di reclutamento dei neutrofili (PMN) anche se le due attività non sembrano correlare.

**Possibili ricadute per ricerca e clinica** I derivati appartenenti a queste tre serie presentano notevole diminuzione dell'attività anti-coagulante e di conseguenza di possibili effetti indesiderati. Alcuni sembrano più promettenti di altri (c22, c23, c19) e potranno essere utilizzati come lead compounds per lo sviluppo di derivati ad attività anti-infiammatorie di seconda generazione. Per verificare *in vivo* l'efficacia di tali composti e confermare l'assenza di effetti collaterali, sono in programma test su topi FC in collaborazione con l'Ospedale San Raffaele di Milano.

# CF Carrier screening

## 18. Cystic fibrosis: to screen or not to screen? Involving citizens' jury in decision on carrier screening

Mosconi P<sup>1</sup>, Villani W<sup>1</sup>, Satolli R<sup>2</sup>, Castellani C<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratory for medical research and consumer involvement, Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, Milano, <sup>2</sup>Roberto Satolli, Zadig Agenzia Editoria Scientifica, Milano, <sup>3</sup>Carlo Castellani, Cystic Fibrosis Centre, Verona (FFC Project#9/2011)



Paola Mosconi, responsabile di progetto

**Background** In the latest years the continuous molecular biology techniques improvements have made carrier detection available for several genetic conditions, including CF. An observational study provides evidence on the impact of two different policies: in the eastern part of north-eastern of Italy CF carrier screening has been offered and performed extensively; in the western part the carrier screening was not actively offered (Castellani, JAMA, 2009).

**Hypothesis and objectives** The choice of an active offering of the carrier screening at a population level should not be done by the local health authorities only, without any consultation of the citizen's preferences. There is the necessity to consider all the possible consequences at the social level. A possible way could be a method of citizens' Jury.

**Methods** Citizens' jury is a method of deliberative democracy to directly involve the citizens in health decisions. It is based on the idea that many issues are best decided by a group of lay people who have no vested interests, and who apply their common sense and experience, having been presented with the best possible evidence. The members of the Jury, without FC experience, have been involved in one day meeting assisted by medical experts and disinterested 'facilitator'. Citizens were asked to answer the question: "Should or shouldn't the Health Service organize a screening of the population in order to identify healthy people that may have children suffering from CF?"

**Results** Informative materials, documents, and pre-post evaluation questionnaires have been developed for this project. The meeting has been held in Verona on May 5, 2012. The vast majority of the Jury was in favor of the Yes, providing reasons covering human, scientific, economic and social justice

aspects. The final document is available on the website [www.PartecipaSalute.it](http://www.PartecipaSalute.it).

**Spin-off for research and clinical purposes** The relevance to the Italian CF Foundation is related to the impact of the issue discussed and to the novelty of the method adopted. In particular: - specific for FC patients, physicians and researchers in the field of FC, and policy maker who will have access to a shared final report on FC carrier screening; - generic, i.e. the development of a feasible and reproducible method to involve citizen in health decisions that can be easily exported to other situations. A manual on the method of Citizen's Jury is available as additional product of the project.

### Lo screening del portatore sano per la fibrosi cistica (FC): la voce dei cittadini. Una esperienza pilota

**Ragioni dello studio** Lo screening del portatore prevede un esame per individuare tra adulti in età riproduttiva i portatori sani, i cosiddetti eterozigoti che hanno una sola copia del gene mutato e quindi non sono malati, ma possono trasmettere la malattia se anche l'altro genitore è portatore sano. Nella parte occidentale del Veneto e Trentino Alto-Adige il test è stato offerto a coloro che avevano un caso di FC in famiglia, mentre l'Università di Padova ha avviato una campagna di offerta attiva. Dopo aver esaminato i dati è risultato che nella parte orientale del Veneto con decine di migliaia di test si sono individuati migliaia di portatori, decine di coppie di eterozigoti e il numero di nuovi nati con la FC è sceso quasi ad annullarsi, mentre questa diminuzione è stata più bassa nella parte occidentale del Veneto e Trentino-Alto Adige dove il test era offerto solo alle famiglie a rischio (Castellani, JAMA, 2009).

**Ipotesi e obiettivi** La scelta di offerta attiva di uno screening del portatore a livello di popolazione non dovrebbe essere fatta da autorità sanitarie locali senza una consultazione delle preferenze del cittadino, considerando tutte le possibili conseguenze.

**Metodi** "La giuria dei cittadini" è un metodo per coinvolgere i cittadini nel processo decisionale attraverso un percorso basato su informazioni e coinvolgimento di esperti e associazioni di pazienti. I cittadini – senza esperienza di FC e senza interessi di parte – devono rispondere alla domanda "Il Servizio Sanitario deve o no organizzare uno screening nella popolazione con lo scopo di individuare persone sane che potrebbero avere figli malati di FC?"

**Risultati** Materiale informativo, documenti di appoggio e questionari di valutazione pre-post sono stati messi a punto per il progetto. La giuria, riunita il giorno 5 maggio 2012 a Verona, si è espressa a favore del "Sì" fornendo motivazioni di carattere umano, scientifico, economico e di giustizia sociale. Il documento finale è a disposizione sul sito [www.PartecipaSalute.it](http://www.PartecipaSalute.it), così come un manuale sull'esperienza Giuria dei cittadini.

**Possibili ricadute per ricerca e clinica** La rilevanza del progetto riguarda: - l'impatto del tema: specifico per pazienti, medici, ricercatori e policy maker nel campo FC che hanno accesso a un rapporto condiviso finale; - la novità del metodo: lo sviluppo di un metodo fattibile e riproducibile per coinvolgere i cittadini nelle decisioni sanitarie esportabile in altre situazioni.

---

## PLENARY SESSION 4

(no abstracts available)

### Clinicians meet investigators 1

#### *Basic defect and new drugs*

*Moderator:* Colombo C

*Clinician:* Braggion C

*Investigator:* Galietta L

#### *Infection and antimicrobial strategies*

*Moderator:* Messore B

*Clinician:* Costantini D

*Investigator:* Leoni L

---

## PLENARY SESSION 5

(no abstracts available)

### Clinicians meet investigators 2

#### *Genetics and screening*

*Moderator:* Borgo G

*Clinician:* Castellani C

*Investigator:* Castaldo G

#### *Inflammation and antiinflammatory strategies*

*Moderator:* Magazzù G

*Clinician:* Minicucci L

*Investigator:* Maiuri L

---

## TWIN POSTER SESSION 1

### Subsession 1A CFTR function/dysfunction//correction

#### **19. Properties of trimethylangelicin in F508del CFTR rescue**

**Casavola V<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Department of General and Environmental Physiology, University of Bari (FFC Project#1/2011)

**Background.** The most frequent mutation of CFTR protein, F508del, produces a mis-folded protein that is associated with a defective chloride secretion, a depletion of airway surface liquid, bacterial infection, inflammation and impairment of lung function. Therefore, it is extremely important to identify small molecule compounds, which could both rescue the biosynthetic defect of F508del-CFTR (correctors) and potentiate the chloride secretion that is known to be defective in F508del CFTR rescued on the apical membrane of polarized monolayers (potentiators). We recently demonstrated that a psoralen-related compound, 4,6,4'-trimethylangelicin (TMA), strongly inhibits the expression of the IL-8 gene in bronchial epithelial



Valeria Casavola, prima a destra, assieme ai collaboratori del laboratorio

cells in which the inflammatory response has been challenged by infection with *Pseudomonas aeruginosa*. Moreover, a short treatment (15 min) with TMA potentiated chloride secretion

through wild-type CFTR present on the membrane of airway epithelial cells.

**Hypothesis and objectives.** In the course of the present project, we will plan to analyze the possible effect of TMA as a "corrector" of F508del CFTR functional expression in airway cell monolayers derived from a cystic fibrosis (CF) patient homozygous for the F508del mutation. Moreover, to analyze if the TMA-induced rescue of CFTR functions could be directly or indirectly correlated with the inflammation, we will perform the analysis of a panel of genes involved in the inflammatory response.

**Methods and results.** By functional experiments of apical chloride efflux, we observed that 24 hrs preincubation with TMA, at nanomolar concentration, rescues CFTR-dependent chloride efflux both in immortalized epithelial CF cells and in well-differentiated primary human bronchial epithelial cells obtained from a F508del-CFTR homozygous patient (*MucilAir-FC*). In parallel, by confocal analysis we found that TMA preincubation significantly rescued the expression of F508del-CFTR on the apical membrane of polarized cell monolayers.

**Conclusions.** Taken together the data obtained in the first year of the project, support the hypothesis that TMA beside to behave as a potentiator of CFTR-dependent chloride efflux may also correct the trafficking of F508del-CFTR to the apical membrane and rescue the F508del CFTR-dependent chloride secretion. Moreover, the experiments conducted in primary human bronchial epithelial cells support the real efficacy of this compound as a corrector since these cells are closer to the physiopathology of the bronchiolar cells of CF patients.

## **Effetto della Trimetilangelicina (TMA) sul ripristino funzionale della F508del-CFTR**

**Premesse e ragioni dello studio.** La più frequente mutazione della proteina CFTR, F508del, dà luogo ad una proteina che, incapace di raggiungere la membrana cellulare, non è in grado di secernere cloro con conseguente disidratazione delle vie aeree, colonizzazione di batteri e infiammazione cronica. Risulta pertanto di grande utilità terapeutica la correzione, anche se parziale, del difetto del traffico della proteina mutata CFTR in modo da ripristinare la secrezione di cloro nei vie aeree di pazienti affetti da Fibrosi Cistica (FC). Attualmente molti studi sono condotti al fine di individuare composti che siano in grado sia di ripristinare l'espressione funzionale della F508del-CFTR sulla membrana apicale degli epitelii polmonari FC (correttori) e, contemporaneamente, potenziare il trasporto di cloro (potenziatori). Recentemente abbiamo dimostrato che la trimetilangelicina (TMA), un derivato dello psoralene, oltre ad avere una spiccata attività anti-infiammatoria in quanto riduce l'espressione dell'Interleuchina-8, è anche in grado di potenziare l'efflusso di cloro della proteina wt CFTR presente sulla membrana delle cellule bronchiolari derivanti da un soggetto sano.

**Ipotesi e obiettivi.** Nel corso del presente progetto ci proponiamo di determinare se il composto TMA, somministrato per un tempo prolungato (24 ore), sia in grado di agire da "correttore" non solo in cellule bronchiolari FC stabilizzate ma anche in colture primarie derivanti da pazienti omozigoti per la mutazione F508del. Inoltre, allo scopo di evidenziare se la correzione indotta dal TMA della proteina CFTR mutata possa influenzare i processi infiammatori in cellule primarie, sarà effettuata l'analisi delle proteine e dei principali geni coinvolti nella risposta infiammatoria.

**Metodi e principali risultati.** Mediante misure funzionali abbiamo osservato che la preincubazione con TMA a concentrazioni nanomolari è in grado di ripristinare l'attività secretoria del cloro della proteina mutata F508del-CFTR sia in cellule bronchiolari stabilizzate CFBE che in cellule primarie derivanti da polmoni di soggetti omozigoti per la mutazione F508 del

(MucilAir-FC). Esperimenti di microscopia confocale hanno inoltre dimostrato come il trattamento con TMA sia in grado di ripristinare l'espressione apicale della proteina F508del CFTR in epitelii di cellule CFBE stabilizzate e di cellule primarie.

**Conclusioni.** I risultati ottenuti in questo primo anno dimostrano che la TMA, oltre a svolgere un'attività di potenziatore dell'efflusso di cloro, è in grado di correggere il difetto di traffico della proteina F508del-CFTR.

## **20. PTC124 derivatives as a novel approach to improve the readthrough of premature stop codons in the CFTR gene**

**Di Leonardo A<sup>1</sup>, Lentini L<sup>1</sup>, Melfi R<sup>1</sup>, Pibiri I<sup>1</sup>**

*Department of Science and Molecular and Biomolecular Technologies (STEMBIO), University of Palermo, Italy (FFC Project#2/2011)*



Aldo Di Leonardo e collaboratrici

**Background** Cystic fibrosis (CF) is caused by mutations in the gene encoding the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). Approximately 10% (worldwide) of patients have in-frame nonsense mutations (UAA, UAG or UGA class I mutations) in the CFTR gene that result in premature stop codons (PTCs) in the mRNA generating truncated CFTR protein responsible for a severe CF phenotype. Pharmacological approaches have been proposed to directly overcome PTCs. Ataluren (PTC124) a small molecule that mimics the activity of aminoglycosides has been suggested to allow PTCs read-through and to partially restore the protein function. However, despite the results obtained "in vitro" and "in vivo" as well the clinical trials done with PTC124, some caveats exist. In particular Ataluren showed a lower activity against UAA and UAG than UGA nonsense mutations and also there is no a general consensus about its mechanism of action.

**Hypothesis and Objectives** Our proposal is aimed to design and synthesize new small molecules structurally related to PTC124 and to establish a new cell based approach to evaluate their ability to promote translational read-through of PTCs present in a reporter plasmid that we generated to transfet human cells.

**Preliminary results** Twelve derivatives were designed, synthesized and tested in HeLa cells transfected with a plasmid harbouring an in-frame PTC (TGA). To this aim we generated a reporter vector with non-sense mutation by introducing in the pBOS-H2BGFP plasmid a TGA codon (opal) by site-directed mutagenesis. PCR and sequencing analyses confirmed the presence of the TGA codon in the plasmid that was transfected in HeLa cells to explore the ability of the derivatives to promote the translational read-through. The positive response after treatments with PTC124 of HeLa transfected cells con-

firmed the correct functioning of the model system. Moreover, HeLa cells transfected with a reporter vector encoding the mutated *FLuc* (opal mutation) showed a positive response when treated with the derivatives.

**Spin-off for research and clinical purpose** Since there is not a general consensus on the mechanism of action of the PTC124 (protein stabilization or PTCs read-through) development of molecules capable of promoting the read-through of all PTCs without adverse effects, as Ataluren is suggested to do for the TGA codon, would be helpful as therapeutic strategy for other nonsense mutations found in CF.

## Sintesi di derivati del PTC124 con capacità di 'readthrough' di codoni di stop prematuri presenti nel gene CFTR e aumentata biodisponibilità

**Premesse e ragioni dello studio** Circa il 10% dei pazienti FC presenta mutazioni non senso (o 'stop': UGA, UAG o UAA mutazioni di classe I) nel gene CFTR che bloccano prematuremente la sintesi della proteina. Sono in fase di studio approcci farmacologici che mirano al superamento del blocco causato da mutazioni non-senso. La molecola Ataluren (PTC124) è una piccola molecola che simula l'attività degli aminoglicosidi che hanno la capacità di ricodificare parzialmente i codoni di stop prematuri. Tuttavia non è ancora chiarito il meccanismo d'azione del PTC124 e la sua capacità di superare la presenza di un codone 'stop' prematuro. Infatti il PTC124 sembra essere più efficace solo verso un tipo di mutazione di stop: UGA e meno per quanto riguarda gli altri due tipi: UAG e UAA.

**Ipotesi e Obiettivi** Il progetto di ricerca si prefigge di progettare nuove molecole, derivate dal PTC124, che presentino una più ampia e maggiore attività rispetto a quella di Ataluren. L'efficacia delle nuove molecole è valutata in cellule umane coltivate in vitro utilizzando un sistema da noi realizzato e basato sull'assenza/presenza di una proteina che emette luce verde. Inoltre, ci proponiamo di individuare tra queste molecole quelle in grado di far superare i due tipi di mutazione verso cui il PTC124 sembra non avere molto effetto.

**Risultati preliminari** Sono stati sintetizzati dodici derivati del PTC124 per essere testati nel nostro sistema modello. A questo scopo abbiamo introdotto nel plasmide H2BGFP-BOS un codone di stop TGA mediante mutagenesi sito diretta. Dopo aver confermato la presenza di tale codone mutato nel plasmide, questo è stato introdotto nelle cellule coltivate in vitro per valutare l'attività dei derivati del PTC124. Inizialmente l'avvenuto superamento del blocco dovuto al codone di stop è stato verificato mediante trattamenti con PTC124 confermando la bontà del sistema modello utilizzato. Inoltre abbiamo effettuato un primo screening dell'attività dei derivati del PTC124 che ha messo in evidenza una risposta positiva per alcune di queste molecole.

**Possibili ricadute in campo clinico** A oggi non c'è ancora un generale consenso sul funzionamento del PTC124 (stabilizzazione proteica o superamento del codone stop), per tale motivo la progettazione e lo sviluppo di nuove molecole in grado di promuovere il superamento dei codoni di stop potrebbero essere d'aiuto come strategia terapeutica nella cura di alcune forme di fibrosi cistica.

## 21. Subverted signalling by protein kinase CK2 in ΔF508 CFTR expressing cells. Functional aspects and prospects in therapy

**Pinna LA<sup>1</sup>, Venerando A<sup>1</sup>, Pagano MA<sup>1</sup>, Cozza G<sup>1</sup>, Arrigoni G<sup>1</sup>, Sarno S<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Department of Biological Chemistry – University of Padova (FFC Project#3/2011)



Lorenzo A. Pinna, primo da destra, assieme al gruppo di ricerca

**Background** In the course of previous investigation supported by FFC we disclosed functional links between CFTR (whose genetic alterations underlie Cystic Fibrosis) and the highly pleiotropic protein kinase CK2, by showing that: i) the NBD1 domain of CFTR is readily phosphorylated by CK2 in vitro at Ser-422, which is located in its "regulatory insert"; ii) peptides reproducing the CFTR 500-518 segment with the F508 deletion which is the commonest cause of CF alter the activity and targeting of CK2. Consistent with the latter observation phosphorylation of CK2 targets in lysates of BHK cells expressing deltaF508 CFTR is subverted with respect to lysates from cells expressing wild type CFTR.

**Hypothesis and objectives** These data led us to hypothesize that CK2 could both mediate some of the consequences of the basic defect causative of CF and play a role in the process leading to premature degradation of delF508 CFTR. Manipulation of CK2 could therefore provide a new tool for treating CF.

**Methods and Preliminary results** By MS analysis of CFTR expressed in yeast 14 phosphorylated residues have been identified one of which, pT1471, located a region implicated in the interaction with several CFTR protein partners, has been unambiguously shown to be a target of CK2. Phosphomimetic mutation of Thr-1471 to Asp makes CFTR very unstable, suggesting that its phosphorylation by CK2 commits CFTR to degradation. We have also observed that the fragmentation patterns of CFTR, either wt, or delF508 and T1471D are quite different among each other, consistent with the notion that CK2 targeting is altered in mutated vs wild type CFTR expressing cells.

**Spin-off for research and clinical purposes** We expect to be able to show that CFTR Thr-1471 phosphorylation by CK2 takes place in living cells and has functional consequences on the maturation, stability and degradation of wild type and/or delF CFTR.. We are also confident to be able to demonstrate an allosteric up-regulation of CK2 holoenzyme by fragments generated through the degradation of delF CFTR and to compile a repertoire of CK2 targets, including several chaperones, whose phosphorylation is specifically enhanced by such a mechanism. Once confirmed a reciprocal cause-effect link between CK2 activity and CFTR functionality, several reagents/strategies already available to manipulate CK2, including CK2 inhibitors in clinical trials for different purposes, will be examined as potential tools for treating CF and/or some of its side effects.

**Alterato signalling da parte di protein chinasi CK2 in cellule che esprimono CFTR con la delezione di F508. Aspetti funzionali e prospettive terapeutiche**

**Premesse e ragioni dello studio** Nel corso di precedenti studi finanziati da FFC abbiamo evidenziato rapporti funzio-

nali tra la proteina "regolatrice transmembrana della Fibrosi Cistica" (CFTR) ed un importante enzima regolatore denominato CK2, dimostrando che : i) il dominio NBD1 di CFTR viene modificato mediante fosforilazione da parte di CK2 in un punto (S422) che si trova nel cosiddetto "inserto regolatore"; ii) frammenti di CFTR che riproducono il segmento 500-518 con la mancanza dell'aminoacido F508 (che è la causa più frequente di fibrosi cistica) modifica l'attività e la specificità di CK2. Di conseguenza abbiamo anche osservato che nei lisati di cellule che esprimono CFTR con questa delezione (delf) la fosforilazione di alcune proteine è alterata rispetto a quella di cellule con CFTR normale.

**Ipotesi e obiettivi** Questi dati ci hanno indotto ad ipotizzare che CK2 possa mediare alcune delle conseguenze del difetto che causa FC e avere un ruolo nel processo che porta CFTR delf a prematura degradazione. Pertanto intervenire su CK2 potrebbe essere utile nel trattamento della FC.

**Metodi e Risultati preliminari** Mediante analisi di massa di CFTR espresso in lievito sono stati identificati 14 aminoacidi fosforilati, uno dei quali, Thr-1471, situato in una regione importante per l'interazione di CFTR con diverse proteine, è stato dimostrato essere un bersaglio di CK2. La mutazione "fosfo-mimetica" di Thr-1471 in acido aspartico rende CFTR molto instabile, suggerendo che la sua fosforilazione acceleri la degradazione di CFTR. Abbiamo anche osservato mediante "western-blot" con anticorpi regio-specifici che i frammenti generati nelle cellule da CFTR WT o con le mutazioni delf508 o T1471D sono diversi tra loro, in accordo con l'osservazione che i bersagli di CK2 sono alterati nelle cellule che esprimono i mutanti.

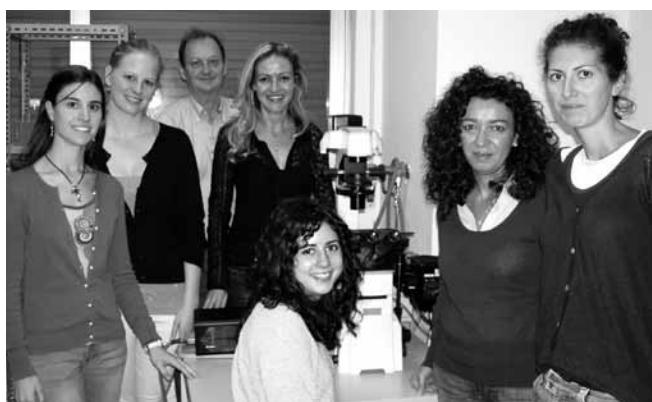
**Possibili ricadute per ricerca e clinica** Ci aspettiamo di riuscire a dimostrare che la fosforilazione di Thr-1471 avviene anche in vivo ed ha conseguenze funzionali sulla maturazione, stabilità e degradazione di CFTR. Confidiamo anche di poter dimostrare per la prima volta che esiste un meccanismo di regolazione fisiologica di CK2 (mediata dai frammenti generati da delf CFTR) e di poter compilare un repertorio di bersagli di CK2 la cui fosforilazione è modificata da delf CFTR.

Se riusciremo in questi intenti, numerosi reagenti e strategie già disponibili per manipolare CK2, compresi inibitori in fase clinica per scopi differenti, diverranno potenzialmente utili per contribuire a correggere il difetto di base.

## 22. Role of spatial cAMP/PKA compartmentalization and activity in regulating CFTR function

Reshkin S<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of General and Environmental Physiology, University of Bari (FFC Project#4/2011)



Stephan Reshkin, terzo da sinistra, con le collaboratrici

**Background** The most frequent mutation of the CFTR protein, F508del, creates a mis-folded protein that is poorly inserted in the apical membrane. This defect is associated with a reduced or absent chloride secretion which underlies the impairment of lung function. Recent research has shown that treatment with small molecule 'chemical chaperones' facilitates some rescue of F508delCFTR and delivery to the apical surface, by promoting the correct folding of F508delCFTR. However, despite cell surface localization of rescued F508del CFTR, it is often observed that stimulators of cAMP- and PKA-dependent CFTR activity have a reduced activation of F508del CFTR that may be due to the unavailability of cAMP/PKA signaling.

**Hypothesis and objectives.** Therefore, maximal therapeutic rescue of F508del CFTR will require combinational therapies that correct its processing, coupled with strategies to restore its normal cAMP-dependent regulation at the plasma membrane. However, the cellular mechanisms underlying this refractoriness of F508del CFTR to activating stimuli have remained unknown. The main objectives of this project are to investigate how the cAMP/PKA signaling pathway is organized and regulated within normal polarized epithelial cells and how this becomes defective in CF cells.

**Methods and results:** The role of the actin cytoskeleton in regulating cAMP and PKA spatio-temporal dynamics and CFTR activity were determined in a series of FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) experiments with cytosolic and membrane probes for both cAMP concentration and PKA activity in human polarized normal and CF airway cell lines.

**Conclusions:** Altogether, the data obtained in the first year of the project support the hypothesis that the cytoskeleton plays a fundamental role in organizing the cAMP/PKA spatio-temporal dynamics in the vicinity of CFTR to regulate its activity. Moreover, the experiments conducted in primary human bronchial epithelial cells support these conclusions. The understanding of how this complex signaling system is altered in CF cells is important not only for understanding the cellular physiology of CFTR, but in designing novel, successful therapeutics for the treatment of cystic fibrosis.

## Ruolo della compartimentazione e dell'attività del sistema AMPc/PKA nella regolazione dell'espressione funzionale del CFTR

**Ragioni dello studio** La fibrosi cistica (FC) è una patologia causata da mutazioni a carico di una proteina di membrana, CFTR, che è un canale al cloro attivato da una protein chinasi AMPc dipendente (PKA). Tali mutazioni inducono la perdita o disfunzione della proteina, con conseguente riduzione della secrezione di cloro. In particolare, la mutazione più frequente, indicata come F508del, non consente l'inserimento del CFTR, seppur parzialmente funzionale, sulla membrana apicale. Tuttavia, pur se molte strategie terapeutiche mirano a reinserire correttamente il CFTR sulla membrana, questo rimane refrattario agli stimoli di attivazione, probabilmente a causa di una scarsa disponibilità del sistema attivante AMPc/PKA a ridosso della membrana, dove risiede il CFTR.

**Ipotesi ed obiettivi** Da studi precedenti abbiamo dimostrato che in cellule bronchiolari di soggetti sani il complesso AMPc/PKA è maggiormente presente a livello della membrana in prossimità del CFTR, mentre in cellule di pazienti affetti da FC, l'AMPc diffonde nel citoplasma cellulare allontanandosi dal CFTR. In questo studio abbiamo verificato se la corretta organizzazione del citoscheletro cellulare funge da barriera fisica alla diffusione del complesso cAMP/PKA, promuovendo in tal modo la formazione di "micro-compartmenti di segnale attivante" in prossimità del CFTR.

**Metodi** Lo studio è stato condotto in cellule bronchiolari stabilizzate e in colture primarie derivanti da pazienti FC omozigoti per la mutazione F508del che, rispecchiando la fisiopatologia delle cellule bronchiolari dei pazienti, risulta

essere uno dei modelli biologicamente più rilevanti per lo studio della FC.

**Risultati preliminari** Gli esperimenti condotti nel primo anno del progetto ci hanno consentito di dimostrare che, in cellule "normali", il citoscheletro, grazie all'intermediazione di proteine di connessione membrana-citoscheletro e di ancoraggio della PKA (tra cui Ezrin) compartmentalizza il cAMP e la PKA in prossimità del CFTR, regolando in tal modo la sua attività di secrezione di cloro. Al contrario, in cellule FC, la riduzione dell'organizzazione del citoscheletro è almeno parzialmente responsabile dell'alterata localizzazione del complesso cAMP/Ezrin/PKA e della conseguente perdita di attività del CFTR. Esperimenti di infezione virale sono attualmente in corso per validare questi dati in cellule epiteliali primarie derivanti da soggetti sani e affetti da FC.

**Possibili ricadute per ricerca e clinica** La comprensione dei meccanismi coinvolti nella regolazione dell'attività del CFTR mediata da PKA rappresenta un passo chiave per lo sviluppo di nuove terapie farmacologiche.

## 23. The read-through approach for the treatment of cystic fibrosis caused by premature termination codons

Borgatti M<sup>1</sup>, Altamura N<sup>2</sup>, Laufer R<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Biochemistry and Molecular Biology Department-Ferrara University, Ferrara, Italy, <sup>2</sup>Nicola Altamura, Institute of Biomembrane and Bioenergetics, CNR, Bari, Italy, <sup>3</sup>IRBM Science Park, Pomezia, Italy (FFC Project#1/2012)



Da sinistra a destra: Monica Borgatti (PI) e i partner Nicola Altamura e Ralph Laufer

**Background.** Nonsense mutations are the leading cause for approximately 30% of inherited diseases, including cystic fibrosis (CF). They promote premature translational termination and following loss of CFTR protein by introduction of premature termination codons (PTCs). Functional consequences of these mutations are minimized by the nonsense-mediated RNA decay pathway (NMD), a cellular mechanism, aimed to detect and degrade mRNA carrying PTCs. In the last few years, it has been demonstrated that drugs (like aminoglycoside antibiotics) can be designed and produced to suppress this process by the ribosomal read-through mechanism where these drugs mask PTC synthetizing a full-length CFTR protein. Recently we have set-up a dual luciferase and dual fluorescence reporter systems based on *S. cerevisiae* suitable to screen potential read-through molecules on PTCs and for development of high throughput screening (HTS) analysis. By using these systems, we have found G418 aminoglycoside has an efficient read-through activity when NMD mechanism is abolished or not, while Tobramycin is active only when NMD is abolished. These model systems can be used to monitor read-through at premature nonsense codons and to discriminate potential direct effects on the reporter gene products by NMD effectors. Moreover we have obtained UPF1 silenced IB3-1 clones in order to modulate NMD mechanism and testing in combination with read-through molecules.

**Hypothesis and objectives.** The rationale supporting of this project is to optimize the ribosomal read-through molecules leading to restoration of CFTR production in cystic fibrosis caused by nonsense mutations. This project will study the development of: (a) HTS assays based on *S. cerevisiae* and human cell lines useful to identify novel molecules exhibiting enhanced read-through activity by screening of chemical libraries and commercial aminoglycosides; (b) experimental strategies to reduce NMD mechanism.

**Methods.** The read-through screening of the IRBM chemical collection (35.000 commercial compounds from different providers) will be carried out in: (a) a dual luciferase and dual fluorescence reporter systems carrying a nonsense codon based on *S. cerevisiae* yeast strains; (b) human epithelial cells carrying gene reporter sequences (e.g. luciferase, GFP) with stop codon mutations; (c) CF cell lines with modulated NMD by chemical treatment or silencing RNA strategy or transcription factor decoy approach (TFD). The level of CFTR protein will be analyzed by Western blotting and relative function by single-cell fluorescence imaging.

**Expected results.** The expected results are: (a) the production of HTS assays for identification of efficient read-through molecules with low toxicity; (b) the identification of the best strategy to decrease the cellular content of the NMD-regulating proteins; (c) the identification of the optimal cocktail (using read-through molecules and NMD inhibitors) sustaining the maximal levels of CFTR production.

**Spin-off for research & clinical purposes.** Pharmacological approach based on molecules able to induce the read-through to restore CFTR production, in CF caused by nonsense mutations, is of great interest. This study may introduce new hopes for the pharmacologic therapeutic treatment of CF.

## L'approccio read-through per il trattamento della fibrosi cistica causata da mutazioni stop

**Ragioni dello studio.** Le mutazioni di stop introducono codoni di stop prematuro e sono la causa di circa il 30% delle malattie ereditarie, inclusa la fibrosi cistica (FC). Esse inducono il termine prematuro della sintesi delle proteine con conseguente perdita della proteina CFTR. Inoltre si può osservare un meccanismo di difesa cellulare, noto con il nome di decadimento di mRNA mediato dal non-senso (NMD), mediante il quale le cellule degradano i messaggeri che contengono questi codoni di stop prematuro. Negli ultimi anni, farmaci come gli antibiotici amminoglicosidici, sono stati utilizzati per sopprimere questo blocco prematuro della sintesi proteica mediante un meccanismo detto read-through in grado di mascherare il segnale di stop prematuro e far riavviare la sintesi di proteina CFTR. Recentemente abbiamo sviluppato modelli basati sui lieviti *S. cerevisiae* da utilizzare per lo screening di potenziali farmaci con attività read-through.

**Ipotesi e obiettivi.** Il nostro progetto prevede di ottimizzare questa strategia utilizzando molecole che agiscono con meccanismo read-through in modelli sperimentali aventi mutazioni di stop per la fibrosi cistica. Questo progetto identificherà nuove molecole read-through mediante screening di librerie chimiche e di amminoglicosidi già in commercio usando nuovi modelli cellulari basati su ceppi di lievito modificati o linee cellulari umane contenenti proteine fluorescenti recanti mutazioni di stop. Inoltre saranno sviluppate strategie per modulare il meccanismo NMD e individuare la migliore combinazione di molecole read-through e modulatori NMD.

**Metodi.** La libreria IRBM di 35000 composti commerciali sarà analizzata per l'attività read-through nei modelli cellulari di: (a) Lieviti *S. cerevisiae* con un doppio sistema reporter fluorescente o luciferasico recante mutazioni di stop; (b) Cellule epiteliali umane recanti geni reporter (luciferasi, GFP) con mutazioni di stop; (c) Linee cellulari FC trattate con inibitori NMD (ad esempio silenziamento genico, strategia decoy). I

livelli di proteina CFTR saranno analizzati mediante Western blotting e la funzionalità mediante tecniche basate sulla fluorescenza.

**Risultati attesi.** I risultati attesi sono: (a) la produzione di saggi per l'identificazione di efficienti molecole read-through a bassa tossicità, (b) l'identificazione della migliore strategia per modulare le proteine che regolano il processo NMD; (c) l'identificazione del cocktail ottimale di molecole read-through e inibitori NMD in grado di sostenere la sintesi di CFTR.

**Possibili ricadute per ricerca e clinica.** Questo studio può essere utile per l'identificazione di molecole con attività read-through per il trattamento delle mutazioni di stop in FC.

## 24. The molecular structure and the folding of the whole Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator

**Moran O<sup>1</sup>, Marasini C<sup>1</sup>, Baroni D<sup>1</sup>, Picco C<sup>1</sup>**

Istituto di Biofisica, CNR, Genova (FFC Project#4/2012)



Oscar Moran, P.I. del progetto

**Background.** Cystic fibrosis (CF) is a genetic disease of epithelia, in which the primary defect, a mutation of the CFTR protein, leads to an alteration in the absorption and secretion of fluid in the airways, bacterial colonization with a massive inflammatory process, the loss of lung function, and eventually death. The most frequent mutation in patients, ΔF508, causes defects in the maturation of the protein, which is destroyed before being inserted into the cell membrane. As a therapy for patients with this mutation it has been indicated the use of compounds, known as correctors, that prevent the destruction of ΔF508, allowing it to reach the membrane and to carry out its salt transport function.

**Hypothesis and objectives.** The determination of the molecular structure of CFTR at atomic level is inhibited by many technical difficulties that prevent the crystallization of the protein. We propose to study the molecular structure of CFTR using methods of small-angle X-ray scattering. With this technique, which has the advantage that does not need to apply any particular treatment of the sample, it is possible to have detailed information on the molecular structure of proteins under conditions similar to physiological ones.

**Methods.** The goal is to study the structure of the normal CFTR in different functional states, and compare it with the structure of the protein carrying the mutation ΔF508. In collaboration with Bob Ford from the University of Manchester, the CFTR, normal or mutated, will be purified from yeast cells, which can also be treated with correctors in order to study how these drugs modify the molecular conformation of the mutant.

**Spin-off for research & clinical purposes.** The results ob-

tained will be used to understand the functional mechanisms of the normal CFTR and its pathological alterations caused by the ΔF508 mutation, and to gain information that could be critical for the development of new and better correctors for the pharmacological therapy of the basic defect in CF.

## La struttura molecolare e la conformazione della proteina coinvolta nella fibrosi cistica (CFTR)

**Ragioni dello studio** La fibrosi cistica (FC) è una malattia genetica degli epitelii, nella quale il difetto primario, una mutazione della proteina CFTR, porta ad un'alterazione nell'assorbimento e secrezione di fluido nelle vie aeree, a colonizzazione batterica con un massiccio processo infiammatorio, alla perdita della funzione polmonare e, infine, alla morte. La mutazione più frequente nei pazienti, ΔF508, causa difetti nella maturazione della proteina, che viene distrutta prima essere inserita nella membrana cellulare. Come terapia per i pazienti portatori di questa mutazione è stata indicato l'uso di composti denominati correttori che evitano la distruzione della ΔF508, permettendogli di arrivare in membrana ed esercitare la sua funzione di trasporto di sale.

**Ipotesi e obiettivi** La determinazione della struttura molecolare della CFTR a risoluzione atomica viene inibita da molte difficoltà tecniche che impediscono la cristallizzazione della proteina. Noi proponiamo di studiare la struttura molecolare della CFTR utilizzando metodi di diffusione di raggi-X a basso angolo. Con questa tecnica, che ha il vantaggio di non prevedere nessun trattamento particolare del campione, è possibile avere informazione dettagliata sulla struttura molecolare delle proteine in condizioni simili a quelle fisiologiche. L'obiettivo è quello di studiare la struttura della CFTR normale in diversi stati funzionali e di confrontarla con la struttura della proteina con la mutazione ΔF508.

**Metodi** Con la collaborazione di Bob Ford dell'Università di Manchester, la CFTR, normale o mutata, sarà purificata da cellule di lievito, che potranno anche essere trattate con correttori, in modo di vedere come questi farmaci modifichino la conformazione molecolare del mutante.

**Possibili ricadute per ricerca e clinica** I risultati ottenuti serviranno a capire i meccanismi di funzionamento della CFTR normale e le sue alterazioni patologiche dovute alla mutazione ΔF508, e di acquisire informazione che potrebbero essere fondamentali per lo sviluppo di nuove e migliori correttori per la terapia farmacologica del difetto di base nella FC.

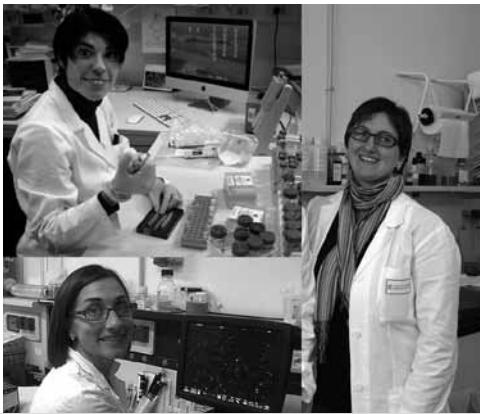
## 25. Modulation of post-translational modification and quality control system as a novel therapeutic strategy for Cystic Fibrosis

**Pedemonte N<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Lab. Genetica Molecolare, Ist. "G. Gaslini", Genova (FFC Project#5/2012)

**Background** 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. Current treatments are focused on treating disease consequences, but they are not designed to correct the basic defect. The development of novel drugs able to correct the basic defect will allow stopping the progression of the disease. To this aim, we need a better understanding of the cellular processes responsible for maturation vs degradation of the mutant protein.

**Hypothesis and objectives** The primary objectives of our project are to study the molecular mechanisms involved in the trafficking defect of F508del mutant, the most frequent among



Nicoletta Pedemonte, a destra, e due collaboratrici del gruppo di ricerca

*CF patients, and to assess the feasibility and therapeutic relevance of their modulation.*

**Methods** Using a technology called RNA interference we have already identified some of the mechanisms leading to the stop of F508del-CFTR maturation, for example the ubiquitin E3 ligase RMA1 and the proteins involved in the sumoylation pathway. Now we plan to evaluate the efficacy of their modulation both *in vitro*, on primary cultures of airway epithelial cells from CF patients, and *in vivo*, on murine models. In parallel, using RNA interference, we will identify other regulators of CFTR maturation. Finally, we plan to evaluate the efficacy of modulation of these regulators on CFTR mutants with trafficking defect, other than F508del.

**Expected results** This study will allow us to identify new proteins that play a role in F508del-CFTR maturation and degradation, and to evaluate the efficacy of their modulation in terms of rescue of F508del-CFTR trafficking defect.

**Spin-off for research & clinical purposes** The proteins identified in this study will constitute the target of treatments with improved efficacy and selectivity, aimed to correct the basic defect associated to F508del-CFTR (45-50% of CF patients in Italy) and possibly other mutants.

### Modulazione delle modificazioni post-traduzionali e dei sistemi di controllo di qualità come nuova strategia terapeutica per la fibrosi cistica

**Ragioni dello studio** La fibrosi cistica (FC) è una grave malattia ereditaria causata da mutazioni che provocano la perdita di funzione di una proteina di membrana (chiamata CFTR) che serve per il trasporto di ioni cloruro. I trattamenti attuali sono mirati alla cura delle conseguenze della malattia, ma non consentono di correggere il difetto di base. La messa a punto di nuovi farmaci in grado di correggere il difetto di base consentirebbe di fermare la progressione della malattia. Per fare ciò, bisogna conoscere i meccanismi molecolari che regolano la maturazione o la degradazione della proteina mutata.

**Ipotesi e obiettivi** Il nostro progetto ha come obiettivi primari studiare i meccanismi molecolari alla base del difetto di maturazione della proteina F508del-CFTR, la più frequente tra i pazienti FC, e verificare se la loro modulazione possa avere una efficacia terapeutica.

**Metodi** Utilizzando una tecnologia chiamata interferenza genica mediata da RNA, abbiamo già identificato alcuni dei meccanismi che determinano l'arresto della maturazione della proteina F508del-CFTR, quali la proteina ubiquitina E3 ligasi RMA1 e le proteine coinvolte nei processi di sumoializzazione. Adesso ci proponiamo di validare l'efficacia della loro modulazione sia *in vitro*, su colture primarie di cellule epiteliali delle vie aeree di soggetti FC, sia *in vivo*, su modelli murini. In parallelo, sempre usando l'interferenza genica mediata da RNA, ci proponiamo di identificare ulteriori regolatori della maturazione della proteina CFTR. Infine, ci proponiamo di

valutare l'efficacia della modulazione di questi regolatori su altri mutanti di CFTR con difetto di maturazione.

**Risultati attesi** Questo studio ci consentirà di identificare nuove proteine che giocano un ruolo nella maturazione e nella degradazione di F508del-CFTR, e di valutare l'efficacia della loro modulazione in termini di recupero del difetto di maturazione di F508del-CFTR.

**Possibili ricadute per ricerca e clinica** Le proteine identificate in questo studio costituiranno il bersaglio per trattamenti più efficaci e selettivi, mirati al ripristino della funzione della proteina mutata F508del (presente nel 45-50% dei pazienti in Italia) e possibilmente di altri mutanti.

### 26. CFTR splicing correction mediated by Exon-Specific U1 small nuclear RNAs (ExSpe U1)

**Pagani F<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>ICGEB, Trieste (FFC Project#6/2012)



Franco Pagani, primo a destra, con il gruppo di ricerca

**Background** A significant proportion of disease-causing mutations in CFTR gene affect pre-mRNA splicing, inducing skipping of the exon from the mature transcript. In these cases, a therapeutic splicing rescue that improves exon definition and induces inclusion of the defective exon in the final transcript is expected to correct the basic defect and restore normal CFTR function.

**Hypothesis and objectives** This project aims to explore a novel RNA-based repair strategy for mis-splicing in CFTR gene, based on Exon Specific U1 snRNA (ExSpe U1). ExSpe U1s are modified U1 snRNAs whose specific binding in intronic sequences downstream the 5'ss are able to rescue splicing of defective exons. We recently demonstrated that a single ExSpe U1 is able to efficiently correct multiple splicing defects in CFTR exon 12 minigene. In this project, we intend: to evaluate the efficacy of the approach to correct aberrant splicing in different CFTR defective exons, to improve the ExSpeU1 efficacy through the investigation of the molecular mechanisms and investigate the ExSpeU1 rescue on the CFTR protein function

**Methods** To evaluate the general efficacy of the approach we will systematically evaluate ExSpeU1 specifically designed to correct different defective CFTR exons. This will require the creation of appropriate minigenes covering most of the 27 CFTR exons to be tested in splicing assay. To improve the ExSpeU1 efficacy we will investigate in detail the ExSpeU1-dependent enhancing mechanism. To investigate the ExSpeU1 rescue on the CFTR protein function we will create, for selected defective exons, a protein-competent splicing minigene that will allow the evaluation of the correction both at the RNA and protein level.

**Spin-off for research and for clinical purposes** Our analy-

*sis will provide, through the analysis of the molecular mechanism involved and the creation of appropriate model cellular systems, a novel RNA-based therapeutic approach to correct CFTR aberrant splicing defects. This project aims to identify a novel therapeutic strategy to redirect aberrant splicing due to CFTR gene mutations which are directly involved in the clinical features of CF. The novel RNA-based approach we propose here will provide a new tool to correct splicing in an exon-specific manner.*

## Correzione dei difetti di *splicing* del gene CFTR attraverso l'utilizzo di piccoli RNA nucleari

**Ragioni del progetto** Questo studio si focalizza sulle mutazioni di splicing del gene CFTR ed in particolare su alcune mutazioni che causano un difetto chiamato "exon skipping" o salto dell'esone. Lo studio si basa su osservazioni preliminari che mostrano come "in vitro" delle molecole chiamate ExSpeU1 (Exon Specific U1s) e corrispondenti a piccoli RNA nucleari, sono in grado di correggere il difetto. Questo studio intende analizzare in dettaglio questa nuova strategia terapeutica.

**Ipotesi ed obiettivi** Gli obiettivi dello studio sono multiplici: si intende identificare diversi ExSpeU1 attivi sul gene CFTR in grado di correggere più mutazioni di *splicing*, ed attraverso la analisi dei meccanismi di base coinvolti, sviluppare molecole con migliore attività. Infine lo studio si propone di studiare l'effetto in modelli cellulari adeguati sulla funzionalità del canale CFTR.

**Metodi** Il lavoro sperimentale utilizzerà modelli "in vitro" (minigeni) e verranno creati modelli cellulari specifici per lo studio della correzione dello *splicing*. Lo studio prevede uno screening di molecole attive e la ottimizzazione delle stesse a livello di correzione dello *splicing*. A tale fase farà seguito la valutazione della loro efficacia sulla funzionalità della proteina CFTR.

**Risultati attesi** Da questo studio ci si attende la identificazione di nuove molecole in grado di correggere alcuni difetti di splicing che sono causa della CF. Sarà possibile identificare per ogni gruppo di mutazioni una singola molecola di ExSpeU1 in grado di correggere il difetto. Tale analisi ne proverà la efficacia in cellule in coltura.

**Possibili ricadute per la ricerca e clinica** Lo studio potrà in futuro portare alla correzione di alcuni difetti di *splicing* che causano la Fibrosi Cistica.

## 27. Development of novel strategies to correct the chloride transport defect in cystic fibrosis

**Galietta L<sup>1</sup>, Millo E<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Lab. Genetica Molecolare – Istituto G. Gaslini – Genova, <sup>2</sup>Di-part. Medicina Sperimentale – Lab. Biochimica – Università degli Studi di Genova (FFC Project#2/2012)

**Background** Rescue of chloride secretion in airway epithelial cells is a major goal of therapeutic approaches for cystic fibrosis (CF). This may be achieved by directly restoring the function of the CFTR chloride channel, the protein mutated in CF, with pharmacological tools. However, treatment of each class of CF mutations requires different drugs. In particular, the most frequent CF mutation, deltaF508, affects CFTR in two ways: a decrease in intrinsic channel activity and an impairment of protein maturation. Therefore, full rescue of deltaF508-CFTR requires a combined treatment with at least two types of drugs: a corrector and a potentiator. An alternative strategy for CF is the stimulation of another type of chloride channel, the TMEM16A protein, which is also expressed in airway epithelial cells.



Luis J. V. Galietta, in alto a sinistra, e i collaboratori di ricerca

**Objectives** The aims of the project are: 1) to identify novel chemical compounds, belonging to the family of aminoaryltiazoles (AATs), with a dual ability to correct both the channel activity defect and the mistraficking caused by deltaF508 and other CF mutations; 2) to study the function and regulation of TMEM16A protein in CF airway epithelial cells in order to assess its suitability as an alternative drug target in CF.

**Methods** We will synthesize novel AAT analogs that will be tested, with functional and biochemical assays, on cells expressing mutant CFTR. Rounds of chemical synthesis and compound testing will allow to generate a structure-activity relationship for AATs. This information will be important to improve efficacy and potency of AATs as pharmacological modulators of CFTR protein activity and trafficking. In parallel, we will study the expression and function of TMEM16A protein in airway epithelial cells from CF and non-CF individuals. By screening a library of kinase inhibitors with a functional assay, we will explore the possibility of modulating TMEM16A activity with pharmacological agents.

**Expected results** We expect to identify novel drug-like molecules able to restore chloride secretion through the rescue of mutant CFTR or through the activation of TMEM16A protein. Such molecules may pave the way for the development of effective therapeutic strategies to correct the basic defect in CF.

**Spin-off for research and clinical purposes** Identification of candidate drugs for the correction of the basic defect in CF is of high relevance for the development of treatments able to revert or arrest the progression of the disease.

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

**Ragioni dello studio** Il ripristino del trasporto di cloruro nelle cellule epiteliali delle vie aeree è uno dei principali obiettivi per la terapia del difetto di base nella fibrosi cistica (FC). Questo risultato può essere ottenuto direttamente attraverso la correzione farmacologica della proteina mutata, CFTR. Il recupero pieno della funzione di CFTR con la mutazione deltaF508 richiede però il trattamento combinato con due tipi di composti diversi, potenziatori e correttori. Infatti la mutazione deltaF508 provoca due problemi diversi a carico della proteina CFTR: un difetto di attività e un difetto di maturazione. Una strategia alternativa per la FC passa invece attraverso la stimolazione di un'altra proteina, TMEM16A, anch'essa capace di trasportare cloruro.

**Obiettivi** Il progetto si propone di: 1) identificare nuovi composti chimici, appartenenti alla famiglia degli aminoaryltiazoli (AAT), che hanno la capacità di funzionare sia da correttori sia da potenziatori; 2) studiare la funzione e regolazione della proteina TMEM16A per valutarne la capacità di compensare il deficit di CFTR nei pazienti FC.

**Metodi** Verranno sintetizzate nuove molecole di AAT da saggiare su cellule con espressione della proteina CFTR mutata. Attraverso modifiche progressive della struttura chimica

di tali composti si cercherà di migliorarne l'efficacia terapeutica su cellule epiteliali bronchiali ottenute da pazienti FC. In parallelo si studierà l'espressione della proteina TMEM16A nelle cellule epiteliali delle vie aeree e la risposta ad agenti farmacologici attivatori.

**Risultati attesi** Si prevede l'identificazione di nuove molecole in grado di stimolare la secrezione di cloruro attraverso il recupero della proteina CFTR mutata oppure attraverso l'attivazione della proteina TMEM16A.

**Possibili ricadute per ricerca e clinica** I risultati potranno essere importanti come punto di partenza per lo sviluppo di terapie farmacologiche in grado di correggere il difetto di base nella FC.

## 28. Study of the pathogenetic and therapeutic role of the Epithelial Na<sup>+</sup> channel (ENaC) in CF and CF-like disease

Lucarelli M<sup>1</sup>, Bombieri C<sup>2</sup>, Conese M<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Sez. Biochimica Clinica, Dip. Biotecnologie Cellulari ed Ematologia, Sapienza Università di Roma, Azienda Policlinico Umberto I, <sup>2</sup>Sez. Biologia e Genetica, Dip. Scienze della Vita e della Riproduzione, Università di Verona, <sup>3</sup>Dip. Scienze Biomediche, Laboratorio di Patologia Generale, Università di Foggia (FFC Project#3/2012)



Marco Lucarelli, secondo da destra, con il suo gruppo di ricerca

**Background** ENaC (Epithelial Na<sup>+</sup> channel) genes and protein have been shown to be involved, although with still unclear mechanisms, in Cystic Fibrosis (CF) and CF-like diseases. The deregulated wild-type ENaC seems a better therapeutic target than the mutated CFTR. Proteolytic activation and epigenetics are likely to play a role as regulatory mechanisms and may represent therapeutic targets.

**Hypothesis and objectives** Our hypotheses: 1) mutations of ENaC genes may sustain some forms of CF; 2) the targeting of epigenetic and/or proteolytic pathways may reveal useful for ENaC downregulation.

Our objectives: 1) to establish whether, in CF or CF-like diseases, mutations or transcriptional alterations in ENaC genes contribute to the pathogenesis and to the phenotype severity; 2) to analyze the mechanisms of coordinated transcription of ENaC genes and of ENaC - CFTR interaction, in physiology and pathology; 3) to characterize the functional effect of the ENaC mutations identified; 4) to evaluate therapeutic approaches of ENaC expression downregulation and activity attenuation.

**Methods** 1) Search for mutations and altered expression of ENaC genes in CF and CF-like subjects with at least 1 unidentified CFTR mutation or the same CFTR mutated genotype but different CF severity; 2) functional characterization of the

ENaC mutations found; 3) analysis, in vitro and ex vivo in human cells, of CFTR and ENaC expression, and of ENaC gene DNA methylation; 4) downregulation of ENaC expression and activity by DNA hypermethylation, chromatin condensation, RNA interference and inhibition of proteolytic activation.

**Expected results** In CF and CF-like diseases, identification of ENaC mutations and transcriptional alterations, and clarification of: a) the role of ENaC, b) the ENaC - CFTR relationship, c) the genotype – phenotype relationship. Identification of ENaC as therapeutic target and strategy for CF cure.

**Spin-off for research and clinical purposes** This study will add new insight into CF molecular mechanisms offering a new panel of ENaC molecular lesions. Practical consequences are expected for CF diagnosis, prediction of the clinical course and genetic counseling. ENaC genes may arise as therapeutic targets opening new perspective for CF therapy. We propose the use of small molecules to synergistically influence ENaC at both transcriptional and functional levels. The moving to clinical trials would be facilitated by the fact that some of the proposed molecules are already approved for clinical use in other pathologies.

## Studio del ruolo patogenetico e terapeutico del canale epiteliale del Na<sup>+</sup> (ENaC) nella Fibrosi Cistica tipica e atipica

**Ragioni dello studio** In vari pazienti con forme tipiche e atipiche di Fibrosi Cistica (FC) non risultano identificate le mutazioni causali; inoltre, è poco chiara la relazione tra le mutazioni del CFTR e la gravità clinica della malattia. La diminuzione della secrezione di cloro e l'aumento del riassorbimento di sodio sono anomalie caratteristiche delle vie aeree nei pazienti con FC. La prima è conseguenza diretta di CFTR difettosa, mentre la seconda è da imputare a un'anomala interazione tra CFTR ed ENaC (il canale epiteliale del sodio). Dati sperimentali suggeriscono che 2 tipi di modifiche molecolari dell'ENaC (la metilazione del DNA dei relativi geni e un taglio parziale della proteina) regolano l'attività di questo canale. Sebbene il ruolo dell'ENaC nella FC sia poco chiaro, i dati disponibili lo individuerebbero come un più facile bersaglio terapeutico rispetto al CFTR.

**Ipotesi e obiettivi** Questo progetto vuole approfondire le conoscenze sul ruolo dell'ENaC nella FC, studiando la possibilità che mutazioni o alterazioni dell'espressione nei 3 geni ENaC, probabilmente associate a mutazioni del gene CFTR, possano causare la FC o modularne la gravità clinica. Si vogliono inoltre valutare approcci terapeutici volti a diminuire l'attività dell'ENaC.

**Metodi** Verrà condotta la ricerca di mutazioni nei geni ENaC in gruppi di pazienti selezionati in base a manifestazioni cliniche caratteristiche e/o almeno 1 mutazione del CFTR non individuata. In sistemi cellulari in coltura verrà studiata l'espressione dell'ENaC in relazione ad un meccanismo di regolazione molecolare (metilazione del DNA). In questi sistemi sarà valutata anche la fattibilità di approcci terapeutici rivolti alla riduzione dell'espressione e della funzione dell'ENaC mediante l'uso di piccole molecole ad azione modulatrice della metilazione del DNA e/o della maturazione della proteina.

**Risultati attesi** I risultati di questo studio consentiranno l'identificazione e la caratterizzazione di uno spettro di lesioni molecolari dell'ENaC coinvolte nella FC, nonché l'individuazione dell'ENaC come nuovo bersaglio terapeutico.

**Possibili ricadute per ricerca e clinica** Il ruolo di geni diversi dal CFTR nell'insorgenza della FC e nella definizione della sua gravità clinica è rilevante per la diagnosi, prognosi e terapia. Questi studi contribuiranno al chiarimento dell'effettivo meccanismo molecolare della FC e allo sviluppo di nuove terapie. L'uso di piccole molecole per modificare l'espressione e/o l'attività dell'ENaC, già approvate per uso clinico in altre patologie, dovrebbe facilitare futuri trial clinici.

## Subsession 1B

# New targets for antiinflammatory therapies

### 29. Inflammasome activation and IL-1 $\beta$ mediated inflammation triggered by *Pseudomonas aeruginosa*: a rationale for novel therapeutic approaches in cystic fibrosis patients

Bernardini ML<sup>1</sup>, Molinaro A<sup>2</sup>, Garlanda C<sup>3</sup>, Abdelmounaim A<sup>4</sup>  
<sup>1</sup>Dip. Biologia e Biotecnologie, Università "La Sapienza", Roma, <sup>2</sup>Dip. Chimica organica e biochimica, Università di Napoli, <sup>3</sup>Fondazione Humanitas per la Ricerca, Milano, <sup>4</sup>Lab. Batteriologia Molecolare - Facoltà di Medicina - Libera Università di Bruxelles (FFC Project#18/2011)



Maria Lina Bernardini, al centro del suo gruppo di ricerca

**Background** Recurrent and persistent airway infections with *Pseudomonas aeruginosa* (PA) are common in CF patients and account for severe inflammation and lung damages. Interaction of PA with lung tissue triggers the innate defense mechanisms leading to the production of pro-inflammatory cytokines e.g. TNF- $\alpha$ , IL-8 and IL-1 $\beta$ . However, as the innate defense seems to be impaired, more the lung is stimulated by bacteria more the inflammation mounts, in the absence of a concomitant eradication of the infection. This is a vicious circle, often leading the patient to death due to lung functional decline. Given these premises and considering the complex scenario in which several cytokines participate to the inflammation, the characterization of the "master" cytokines against which targeting a proficient treatment seems to be a major goal in CF therapies.

**Hypothesis and objectives** This project points to IL-1 $\beta$  production as a master cytokine driving inflammation in lung of CF patients infected by PA. The primary objective is to identify possible therapeutic targets in the processes of IL-1 $\beta$  synthesis and signaling.

**Methods** The specific aims are: the identification of the PA factors and molecules acting as a triggers to stimulate the inflammasome assembly and the IL-1 $\beta$  production; and the analysis of the role of IL-1 $\beta$  during the airway infection of PA by exploiting the murine model of acute pulmonary infection with wild type and animals defective for key factors, such as Toll interleukin-1 receptor (IL-1R) 8 (TIR8), which acts as negative regulator of the IL-1 R/TLR pathways. In parallel, the usage of functional murine mAb directed against IL-1 $\beta$  is a further tool to verify the role of this cytokine during PA infection of airways of wild type animals.

**Preliminary results** The results of the first year activity of the project arisen by the *in vivo* experiments and indicate that

the IL-1 pathway plays a key role in fueling the inflammatory reaction induced by PA and that the functional blockage of IL-1 $\beta$  can modulate the severity of the inflammation.

**Spin-off for research & clinical purposes** Our goal is to validate the usage of already existing pharmacological compounds aimed at containing the level of this cytokine in the context of CF.

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

**Ragioni dello studio** Nei polmoni dei malati di fibrosi cistica (CF), i processi infettivi sostenuti da patogeni opportunisti, quali *Pseudomonas aeruginosa* (PA), aggravano uno stato infiammatorio probabilmente pre-esistente all'infezione e contribuiscono al declino funzionale dei polmoni. È, dunque, di fondamentale importanza individuare quali siano quei fattori che possono agire da bersaglio nelle strategie terapeutiche finalizzate al contenimento dell'infiammazione.

**Ipotesi e obiettivi** La nostra attenzione è focalizzata sulla citochina pro-infiammatoria interleuchina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), che sembra avere un ruolo chiave nell'insorgenza, sviluppo e gravità delle infezioni polmonari da PA. L'obiettivo è quello di verificare se l'inibizione della sintesi o dell'attività biologica di questa molecola possa contribuire al decremento dell'infiammazione e possa contrastare l'infezione di PA, creando un ambiente meno favorevole alla colonizzazione da parte di questo patogeno. In altre parole ci proponiamo di verificare cosa succeda quando questo circolo vizioso – bisogno di IL-1 $\beta$  per l'infezione di PA e produzione di IL-1 $\beta$  come effetto dell'infezione da PA- venga spezzato.

**Metodi** Il progetto si articola su due livelli: a livello di PA il nostro obiettivo è quello di identificare quelle molecole batteriche che sono in grado di stimolare la produzione di questa citochina. A livello dell'infiammazione nell'ospite, abbiamo pianificato un doppio approccio che sfrutta l'uso di modelli murini di infezione polmonare acuta con PA. In questo ambito, il progetto prevede l'impiego di topi difettivi nei processi chiave che regolano la produzione di IL-1 $\beta$  e, in parallelo, la somministrazione di anticorpi funzionali contro il-1 $\beta$  nei topi selvatici (ovvero non difettivi).

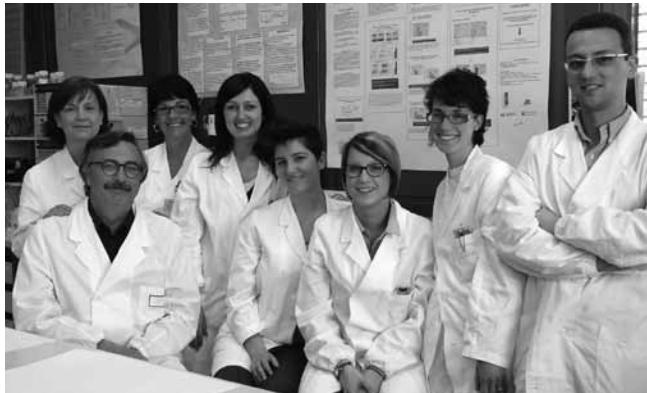
**Risultati preliminari** I risultati di questo primo anno di progetto che integrano entrambi gli approcci ci hanno permesso di stabilire che l'eccessiva produzione di IL-1 $\beta$  esacerba gli effetti dell'infezione di PA e che il blocco funzionale di questa citochina può avere un ruolo benefico sulla gravità dell'infiammazione.

**Possibili ricadute per ricerca e clinica** Molecole per uso terapeutico anti- IL-1 $\beta$  sono già commerciali ed analizzate in trials nell'ambito di quelle patologie dove il ruolo fondamentale di questa citochina è stato già accertato. Questo progetto mira a valutare se queste molecole già presenti sul mercato possano essere utilizzate per alleviare la sintomatologia clinica nei malati di CF.

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

**Cabrini G<sup>1</sup>, Pinton P<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Dip. Patologia e Diagnostica, Università di Verona, <sup>2</sup>Dip. Medicina Sperimentale e Diagnostica, Università di Ferrara (FFC Project#19/2011)



Giulio Cabrini, primo da sinistra, con il gruppo di ricerca

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

**Hypothesis and objectives** The main objective of this project is to test the hypothesis that reduction of the activity of PLCB isoforms reduces the excessive release of IL-8, mitigating the inflammatory response without completely blunting its anti-infective role.

**Methods** Analysis of the inflammatory response is carried on in human bronchial epithelial cells *in vitro*.

**Preliminary results** In the first year of the project we observed that isoforms PLCB1, 3 and 4 play a redundant and complementary role in bronchial epithelial cells, strengthening the hypothesis that targeting one of them could mitigate the excessive lung inflammation without blunting the anti-infective response. Since we previously identified Ser845Leu variant as protective in regards of the progression of lung disease in CF patients, we started investigating its role in controlling PLCB3 function.

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

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

**Ragioni dello studio** È stato riportato che una ridotta espressione di IL-8 proteina è protettivo rispetto alla gravità della progressione della malattia polmonare in pazienti con fibrosi cistica. Abbiamo precedentemente rilevato, da una indagine genotipo-fenotipo su 135 geni candidati della rete di

segnali intracellulari pro-infiammatori, che isoforme di fosfolipasi C (PLC) isoforma beta (PLCB) sono in associazione con la progressione della malattia polmonare nei pazienti FC e che la isoforma PLCB3 è coinvolta nell'aumentare l'espressione di IL-8 in cellule epiteliali bronchiali dopo esposizione a *P. aeruginosa*.

**Ipotesi e obiettivi** L'obiettivo principale di questo progetto è di verificare l'ipotesi che la riduzione dell'attività di isoforme PLCB riduce l'eccessivo rilascio di IL-8, attenuando l'eccessiva risposta infiammatoria in fibrosi cistica senza abolire completamente il suo fondamentale ruolo di difesa anti-infettiva.

**Metodi** Analisi della risposta infiammatoria sono condotte in modelli di cellule epiteliali bronchiali *in vitro*.

**Risultati preliminari** Nel primo anno del progetto abbiamo verificato come le isoforme PLCB1, 3 e 4 svolgono un ruolo ridondante e complementare nelle cellule epiteliali bronchiali, rafforzando l'ipotesi di poter ridurre l'eccessiva infiammazione senza annullare la risposta immunitaria anti-infettiva. Poiché avevamo identificato che la variante Ser845Leu è protettiva nei confronti della patologia polmonare dei pazienti fibroscistici, abbiamo iniziato a verificare il suo ruolo nel regolare la funzione di PLCB3.

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

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

**Evangelista V<sup>1</sup>, Romano M<sup>2</sup>**

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



Virgilio Evangelista, primo a sinistra, e il suo gruppo di ricerca

**Background** Current therapies lack of specific approaches to tackle the two main steps of the neutrophilic inflammation in CF: a) Exaggerated recruitment and b) Functional alterations of neutrophils migrated into the lungs.

**Hypothesis and objectives** 1) To define the impact of PDE4 blockade on adhesive, functional and biochemical responses of neutrophils, potentially relevant to the pathogenesis of pulmonary disease in CF, in *in vitro* models. 2) To validate the concept that PDE4 may be a potential target to reduce neutrophilic inflammation *in vivo* in CFTR-null mice.

**Methods** The 1st year of the project was focused on *in vitro* studies aimed to define the impact of PDE4 blockade on adhesive, functional and biochemical responses of human

neutrophils treated with CFTRinh-172 to reproduce CFTR dysfunction.

**Results** We observed that selective PDE4 blockade: i) Reduced neutrophil transmigration on endothelial monolayer under dynamic flow conditions. ii) Suppressed NETs release. iii) Preserved neutrophil morphological integrity. iv) Reduced release of Annexin-V-binding microparticles. v) Restrained myeloperoxidase into the cytoplasmic granules of neutrophils. Moreover, PDE4 inhibitor-treated neutrophils remained morphologically intact for several hours and underwent physiological apoptosis. Selective inhibitors of SFK, PI3K-p110b and PI3K-p110 but not of PI3K-p110 / and PI3K-p110 reduced neutrophil "nettosis". PDE4 blockade prevented time-dependent phosphorylation of Pyk2-Tyr579/Tyr580 and Akt-Ser-473, uncovering a novel mechanism of action of PDE4 inhibitors on "nettosis". Finally, compared to controls, CFTRinh-172-treated neutrophils produced higher amounts of IL-8 that were enhanced by PDE4 inhibition. Notably, in most of the experimental settings, PDE4 inhibitors showed increased pharmacological activity with CFTRinh-172-treated neutrophils, suggesting an unexpected functional interaction between CFTR and PDE4-regulated signaling events. Studies with neutrophils from CF patients are underway to confirm this hypothesis.

**Spin-off for research & clinical purposes** Our study strongly supports the role of PDE4 as a novel target to "correct" the neutrophilic inflammation in CF. We hypothesize that local administration of PDE4 inhibitors, may sustain a local signal that may drive neutrophilic inflammation towards physiological resolution.

## Fosfodiesterasi tipo-4 (PDE4) come potenziale bersaglio farmacologico per ridurre l'infiammazione neutrofilica e il danno polmonare nella fibrosi cistica

**Ragioni dello studio** Le attuali terapie mancano di interventi specifici adatti a ridurre i due principali fattori alla base dell'infiammazione neutrofilica nei polmoni di pazienti con FC: a) l'eccessivo reclutamento b) le alterazioni funzionali dei neutrofili migrati nei polmoni.

**Ipotesi e obiettivi** 1) Definire l'impatto del blocco farmacologico delle fosfodiesterasi (PDE)-4 sulle risposte adesive, funzionali e biochimiche, nei neutrofili, potenzialmente rilevanti nella patogenesi della patologia polmonare. 2) Validare l'ipotesi che le PDE4 rappresentino un bersaglio farmacologico rilevante per la FC in modelli in vivo in topi CFTR-deficienti.

**Metodi** Il 1° anno di attività del progetto è stato concentrato su studi vitro con l'obiettivo di caratterizzare l'effetto farmacologico di inibitori selettivi di PDE4 su una serie di risposte funzionali e biochimiche in neutrofili umani trattati con il CFTRinh-172 allo scopo di riprodurre l'alterazione funzionale del CFTR.

**Risultati** Abbiamo osservato che l'inibizione selettiva di PDE4: i) riduce la capacità dei neutrofili di avviare il processo di trasmigrazione su cellule endoteliali in condizioni di flusso dinamico, ii) inibisce il rilascio di DNA sotto forma di "neutrophil extracellular traps" (NETs), iii) preserva l'integrità morfologica dei neutrofili, che vanno incontro ad apoptosi fisiologica, iv) riduce il rilascio di microparticelle che legano Annexina-V e v) il rilascio di mieloperossidasi.

Paragonati ai controlli, i neutrofili trattati con CFTRinh-172 producono maggiori quantità di IL-8, che vengono ulteriormente aumentate da inibitori di PDE4. Per tutte le funzioni analizzate, inibitori di PDE4 mostrano una maggiore efficacia farmacologica nei neutrofili con CFTR inibito rispetto ai neutrofili normali, suggerendo una insospettabile interazione funzionale tra attività del CFTR e le vie di segnale regolate da PDE4. Questa ipotesi verrà testata in studi con neutrofili isolati da pazienti FC.

**Possibili ricadute per ricerca e clinica** I nostri risultati supportano fortemente il ruolo di PDE4 come nuovo bersaglio per promuovere una "correzione" della infiammazione neutrofilica nella FC, e permettono di ipotizzare che la somministrazione locale per via inalatoria di questi farmaci può sostenere localmente un segnale che guida l'infiammazione neutrofilica nella direzione della risoluzione. Inibitori orali di PDE4, sono già in uso clinico, altri sono in fase avanzata di sperimentazione per il trattamento della BPCO. La dimostrazione di efficacia di queste molecole nella nostra sperimentazione preclinica potrebbe portare ad una sufficientemente rapida sperimentazione clinica nella FC.

## 32. Targeting ceramide metabolism as a pharmacological strategy in cystic fibrosis

Ghidoni R<sup>1</sup>, Caretti A<sup>1</sup>, Signorelli P<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lab Biochemistry and Mol Biology, Dept Medicine, San Paolo Hospital, University of Milan, Milano (Italy) (FFC Project#22/2011)



Riccardo Ghidoni con due collaboratrici al progetto di ricerca

**Background** Sphingolipids are structural molecules endowed of key intra- and extra-cellular signalling activities. Ceramide is a key member of this lipid class known as a therapeutic target in cancer, Parkinson, Alzheimer, Batten disease and Amyotrophic Lateral Sclerosis and Retinitis Pigmentosa. Recent findings demonstrate that CFTR deficiency caused age-related ceramide accumulation in respiratory epithelium. Increased ceramide content was found in nasal respiratory epithelial cells from human CF patients. Pharmacological targeting of ceramide was successfully used in a phase II study in CF patients. The major outcome of the CFTR mutation is a persistent mucosa inflammation that favors lung infection with opportunistic bacterial pathogens. The vicious loop of inflammation/infection culminates in lung destruction. Sphingolipid metabolites are intimately modulated within inflammatory processes and many studies have demonstrated that sphingolipid mediators or modulators finely tune different phases of inflammatory response, both in mucosa epithelia and in infiltrate.

**Hypothesis and Objective** With the aim of demonstrating that sphingolipid metabolism is a suitable pharmacological target to counteract inflammation and infection in CF, this project will investigate the effect of de novo ceramide synthesis inhibitors in human epithelial CF cells in culture and in CF mice models.

**Methods** The efficacy of a novel solid lipid nanocarrier will be evaluated in CF mice for pulmonary delivery of the drugs and an innovative method of intra-tracheal injection will be performed by mean of a microsprayer nebulization. Sphingolipid profile will be evaluated by LC-MS and inflam-

mation and infection will be evaluated in CF mice infected with *P. aeruginosa*.

**Preliminary results** Inhibition of de novo sphingolipid synthesis inhibition corrected high ceramide level and cytokines release, both in basal and TNF $\alpha$  stimulated CF human epithelial cells. De novo sphingolipid synthesis inhibition in CF mice lung, obtained by nanocarriers drug delivery and intratracheal nebulization, significantly reduced lung inflammatory cytokines levels upon acute infection with *P. aeruginosa*.

**Spin off for research and clinical purposes** The results of the present project will assess how sphingolipid de novo synthesis inhibitors can be addressed in CF clinical trials. The main objective is to obtain an aerosol-like formulation containing drug loaded solid lipid nanocarriers, suitable for spin-off formation and clinical application.

## Modulazione del metabolismo del ceramide nella terapia della fibrosi cistica

**Ragioni dello studio** Il paziente con Fibrosi Cistica (FC) ha uno stato di infiammazione cronica polmonare, causato da anomalie nelle secrezioni che proteggono le mucose. L'infiammazione cronica favorisce le infezioni di patogeni opportunisti e provoca danni strutturali ai tessuti (fibrosi). I farmaci attualmente usati in clinica sono nuove generazioni di antibiotici, che però spesso non riescono a penetrare le comunità di patogeni (biofilm) o vengono eluse da meccanismi di resistenza. Ci proponiamo di sperimentare, in modelli animali di FC, molecole in grado di correggere l'anomalo stato infiammatorio che sottende alle infezioni. Tali molecole agiscono bloccando la produzione di sfingolipidi, una classe di mediatori del segnale noti per il loro coinvolgimento in altre patologie a carattere cronico e spesso ereditario, come i tumori, Parkinson, Alzheimer, Sclerosi laterale amiotrofica e Retinite Pigmentosa. Nelle vie respiratorie sia di modelli animali che di pazienti FC è stata riscontrata una eccessiva presenza di particolari sfingolipidi, associabile allo stato infiammatorio e suscettibilità all'infezione.

**Ipotesi ed obiettivi** Ci proponiamo di verificare che inibitori della produzione di sfingolipidi, somministrati ad animali FC, siano in grado di ridurre l'eccessiva risposta infiammatoria e di garantire un sensibile miglioramento nelle capacità dell'animale a combattere l'infezione polmonare di *P. aeruginosa*.

**Metodi** La necessità di distribuire il farmaco in modo omogeneo nelle vie respiratorie e di trattare l'animale ripetutamente con minima invasività e sofferenza possibili, ci hanno spinto a ricorrere alle nanotecnologie e ad utilizzare nanoparticelle come diffusori del potenziale farmaco con una tecnica innovativa di nebulizzazione intra-trachea mediante micro-sprayer.

**Risultati preliminari** Uno degli inibitori proposti corregge l'anomalia lipidica delle cellule umane epiteliali FC in coltura e si associa alla capacità di spingere l'eccessiva produzione di citochine infiammatorie.

In vivo, le nano particelle sono un ottimo carrier per la diffusione polmonare e il farmaco proposto è in grado di ridurre la risposta infiammatoria polmonare causata da infezione acuta con *P. aeruginosa*.

**Possibili ricadute per la ricerca clinica** L'obiettivo finale è la formulazione di un prodotto che possa funzionare da simil-aerosol e che possa essere usato anche per periodi lunghi (in cronico) al fine di controllare l'eccessiva infiammazione limitando la suscettibilità alle infezioni. Un tale prodotto di ricerca meriterebbe di essere preso in considerazione per la ricerca clinica.

## 33. Polyethylenimine-engineered respirable particles delivering a decoy oligonucleotide to NF- $\kappa$ B: a novel combination therapy for cystic fibrosis?

Quaglia F<sup>1</sup>, Carnuccio R<sup>2</sup>

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



Fabiana Quaglia, al centro del suo gruppo di ricerca

**Background** Nuclear Factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) is activated in CF and, thus, play a key role in lung chronic inflammation. We have previously developed particles (LPP) for the pulmonary delivery of a decoy oligodeoxynucleotide against NF- $\kappa$ B (dec-ODN), which represent the first example of dry powder for oligonucleotide inhalation. LPP exhibit a prolonged inhibition of bronchoalveolar neutrophil infiltration as well as cytokine expression induced by LPS as compared to the naked dec-ODN (FFC #5/2007).

**Hypothesis and objectives** Besides chronic inflammation, multifunctionality aimed at controlling also infection and iper-production of a viscous mucus is required in CF treatment. In the light of its osmotic nature, proved antibacterial properties toward Gram (-) bacteria, and potential mucolytic effect, poly(ethyleneimine) (PEI) could represent an interesting candidate to provide additional properties to dec-ODN LPP. Thus, the goal of this project is the development of novel multipurpose respirable LPP modified with PEI for dec-ODN pulmonary delivery (LPP<sub>PEI</sub>).

**Methods** During the first year of the project, we have investigated how PEI addition in LPP may affect those carrier properties considered crucial to the development of therapeutically-relevant delivery systems. The effect of dec-ODN released from LPP<sub>PEI</sub> on the expression of IL-8 in LPS-stimulated CF human bronchial epithelial IB3-1 cells was assessed. Afterwards, taking into account that mucin gene expression in lung disease is regulated by inflammatory mediators and *P. aeruginosa* LPS induces the expression of MUC2 gene via NF- $\kappa$ B, we studied the effects of LPP<sub>PEI</sub> on MUC2 gene expression in LPS-stimulated mucoepidermoid carcinoma cells (NCI-H292).

**Preliminary results** The developed LPP<sub>PEI</sub> are respirable upon delivery from a breath-actuated dry powder inhaler, exert a temporal control over dec-ODN released amounts, while preserving its integrity, and cause a persistent inhibition of important pro-inflammatory mediator expression (IL-8 and MUC2) as compared to naked dec-ODN. In particular, LPP engineering with PEI plays an important role in controlling mucin gene expression and, in turn, may represent a key factor for the *in vivo* improvement of an inhalation therapy based on dec-ODN.

**Spin-off for research & clinical purposes** These results prompt us to go in depth into *in vivo* safety and potential of LPP<sub>PEI</sub> in CF treatment, with particular regard to further roles of PEI as multipurpose agent. In perspective, PEI-engineered respirable particles for dec-ODN may represent a valid therapeutic support in CF therapy and move nucleic acid inhalation from the laboratory bench to the clinic.

## Particelle respirabili modificate con poli (etilenimina) per la veicolazione di un oligonucleotide decoy contro il fattore di trascrizione nucleare NF-κB: una nuova strategia per la terapia combinata della fibrosi cistica?

**Ragioni dello studio:** Nei nostri laboratori sono state sviluppate, con il supporto della FFC, polveri respirabili, denominate LPP, contenenti un oligonucleotide decoy diretto contro il fattore di trascrizione NF-κB (dec-ODN), che regola l'espressione di geni pro-infiammatori coinvolti in FC. Tali sistemi microparticellari, biocompatibili e biodegradabili, rappresentano il primo esempio di polveri secche per l'inalazione di oligonucleotidi che, testate in modelli animali, hanno mostrato di distribuirsi omogeneamente nel polmone e di inibire in maniera prolungata la produzione di importanti mediatori dell'infiammazione.

**Ipotesi e obiettivi:** Il trattamento terapeutico dell'infiammazione polmonare in FC è condizione necessaria ma non sufficiente per la regressione della patologia, che richiede una combinazione di farmaci mirati tra l'altro alla rimozione delle secrezioni bronchiali e delle infezioni respiratorie. L'idea alla base di questo progetto è di sviluppare delle particelle respirabili contenenti dec-ODN potenziate nell'effetto grazie all'aggiunta di poli(etilenimina) (PEI), un eccipiente multifunzionale, il cui uso in FC si è rivelato particolarmente promettente per le sue proprietà osmotiche, la comprovata attività antibatterica verso i Gram (-) e la potenziale attività mucolitica.

**Metodi:** In questo primo anno di studi, sono state progettate e sviluppate nuove LPP contenenti dec-ODN e PEI (LPP<sub>PEI</sub>) ottimizzate per il rilascio prolungato del dec-ODN nel polmone. Particolare attenzione è stata dedicata alla valutazione dell'effetto della PEI su proprietà aerosolizzanti e di rilascio e del sistema, considerate rilevanti ai fini terapeutici. È stato, quindi, valutato il profilo di attività delle LPP<sub>PEI</sub> sull'espressione di alcuni geni responsabili della produzione di fattori pro-infiammatori regolati dal fattore di trascrizione NF-κB, in specifiche cellule epiteliali umane delle vie aeree.

**Risultati preliminari:** Le LPP<sub>PEI</sub> sono respirabili dopo erogazione da un inalatore di povere secca respiro-attivato, rilasciano il dec-ODN in forma integra per tempi prolungati e determinano, rispetto al dec-ODN non veicolato, un'inibizione prolungata dell'espressione di interleuchina-8 e mucina-2. In particolare, l'ingegnerizzazione delle LPP con PEI svolge un ruolo importante nel controllo dell'espressione del gene per la mucina, con evidenti ricadute in campo applicativo del sistema di veicolazione oggetto di studio.

**Possibili ricadute per ricerca e clinica:** Sulla base dei risultati incoraggianti sinora ottenuti, si potrà procedere alla valutazione della sicurezza d'impiego e del potenziale terapeutico in FC delle LPP<sub>PEI</sub>, con particolare riguardo al ruolo della PEI come eccipiente multifunzionale. In prospettiva, le particelle respirabili per il rilascio prolungato di dec-ODN possono rivelarsi un valido strumento di supporto alla terapia della FC. I risultati attesi potrebbero consentire un ulteriore passo in avanti della ricerca verso l'applicazione di acidi nucleici in campo clinico.

## 34. Structure-activity relationships (SAR) of neoglycoconjugates derived from deoxynojirimycin as possible therapeutic agents for cystic fibrosis lung disease, by modulating the metabolism of sphingolipids

**Dechechchi MC<sup>1</sup>, Becq F<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Lab. Patologia Molecolare, Laboratorio Analisi AOUI, Verona), <sup>2</sup>Inst. Physiologie et Biologie Cellulaires, Université de Poitiers, France (FFC Project#14/2012)



In alto, Maria Cristina Dechechchi, prima a destra, con il gruppo di ricerca e, in basso, il gruppo francese di Frédéric Becq (al centro)

**Background** strategies aimed to limit the excessive inflammatory response are a relevant approach for CF patients. Recent findings suggest that the pathophysiology associated with CF may be at least partly corrected by interfering with sphingolipid (SL) metabolism, already known to play a crucial role in the pathogenesis of several lung diseases. Under a previous FFC grant we demonstrated that the iminosugar, N-butyl deoxynojirimycin (NB-DNJ, miglustat) produces an anti-inflammatory effect *in vitro* and *in vivo*, reduces the *P. aeruginosa*-induced immunoreactive ceramide expression and restores the defective F508del CFTR function.

**Hypothesis and objectives** miglustat inhibits different enzymes involved in SL metabolism that could lead to eventual off-target effects, raising concerns about the efficacy of the treatment. Therefore we need to address research toward the biochemical pathways that are impacted by miglustat, to facilitate the design of more potent derivatives with high potential as therapeutic agents for CF lung disease. Our preliminary results, using inhibitors of different enzymes of SL metabolism, strengthen the concept that targeting different pathways in SL metabolism with the final goal to reduce ceramide, both through inhibition of hydrolysis of GlcCer or biosynthesis of ceramide, might offer a therapeutic tool for limiting the excessive lung inflammation in CF patients. A library of neoglycoconjugates derived from the lead compound deoxynojirimycin with an adamantane (AMP-DNJ) moiety, has been synthesized

and shown to enable efficient modulation of their biological activity. This study is aimed to perform a SAR on these compounds as anti-inflammatory agents by modulating SLs.

**Methods** the AMP-DNJ derivatives will be tested in bronchial cell lines for their effect on expression of the main chemokine IL-8, as primary read-out system of inflammatory response to *P. aeruginosa*, and modulation of intracellular ceramides. The most promising derivatives will be then tested in CF primary human airway cells grown at ALI for their effect on: i) expression of key genes involved in the inflammatory response to *P. aeruginosa* and ii) rescue of F508del-CFTR function. Selected compounds shown to be the most effective anti-inflammatory molecules in CF primary cells will be tested in murine lung models infected with *P. aeruginosa*, in term of lung inflammation and infection.

**Spin-off for research & clinical purposes** The anticipated output of this study is to develop powerful iminosugars, DNJ derivatives that could provide novel therapeutic options for CF lung inflammation and to generate knowledge about relevant targets, pathways and chemical structures that may be used as starting points for a drug discovery campaign.

## Relazione struttura-attività(SAR) di nuovi glicocconiugati, derivati da deoxynojirimicina che agiscono sul metabolismo degli sfingolipidi, come possibili farmaci per la malattia polmonare in fibrosi cistica

**Ragioni dello studio** Le strategie mirate a limitare l'eccessiva risposta infiammatoria rappresentano un obiettivo terapeutico rilevante per i pazienti con FC. Studi recenti suggeriscono che l'infiammazione polmonare in FC potrebbe essere normalizzata, almeno in parte, interferendo con il metabolismo degli sfingolipidi (SLs), che sono noti svolgere un ruolo critico nella patogenesi di molte malattie polmonari. Grazie ad un precedente finanziamento della FFC, abbiamo dimostrato che l'imino zucchero n-butil deossinorimicina (NB-DNJ, miglustat) produce un effetto anti-infiammatorio *in vitro* e *in vivo*, riduce l'accumulo dello SL ceramide indotto da *P. aeruginosa* e corregge la funzione della proteina mutata CFTR F508del.

**Ipotesi e obiettivi** l'attività del miglustat su differenti enzimi coinvolti nel metabolismo degli SLs potrebbe avere effetti collaterali indesiderati, diminuendone l'efficacia. Quindi occorre indirizzare la ricerca verso i bersagli molecolari del miglustat in modo da sviluppare nuovi composti sempre più specifici e, possibilmente con effetti avversi limitati. I nostri risultati preliminari, ottenuti utilizzando diversi inibitori di enzimi del metabolismo degli SLs, rafforzano l'idea che la modulazione di diverse attività enzimatiche, mirata a ridurre la ceramide inibendo sia l'idrolisi di glucosil ceramide che la biosintesi di ceramide, potrebbe fornire un'opportunità terapeutica specifica per l'infiammazione polmonare FC. Partendo dal composto DNJ è stata prodotta una serie di nuovi imino zuccheri, coniugati ad adamantina (AMP-DNJ), già ben caratterizzati in termini di profilo d'inibizione degli enzimi del metabolismo degli SLs e di attività sulla funzione della proteina CFTR. Con questo progetto proponiamo di studiare una relazione tra struttura ed attività (SAR) di questi composti, come possibili anti-infiammatori, modulando le ceramidi.

**Metodi** analoghi di AMP-DNJ verranno inizialmente valutati in linee cellulari bronchiali per il loro effetto sulla trascrizione della principale chemochina IL-8, come marcatore di risposta infiammatoria all'infezione da *P. aeruginosa*, e sulla modulazione di ceramidi. I derivati più promettenti saranno poi valutati in colture primarie di pazienti FC in termini di: i) espressione di geni chiave coinvolti nella risposta infiammatoria a *P. aeruginosa*, ii) funzione difettosa della proteina CFTR F508del. Gli analoghi che risulteranno efficaci in colture primarie FC saranno poi analizzati in modelli murini di infezione polmonare da *P. aeruginosa*.

**Possibili ricadute per ricerca e clinica** È auspicabile che i risultati di questo studio portino ad individuare nuovi derivati di DNJ in grado di ridurre specificamente l'infiammazione polmonare FC. Questa ricerca avrà ricadute sulla identificazione di alcuni possibili bersagli molecolari e strutture chimiche rilevanti che potrebbero in futuro rappresentare il punto di partenza per la scoperta di nuovi farmaci.

## 35. The Heme-oxygenase 1 (HO-1) as modulator of Cystic Fibrosis lung disease

**Raia V<sup>1</sup>, Bruscia E<sup>2</sup>, Maiuri L<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Department of Pediatrics, Federico II University; Naples,

<sup>2</sup>Department of Pediatrics, Yale University School of Medicine; USA, <sup>3</sup>European Institute for Research in Cystic Fibrosis (IERFC), San Raffaele Scientific Institute; Milan (FFC Project#15/2012)



Valeria Raia, coordinatrice del progetto (foto a sinistra seduta) e i partner Emanuela Bruscia (seconda foto) e Luigi Maiuri con collaboratori (foto a destra)

**Background.** In Cystic Fibrosis (CF) pathology, the tightly regulated relationship between oxidative stress and inflammation is unbalanced, as a consequence of defective CFTR function. This favors chronic lung inflammation, susceptibility to bacterial infection and colonization and tissue damage over time. More recently, non-functional CFTR in macrophages has been associated with increased responsiveness to inflammatory stimuli and reduced bactericidal activity, adding complexity to the CF pathophysiology. Importantly, oxidative stress in CF cells causes inhibition of a cellular catabolic mechanism, autophagy, which is fundamental for preserving cellular homeostasis ensuring inadequate cellular response to environmental (e.g. pathogens) and endogenous challenges (e.g. metabolites deprivation, damaged cellular organelles and protein aggregates). Thus targeting oxidative stress and inflammation in CF may ameliorate many aspects of the disease. However, the mechanisms by which lack of functional CFTR leads to an unregulated control of oxidative stress and inflammation is still not fully understood. We have compelling data showing that CF cells (airway epithelial cells and macrophages) have defective induction of the heme-oxygenase 1 (HO-1), which is a key cellular pathway that once induced modulates the redox status of the cells, the inflammatory response, autophagosome formation and bacterial killing.

**Objectives.** We hypothesized that decreased HO-1 induction in CF cells leads to unbalanced redox regulation together with defective induction of cytoprotective pathways (e.g. anti-inflammatory response, autophagy and bacterial killing) during inflammatory insults, which exacerbate CF lung pathology. We will test whether: 1) reduced induction of the HO-1 pathway contributes to CF-related oxidative stress and hyper-inflammation; 2) defective HO-1 pathway in CF cells impairs expression of anti-oxidant genes; 3) re-established HO-1 path-

way rescues autophagy in CF cells; and 4) HO-1 pathway can re-establish the reduced bacterial killing capability in CF MΦs.

**Methods.** We will use pharmacological (we will use FDA approved drugs that are known to modulate HO-1 activity) or genetic reconstitution (by plasmid and viral vectors) for modulating the HO-1 pathway in *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* models of CF.

**Expected Results.** We expect that modulation of the HO-1 pathway mitigates oxidative stress and hyper-inflammation and restores autophagy in CF cells and CF mouse models. At the end of this study, we will understand whether modulation of this pathway can be beneficial for CF.

**Spin-off for research and clinical purposes.** Understanding the implications of HO-1 modulation in CF may pave the way for identification of innovative molecular targets for therapeutic intervention that may help to ameliorate many aspects of CF-related lung disease.

## L'eme-ossigenasi 1(HO-1): potenziale modulatore della patologia polmonare in fibrosi cistica

**Ragioni dello studio** Nei polmoni dei pazienti affetti da Fibrosi Cistica (FC), il difettivo funzionamento della proteina CFTR è associato ad un alterato controllo della risposta infiammatoria e un eccessivo stress ossidativo. Queste condizioni favoriscono l'infiammazione cronica, la suscettibilità ad infezioni batteriche croniche, e al danno del tessuto polmonare. A complicare l'evoluzione della patologia polmonare FC contribuiscono anche cellule del sistema immunitario, i macrofagi, che, in assenza di CFTR funzionale, hanno un'incrementata produzione di citochine pro-infiammatorie e sono meno efficienti nell'eliminare i batteri fagocitati. In aggiunta, lo stress ossidativo in cellule FC (epiteliali e immunitarie) causa l'inibizione di un importante meccanismo catabolico cellulare, l'autofagia, la cui funzionalità è fondamentale per garantire il mantenimento dell'omeostasi cellulare. L'autofagia è necessaria per facilitare la riposte cellulare a stress esterni (per esempio invasione di patogeni) e intracellulari (come riduzione di metaboliti, danno di organelli cellulari o formazione di aggregati proteici). È plausibile ipotizzare che controllare la risposta infiammatoria e lo stress ossidativo in FC possa mitigare molti aspetti associate alla patologia polmonare. Ad oggi, i meccanismi che associano la mancata funzionalità del CFTR con l'iper-infiammazione e stress ossidativo non sono conosciuti. Il nostro gruppo ha recentemente scoperto che l'induzione di un'importante proteina coinvolta nella regolazione redox cellulare, infiammazione, autofagia e attività battericida, l'eme-ossigenasi 1 (HO-1), è difettosa in cellule FC (epitelio e macrofagi).

**Obiettivi** In questo studio noi ipotizziamo che la difettosa induzione dell'HO-1 in cellule FC contribuisce allo stress ossidativo e alla ridotta attivazione di meccanismi citoprotettivi, quali mediatori anti-infiammatori, autofagia e attività battericida, aggravando così la patologia polmonare in FC. Questo studio propone i seguenti obiettivi: 1) testare l'ipotesi che la ridotta induzione di HO-1 contribuisce allo stress ossidativo e iper-infiammazione in FC; 2) testare l'ipotesi che la ridotta induzione di HO-1 direttamente contribuisce alla ridotta trascrizione di gene anti-infiammatori in FC; 3) testare l'ipotesi che il ripristino del pathway dell'HO-1 ristabilisce la risposta autofagica in FC; 4) testare l'ipotesi che il ripristino del pathway dell'HO-1 ristabilisce l'attività battericida in macrofagi FC.

**Metodi** Proponiamo di modulare l'attività di HO-1 con 1) sostanze che sono in grado di stimolare questa risposta difensiva e sono già utilizzati per altre patologie (e quindi già disponibili per i pazienti); 2) manipolazioni genetiche (mediante vettori plasmatici e virali). La modulazione dell'HO-1 sarà testata in modelli FC *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo*.

**Risultati attesi** Ci aspettiamo che la difettosa induzione di HO-1 in un contesto FC contribuisca allo stress ossidativo e

all'iper-infiammazione. Questo studio permetterà di valutare se la modulazione di HO-1 può avere effetti benefici per la patologia polmonare FC.

**Possibili ricadute per ricerca e clinica** La comprensione del ruolo dell'HO-1 nella modulazione dei difetti cellulari associati alla mancanza di CFTR funzionale potrebbe portare all'identificazione di nuovi targets molecolari per potenziali interventi terapeutici atti a migliorare la patologia polmonare FC.

## 36. Targeting pathogenic pathways leading to inflammatory Th17 responses in cystic fibrosis: a drug discovery approach

**Romani L'**

<sup>1</sup>Dipartimento di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche/Microbiologia, Perugia (FFC Project#16/2012)



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

**Background** Hyperactivation of the Th17 pathway, that negatively affects indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)-dependent immune tolerance, is causally related to the unresolved inflammation and susceptibility to allergic broncho-pulmonary aspergillosis (ABPA), the main clinical form of Aspergillus disease in CF. Several lines of evidence suggest that hypoxia is a double edged sword of immunity, in that divergently regulates the innate and adaptive immunity. Specifically, hypoxia enhances Th17 cell development while attenuating IDO-dependent tolerance, thus potently regulating the Th17/Treg cell balance. Beside regulating CFTR expression, hypoxia contributes to tissue inflammation by increasing the expression of the receptor for advanced glycation end products (RAGE), a multiligand receptor that is expressed at high levels in the lungs and released as soluble forms (*s*RAGE).

**Hypothesis and objectives** There is one additional aspect that leads us to believe that hypoxia may have a previously unrecognized role in the host susceptibility to infection.

**Methods** We propose to:

1. Assess the functional association of hypoxia and the Th17/Treg cell axis in experimental and human CF. 2. Assess the involvement of the RAGE/*s*RAGE axis downstream hypoxia signalling. 3. Develop pharmacological strategies to minimize the hypoxia/RAGE axis and counteract the excessive inflammatory response driven by the Th17/Treg imbalance. 4. Evaluate the impact of hypoxia on the effects of antifungals *in vivo* in experimental CF. 5. Discover the potential associations between single nucleotide polymorphisms (SNPs) and the HIF-1 $\alpha$ /RAGE genes, susceptibility to fungal diseases and predictive response to antifungal therapy in CF.

**Expected results** Deficiencies in *s*RAGE are linked to heightened inflammation in various chronic conditions, including invasive aspergillosis. Thus, measurement of *s*RAGE

levels may represent a novel biomarker for RAGE ligand related pathogenic states.

**Spin-off for research & clinical purposes** This may provide means for improving not only host response to fungal infections but also the therapeutic efficacy of current antifungal therapies in CF.

## Studio, identificazione e “targeting” di meccanismi responsabili dell’attivazione di risposte infiammatorie Th17 nella CF.

**Ragioni dello studio** L’infiammazione e le infezioni respiratorie ricorrenti sono importanti cause di morbosità e morbilità nella fibrosi cistica (FC) e giustificano la terapia antibiotica combinata con anti-infiammatori. Noi abbiamo dimostrato che una eccessiva attivazione di linfociti T producenti IL-17A (subset Th17) è causalmente associata allo stato di infiammazione cronica in modelli sperimentali di CF e che determinati polimorfismi genetici di IDO si associano a rischio di infiammazione/infezione nella CF umana.

**Ipotesi e obiettivi** In questo progetto vogliamo perseguire tale studio andando ad indagare su meccanismi a monte dell’attivazione della risposta patogenetica Th17 e, tra questi, l’ipossia.

**Metodi** Per tutte queste considerazioni, abbiamo motivi per ritenere che l’ipossia, in seguito al doppio ruolo giocato sull’ospite e sul patogeno, possa costituire un bersaglio terapeutico unico in CF e superiore al blocco della risposta Th17 che, ancorchè eccessiva, è pur sempre fisiologica.

**Risultati attesi** Il razionale del nostro progetto si basa sulle seguenti considerazioni: 1. l’ipossia è presente in molti stati di infiammazione cronica nell’uomo; 2. l’adattamento all’ipossia comporta una serie di modifiche genetiche ed epigenetiche risultanti in disregolazione immunitaria, infiammazione cronica ed autoimmunità; 3. il recettore dell’infiammazione RAGE è infatti attivato in condizioni di ipossia; 4. la tolleranza immunologica, dipendente dall’enzima IDO, è diminuita dall’ipossia; 5. l’adattamento microbico all’ipossia può risultare in aumento di virulenza e ridotta sensibilità alla chemoterapia antimicrobica.

**Possibili ricadute per ricerca e clinica** La disponibilità di inhibitori specifici dell’ipossia permetterà di capire rapidamente se il blocco dell’ipossia sarà di efficacia terapeutica ed immunoriconstituente in CF.



Mario Romano, al centro, e il gruppo di ricerca

mechanisms of endothelial responses to CFTR dysfunction. 3. The clinical significance of monitoring circulating endothelial events. 4. Correctors of endothelial dysfunction in CF.

**Preliminary results** 1. Upon CFTR blockade, umbilical vein endothelial cells (HUVEC) exposed to inflammatory cytokines under shear flow, showed blebbing, retraction, shrinking, which were prevented by phosphodiesterase (PDE) inhibitors. 2. CFTR inhibition blunted nitric oxide generation by HUVEC. 3. We setup novel flow cytometric methodology for accurate recognition of circulating endothelial cells and microparticles.

**Project description** We plan to: 1) Isolate and culture endothelial cells from human CF lung vessels. 2) Evaluate the impact of CFTR dysfunction on endothelial readouts of inflammation. 3) Analyze the intercellular junctions of CF endothelium and biochemical events related to changes in these junctions. 4) Determine microparticle release by CF endothelial cells and their miRNA profile as well as circulating endothelial events in CF and their relationship with clinical parameters. 5) Assess whether PDE4 inhibitors protect the endothelial monolayer when CFTR is dysfunctional. To achieve these tasks, we will employ cell and molecular biology, flow cytometry, biochemical and clinical approaches on human blood samples and endothelial cells, normal and CF.

**Spin off research and clinical purposes** Data from this program can support the clinical use of PDE4 inhibitors to combat CF inflammation. Moreover, they may lead to the discovery of biomarkers of endothelial damage and repair capability for monitoring disease progression and response to treatment.

## 37. The role of vascular endothelium in cystic fibrosis inflammation

**Romano M<sup>1</sup>, Totani L<sup>2</sup>, Marchisio M<sup>3</sup>, Moretti P<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Dip. Scienze Biomediche, Università Chieti-Pescara, Lab. Medicina Molecolare, <sup>2</sup>Dip. Farmacologia Traslazionale, Consorzio “Mario Negri” Sud, Chieti, <sup>3</sup>Dip. Medicina e Scienze dell’Invecchiamento, Università Chieti-Pescara, <sup>4</sup>Centro FC, Teramo (FFC Project#17/2012)

**Background** Neutrophilic inflammation is a key pathogenetic mechanism of cystic fibrosis (CF) lung disease. The vascular endothelium represents the first barrier that neutrophils encounter in their path to the airways. If dysfunctional, endothelium may allow unchecked leukocyte extravasation and tissue accumulation, thus promoting inflammation. Although we reported peripheral signs of endothelial perturbation in CF patients, an accurate evaluation of the impact that CFTR dysfunction may have on the vascular endothelium is awaited.

**Hypothesis and Objectives** We hypothesize that the vascular endothelium plays a significant role in CF inflammation. To verify this hypothesis, we will examine: 1. The impact of CFTR dysfunction on endothelial cell barrier function. 2. Molecular

## Il ruolo dell’endotelio vascolare nell’infiammazione della fibrosi cistica

**Background** L’infiammazione neutrofilica è un meccanismo patogenetico primario nella malattia respiratoria della fibrosi cistica (FC). Le cellule endoteliali vascolari rappresentano la prima barriera che i neutrofili incontrano nel loro tragitto verso le vie respiratorie. Un endotelio disfunzionale potrebbe permettere quindi un incontrollato passaggio dei neutrofili e il loro accumulo nelle vie respiratorie e quindi l’infiammazione. Nonostante abbiano osservato segni periferici di perturbazione endoteliale nei pazienti FC, l’impatto della disfunzione del CFTR sull’endotelio rimane ancora da valutare accuratamente.

**Ipotesi e Obiettivi** Ipotizziamo che l’endotelio vascolare possa svolgere un ruolo significativo nella infiammazione della FC. Ci proponiamo quindi di studiare: a) La funzione di CFTR nelle cellule endoteliali. b) I meccanismi delle alterazioni prodotte nelle cellule endoteliali dalla disfunzione di CFTR. c) Se il monitoraggio delle cellule endoteliali circolanti abbia significato diagnostico e/o prognostico del danno endoteliale nella FC. d) Correttori per la disfunzione endoteliale nella FC.

**Risultati preliminari** 1. A seguito del blocco del CFTR, cellule endoteliali delle vene ombelicali (HUVEC) esposte a citochine infiammatorie hanno mostrato alterazioni morfolo-

giche che sono corrette da inibitori delle fosfodiesterasi (PDE). 2. Il blocco del CFTR ha soppresso il rilascio di ossido nitrico da parte delle HUVEC. 3. Abbiamo messo a punto nuove metodologie per l'identificazione di cellule e microparticelle endoteliali circolanti.

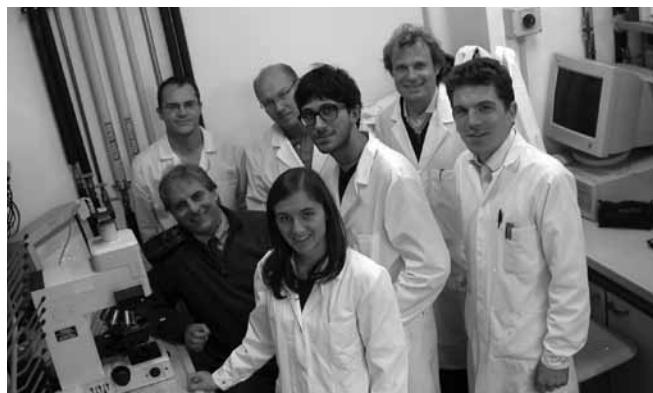
**Descrizione del progetto** Utilizzando tecniche di biologia cellulare e molecolare, citofluorimetria e approcci clinici e biochimici su campioni di sangue e cellule endoteliali normali e CF, abbiamo in programma di: 1) Isolare cellule endoteliali umane da vasi polmonari CF. 2) Valutare l'impatto della disfunzione CF su marcatori dell'infiammazione di origine endoteliale. 3) Analizzare le giunzioni intercellulari endoteliali. 4) Determinare il rilascio di microparticelle da parte delle cellule endoteliali FC e il loro contenuto in microRNA, oltre che monitorare le cellule endoteliali circolanti nella FC e la loro relazione con parametri clinici. 5) Stabilire se gli inibitori della PDE4 proteggano l'endotelio CF.

**Possibili ricadute per ricerca e clinica** Ci aspettiamo di identificare nuovi: a) Bersagli per interventi anti-infiammatori mirati nella FC. b) Marcatori biologici del danno infiammatorio nella FC della sua risposta alle terapie.

### 38. Cystic Fibrosis liver disease: the role of CFTR as regulator of epithelial innate immunity

**Strazzabosco M<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Dip. Medicina Clinica e Prevenzione, Università Milano-Bicocca, Milano (FFC Project#18/2012)



Mario Strazzabosco, seduto, attorniato dai collaboratori del progetto

**Background** CF-associated liver disease (CFLD) negatively impacts the quality of life and survival of CF patients. Consistent with the specific expression of CFTR in the biliary tree, CFLD is characterized by a chronic cholangiopathy that can eventually evolve into sclerosing cholangitis and focal biliary cirrhosis. Liver disease in patients with CF has been classically considered a consequence of the impaired bile flow and biliary alkalization caused by the defective channel function of CFTR. However, the pathogenesis of CFLD is not well understood and the treatment is limited to the administration of choleric bile acids. Using an experimental model in which CFTR-defective biliary cells were exposed to endotoxins, we have recently found that cholestasis is not the primary event involved in the induction of the biliary damage and that a "two hit phenomenon" (i.e endotoxemia) is needed to develop the liver phenotype.

**Hypothesis and objectives** Our hypothesis is that CFTR participates to the regulation of epithelial innate immunity, by controlling toll-like receptors (TLR) mediated responses. We aim to investigate the pathogenetic role of TLRs in CFLD, the

mechanistic relationships between CFTR and TLR-mediated signaling, and novel therapeutic approaches based on these interactions.

**Methods** We will study whether TLR2, 4 and 5 are regulated by CFTR in murine primary cholangiocytes cell lines, and use liver specific MyD88/CFTR double KO mice to demonstrate the pathogenetic role of TLRs in CFLD in vivo. Then, we will address the role of protein kinase Src as the mechanistic link between CFTR deficiency and TLR stimulation. We will study if blockage of Src or of TLR4 signaling prevents biliary damage in Ctr-KO mice. Finally, we will study the potential anti-inflammatory therapeutic value of PPAR agonists in vitro and vivo.

**Expected results** We expect to find that CFTR is involved in the regulation of epithelial innate immunity and that CFLD results from an altered TLRs-dependent immune response of the biliary epithelium. Also, we will prove the therapeutic benefit of interfering with several signaling proteins involved in epithelial innate responses.

**Spin-off for research & clinical purposes** These studies will change our current understanding of the pathogenesis and treatment of CF-cholangiopathy. This novel interpretation of the pathogenesis of CFLD may have important therapeutic consequences and significantly impact on the management of CFLD.

### Malattia epatica associata alla Fibrosi Cistica: ruolo del Ctr come regolatore dell'immunità innata nell'epitelio

**Ragioni dello studio** La Fibrosi Cistica (FC) è una grave e comune malattia genetica, causata da mutazioni del CFTR, una proteina che regola la secrezione di fluidi in molti organi. Alcuni pazienti con FC presentano complicanze epatiche che possono compromettere la sopravvivenza e la qualità di vita. Purtroppo una cura per le complicanze epatiche non è ancora disponibile. Nel fegato il CFTR è espresso dalle cellule dell'epitelio biliare, specializzate nella produzione della bile. Il difetto di CFTR compromette la capacità delle cellule biliari di produrre bile in quantità e qualità adeguata causando una colestasi che può evolvere in una severa disfunzione dell'organo. Tuttavia, utilizzando dei modelli sperimentali con CFTR difettivo esposti a endotossine batteriche abbiamo visto che la colestasi non è l'evento primario che determina il danno biliare ma è un'alterata risposta alle endotossine che provoca la malattia epatica.

**Ipotesi e obiettivi** Abbiamo quindi ipotizzato che la mancanza di CFTR abbia un profondo impatto sui meccanismi di difesa che in condizioni normali, proteggono il sistema biliare dalle infezioni (immunità innata). In questo progetto vogliamo studiare il ruolo di CFTR nella regolazione dell'immunità innata delle cellule epiteliali e basandoci sulle nostre osservazioni testare nuove strategie terapeutiche.

**Metodi** Utilizzeremo cellule biliari di topo normali e con CFTR mutato per determinare in vitro come CFTR regola i TLR, recettori Toll-like che riconoscono molecole associate a patogeni. Successivamente, studieremo in vivo in modelli murini, l'effetto terapeutico mediato dalla perturbazione di meccanismi coinvolti nell'attivazione di questi recettori.

**Risultati attesi** Ci aspettiamo di trovare che il CFTR è necessario per un corretto funzionamento dell'immunità innata epiteliale e che in corso di FC la complicanza epatica è il risultato di una risposta infiammatoria esagerata delle cellule biliari con CFTR difettivo.

**Possibili ricadute per ricerca e clinica** I nostri studi cambieranno l'attuale comprensione della patogenesi della coangiopatia in FC e proporranno nuove strategie terapeutiche con un significativo impatto sulla gestione dei pazienti con malattia epatica in FC.

## PLENARY SESSION 6

(no abstracts available)

### New FFC facility presentation

Galietta L

Primary Cell Cultures (PCC)

Buzzetti R

Cystic Fibrosis Database (CFDB)

## TWIN POSTER SESSION 2

### Subsession 2A Basic and applied genetics

#### 39. A field study in an area of extensive carrier screening for cystic fibrosis

Castellani C<sup>1</sup>, Picci L<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro Regionale FC, Azienda Ospedaliera Universitaria, Verona, <sup>2</sup>Clinica Pediatrica, Azienda Ospedaliera, Padova (FFC Project#8/2011)



Carlo Castellani, a sinistra, e Luigi Picci

**Background** CF carriers couples have a 1 in 4 risk of having a child with CF for each pregnancy. Testing for CF mutations and finding most CF carriers is nowadays possible, so that people can be informed of their risk of having an affected child. The offer of CF carrier tests to individuals and couples with no affected relatives (carrier screening) is widely practiced in part of Veneto, leading to a reduction in the number of births of babies with CF.

**Hypothesis and objectives** 1) to continue the monitoring of carrier screening and its relationship with CF incidence; 2) to observe the reproductive choices of couples of carriers identified by the screening system.

**Methods** The study concerns the eastern area of Veneto.

Major actions will be: - creation of a dedicated website, which will assist potential users in understanding the processes, the potential benefits and limitations and the implications of CF carrier screening and will provide information for health

professionals offering the carrier test; - development of a network of laboratories and of health care providers; - centralization of genetic counselling for carrier couples; - monitoring of laboratories results; - follow-up of carrier couples' attitudes and behaviours.

**Preliminary results** The development of the website is in its final stage. A list of laboratories offering and performing CF mutation analysis for carrier screening has been updated by exploring various information channels. All these laboratories have been contacted, and collection of information is in process. First steps have been made for the creation of a Veneto Network of laboratories sharing protocols for analysis and information and for the establishment of a Network of health care providers

#### Spin-off for research and clinical purposes

This project is expected to: 1) have a positive effect on the carrier screening practice in the area under study, by making carrier screening practice uniform; 2) keep monitoring the relationship between carrier screening and CF incidence; 3) reassess spectrum and prevalence of the disease mutations in the screened population.

#### Analisi dello screening del portatore di fibrosi cistica su un ampio territorio

**Ragioni dello studio** Le coppie di portatori di Fibrosi Cistica hanno una probabilità di 1 su 4 di avere un figlio malato di Fibrosi Cistica ad ogni gravidanza che affrontano. Al giorno d'oggi è possibile effettuare un test che consente di identificare le mutazioni della Fibrosi Cistica e questo permette di individuare la gran parte dei portatori di Fibrosi Cistica, così che le persone possono essere correttamente informate circa il loro rischio di avere un figlio malato.

L'offerta del test per il portatore di Fibrosi Cistica (il cosiddetto screening del portatore) è una pratica ampiamente diffusa in parte del Veneto e grazie ad essa è stato possibile giungere ad una riduzione del numero di nascite di bambini affetti da Fibrosi Cistica.

**Ipotesi e obiettivi** 1. Proseguire l'attività di monitoraggio dello screening del portatore e della sua relazione con l'incidenza della Fibrosi Cistica nella popolazione. 2. Osservare le scelte riproduttive delle coppie identificate dal sistema di screening.

**Metodi** Lo studio è rivolto alla zona orientale del Veneto. Le principali azioni previste dal progetto sono: - creazione di un sito web dedicato che aiuterà i potenziali utenti a comprendere i processi, i potenziali vantaggi e le possibili limitazioni ed implicazioni dello screening del portatore FC e che fornirà informazioni ai professionisti che propongono il test del portatore; creazione e sviluppo di un network di laboratori e di operatori sanitari del settore; centralizzazione della consulenza genetica per le coppie di portatori; monitoraggio dei risultati dei laboratori; follow-up delle attitudini e dei comportamenti delle coppie di portatori.

**Risultati preliminari** Lo sviluppo del sito web è entrato nella sua fase conclusiva. Grazie ad un'accurata ricerca effettuata tramite diversi canali d'informazione, è stato possibile aggiornare una lista di laboratori che offrono ed effettuano l'analisi delle mutazioni della Fibrosi Cistica per lo screening del portatore. Tutti questi laboratori sono stati contattati ed attualmente è in corso una raccolta dei loro dati. Sono stati fatti i primi passi per la creazione di un Network Veneto di laboratori che condividono i protocolli d'analisi e le informazioni e per la costituzione di una rete di operatori sanitari attivi nel settore.

## 40. European Cystic Fibrosis Modifier Gene Study

**Corvol H<sup>1</sup>, Cabrini G<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Pediatric CF Center of Trousseau Hospital - Inserm U938 / UPMC, Paris, France, <sup>2</sup>Dip. Patologia e Diagnostica, Università di Verona (FFC Project#5/2011)



Harriet Corvol, ottava da sinistra, con il suo gruppo di ricerca

**Background** Although cystic fibrosis (CF) is recognized as a single gene disorder, considerable clinical diversity exists among patients with the same CFTR mutations, especially regarding the lung disease severity. In France, a national study on CF modifier genes has been underway since 2006 and more than 3000 French CF patients already participated. Similar independent initiatives have been conducted in several European countries (Italy, United Kingdom, Ireland, Belgium and Czech Republic). However, the population size of each separate study limited significantly the impact of the results obtained so far.

**Hypothesis and objectives** Reassembling these independent studies into a large European Consortium appears essential. Our aim is to amalgamate French and EU-wide clinical and DNA data to go beyond current approaches pioneered in North America using a new approach that has not previously been applied in large CF populations, namely, haplotype and single gene approaches studies in combination.

**Methods** Together, French, British, Irish, Italian, Belgian and

Czech CF experts are forming a European consortium to sequence the genomes of participants within their study populations (each numbering over a hundred participants). The final results will be pooled. The scientific program consists of several stages: 1) recruitment of the CF patients from all the CF participating centers in Europe (approximately 9000 to 10000 patients); 2) establishment of a collection of well defined clinical data on a longitudinal basis; 3) storage of DNA at the Genethon DNA and cell bank (Evry); 4) phenotype analyses allowing extreme disease phenotype determination; 5) genetic analyses at the Centre National de Génotypage (Evry); 6) further genotype/phenotype association analyses, 7) replication in independent CF cohorts.

**Preliminary results** The expected results will be the identification of genetic variants involved in CF disease severity. The information derived from the study might also find hitherto unknown proteins and pathways involved in the disease, and as such identify new targets for the development of new therapies.

**Spin-off for research & clinical purposes** The study should contribute to the identification of genetic factors other than the CFTR mutations that could impact on the severity of CF. Identification of these modifier genes is a great challenge that should offer not only a way to distinguish those patients at risk of developing a more severe disease and to adapt a care accordingly, but also to better understand the physiopathological mechanisms of CF and enable the development of new drugs.

## Studio Europeo sui geni modificatori in fibrosi cistica

**Ragioni dello studio** Anche se la fibrosi cistica è riconosciuta come una malattia da singolo gene, si osserva una notevole diversità clinica tra pazienti con la stessa mutazione del gene CFTR, in particolare per quanto riguarda la gravità ed il decorso della patologia polmonare. In Francia è stato intrapreso sin dal 2006 uno studio nazionale a questo riguardo, al quale hanno già partecipato più di 3000 pazienti affetti da fibrosi cistica. Simili iniziative indipendenti sono state condotte in altri Paesi europei (Italia, Gran Bretagna, Irlanda, Belgio e Repubblica Ceca). Purtroppo, le dimensioni delle popolazioni in ciascun studio separato hanno limitato significativamente l'impatto dei risultati ottenuti sinora.

**Ipotesi e obiettivi** Rilanciare questi studi separati unificandoli in un largo Consorzio Europeo appare fondamentale. Il nostro scopo è di raccogliere e omogeneizzare i dati clinici ed i campioni di DNA di un largo campione nonché di utilizzare nuovi approcci di studio genetici.

**Metodi** Assieme, gli esperti delle nazioni partecipanti formano un Consorzio Europeo allo scopo di sequenziare il genoma dei pazienti fibroscistici partecipanti. I risultati finali verranno omogeneizzati in un unico pool. Il programma consiste di diversi stadi successivi: 1) reclutamento dei pazienti fibroscistici da tutti i Centri FC partecipanti in Europa (circa 9000 - 10000 pazienti); 2) creazione e consolidamento di un database con dati clinici ben stabiliti su base longitudinale; 3) banking del DNA presso la facility Genethon (Evry); 4) analisi dei fenotipi con determinazione degli estremi; 5) genotipizzazione al Centro Nazionale di Genotipizzazione di Genethon (Evry); 6) ulteriori analisi di associazione genotipo/fenotipo; 7) studi di replicazione in coorti indipendenti di pazienti fibroscistici.

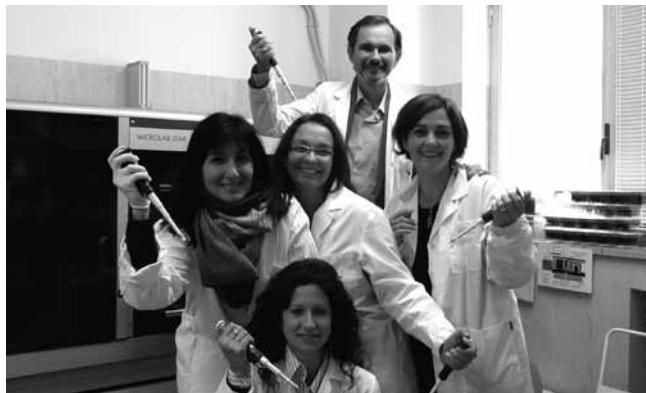
**Risultati preliminari** Riguardano l'identificazione di varianti geniche implicate nella gravità della malattia.

**Possibili ricadute per ricerca e clinica** L'informazione derivata dallo studio potrà identificare il coinvolgimento di vie metaboliche inattese, quindi possibili nuovi bersagli di cura per la fibrosi cistica.

## **41. CFTR mRNA analysis as a key step to understand the role of CFTR gene mutations in cystic fibrosis disease expression**

**Duga S<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Dip. Biologia e Genetica per le Scienze Mediche, Università di Milano (FFC Project#6/2011)



Stefano Duga e le collaboratrici del progetto

**Background/Rationale** Despite extensive genetic screening, 1-5% of cystic fibrosis (CF) patients lack a definite molecular diagnosis. The growing interest on the effects of variations in coding and noncoding regions on splicing is expected to have a significant impact on the diagnosis and treatment of CF. The systematic search for mRNA defects is not routinely undertaken in diagnostic laboratories. Besides mRNA analysis, mutations altering mRNA processing outside splice junctions can be detected by sequencing the whole gene. Advancements in next-generation sequencing (NGS) technology are making this approach increasingly affordable even for large genes, like CFTR.

**Objectives** 1. Widen the mutational spectrum of CF by identifying mutations escaping routine screening; 2. perform a full-gene sequencing of CFTR in CF (and CF-like) patients with no definite genetic diagnosis. The SCNN1A, SCNN1B, and SCNN1G genes, coding for the ENaC receptor, will also be sequenced; 3. define the pathogenic role of newly identified mutations by studying their effect on CFTR mRNA.

**Methods** 1. RNA extraction will be performed from nasal brushing and white blood cells. 2. Search for defects impacting CFTR mRNA processing will be performed by RT-PCR analysis and sequencing. 3. Targeted NGS of the CFTR locus will be performed in outsourcing (Yale Genome Center) whereas data analysis will be performed in house. Novel interesting variations will be confirmed and genotyped in available relatives. 4. Identified mutations will be functionally characterized by *in-vivo* and/or by *in-vitro* analyses.

**Preliminary results** During the first year: 1. We characterized of the c.1584+18672A>G deep-intronic mutation. The obtained data will be helpful to establish the minimum level of mRNA necessary to give a mild phenotype. 2. We selected patients for NGS and explored the available options for target enrichment (evaluating costs, coverage, level of multiplexing). We designed the set of probes for target capture and are building up a custom bioinformatics pipeline for data analysis.

**Spin-off for research & clinical purposes** The project is expected to give clues on the technical and economical feasibility of the NGS approach for CFTR screening. Hopefully, it will lead to the identification of novel mutations, thus improving the molecular diagnosis. The molecular characterization of identified splicing defects will pave the way for future RNA-based correction strategies.

## **Studio del ruolo di mutazioni nel gene CFTR nel modulare l'espressione fenotipica della fibrosi cistica mediante analisi dell'mRNA**

**Stato dell'arte e razionale dello studio** Malgrado i sofisticati test disponibili, l'1-5% dei pazienti affetti da fibrosi cistica (FC) non ha una diagnosi genetica completa. Una spiegazione è la presenza di mutazioni in regioni del gene che non vengono normalmente analizzate (gli introni) e che possono alterare la maturazione dell'RNA messaggero (mRNA). Tuttavia, la ricerca dei difetti a livello di mRNA non viene affrontata in maniera *routinaria* nei laboratori diagnostici. Una possibilità alternativa è quella di sequenziare l'intero gene, resa oggi possibile dall'avvento delle tecnologie di sequenziamento di nuova generazione (*next-generation sequencing*, NGS).

**Obiettivi del progetto** 1. Ampliare lo spettro mutazionale della FC e migliorare quindi la diagnosi molecolare. 2. Effettuare il sequenziamento dell'intero gene CFTR (e degli esoni dei geni SCNN1A, SCNN1B e SCNN1G codificanti per le subunità del recettore epiteliale del sodio, ENaC) in pazienti affetti da FC e forme atipiche di FC senza una diagnosi genetica definitiva. 3. Definire il ruolo patogenetico delle nuove mutazioni studiandone gli effetti a livello del mRNA del gene CFTR

**Metodi** 1. L'RNA verrà estratto da cellule dell'epitelio nasale ottenute mediante *brushing* e da leucociti. 2. La ricerca dei difetti che alterano la maturazione del mRNA del gene CFTR verrà effettuata mediante sequenziamento 3. Il DNA di pazienti privi di una diagnosi genetica conclusiva verrà sottoposto all'analisi mediante NGS. 4. Le mutazioni identificate verranno caratterizzate dal punto di vista funzionale *in vivo* e *in vitro*.

**Risultati preliminari** Durante il I anno abbiamo: 1. effettuato la caratterizzazione della mutazione c.1584+18672>G fornendo utili dati per stabilire il minimo livello di mRNA necessario per determinare un fenotipo lieve; 2. selezionato i pazienti da sottoporre all'NGS e messo a punto le metodologie sperimentali. Stabilito una collaborazione con lo Yale Genome Center (USA) e allestito una procedura dedicata di analisi bioinformatica dei dati.

**Possibili ricadute per ricerca e clinica** Il progetto fornirà informazioni sulla fattibilità tecnica ed economica dell'approccio mediante NGS alla ricerca di mutazioni nel gene CFTR. Auspicabilmente, lo studio consentirà l'identificazione di nuove mutazioni che sfuggono all'analisi genetica convenzionale. Infine, la caratterizzazione molecolare dei difetti di splicing rappresenterà la base necessaria per lo sviluppo di future strategie di correzione del difetto basate su RNA.

---

## **42. New strategies for clinical application of noninvasive prenatal diagnosis of cystic fibrosis based on the analysis of fetal mutated alleles in maternal plasma**

**Ferrari M<sup>1</sup>, Cretich M<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Lab. Biologia Clinica Molecolare e Citogenetica, Università Vita-Salute HSR, Milano, <sup>2</sup>Ist. di Chimica del Riconoscimento Molecolare, CNR, Milano (FFC Project#7/2011)

**Background** The possibility to retrieve fetal DNA from maternal plasma has made available a new source of fetal genetic material for noninvasive analysis of numerous fetal pathological conditions. Nevertheless, due to the scarcity of fetal DNA in maternal plasma and the difficulty in detecting fetal mutated alleles noninvasive prenatal diagnosis (NIPD) has not yet attained a widespread clinical application. Different approaches have been developed so far to enrich fetal minority sequences based on either the use of sophisticated techniques or cumbersome protocols.



Maurizio Ferrari e il gruppo di ricerca

**Hypothesis and objectives** Our goal is to develop, optimize and validate simple and accurate tests for NIPD which combine high sensitivity, speed and ease of use during the first trimester of pregnancy.

**Methods** The project is focused on the set up of methodologies for the identification of fetal paternally inherited mutations/polymorphisms in maternal plasma. Two main research lines are been investigated: the development of amplification protocols based on CO-amplification at Lower Denaturation temperature-PCR (COLD-PCR) combined with Sanger sequencing and highly sensitive microarray substrates which could allow the detection of fetal minority sequences without any enrichment strategy.

**Preliminary results** COLD-PCR uses a critical denaturation temperature ( $T_c$ ) to selectively amplify minority mutated alleles in a wild-type allele background. We have identified the  $T_c$  for 7 frequent CF mutations ( $\Delta F508$ ,  $N1303K$ ,  $G542X$ ,  $2183AA>G$ ,  $1717-1G>A$ ,  $W1282X$ ,  $R1162X$ ) and for 3 common polymorphisms ( $rs213950$ ,  $rs214164$  and  $rs1800136$ ). Moreover, we have developed assays for the identification of fetal paternally inherited  $\Delta F508$  mutation in maternal plasma in 3 couples. In 2 of these the fetus have inherited the paternal mutation. The results obtained were in complete concordance with those obtained on fetal DNA extracted from chorionic villi. We have developed a microarray assay for the identification of fetal paternally inherited  $\Delta F508$  mutation in maternal plasma in all the three couples previously tested. The results obtained were in complete concordance with those obtained with COLD-PCR.

**Spin-off for research & clinical purposes** The identification of minority mutated alleles is one of the major challenges in future molecular medicine due to its important implications in early diagnosis and clinical management. We plan to optimize assays which could be easily transferable to clinical setting for early NIPD.

## Nuove strategie per applicazioni cliniche alla diagnosi prenatale non invasiva di fibrosi cistica: analisi di alleli fetali mutati nel plasma materno

**Ragioni dello studio** Attualmente la diagnosi prenatale richiede il prelievo di cellule fetalni mediante metodiche invasive, (amniocentesi e villocentesi) che comportano un rischio (0.5-1%) di provocare un aborto. La scoperta del DNA fetale nel plasma materno ha dato impulso allo sviluppo di procedure alternative di diagnosi prenatale che non costituiscono un rischio per il feto. Inoltre, l'analisi su plasma materno può essere effettuata su minime quantità di sangue, sottolineando la non invasività di tale approccio. Il DNA fetale nel plasma materno, oltre ad essere in concentrazione molto scarsa, si trova in presenza di un grande eccesso (>95%) di DNA di origine materna. Questo complica notevolmente l'identificazione delle mutazioni fetalni, dato che la maggior parte delle malattie genetiche è causata da difetti a carico di una singola base.

**Ipotesi e obiettivi** Ci proponiamo di sviluppare due strategie dotate di elevata sensibilità e accuratezza, facilmente accessibili, per la diagnosi prenatale non invasiva di fibrosi cistica nel primo trimestre di gravidanza.

**Metodi** Applicheremo la reazione di CO-amplification at Lower Denaturation temperature-PCR (COLD-PCR) un metodo sviluppato per arricchire sequenze mutate minoritarie.

Il DNA fetale arricchito sarà analizzato mediante metodiche di facile accesso (sequenziamento). Svilupperemo inoltre dei saggi con un sistema microarray che dovrebbe consentire l'identificazione diretta di sequenze fetalni mutate nel plasma materno evitando procedure di arricchimento.

### Risultati preliminari

COLD-PCR: Abbiamo messo a punto per le mutazioni e i polimorfismi oggetto di studio, la Temperatura Critica ( $T_c$ ) di ogni frammento e verificato l'arricchimento dell'allele mutato minoritario nel plasma. Inoltre sono state effettuate 3 diagnosi prenatali in coppie in cui il padre era portatore della mutazione  $\Delta F508$  (in 2 casi su 3 il feto aveva ereditato l'allele paterno mutato). I risultati da noi ottenuti concordano con quelli delle metodiche invasive.

Microarray: Abbiamo messo a punto il sistema per la rilevazione della mutazione  $\Delta F508$  e analizzato le 3 coppie precedentemente testate con il protocollo di COLD-PCR confermando i risultati ottenuti.

**Possibili ricadute per ricerca e clinica** I sistemi innovativi da noi proposti potrebbero rappresentare un modello di riferimento e costituire la base per lo sviluppo di ulteriori saggi facilmente trasferibili nelle cliniche ginecologiche e nei laboratori specializzati del sistema sanitario nazionale.

## Monitoring disease course and therapy

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

**Morana G<sup>1</sup>, De Leo F<sup>1</sup>, Tavano V<sup>1</sup>, Bertolo S<sup>1</sup>, Ciet P<sup>1</sup>, Ros M<sup>1</sup>**  
Servizio Fibrosi Cistica, Ospedale Ca' Foncello, Treviso (FFC Project#25/2011)

**Background** Currently, no sensitive, radiation-free methods are available to localize and quantify lung inflammation in CF population. Today CT is the gold standard for the diagnosis of lung structural changes, but it has disadvantages, the most

important one being exposure to relatively high amount of ionizing radiation. Developments in NMR imaging technique have made possible its larger use in thoracic imaging to obtain morphological and also functional information. The diffusion weighted imaging (DWI) could be a promising tool to detect inflammation sites in the lung in patients with CF. DWI strictly depends on water movement in the extracellular compartment, that is altered in the presence of inflammation.

**Hypothesis and objectives** The hypothesis of the present study is that the DWI is able to recognize the lung inflammation. The aim of this study is assess the sensitivity of lung-MRI to monitor inflammation and disease in CF lung, in particular to assess the correlation between DWI features and lung dis-



Giovanni Morana, seduto, assieme al suo gruppo di ricerca

ease in CF patients, both at the onset and after resolution of an acute exacerbation episode.

**Method** In this study we planned to enroll 30 patients with pulmonary exacerbation treated with intravenous antibiotic (cases) and 30 patients in stable condition (controls). The 30 cases, after the diagnosis of respiratory exacerbation (criteria of Rosenfeld), had to receive an MRI examination (4 sequences MRI of approximately 45 minutes total duration) to be repeated at the end of therapy (after 20 days). Similarly the control group had to perform 2 MRI within 20 days.

**Preliminary results** Until now 25 patients, 12 cases and 13 controls were enrolled and we analyzed the images of 10 cases and 10 controls. The preliminary results seem to be very interesting. Reporting and image processing is taking place in "blind" without knowing the membership group of patients. As we expected, the lung DWI signal in the patient group is high at the onset (first examination) and got lower after the resolution of the exacerbation episode while in the control group there aren't significant changes in diffusion signal.

**Spin-off for research and clinical purposes** This study could help identify and quantify lung inflammation and then validate a new method for the evaluation of pulmonary inflammatory lesions. The objective is therefore to allow a more efficient management of FC patients monitoring the pulmonary inflammatory conditions using an imaging systems like NMR that does not expose the patient to ionizing radiation.

## DWI (Diffusion Weighted Imaging), un nuovo metodo per valutare l'infiammazione nella popolazione FC con esacerbazione polmonare

**Ragioni dello studio** Attualmente non esistono metodiche non irradianti per valutare e quantificare l'infiammazione polmonare. La TC è l'unica metodica a fornire informazioni loco-regionali sulle aree da trattare, tuttavia data l'esposizione a radiazioni ionizzanti, il suo uso è limitato, specie nella popolazione FC costituita in gran parte da pazienti pediatrici. L'introduzione della RM polmonare, ottenuta grazie alle nuove tecnologie e strategie sviluppate in questo campo, ha permesso di ottenere informazioni non solo morfologiche, ma anche funzionali. Tra le metodiche funzionali, la DWI (che ci permette di misurare un segnale dipendente dal movimento delle molecole d'acqua) applicata al polmone potrebbe essere di grande utilità nello studio della flogosi nei pazienti FC sia per la diagnosi precoce che per il follow-up delle infezioni.

**Ipotesi e obiettivi** L'ipotesi del presente studio è che la DWI sia in grado di riconoscere l'infiammazione polmonare. L'obiettivo è quello di valutare la correlazione tra le features DWI e la patologia polmonare nei pazienti FC, sia in condizioni basali, sia all'esordio e dopo risoluzione di un'esacerbazione respiratoria.

**Metodi** Lo studio prevede l'arruolamento di 30 pazienti con esacerbazione respiratoria che necessitano di trattamen-

to antibiotico endovenoso e 30 pazienti in condizioni stabili, arruolati come controlli. I 30 casi, dopo aver fatto diagnosi di esacerbazione respiratoria mediante i criteri di Rosenfeld, eseguiranno una RMN (4 sequenze per un totale di 45 minuti) che verrà ripetuta al termine del ciclo di terapia (dopo circa 20 giorni). Analogamente i controlli eseguiranno due RMN a distanza di 20 giorni l'una dall'altra.

**Risultati preliminari** Sono stati per ora arruolati 25 pazienti di cui 12 casi e 13 controlli e sono state analizzate le immagini di 10 casi e 10 controlli. I risultati preliminari sembrano essere molto interessanti. La refertazione e l'elaborazione di immagini si sta svolgendo in cieco senza quindi sapere a che gruppo appartengono i pazienti. Come ci aspettavamo il segnale DWI nei pazienti in fase acuta (i casi) si riduce tra l'esordio (1°risonanza) e la risoluzione dell'episodio di esacerbazione (il mucus plugging si è ridotto) mentre nei controlli non si verificano significative variazioni del segnale di diffusione.

**Possibili ricadute per ricerca e clinica** Il presente studio potrebbe consentire di identificare e quantificare l'infiammazione polmonare e quindi validare una nuova metodica per la valutazione delle lesioni infiammatorie polmonari. L'obiettivo è quindi quello di permettere una più efficiente gestione dei pazienti FC monitorando le condizioni infiammatorie polmonari utilizzando un sistema di imaging come la RMN che non espone i pazienti a radiazioni ionizzanti.

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

**Sorio C<sup>1</sup>, Buffelli MR<sup>2</sup>**

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



Claudio Sorio, secondo da destra, e il gruppo di ricerca

**Background** Measurement of CFTR activity on patients is not yet an optimized procedure. We have previously demonstrated CFTR expression and function in human monocytes.

**Hypotheses and objectives** Blood leukocytes could represent a new source of easily accessible primary cells for testing CFTR expression and function. Our goal is to set up a novel method for the evaluation of expression and CFTR function in individual patients.

**Methods** Patch clamp and single cell depolarization assay. In this first year, we have set up and performed an initial characterization of the electrophysiology properties of CFTR in human monocytes by patch clamp using the whole cell recording (WCR). In all the subjects we measured in parallel the cell membrane depolarization, by single-cell fluorescence imaging.

**Preliminary Results** Application have been approved by

*ethical committee on May 2012 (Protocol number 24737). Task 1) We recorded monocytes isolated from healthy subjects, CF patients heterozygous for nonsense and homozygous ΔF508 mutations and carriers of nonsense mutations. To date, we obtained optimal electrophysiological recordings in 23 cells from 4 healthy subjects, in 29 cells from 4 CF patients and 48 cells from 8 subjects of the clinical trial PTC124. Based on these results normal monocytes express functional CFTR channels at variance with cells derived from CF patients. Membrane depolarization assay was performed in the same subjects. Data from patients in clinical trials awaits the conclusion of study for their proper evaluation. Task 2) Membrane depolarization assay shows 4/13 subjects with an increase of the CF index following treatment with PTC124; 3/13 shown a partially response, and the other subjects (6/13) didn't respond. Likewise, membrane depolarization was tested on monocytes derived from subjects carrying F508del mutation, before and after in-vitro treatment with VX-809 (10 μM for 24h). Task 3) Data on the effect of PTC 124 treatment on membrane depolarization of monocytes from patients enrolled in the clinical trial are under collection and are bound to a temporary no-divulgation agreement with PTC therapeutics that will also provide us with their proprietary informations.*

**Spin-off for research & clinical purposes** The results of these studies are being prepared for communication to peer-reviewed journals. We expect application in the CF diagnostic field and in the functional evaluation of the effect of novel drugs specifically targeting CFTR.

## Valutazione funzionale dei monociti umani come nuovo strumento per la ricerca clinica e preclinica in fibrosi cistica

**Ragioni dello studio** La misurazione dell'attività funzionale del canale CFTR nei pazienti è una procedura ad oggi non completamente soddisfacente. In nostri studi recentemente pubblicati avevamo dimostrato l'espressione e la funzionalità del gene CFTR nei monociti derivati da sangue periferico.

**Ipotesi e obiettivi** I leucociti del sangue potrebbero rappresentare una nuova fonte di cellule primarie facilmente accessibili utili per analizzare la funzione ed espressione del CFTR. Il nostro obiettivo è quello di elaborare nuovi approcci per valutare l'espressione e la funzionalità del canale CFTR nei singoli pazienti.

**Metodi** In questo primo anno, abbiamo messo a punto ed eseguito una prima caratterizzazione delle proprietà elettrofisiologiche del CFTR in monociti umani utilizzando la tecnica del patch clamp, analizzando singolarmente le cellule intere e misurato negli stessi campioni la depolarizzazione della membrana cellulare.

**Risultati preliminari** Come programmato abbiamo ottenuto l'approvazione per questo studio da parte del comitato etico AOUI nel maggio 2012 (protocollo numero 24737). Ad oggi, abbiamo ottenuto ottime registrazioni elettrofisiologiche in 23 cellule da 4 soggetti sani, in 29 celle da 4 pazienti con FC e 48 cellule da 8 soggetti della sperimentazione clinica on PTC124. I risultati mostrano chiaramente che i monociti normali esprimono canali CFTR funzionali. I dati dei pazienti in sperimentazione clinica sono in corso di elaborazione. Gli stessi campioni sono stati analizzati anche con la metodica di analisi della depolarizzazione della membrana con risultati concordanti. Abbiamo trattato monociti derivati da soggetti portatori della mutazione F508del con VX809 e VX-325 (in corso, non mostrato), e pazienti affetti da nutazioni nonsenso con PTC 124 (Ataluren). I risultati fin qui ottenuti indicano un effetto di PTC 124 su 7 pazienti dei 13 analizzati.

I dati sugli effetti del trattamento con PTC-124 sui pazienti sono in fase di raccolta ed elaborazione in attesa delle informazioni che saranno messe a disposizione da PTC Therapeutics.

**Possibili ricadute per ricerca e clinica** Due pubblicazioni

che descrivono i risultati ottenuti sono in preparazione per la presentazione a riviste internazionali. Applicazioni diagnostiche e cliniche, quali la valutazione della risposta ai farmaci nei pazienti con FC, rappresentano la prospettiva di sviluppo prevista per questi studi.

## 45. Risk factors for poor outcomes in Cystic Fibrosis newborns diagnosed by neonatal screening in Italy: years 2009-2011

### Repetto T<sup>1</sup>

<sup>1</sup>A.O.U. "A. Meyer", Centro Regionale Toscano Fibrosi Cistica, Firenze (FFC Project#19/2012)



Teresa Repetto, responsabile del progetto

**Background** Cystic fibrosis neonatal screening (CFNBS) is widely expanded and implemented on the basis that early identification of babies with Cystic Fibrosis (CF) improves outcome in the current environment of new improved treatments. Although not randomised trials, long term observational studies indicate that early treatment made possible by NBS is important in determining subsequent clinical outcomes for children with CF.

**Objectives** The first aim of this study is the follow up of CF newborn diagnosed by NBS in Italy to identify risk factors associated to poor clinical outcomes. The secondary aim is to register for assessment CF patients identified subsequent to a negative CFNBS.

**Preliminary results** A previous our 2010 survey of CFNBS in Italy (FFC#23 2010) included 124 screened CF infants, born in 2009 and diagnosed within the first year of life. Out of 124 screened infants 19.2% presented wasting and 15% presented stunting at diagnosis; 21.4% had wasting and 10.7% had stunting at age of 1 years; 6.7% were chronically infected with *Pseudomonas aeruginosa* within the first year of life.

**Methods** Our survey (an observational longitudinal prospective cohort study and a nested case-control study) will include CF infants born in the years 2009-2010-2011 and diagnosed in the period 2009-2012, recruited in the 16 CF care Centres representing all the Italian regions performing CFNBS. All subjects will be evaluated according to gender, genotype, pancreas status, meconium ileus, ethnicity, age at diagnosis, age at start of therapy, regarding some clinical longitudinal outcomes as nutritional status microbiological status, pulmonary exacerbations and hospitalizations at age of 6 months, 1-2 and 3 years old. Data relative to individual therapies, treatments procedures and control infection measures performed in the CF Centers, will be also recorded. CF patients negative to NBS (with or without meconium ileus) will be included and considered apart. All clinical data will be recorded by research assistants (monitors) trained in audit visits.

**Expected results** We expect to identify the main risk factors for poor clinical outcomes in order to plan action to improve good practice and patient's outcomes.

**Spin off for research clinical purpose** The possibility to highlighting the main causes of poor clinical long term outcomes in patients diagnosed through NBS could make it possible to recognize modifiable factors especially if referred to clinical and care practices that can be improved.

### Fattori di rischio per esiti sfavorevoli nei neonati FC diagnosticati tramite lo screening neonatale in Italia

**Ragioni dello studio** Un nostro precedente studio sullo screening in Italia (FFC#23 2010) ha mostrato una grande variabilità di protocolli adottati, sia clinici che di laboratorio, con variabilità in alcuni risultati quali ad es. età media alla diagnosi, età mediana alla prima visita. Grande variabilità è stata anche riscontrata riguardo agli aspetti organizzativi e di comunicazione. Lo stesso studio includeva 124 bambini nati nel 2009 e diagnosticati per screening; in questi bambini abbiamo inaspettatamente trovato una percentuale non trascurabile, nel primo anno di vita, di bambini sottopeso(21,4%) di bassa statura (10,7%) e di infezione cronica da *Pseudomonas aeruginosa* (6,7%).

**Obiettivi dello studio** L'obiettivo primario di questo studio è quello di verificare nei bambini diagnosticati in Italia

per screening, alcune variabili cliniche quali un cattivo stato nutrizionale e la prevalenza di infezione da *Pseudomonas* per identificare possibili fattori di rischio associati a questi esiti sfavorevoli. Obiettivo secondario è di descrivere i casi FC risultati negativi allo screening.

**Metodi dello studio** Si tratta di uno studio osservazionale longitudinale di coorte con un caso-controllo innestato. Lo studio di coorte includerà bambini nati negli anni 2009-2010-2011 e diagnosticati nel periodo dal 2009 in poi, reclutati nei 16 centri di cura FC Tutti i soggetti saranno valutati secondo sesso, etnia, genotipo, stato pancreatico, ileo da meconio età di inizio terapia, e secondo *outcomes* quali lo stato nutrizionale e lo stato microbiologico, esacerbazioni polmonari e ospedalizzazioni all'età di 6 mesi e 1-2-3 anni. Saranno anche raccolti dati relativi alle terapie e alle procedure di trattamento Si tenderà quindi di comprendere le relazioni tra le principali esposizioni sopra elencate e gli *outcomes* avversi, quali appunto peso e altezza inferiori alla norma e presenza di infezione da *Pseudomonas*. A questo proposito verrà condotto uno studio caso-controllo su 40 casi con misure di esito avverso e 120 controlli. Saranno inoltre inclusi, e considerati separatamente, pazienti FC risultati negativi allo screening. Tutti i dati clinici saranno registrati da monitori esperti in visite di audit.

**Risultati attesi** Ci aspettiamo di individuare i principali fattori di rischio collegati a *outcomes* negativi allo scopo di pianificare azioni correttive e implementare una buona pratica clinico-assistenziale.

## New aspects of CF lung infection

### 46. Host Response to *Pseudomonas aeruginosa* adaptation during airway chronic infection

Cigana C<sup>1</sup>, Colombo C<sup>2</sup>

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



Cristina Cigana, seconda da destra, e il suo gruppo di ricerca

**Background.** *P. aeruginosa* can establish life-long airways chronic infection in CF patients with pathoadaptive variants distinguished from initially acquired strain. The persistent *P. aeruginosa* infection escapes the immune response and causes damage to the host.

**Hypothesis and objectives.** The hypothesis is that airways damage is caused by the host response due to bacterial phe-

notypes generated after years of chronic infection in the CF lung. Thus the aims are: 1. to establish the ability of early vs late *P. aeruginosa* strains to provoke inflammation vs tissue damage in vitro and mouse models; 2. to correlate airway damage with *P. aeruginosa* patho-adaptive traits in long term chronic persistence in CF patients.

**Methods and results.** *P. aeruginosa* early strain of CF origin AA2 induced higher inflammation in vitro in CF bronchial epithelial cells (TNF- $\alpha$ , Gro $\beta$ , VCAM-1), while the late clonal isolates AA43 and AA44 stimulated the production of MMP-9, a matrix metalloprotease involved in tissue damage. During acute infection in C57BL/6NCrlBR mice, early AA2 strain caused death of the animal, while late AA43 and AA44 strains were completely cleared by the host immunosystem after 48 hours. However after 14 days of infection in the agar-beads mouse model, only adapted isolates were able to establish chronic infection with a stable bacterial load till 90 days. Lungs cytokines amounts were lower after infection with late strains, confirming that the early strain provokes a higher inflammatory response. The majority of cytokines/chemokines analyzed by bioplex were still detectable after 28 days of chronic infection with late strains even though lower than after acute infection. Impressively, MCP-1, IL-17, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  levels were comparable to those detected after 12 and 24 hours of acute infection, indicating a continuous triggering of specific pathways, as adaptive immunity. Considering damage markers, murine lungs chronically infected with late isolates AA43 and AA44 for 28 days had higher glycosaminoglycans and active MMP 9 content in comparison to lungs treated with sterile beads. We have started to characterize the response of gut-corrected CF mice to *P. aeruginosa* adapted clinical strain AA43. At 28 days, both CF and isogenic wt mice had lung colonization with same bacterial load and percentage of chronicity. The analysis of the inflammatory response is in progress.

**Spin-off for research & clinical purposes.** The results of the project up to date support that *P. aeruginosa* early isolates

trigger inflammation, while late adapted strains induce tissue damage and evade the immune response. The validation in human samples could help in identifying MMP-9 as a possible target for therapeutic intervention.

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

**Ragioni dello studio.** Le infezioni persistenti sono causate da batteri che utilizzano strategie per evitare la risposta da parte del sistema immunitario. Non è chiaro se questa strategia è utilizzata anche da *P. aeruginosa* come meccanismo per la colonizzazione a lungo termine delle vie aeree dei pazienti con fibrosi cistica (FC). Nonostante cicli continui ed aggressivi di trattamenti antibiotici, nelle vie aeree del paziente FC si stabilisce inevitabilmente l'infezione cronica da *P. aeruginosa*. **Ipotesi e obiettivi.** L'ipotesi del progetto è che i ceppi di *P. aeruginosa* adattati alle vie aeree FC eludono il controllo del sistema immunitario e al contempo causano danno al tessuto polmonare. Gli obiettivi sono di 1) stabilire la capacità degli isolati precoci e adattati di *P. aeruginosa* di indurre infiammazione o danno tissutale nell'ospite in modelli in vitro e murini e 2) correlare il danno tissutale delle vie aeree con caratteristiche di adattamento di *P. aeruginosa* in pazienti FC.

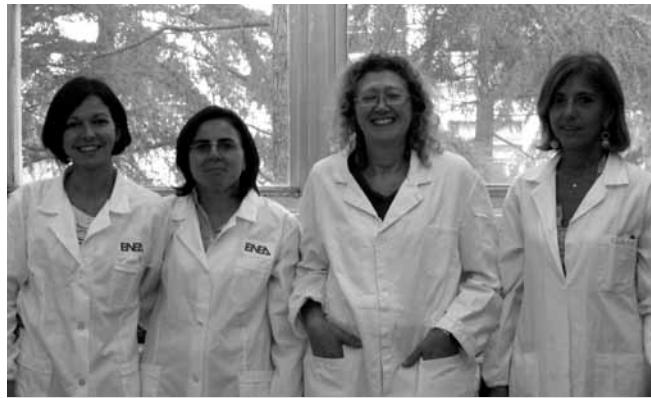
**Metodi e risultati.** Ceppi precoci di *P. aeruginosa* inducono maggiore infiammazione in cellule epiteliali bronchiali FC, mentre gli isolati clonali tardivi adattati stimolano la produzione di MMP-9, una metalloproteasi coinvolta nel danno tissutale. Durante l'infezione acuta in topi non FC, il ceppo precoce causa la morte dell'animale. Tuttavia, dopo 14 giorni in un modello murino di infezione cronica, solo gli isolati adattati sono in grado di persistere. L'infiammazione nei polmoni murini risulta inferiore dopo infezione con ceppi tardivi, e tende a decrescere nel corso dell'infezione cronica. Al contrario per quanto riguarda i marcatori di danno tissutale, i polmoni murini infetti cronicamente con gli isolati adattati hanno un contenuto di glicosamminoglicani solfati e di MMP-9 maggiore rispetto ai polmoni non infetti. Abbiamo iniziato a caratterizzare la risposta in topi FC dopo infezione cronica con un ceppo tardivo. A 28 giorni, i topi FC e non FC presentano la stessa percentuale di infezione cronica con un numero totale di batteri simile, indicando che la capacità del ceppo clinico tardivo di persistere nel polmone murino è indipendente dal difetto di CFTR. L'analisi della risposta infiammatoria è in corso.

**Possibili ricadute per ricerca e clinica** I risultati del progetto confermano che isolati precoci di *P. aeruginosa* inducono infiammazione, mentre i ceppi adattati alle vie aeree FC, eludendo la risposta immunitaria, sono responsabili di danno ai tessuti. La validazione in campioni umani potrebbe aiutare a identificare MMP-9 come possibile bersaglio di un'innovativa strategia terapeutica.

## 47. Investigation of cystic fibrosis airway microbiome in patients showing a severe decline in lung function and not responding to conventional antimicrobial therapy

**Bevvino A<sup>1</sup>, Mengoni A<sup>2</sup>, Taccetti G<sup>3</sup>, Ficarelli E<sup>4</sup>, Manno G<sup>5</sup>**

<sup>1</sup>Unità per lo Sviluppo Sostenibile e Innovazione Sistema Agro-Industriale, ENEA, Roma, <sup>2</sup>Dip. Biologia dell'Evoluzione, Università di Firenze, <sup>3</sup>Centro FC, Ospedale "A. Meyer", Firenze, <sup>4</sup>Laboratorio Microbiologia, Ospedale "Bambin Gesù", Roma, <sup>5</sup>Dip. di Scienze Pediatriche, Università di Genova (FFC Project#8/2012)



Annamaria Bevvino, seconda da sinistra, assieme al gruppo di ricerca

**Background** Cystic fibrosis (CF) is characterized by a progressive decline in lung function. Several studies have evidenced that some patients' FEV1 seriously declines despite treatment with traditional antimicrobial therapy. The presence of other microorganisms, in addition to the common CF bronchial pathogens identified by the traditional culture methods, may significantly affect the course and outcome of CF lung disease.

**Hypothesis and objectives** The objective of the present project is to assess the composition of airways microbiota in CF patients with a severe decline in lung function and not responding to antimicrobial therapy, by employing novel molecular and metagenomic technologies, aiming at discover new opportunistic (nonculturable) pathogens involved in pulmonary disease and novel bacterial genes with potential as innovative drug targets.

**Methods** Three groups of CF patients will be investigated: 1) normal lung function/mild decline (FEV<sub>1</sub> > 70% of predicted), 2) moderate lung dysfunction (FEV<sub>1</sub> 40 to 69% of predicted) and 3) severe lung dysfunction (FEV<sub>1</sub> < 40% predicted). Within each group, "non-responder" CF patients who have showed a severe decline in lung function (FEV1 ≥ 5% in the last year) and did not respond to antimicrobial therapy, and "stable" CF patients (having had no change in pulmonary function or a rate decline in FEV1 equal to average value in the last year) will be enrolled. In the project, composition of total (culturable and nonculturable) CF microbiota will be investigated by using advanced culture-based methods and **Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) analysis**. The metagenome of the microbial communities of 4 CF sputum samples recovered from two "stable" and two "non-responder" CF patients, representative of normal/mild and severe lung disease groups, will be analyzed by using Roche 454 Sequencing Technology and the related bioinformatics.

**Expected results** The present project is aimed at identifying the factors responsible for the seriously decline in lung function in the groups of CF patients considered despite treatment with traditional antimicrobial therapy. The high-throughput technologies will enable to identify novel opportunistic non-culturable pathogens and novel genes potentially involved in pulmonary disease.

**Spin-offs** The results obtained will set the basis to identify new targets for treatment and management of bacterial infections in CF patients.

**Indagine del microbioma delle vie aeree nei pazienti con fibrosi cistica che presentano un severo declino della funzione polmonare e non rispondono alla terapia convenzionale antimicrobica**

**Ragioni dello studio** La Fibrosi cistica è caratterizzata da un progressivo declino della funzione respiratoria. Diversi

studi hanno evidenziato che alcuni pazienti, nonostante il trattamento terapeutico, presentano un severo calo annuo del FEV1. La presenza di altri microorganismi nell'apparato respiratorio FC, oltre ai comuni patogeni identificati mediante i metodi tradizionali dipendenti dalla coltivazione, può significativamente condizionare il decorso della malattia polmonare FC.

**Obiettivi principali** L'obiettivo principale del presente progetto è valutare la composizione del microbiota delle vie aeree nei pazienti con fibrosi cistica che hanno mostrato nell'ultimo anno un grave declino della funzione respiratoria nonostante il trattamento con terapia antimicrobica convenzionale. L'impiego di tecnologie molecolari classiche e di ultima generazione porterà alla scoperta di nuovi patogeni opportunisti coinvolti nella malattia polmonare e di nuovi geni che potranno essere utilizzati come bersagli di farmaci innovativi.

**Metodi** Saranno studiati tre gruppi di pazienti con FC: 1°) pazienti con una funzione polmonare normale o con un lieve calo ( $\text{FEV1} > 70\%$  del predetto), 2°) pazienti con disfunzione polmonare moderata ( $\text{FEV1}$ , dal 40 al 69% del predetto) e 3°) pazienti con disfunzione polmonare grave ( $\text{FEV1} < 40\%$  del predetto). All'interno di ciascun gruppo, saranno arrociati pazienti che hanno mostrato un forte calo della funzione polmonare nell'ultimo anno ( $\text{FEV1} \geq 5\%$ ) e non hanno risposto alla terapia antimicrobica (*non-responders*), e pazienti "stabili" che non hanno avuto nessun cambiamento nella funzione polmonare nell'ultimo anno o hanno presentato un declino del  $\text{FEV1}$  pari al valore medio. La composizione del microbiota CF sarà analizzata utilizzando metodiche avanzate della coltivazione e l'analisi dei polimorfismi di lunghezza dei frammenti terminali di restrizione (T-RFLP). L'analisi del metagenoma delle comunità micobiche sarà effettuata su 4 campioni di espettorato CF, raccolti da due pazienti stabili e due "*non-responders*", selezionati dal primo e terzo gruppo di pazienti analizzati, utilizzando la piattaforma di sequenziamento 454-Roche e analisi bioinformatiche.

**Risultati attesi** Il progetto è volto ad individuare i fattori responsabili del grave e rapido declino della funzione polmonare nei gruppi di pazienti FC considerati nello studio, nonostante il trattamento con la tradizionale terapia antibiotica. La tecnologia *high-throughput* consentirà di identificare nuovi patogeni opportunistici noncoltivabili e nuovi geni potenzialmente coinvolti nella malattia polmonare.

**Possibili ricadute per ricerca e clinica** I risultati che si otterranno costituiranno la base per identificare nuovi bersagli per il trattamento e la gestione delle infezioni batteriche nei pazienti con FC.



Andrea Battistoni, secondo da sinistra, e il gruppo di ricerca

these proteins is Calprotectin (CP), a zinc and manganese-sequestering protein released by neutrophils at sites of infection. We have recently contributed to demonstrate that the ability of a gut pathogen to withstand the antimicrobial activity of CP depends on its ability to produce a metal transporter characterized by a very high affinity for the zinc ion. As CP is the most abundant protein in the sputum from CF patients, we hypothesize that *P. aeruginosa* must be able to implement effective strategies to counteract calprotectin-induced metal starvation and efficiently colonize the CF lung. Our preliminary observations suggest that this bacterium is highly resistant to zinc sequestration mechanisms, possibly due to the presence of multiple zinc uptake systems

**Objectives** The goals of this project are: 1) To characterize the zinc import apparatus of *P. aeruginosa* and its functional importance for bacterial growth in zinc-limiting conditions; 2) to evaluate if zinc uptake mechanisms are key to *P. aeruginosa* ability to colonize the CF lung and resist to the zinc sequestering activity of CP. To reach our aims, we shall construct *P. aeruginosa* mutant strains lacking genes encoding for zinc transporters and carry out experiments to evaluate the contribution of such transporters to bacterial growth in zinc-limiting conditions *in vitro* and to colonization of the lung of wild type and *cfr* mutant mice. The contribution of CP to the control of *P. aeruginosa* growth will be analyzed *in vitro* and by carrying out infections in neutropenic mice

**Spin-off for research & clinical purposes** In the light of recent studies showing that it is possible to pharmacologically target zinc homeostasis in pathogenic microorganisms, we believe that the elucidation the role of zinc in the host-*P. aeruginosa* interaction in CF may be useful to identify novel important targets for antimicrobial strategies.

**Ruolo dei trasportatori di zinco ad alta affinità nella capacità di *Pseudomonas aeruginosa* colonizzare il polmone infiammato tipico della fibrosi cistica.**

**Ragioni dello studio** Metalli di transizione quali il ferro e lo zinco hanno un ruolo molto importante nella fisiologia batterica, in quanto costituenti essenziali di numerose proteine. Per controllare la disseminazione degli agenti infettivi, i vertebrati adottano diverse strategie finalizzate a rendere tali metalli non accessibili ai patogeni. Questo concetto è noto come "immunità nutrizionale". Studi recenti hanno chiarito che il rilascio di proteine antimicrobiche capaci di sequestrare metalli è parte integrante dei meccanismi antiinfiammatori mirati al controllo dei patogeni. Una di queste proteine rilasciata dai neutrofili nei siti di infezione è la calprotectina (CP), capace di sequestrare zinco e manganese. Abbiamo recentemente dimostrato che la capacità di un patogeno intestinale di resistere all'azione antimicrobica della CP è legata alla capacità di

## 48. Role of high affinity zinc transporters in *Pseudomonas aeruginosa* ability to colonize the inflamed cystic fibrosis lung

Battistoni A<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dip. Biologia, Università Tor Vergata, Roma  
(FFC Project#13/2012)

**Background** Transition metals such as iron and zinc play a very important role in bacterial physiology as they are essential constituents of a large number of proteins. In order to control the spread of infectious microorganisms in their tissues, vertebrates adopt a series of strategies aimed at making metals unavailable to bacterial pathogens. This concept is now described as "nutritional immunity". Recent studies have made clear that the release of antimicrobial metal-sequestering proteins has an important role in the inflammatory response aimed at the control of bacterial pathogens. One of

esprimere un trasportatore di metalli con altissima affinità per lo zinco. Poiché la CP è la proteina più abbondante nello sputo dei pazienti FC, ipotizziamo che, per colonizzare in modo efficiente il loro polmone, *P. aeruginosa* debba adottare strategie volte a controbilanciare la carenza di zinco indotta dalla CP. Le nostre osservazioni preliminari confermano che questo microrganismo è estremamente resistente ai meccanismi di sequestro dello zinco, probabilmente grazie alla presenza di diversi sistemi di acquisizione dello zinco.

**Obiettivi e Metodi** Gli obiettivi di questo progetto sono: 1) caratterizzare l'apparato di acquisizione dello zinco di *P. aeruginosa* e la sua importanza per la crescita batterica in condizioni di carenza di zinco; 2) valutare se questo apparato abbia ruolo critico nella capacità di *P. aeruginosa* di colonizzazione

il polmone dei pazienti e resistere all'azione antimicobica della CP. A questo scopo, costruiremo ceppi di *P. aeruginosa* privi dei geni codificanti per i trasportatori di zinco ed effettueremo esperimenti volti a chiarire il loro contributo alla crescita batterica in ambienti poveri di metalli e alla colonizzazione del polmone in modelli murini. Il contributo specifico della CP al controllo di *P. aeruginosa* sarà valutato attraverso saggi in vitro e tramite infezioni in animali neutropenici.

**Possibili ricadute per ricerca e clinica** Alla luce di recenti risultati che hanno dimostrato che è possibile sviluppare strategie farmacologiche che interferiscono con l'omeostasi dello zinco nei patogeni, pensiamo che questo studio possa portare all'identificazione di nuovi bersagli per strategie antimicrobiche utili a controllare le infezioni polmonari in FC.

## Subsession 2B Towards novel antimicrobial strategies

### 49. Pulmonary delivery of inhaled peptidomimetic as novel antibiotics to control *Pseudomonas aeruginosa* infection in murine models

**Bragonzi A<sup>1</sup>, Obrecht D<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Divisione di Immunologia, Trapianti e Malattie infettive, Infections and Cystic Fibrosis Unit, Istituto San Raffaele, Milano

<sup>2</sup>Polyphor Ltd, Switzerland (FFC Project#10/2011)



Alessandra Bragonzi, terza da sinistra, e il gruppo di ricerca

**Background.** The discovery, development, and clinical exploitation of antibiotics with new mode of action together with efficient pulmonary drug delivery systems is a top priority in the battle against untreatable chronic infections in cystic fibrosis (CF) patients.

**Hypothesis and objectives.** The long-term goal of this project is the pre-clinical development of a new class of anti-bacterial peptidomimetics which are active against sensitive and multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains in respiratory infections and their optimization for aerosol administration.

**Methods.** The therapeutic efficacy of the peptidomimetic POL7001 from Polyphor was tested both *in vitro* against a panel of *P. aeruginosa* clinical isolates from CF patients and *in vivo* in acute and chronic mouse infection models. Acute infection experiments with the reference PAO1 strain and the multi-drug resistant RP73 strain were performed in mice treated with POL7001 or with ciprofloxacin, an approved antibiotic currently used in clinics, by subcutaneous and intratracheal

administrations. Mice challenged with RP73 embedded in agar beads and treated subcutaneously were used for chronic infection experiments. To determine the absorption and biodistribution of POL7001, the concentration of the compound in lung tissue and plasma was determined after subcutaneous and intratracheal administrations in mice.

**Preliminary results.** POL7001 showed a potent *in vitro* activity against a large panel of CF multi-drug resistant strains. *In vivo* acute infection experiments with PAO1 and RP73 demonstrated a high antibacterial activity of the compound after both subcutaneous and intratracheal administration. In particular, intratracheal administration of POL7001 led to a better efficacy in reducing RP73 bacterial load when compared to ciprofloxacin. Analysis performed on the bronchoalveolar lavage fluid revealed that POL7001 had also an anti-inflammatory action both on mice acutely infected with PAO1 and RP73. The compound was tested also in a mouse model of chronic infection using RP73 and showed to have a good efficacy in reducing the bacterial load. Pharmacokinetic studies confirmed that pulmonary administration can be a possible therapeutic approach, as POL7001 reached favorable concentrations in the lung after intratracheal administration, with rather low systemic exposure.

**Spin-off for research and clinical purposes.** The results obtained so far indicate a high efficacy of POL7001 as an antibiotic against clinical multi-drug resistant *P. aeruginosa* strains. The intratracheal administration in mice gave good results, paving the way for pulmonary delivery in mice by MicroSprayer TM aerolizer in the next year.

### Sviluppo pre-clinico di Peptidomimetici attraverso la via inalatoria per il controllo delle infezioni da *Pseudomonas aeruginosa* in modelli murini

**Ragioni dello studio** Nonostante la crescente preoccupazione dei clinici rispetto al numero limitato di farmaci efficaci nel combattere ceppi multi-resistenti di *Pseudomonas aeruginosa*, solo un numero esiguo di nuovi agenti anti-*Pseudomonas* è attualmente in fase avanzata di sviluppo pre-clinico o clinico. Inoltre, per il trattamento delle infezioni polmonari croniche in pazienti con fibrosi cistica, negli ultimi anni si stanno facendo grandi sforzi per sviluppare diverse classi di antibiotici per terapia inalatoria.

**Ipotesi ed obiettivi** L'obiettivo a lungo termine di questo progetto è lo sviluppo pre-clinico di una nuova classe di antibatterici (peptidomimetici) e la loro ottimizzazione, perché possano essere usati correntemente per via inalatoria.

**Metodi** POL7001, scoperto dalla Compagnia Svizzera Po-

lyphor, è sintetizzato sul modello del peptide naturale Protegrina-1 (i "polipeptidi" naturali sono brevi sequenze di aminoacidi, come piccole proteine con meno di 20 aminoacidi, secrete dall'organismo con funzioni di difesa antibatterica). Questo nuovo antibiotico peptido-simile è stato testato e comparato ad altri antibiotici già usati in clinica per la sua attività nell'inibire la crescita di ceppi batterici di *Pseudomonas aeruginosa* adattati ritrovati nei polmoni di pazienti affetti da fibrosi cistica. La sua attività è stata testata anche in modelli animali di infezione acuta e cronica.

**Risultati** POL7001 è risultato efficace nel diminuire la carica batterica di ceppi resistenti a molti altri antibiotici già approvati per uso clinico sia in test *in vitro* che *in vivo* sugli animali utilizzando somministrazioni sottocutanee e intratracheali. L'efficacia del POL7001 come composto antibatterico è risultata essere maggiore rispetto a quella della ciprofloxacin (antibiotico usato correntemente nei pazienti FC), usata come controllo positivo.

**Possibili ricadute per ricerca e clinica** I risultati ottenuti finora indicano un'elevata efficacia di POL7001 come antibatterico contro ceppi clinici resistenti a più farmaci. La somministrazione polmonare negli animali ha dato buoni risultati, apreendo la strada allo sviluppo di una formulazione adatta al trattamento tramite aerosol.

## 50. Design, synthesis, in vitro biological evaluation and anti-biofilm activity of new beta-lactam and linezolid-like compounds as potential antibacterial agents against *Staphylococcus aureus* infections in cystic fibrosis patients

Cocuzza CE<sup>1</sup>, Musumeci R<sup>1</sup>, Oggioni D<sup>1</sup>, Pace A<sup>2</sup>, Cariani L<sup>3</sup>, Garlschi L<sup>3</sup>, Peroni I<sup>3</sup>, Galletti P<sup>4</sup>, Gentilucci L<sup>4</sup>, Tolomelli A<sup>4</sup>, Giacomini D<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Department of Surgery and Interdisciplinary Medicine, University of Milano-Bicocca, <sup>2</sup>Department of Science, Molecular and Biomolecular Technologies, University of Palermo, <sup>3</sup>Central Laboratory CF Microbiology, Fondazione IRCCS Cà Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano, <sup>4</sup>Department of Chemistry "G. Ciamician" University of Bologna (FFC Project#11/2011)



Clementina Elvezia Cocuzza, seconda da destra, con il gruppo di ricerca

**Background** *Staphylococcus aureus* colonizes the lungs of CF patients, causing recurrent and relapsing infections. An increased incidence of infections caused by methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) in the CF population has recently been reported in Europe and USA. These antibiotic-resistant strains are characterized by the presence of additional virulence factors and have been associated with a decline in lung function.

**Hypothesis and objectives** The emergence of multidrug-resistant bacteria poses a special challenge in the treatment of infections in CF and new therapeutic agents are required. The aim of this project is the design, synthesis and evaluation of the "in vitro" activity of new antistaphylococcal agents active against antibiotic-resistant strains of *S. aureus* isolated from children with CF.

**Methods** During this first year of the project a total of 15 new anti-staphylococcal compounds, with lactam (13) or oxazolidinone-like (2) structures, have been designed and synthesized by the Bologna Unit. The Unit of Milano isolated *S. aureus* strains from respiratory samples of children with CF; these have been characterized phenotypically, by means of antibiotic susceptibility profiles, and genotypically by means of spa typing. The Unit of Milano-Bicocca carried out the screening of the libraries of new compounds, developed by the Bologna Unit, for their antibacterial activity against 45 clinical isolates of MRSA, by determining their Minimum Inhibitory Concentrations (MICs). The 3 compounds which have shown the most promising activity have been further evaluated by determining their Minimum Bactericidal concentrations (MBC).

**Preliminary results** Preliminary results on the antibacterial activity of the three newly developed compounds against antibiotic-resistant clinical isolates of *S. aureus* have demonstrated promising results. Electron microscopy and cytotoxicity studies will be carried out to determine their possible mechanism of action of these most promising compounds.

**Spin-off for research & clinical purposes** The development and optimization of new compounds active against antibiotic-resistant bacteria will aim to bring about important advances in terms of reduction of morbility and mortality in patients with serious infections caused by these pathogens.

## Progettazione, sintesi, valutazione biologica in vitro e attività anti-biofilm di nuovi composti beta-lattamici e linezolid-simili come potenziali agenti antibatterici contro le infezioni da *Staphylococcus aureus* in pazienti affetti da fibrosi cistica.

**Ragioni dello studio** Lo *Staphylococcus aureus* colonizza le basse vie aeree di pazienti con fibrosi cistica (FC) causando infezioni ricorrenti e recidivanti. Recentemente, in Europa e negli Stati Uniti è stata riportata nella popolazione con FC una maggiore incidenza di infezioni da *S. aureus* meticillino-resistente (MRSA). Questi ceppi antibiotico-resistenti sono caratterizzati dalla presenza di fattori di virulenza aggiuntivi e sono stati associati ad una maggiore diminuzione della funzionalità polmonare.

**Ipotesi e obiettivi** L'emergere di batteri multi-resistenti rende necessaria la scoperta di nuovi agenti terapeutici, utili nella terapia di queste infezioni.

Lo scopo di questo progetto è stato la progettazione, sintesi e valutazione delle attività "in vitro" di nuove molecole nei confronti di *Staphylococcus aureus* resistenti agli antibiotici isolati da bambini con FC.

**Metodi** Durante il primo anno del progetto sono stati sviluppati 15 nuovi composti, aventi strutture lattamiche (13) o oxazolidinoni-simili (2). L'Unità di Milano ha isolato ceppi di *S. aureus* da campioni respiratori di bambini con FC; alcuni di questi isolati sono stati successivamente caratterizzati sia a livello fenotipico, mediante il profilo di sensibilità ad un pannello di antibiotici in uso clinico, che a livello genotipico, tramite lo spa-typing.

L'Unità di Milano-Bicocca ha effettuato lo screening delle librerie di composti sviluppati dall'Unità di Bologna, utilizzando un totale di 45 ceppi di MRSA, mediante la determina-

zione delle Minime Concentrazioni Inibenti (MIC) – concentrazioni utili a bloccare la crescita batterica. I 3 composti che hanno mostrato una migliore attività antibatterica sono stati ulteriormente valutati per la loro attività battericida (MBC) – concentrazioni in grado di provocare la morte della cellula batterica.

**Risultati preliminari** Ad oggi, i risultati preliminari sull'attività antibatterica dei nuovi composti contro ceppi clinici antibiotico-resistenti di *S. aureus*, hanno dato risultati promettenti. Studi di microscopia elettronica e di citotossicità saranno effettuati sulle molecole con maggiore attività per determinare il loro possibile meccanismo d'azione.

**Possibili ricadute per ricerca e clinica** Lo sviluppo e ottimizzazione di queste nuove molecole, attive nei confronti di batteri antibiotico-resistenti, potrà portare nel futuro ad importanti ricadute in termini di riduzione nella morbilità in pazienti con infezioni gravi associate a questi patogeni.

## 51. New drugs for *Burkholderia cepacia* from Antarctic bacteria

Fani R<sup>1</sup>, Tutino ML<sup>2</sup>, Rovero P<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Dip. Biologia dell'Evoluzione, Università di Firenze, <sup>2</sup>Dip. Chimica Organica e Biochimica, Università Federico II, Napoli,

<sup>3</sup>Dip. Scienze Farmaceutiche, Università di Firenze (FFC Project#12/2011)



Renato Fani, primo da destra, e il gruppo dei collaboratori

**Background** Lungs infection in Cystic Fibrosis (CF) patients are usually caused by Gram negative organisms, including bacteria belonging to the *B. cepacia* complex (Bcc), which exhibit a high level of multidrug resistance and virulence determinants that, in turn, renders their eradication difficult.

**Hypothesis and objectives** To overcome these difficulties, the aim of the project is the identification of new natural antibiotics targeted toward Bcc bacteria. We focused the attention on "unusual" microorganisms isolated from extreme environments, such as Antarctica, which represent an extraordinary source for the discovery of new natural antibiotics to be exploited in the control of infections in CF patients. This is due to the fact that these bacteria have adopted particular strategies to survive in these environments relying on the production of antimicrobial compounds.

**Methods and expected results** Specific assays for the detection of antibacterial activity have revealed a specific antimicrobial activity of Antarctic bacteria against Bcc cells, by producing one (or more) volatile organic compound(s) (VOCs). Some of the active compounds have been identified by applying advanced analytical methodologies. Most of them are sulfur-containing molecules. In order to identify the genes involved in the biosynthesis of such molecules, the

whole genome of twenty-three VOCs-producing Antarctic bacteria belonging to different species has been sequenced. The analysis of these genomes will allow to identify a set of genes likely involved in the VOCs biosynthesis and a set of specific insertion/deletion mutants will be constructed; a parallel study will allow to identify non-producing mutant strains through transposon-based mutagenesis. On the other side, another study is aimed to identify the molecular target(s) of the antimicrobial compounds produced by Antarctic bacteria. To this purpose Bcc mutants resistant to the antimicrobial compounds will be isolated, phenotypically characterized, and then the whole genome sequence will be determined. The identification of genes involved in VOCs resistance will be carried out through SNPs detection and also gene products will be identified.

**Spin-off for research and clinical purposes** In this way it will be possible to put the basis for the discovery and use of new effective antibiotics to be applied in the control of infections in CF patients by Bcc bacteria.

## Nuovi antibiotici prodotti da microrganismi antartici contro i batteri del *Burkholderia cepacia* complex

**Ragioni dello studio** Le infezioni polmonari dei pazienti FC sono di solito causate da organismi Gram negativi, alcuni dei quali appartengono al gruppo chiamato *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) che sono capaci di resistere a numerosi antibiotici, una proprietà che rende complicata la loro eradicazione dall'ospite.

**Ipotesi e obiettivi** Per aggirare questo ostacolo, il progetto è rivolto alla scoperta di nuove sostanze antibiotiche dirette contro i batteri del Bcc. Da questo punto di vista microrganismi "inusuali", come quelli che vivono in ambienti estremi (es. Antartide) possono rappresentare una fonte straordinaria di nuovi antibiotici. Infatti, i batteri che hanno colonizzato l'ambiente antartico, caratterizzato da condizioni ambientali molto avverse, hanno adottato particolari strategie per sopravvivere in un ambiente così "ostile", strategie che spesso si basano sulla produzione di molecole antibiotiche particolari e non ancora identificate. L'obiettivo di questo progetto è pertanto l'isolamento e la caratterizzazione (strutturale e funzionale) di nuovi antibiotici naturali prodotti da batteri isolati in Antartide per combattere e sconfiggere le infezioni dovute ai batteri appartenenti al Bcc.

**Metodi e risultati attesi** In precedenza l'uso di saggi appositamente allestiti per il rilevamento di molecole antibiotiche prodotte ha rivelato che molti batteri Antartici sono capaci di inibire completamente la crescita dei batteri appartenenti al Bcc che infettano pazienti FC. È stato anche dimostrato che questi potenti antibiotici prodotti dai batteri antartici sono molecole gassose e vengono chiamate VOC (Composti Organici Volatili), alcune delle quali sono già stati identificate. Molti di esse sono composti solforati. L'identificazione, l'isolamento e la caratterizzazione degli "antibiotici antartici" sarà possibile grazie ad un approccio multidisciplinare integrato che prevederà la stretta collaborazione tra i diversi gruppi partecipanti al progetto e l'utilizzo di metodiche avanzate nel campo della genomica, della bioinformatica, della genetica, della microbiologia e della farmacologia, quali ad esempio il sequenziamento massivo dei genomi batterici (al momento è stato sequenziato il genoma di 23 ceppi produttori di VOC) e la spettrometria di massa. L'uso combinato di queste metodologie permetterà non solamente di identificare le vie metaboliche dei batteri antartici responsabili della sintesi di tali composti, ma anche di isolare e determinare la struttura dei nuovi antibiotici.

**Possibili ricadute per ricerca e clinica** In questo modo saranno poste le basi per nuove terapie antibiotiche contro le infezioni da batteri appartenenti al Bcc.

## 52. Development of new host-defence like peptides and lipopeptides against lung pathogens: in vitro and in vivo studies

Mangoni ML<sup>1</sup>, Yechiel S<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dip. Scienze Biochimiche, Univ. "La Sapienza", Roma, <sup>2</sup>Dep. of Biological Chemistry, The Weizmann Institute of Science, Israel (FFC Project#14/2011)



In alto, Maria Luisa Mangoni, al centro, con collaboratori.  
Sotto, il gruppo del partner israeliano S. Yechiel

**Background** Patients with cystic fibrosis (CF) harbour distinct microorganisms, being *Pseudomonas aeruginosa* the most predominant one and quite difficult to eradicate, mainly because of its ability to form sessile communities named biofilms and the acquired resistance to most available antibiotics.

**Hypothesis and objectives** The general objective of the present study is to develop antimicrobial peptides (AMPs) of amphibian origin or de-novo designed peptides containing D-aminoacids (which make peptides more resistant to proteolytic degradation), as new drugs for the treatment of *P. aeruginosa* infections. They have advantages over existing AMPs by their small size (to guarantee a low cost of production); ability to preserve activity in biological fluids and at high salt concentration (which is common in the apical membrane of the airway epithelia in CF); lack of toxicity to mammalian cells; ability to perturb the target microbial membrane as a major mode of action, thus limiting the induction of bacterial resistance to them, and the ability to neutralize the toxic effect of the lipopolysaccharide (LPS) released from the microbial cell wall upon antibiotic treatment.

**Methods** A multidisciplinary approach combining biochemical, biophysical and microbiology techniques, as well as mice models *P. aeruginosa* lung infections

**Preliminary results** The results found in the first year of Project have conducted to the identification of a short (21 amino acids long) amphibian AMP endowed with the same efficacy against both reference and clinical isolates of *P. aeruginosa* strains and with a rapid killing kinetics (15 min). In addition, it is active on both the free-living and sessile forms of *Pseudomonas* and with membrane-perturbing activities on both forms of this pathogen. Moreover, it can prolong survival of neutropenic mice models of lung infection, once injected intratracheally. We will next characterize its capability to detoxify LPS from *P. aeruginosa* strains with the aim to limit de-

terioration of lung function in CF sufferers. In parallel, studies performed with the synthetic peptides have allowed us to know the effect of amino acids composition within an AMP on its ability to prevent biofilm formation.

**Spin-off for research and clinical purposes** Beside expanding our knowledge on the structure-function relationship of AMPs, the proposed studies will assist to lead to the generation of new low cost peptide-based anti-*Pseudomonas* medical preparations to be used in clinical medicine against CF.

## Sviluppo di nuovi peptidi e lipopeptidi attivi nel trattamento di patogeni polmonari: studi *in vitro* ed *in vivo*

**Ragioni dello studio** Pazienti con fibrosi cistica (FC) ospitano diversi microorganismi, tra cui lo *Pseudomonas aeruginosa* che è alquanto difficile da debellare a motivo della sua capacità di formare comunità sessili, chiamate biofilm, e della sua acquisita resistenza agli antibiotici correnti.

**Ipotesi e obiettivi** Il nostro scopo è quello di sviluppare peptidi antimicrobici (AMP) naturali da pelle di anfibio o di sintesi chimica contenenti D-aminoacidi (che li rendono più resistenti alla degradazione proteolitica) come nuovi farmaci per il trattamento di infezioni da *P. aeruginosa*. Rispetto ad altri AMP esistenti, essi hanno il vantaggio di possedere piccole dimensioni (garantendo un basso costo di produzione); di esplorare attività antimicrobica anche in fluidi biologici e ad alta concentrazione salina (presente negli epitelii aerei di pazienti con FC); di essere privi di tossicità nei confronti di cellule di mammifero; di avere un'azione membranolitica come principale meccanismo d'azione, limitando, pertanto, l'induzione di resistenza ad essi e di neutralizzare l'effetto tossico del lipopolisaccaride (LPS) rilasciato dalle cellule微生物 durante il trattamento antibiotico.

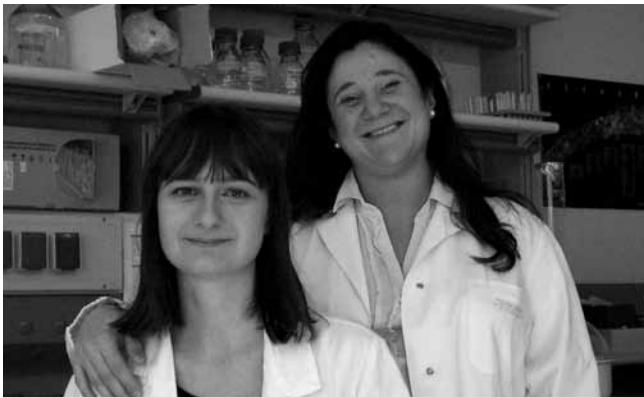
**Metodi** Impiego di un approccio multidisciplinare coinvolgente tecniche biochimiche, biofisiche, microbiologiche e modelli animali di infezione polmonare da *P. aeruginosa*. Risultati preliminari I risultati ottenuti nel primo anno del Progetto hanno condotto all'identificazione di un AMP di anfibio di piccole dimensioni (21 aminoacidi) dotato della stessa efficacia sia contro ceppi standard che isolati clinici di *P. aeruginosa*; con una rapida velocità di uccisione (15 min) e con un'azione membranolitica sia sulla forma libera che sessile di *Pseudomonas*. È in grado di prolungare la sopravvivenza di modelli murini d'infezione polmonare, una volta somministrato intra-trachealmente. Prossimamente, sarà caratterizzata la sua capacità di detossificare LPS da *P. aeruginosa* allo scopo di ridurre il deterioramento delle funzioni polmonari nei pazienti FC. In parallelo, studi eseguiti con i peptidi di sintesi chimica ci hanno permesso di conoscere l'effetto della composizione aminoacidica di un AMP sulla sua capacità di prevenire la formazione del biofilm.

**Possibili ricadute per ricerca e clinica** Oltre ad allargare la nostra conoscenza sui rapporti struttura-funzione degli AMP, la nostra ricerca permetterà di ottimizzare lo sviluppo di farmaci a base peptidica da impiegare utilmente nella medicina, contro la principale forma di infezione microbica nella FC.

## 53. Metalloproteases released by *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains as virulent factors in CF: clinical correlations and chemical modulators

Bergamini G<sup>1</sup>, Melotti P<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dip. Patologia e Diagnostica, Sez. Patologia Generale, Università di Verona, <sup>2</sup>Centro Regionale Fibrosi Cistica, AOUI Verona (FFC Project#7/2012)



Gabriella Bergamini, a destra, con collaboratrice di ricerca

**Background** *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) is the most common virulent pathogen of cystic fibrosis (CF). During bacterial lung colonization, the products of its metabolism are released in the extracellular space. Therefore we focused our attention on members of the metalloprotease family of bacterial enzymes (MP), known for their strong proteolytic activities in cells and tissues.

**Hypothesis and objectives** The modulation of Pa virulence factors such as MPs was suggested as mechanism for azithromycin (AZM) beneficial effects in CF patients. We plan to identify MP activity in Pa clinical strains and establish the sensitivity of it to AZM. Our study will enable to develop a highly reproducible and easy method to detect and measure the MP activity in many strains belonging to the collection of the Cystic Fibrosis Center of Verona.

**Methods** The method based on the flow cytometric assay with fluorochrome-labeled substrate (FITC-gelatin) coated microspheres will allow to evaluate MP activity in supernatants from more of 300 clinical strains isolated from the airways of CF patients featuring sporadic or chronic colonization. Then we would like to study the efficacy of AZM in all strains both sporadic or chronic capable to release MPs. Afterwards we are going to study the MMP activity in a large number of sputum from CF patients featuring sporadic or chronic colonization. It is mandatory to evaluate the metalloprotease activity in sputum from CF patient which will be prescribed AZM (after a period of suspension of at least one year) before therapy and after at least one month of treatment.

**Preliminary results** The MPs activity was already tested through zymography technique in some clinical isolates belonging to the collection of the Cystic Fibrosis Center of Verona. In 68 % of the sporadic strains we detected MPs activity while this was true only for 40% of the chronic strains. The 87% of sporadic strains decreased MPs activity following exposure to AZM while the same occurred only for 37% of chronic strains.

**Spin-off for research & clinical purposes** The evaluation of MP activity in a larger series of clinical isolates may provide insights on the correlation between this parameter and lung function in CF patients colonized by Pa strains. Our previous data shown that AZM has the greatest efficacy against early isolates of *P. aeruginosa* in CF, than against the strains from patients with longstanding infection. Determining the strain sensitivity to AZM could provide a rationale for treatment of individual patients.

## Metalloproteasi rilasciate da ceppi clinici di *Pseudomonas aeruginosa* quali fattori di virulenza in FC: correlazioni cliniche e modulatori chimici.

**Ragioni dello studio** *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) è l'agente patogeno virulento più comune della fibrosi cistica

(FC). Durante la colonizzazione batterica delle vie aeree, i prodotti del metabolismo di Pa vengono rilasciati nello spazio extracellulare. Noi quindi abbiamo deciso di studiare gli enzimi definiti metalloproteasi (MP), noti per la loro spiccata attività proteolitica in cellule e tessuti dell'ospite.

**Ipotesi e obiettivi** La modulazione di fattori di virulenza di Pa quali le MP è stata proposta come possibile causa degli effetti benefici dell' azitromicina (AZM) in pazienti affetti da FC. I nostri obiettivi sono identificare l' attività di MP in ceppi clinici di Pa e stabilire l'effetto dell'AZM sull'attività di MP. Il nostro studio permetterà di sviluppare un metodo riproducibile e semplice per rilevare e misurare l'attività MP in molti ceppi appartenenti alla collezione del Centro Fibrosi Cistica di Verona.

**Metodi** Il metodo, basato sull'analisi al citofluorimetro di microsfere rivestite dal substrato delle MP legato a un fluorocromo (FITC-gelatina) permetterà di valutare l'attività di MP in supernatanti di più di 300 ceppi clinici isolati dalle vie aeree di pazienti FC affetti da colonizzazione sporadica o cronica. È nostra intenzione anche studiare l'efficacia di AZM in tutti i ceppi sia sporadici che cronici in grado di rilasciare MP. In seguito analizzeremo l'attività MP in un elevato numero di espettorati di pazienti FC affetti da colonizzazione sporadica o cronica. Sarà indispensabile valutare l'attività di MP nell'espettorato dei pazienti FC ai quali è prescritta l'AZM (dopo un periodo di sospensione di almeno un anno) prima della terapia e dopo almeno un mese di trattamento.

**Risultati preliminari** L'attività di MP è già stata testata mediante zimografia in alcuni isolati clinici appartenenti alla collezione del Centro Fibrosi Cistica di Verona . Abbiamo rilevato attività MP nel 68% dei ceppi sporadici e solo nel 40% dei ceppi cronici. L' attività metalloproteasica è inoltre ridotta in seguito a trattamento con AZM nell' 87% dei ceppi sporadici e nel 37% dei ceppi cronici.

**Possibili ricadute per la ricerca e clinica** La valutazione dell'attività metalloproteasica in una serie più ampia di isolati clinici può fornire indicazioni sulla correlazione tra questo parametro e la funzione polmonare nei pazienti FC colonizzati da ceppi Pa. I nostri dati precedenti dimostrano che AZM ha la massima efficacia contro ceppi Pa di inizio infezione in FC, che contro i ceppi provenienti da pazienti con infezione di lunga data. La determinazione della sensibilità del ceppo ad AZM potrebbe fornire una spiegazione razionale per il trattamento di singoli pazienti.

---

## 54. Development, production and characterization of antibacterial peptides (CAMPs) active on the sessile form of the opportunistic human pathogens *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cenocepacia*

**Pizzo E<sup>1</sup>, Varcamonti M<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Dip. Biologia Strutturale e Funzionale, Università "Federico II", Napoli, <sup>2</sup>Dip. Biologia Strutturale e Funzionale, Università di Napoli "Federico" (FFC Project#9/2012)

**Background** In Cystic Fibrosis the major threat is related to opportunistic pathogens which, developing the multi-drug resistance phenotype (MDR), cause infections extremely difficult to eradicate. These pathogens often produce complex communities, the so-called biofilms, which confer further resistances to a broad spectrum of antibiotics. Therefore new antibiotics are needed to combat specifically MDR and/or biofilm forming pathogens, but progress in this direction has been slow so far. Naturally occurring, cationic antimicrobial peptides (CAMPs) are small amino acid-based molecules with broad spectrum ac-



Eliodoro Pizzo, primo a sinistra, con il gruppo di ricerca

tivity in a variety of pathogens including bacteria, viruses, and fungi. Humans and animals alike utilize these as a first natural line of defense against microbial invasion. As the molecular target of CAMPs, unlike conventional antibiotics, is the membrane these peptides are generally active on MDR strains and resistant strains are very rare. Thus the use of CAMPs appears promising to fight bacterial infections.

**Objectives** Our group has developed a panel of chemically modified human CAMPs (FFC#15/2011) active on several CF hypermutable and mucoid *P. aeruginosa* strains and not toxic on murine and human cell cultures. The present project is aimed to perform *in vivo* experiments on an acute infection model and at a second stage and guided from the outcome of the first experiments, to evaluate their potency on a chronic infection model.

**Methods.** Human CAMPs, and/or their chemical derivatives will be produced through recombinant DNA technology and opportune chemical manipulations. These CAMPs will be assayed on CF murine models of acute and chronic *P. aeruginosa* lung infections. As control experiment, CAMPs will be tested on human bronchial epithelial cells from FC patients to evaluate toxic effects, together with biochemical and functional studies.

**Expected results** During the course of this project and on the basis of the *in vitro* tests (FFC#15/2011), we expect as first result to observe the reduction of the bacterial load in the lungs of the animals treated. This will permit us to optimize the design of new human peptide-based drugs specifically direct to *Pseudomonas* lung infections, and/or to proceed with the search of effective formulation of the drug(s).

**Spin-off for research & clinical purposes** The present project is part of a larger program where we are interested to produce "bactericidal drugs", active alone or in combination with traditional antibiotics, for the treatment of pathogenic multi-drug resistant and/or biofilm forming bacteria.

## Sviluppo, produzione e caratterizzazione di peptidi antibatterici (CAMPs) attivi su patogeni umani opportunisti *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cenocepacia*

**Ragioni dello studio** La caratteristica distintiva della malattia polmonare dei pazienti affetti da Fibrosi Cistica è legata ai patogeni opportunisti che, sviluppando il fenotipo della multi-resistenza ai farmaci (MDR), causano infezioni estremamente difficili da trattare. Questi patogeni spesso producono complesse comunità, i cosiddetti biofilm, che conferiscono ulteriore resistenza a un ampio spettro di antibiotici. Quindi nuovi antibiotici sono necessari per combattere in maniera specifica i patogeni MDR e/o quelli in grado di formare biofilm, ma progressi in tale direzione sono ancora scarsi. A tal proposito risultano interessanti i CAMP, piccole molecole peptidiche con un ampio spettro di attività nei confronti

di una vasta gamma di patogeni di origine virale, batterica e fungina. L'uomo e in generale gli animali li utilizzano come prima linea di difesa naturale durante le invasioni batteriche. Essendo la membrana il target molecolare dei CAMP, questi peptidi generalmente sono attivi contro i ceppi MDR ed estremamente rari sono i fenomeni di resistenza sviluppati contro essi. Pertanto l'uso dei CAMP appare promettente per combattere le infezioni batteriche.

**Obiettivi** Il nostro gruppo ha sviluppato CAMP umani ricombinanti chimicamente modificati (FFC#15/2011) attivi contro numerosi ceppi di *P. aeruginosa* FC mucoidi e iper-mutanti e non tossici su cellule umane e murine. Il presente progetto è incentrato all'elaborazione di esperimenti *in vivo* su modelli murini FC.

**Metodi** CAMP umani e/o i loro derivati chimici saranno prodotti in forma ricombinante e successivamente modificati chimicamente a carico di residui chiave. Questi CAMP saranno saggiati su modelli murini infettati con *P. aeruginosa*. Come esperimenti di controllo, i CAMP saranno testati su epitelio bronchiale da pazienti FC per valutarne sia eventuali effetti tossici sia le loro proprietà biochimiche e funzionali.

**Risultati attesi** Durante il progetto e sulla base di test *in vitro* (FFC#15/2011) ci auguriamo di ottenere dati iniziali riguardanti la riduzione della carica batterica nei polmoni degli animali trattati. Questo ci permetterà di ottimizzare la progettazione di nuovi farmaci umani di natura peptidica specifici per le infezioni polmonari da *P. aeruginosa*.

**Possibili ricadute per ricerca e clinica** Il presente progetto è parte di un programma il cui scopo finale è la produzione di farmaci battericidi per il trattamento singolo o in combinazione con gli antibiotici tradizionali dei batteri multi resistenti.

## 55. A very promising drug against *Burkholderia cenocepacia*

**Riccardi G<sup>1</sup>, Fani R<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Dip. di Biologia e Biotecnologie, Università di Pavia,

<sup>2</sup>Dip. Biologia dell'Evoluzione, Università di Firenze (FFC Project#10/2012)



Giovanna Riccardi, responsabile del progetto

**Background** Chronic infections of the respiratory tract is a hallmark of cystic fibrosis (CF). Acquired and intrinsic resistance of CF-specific pathogens, such as *Burkholderia cenocepacia*, to various classes of antibiotics (MDR phenotype) explains the need for novel therapeutic strategies.

**Hypothesis and objectives** Important mediators of MDR in Gram-negative bacteria are transporters belonging to the RND family, whose members catalyze the efflux of many antibiotics. 16 rnd genes (*rnd1-rnd16*) were found in the *B. cenocepacia* genome. Through knock-out experiments we demonstrated

that RND-4 is the most important drug efflux pump in this organism. Consequently, in the development of a new drug it will be fundamental to avoid its extrusion by this RND transporter.

The objectives and expected results of this project are: 1. The heterologous production of RND-4 transporter for future structural studies and drug design in order to find molecules that will block this pump. 2. The synthesis of new molecules against *B. cenocepacia*. We recently found that a pyridine compound (11026103) is very active and we identified a mechanism of resistance, which relies on the extrusion of the new drug by RND-4 transporter. We aim to synthesize new derivatives that will not be recognized by the pump as a substrate. Toxicity of this compound is currently under investigation in Dr. Makarov's laboratory. 3. The target identification of pyridine derivatives.

**Methods** The first point will be addressed by cloning the genes which compose RND-4 into different expression vectors and many expression conditions will be carried out using *E. coli* as host strain. The identification of the cellular target of 11026103 will be carried out through selection and genome sequencing of spontaneous resistant mutants.

**Expected results** Production of RND-4 and identification of the cellular target of 11026103 compound.

**Spin-off for research & clinical purposes** It is well known that CF patients often die because of *B. cenocepacia* infections. The discovery of new drugs is vital for their life. Pyridine derivatives are under investigation for tuberculosis treatment (especially for the latent form) and the discovery that they are also active against *B. cenocepacia* is a very good starting point. When a molecule is active it is imperative to proceed.

## Un farmaco molto promettente contro *Burkholderia cenocepacia*

**Ragioni dello sviluppo** Le infezioni croniche del tratto respiratorio sono tipiche dei pazienti affetti da Fibrosi Cistica (FC). La resistenza intrinseca ed acquisita dei patogeni FC-specifici, come *Burkholderia cenocepacia*, a diverse classi di antibiotici (fenotipo MDR) fanno sì che ci sia bisogno di nuove strategie terapeutiche.

**Ipotesi e obiettivi** Tra i più importanti mediatori di MDR nei batteri Gram-negativi ci sono i trasportatori appartenenti alla famiglia RND, i cui membri catalizzano l'efflusso di parecchi antibiotici. Nel genoma di *B. cenocepacia* ci sono 16 geni (*rnd1-rnd16*) codificanti RND. Attraverso esperimenti di inattivazione genica abbiamo dimostrato che RND-4 è la pompa di efflusso più importante in questo organismo. Quindi, nello sviluppo di un nuovo farmaco, sarà essenziale evitare l'estruzione da parte di questo trasportatore. Gli obiettivi e i risultati attesi da questo progetto sono i seguenti: 1. La produzione eterologa del trasportatore RND-4 per studi cristallografici e di "drug design" per scoprire nuove molecole che bloccino questa pompa. 2. La sintesi di nuove molecole contro *B. cenocepacia*. Recentemente abbiamo scoperto che il composto denominato 11026103 è molto attivo e abbiamo individuato un meccanismo di resistenza basato sull'estruzione da parte di RND-4. Speriamo di sintetizzare dei derivati che non siano riconosciuti da questa pompa. La tossicità del composto è attualmente studiata dal Dr. Makarov. 3. L'identificazione del bersaglio di questo composto.

**Metodi** I geni che codificano le proteine che compongono RND-4 saranno clonati in diversi vettori di espressione e diverse condizioni di espressione saranno condotte in *E. coli*. Attraverso la selezione di mutanti spontanei e il sequenziamento del loro genoma speriamo di trovare il bersaglio del farmaco.

**Risultati attesi** Produzione della proteina RND-4 e identificazione del bersaglio cellulare del composto 11026103.

**Possibili ricadute per ricerca e clinica** È noto che i pazien-

ti FC muoiono spesso a causa delle infezioni dovute a *B. cenocepacia*. La scoperta di un nuovo farmaco è essenziale per la loro sopravvivenza. I composti descritti nel progetto sono studiati anche per il trattamento della tubercolosi (specialmente per le forme latenti) e la scoperta che sono attivi anche contro *B. cenocepacia* è un buon punto di partenza. Quando una molecola è attiva è essenziale andare avanti.

## 56. Development of optimized anti-infective peptides and exploration of a novel drug delivery system for the respiratory infection therapy in an animal model

**Scocchi M<sup>1</sup>, Di Bonaventura G<sup>2</sup>, Costantino ML<sup>3</sup>, Mardirosian M<sup>1</sup>, Pompilio A<sup>2</sup>, Bagnoli P<sup>3</sup>, Guida F<sup>1</sup>, Gennaro R<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Dept. of Life Sciences - Univ. of Trieste, Trieste; <sup>2</sup>Dept. of Biomedical Sciences, "G. D'Annunzio" University of Chieti-Pescara, Laboratory of Clinical Microbiology; <sup>3</sup>Dept. of Structural Engineering, Politecnico di Milano, Laboratory of Biological Structure Mechanics (FFC Project #11/2012)



In alto, Marco Scocchi, secondo in piedi da sinistra, con i collaboratori. Nella altre foto, i partner Giovanni Di Bonaventura e Maria Laura Costantino (al centro delle rispettive foto).

**Background** Patients with cystic fibrosis (CF) often show complications caused by antibiotic-resistant bacteria. Antimicrobial Peptides (AMPs) are a weapon that might be used against pulmonary infections. AMPs are natural molecules produced by animal and plants, endowed with anti-bacterial effects. Some AMPs, tested in a previous project, are active against antibiotic-resistant bacteria and are able to overcome or prevent the formation of biofilm. Despite these advantages, most AMPs are quite toxic, damaging the tissues of the patient. Other than resistant bacteria, a second obstacle for the eradication of pulmonary infections in CF patients is the difficulty of drug-delivery into patient's lungs, that are inflamed and obstructed by mucus.

**Hypothesis and objectives** Aim of the project is the testing of some modified natural BMAP peptides designed to maintain a good antibacterial activity and at the same time to re-

duce their toxicity. A second aim is to apply, as a novel system for the pulmonar drug delivery, a particular bronchoalveolar lavage, a procedure in which the airways are washed with an oxygenated liquid perfluorocarbon (PFC).

**Methods** The modified AMPs will be synthesized, their antibacterial activity will be tested *in vitro* also in combination with PFC and their toxicity assessed on mice. Their capability to cure a pulmonary infection will be tested in normal mice and in CF-mice.

**Expected results** To select, among the tested peptides, that one showing the best antibacterial properties and lowest toxicity against pulmonary tissues; to identify an AMPs able to be effective in the treatment of pulmonary infection caused by *P. aeruginosa* in a mouse model of infection; to find a peptide-PFC preparation for bronchoalveolar lavage effectives to clean pulmonary airways and to decrease the number of viable bacteria into the lungs.

**Spin-off for research & clinical purposes** We intend to provide new antibacterial molecules for the antibiotic therapy and to develop a new and more efficient procedure to administrate them to patients.

## Sviluppo di peptidi anti-infettivi ottimizzati e sperimentazione di un nuovo sistema di somministrazione di farmaci per la terapia delle infezioni respiratorie in un modello animale

**Ragioni dello studio** I pazienti affetti da fibrosi cistica frequentemente presentano complicazioni infettive dovute a batteri resistenti agli antibiotici. Una possibile strategia che potrebbe essere impiegata contro le infezioni polmonari è rappresentata dai Peptidi Antimicrobici (Anti-Microbial Peptides, AMPs), molecole dotate di azione antibatterica naturalmente prodotte sia da animali che da piante. Gli AMPs precedentemente saggiati sono attivi contro batteri resistenti agli antibiotici e sono in grado di eliminare o ridurre la formazione di biofilms, comunità microbiche particolari responsabili della cronicizzazione dell'infezione polmonare. A dispetto di questi vantaggi, la maggior parte degli AMPs presenta tossicità, danneggiando i tessuti del paziente come effetto collaterale. Oltre alla presenza di batteri antibiotico-resistenti, un secondo ostacolo all'eradicazione delle infezioni polmonari nei pazienti affetti da fibrosi cistica è rappresentato dalla difficoltà di somministrare farmaci nei polmoni del malato, infiammati ed ostruiti dal muco.

**Ipotesi e obiettivi** Il primo obiettivo del progetto è la messa a punto di forme modificate degli AMPs naturali, progettati per mantenere una buona attività battericida e per ridurre nel contempo gli effetti collaterali. Il secondo obiettivo è di utilizzare, come nuovo metodo di somministrazione di farmaci e di rimozione del biofilm, una particolare tecnica di lavaggio bronco-alveolare (BAL), nella quale le vie aeree vengono lavate con un liquido ossigenato, il perfluorocarburo (PFC).

**Metodi** A seguito della produzione di AMPs modificati, essi verranno saggianti *in vitro* per la attività antibatterica – in singolo ed in combinazione con il PFC – mentre gli eventuali effetti tossici saranno valutati *in vivo* utilizzando un modello murino. Si valuterà quindi l'efficacia degli AMPs nel contrastare la infezione polmonare in un modello murino wild-type e Cftr.

**Risultati attesi** Il principale risultato che si intende raggiungere è quello di individuare un AMP con una rilevante attività antibiotica e che, nel contempo, sia dotato di una trascurabile tossicità a livello polmonare. Ci aspettiamo che questo peptide sia in grado di combattere efficacemente un'infezione polmonare murina causata da *Pseudomonas aeruginosa*. Si cercherà inoltre di standardizzare una preparazione di AMP-perfluorocarburo in grado di lavare efficacemente le vie aeree ostruite dal muco ed in grado di ridurre significativamente la carica batterica polmonare.

**Possibili ricadute per ricerca e clinica** i risultati ottenuti dall'attività del presente progetto potrebbero fornire nuovi farmaci utili alla terapia antibiotica e sviluppare una nuova e più efficace strategia per la loro somministrazione ai pazienti.

## 57. Naturally occurring antimicrobials to counteract lung infections in cystic fibrosis patients: Cecropin A-Melittin (CA-M) hybrid peptides and polymixins

**Silipo A<sup>1</sup>, Di Bonaventura G<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Dip. Scienze Chimiche, Università "Federico II", Napoli,

<sup>2</sup>Dip. Scienze Biomediche, Università Chieti-Pescara (FFC Project#12/2012)



Alba Silipo, seconda da sinistra, assieme ai colleghi del gruppo di ricerca

**Background** The management of cystic fibrosis (CF) infections by *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) is significantly affected by the emergence of multidrug-resistant (MDR) strains. New therapeutic strategies are needed to circumvent these problems. Naturally occurring antimicrobials, such as antimicrobial peptides (AMPs), are being sought as "lead compound" for developing alternative antimicrobials. The design of enhanced synthetic variants to be used alone or in combination with other antibiotics could, therefore, represent an alternative strategy to counteract multidrug-resistant (MDR) strains.

**Hypothesis and objectives** The present project will be focused on the definition of novel therapeutic strategies in the treatment of CF lung infections based on the use of naturally occurring AMPs: Cecropin A-Melittin (CA-M) hybrid peptides and their derivates (CA-M hybrids), as well as polymixins. We aim to: i) explore the mechanisms of interaction of CA-M hybrids with bacterial cell envelope, in order to define the molecular requisites for resistance, adaptation and modulation of the host immune response by opportunistic CF pathogens such as *P. aeruginosa* and Bcc; and ii) evaluate the *in vivo* and *in vitro* activity of CA-M hybrids, alone and in combination with antibiotics commonly used in CF therapy (i.e., tobramycin), against planktonic and biofilm cells of CF MDR *P. aeruginosa* and Bcc strains.

**Methods** production of CA-M derivatives via synthetic methodologies; elucidation of the primary structure of bacterial lipopolysaccharide (LPS) via chemical, spectroscopic and spectrometric techniques; assessment of the pro-inflammatory activities of such isolates; characterization of the micro- and mesostructuring of lipopolysaccharide in lipid bilayers and study of the interaction of LPS-based bilayers with CA-M hybrids; Evaluation, in "CF-like" conditions, of CA-M hybrids activity against planktonic and biofilm phenotype of *P. aeruginosa* and Bcc; Assessment of toxicity of selected CA-M hybrids and protective effect in murine models of pul-

monary acute and chronic infection including CF mice.

**Expected results and spin-offs for research & clinical purposes** Elucidation of mechanisms of bacterial interaction with AMP (as CA-M hybrids) and definition of molecular requisite for resistance, adaptation and modulation of the host immune response. Characterization of the primary and supramolecular structure of LPS and of its interaction with CA-M hybrids; assessment of AMP *in vitro* and *in vivo* antimicrobial activity of CA-M hybrids and derivatives: evaluation of the antibacterial potential of CA-M hybrids, alone and in combination with antibiotics.

## Antimicobici di origine naturale per combattere le infezioni polmonari in pazienti affetti da fibrosi cistica: peptidi ibridi, Cecropina A-Melittina e polimixine.

**Ragioni dello studio** Il trattamento di infezioni da *Pseudomonas aeruginosa* e ad opera del *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) in fibrosi cistica è reso significativamente difficile dalla diffusione crescente di ceppi multi resistenti (MDR). La necessità di mettere a punto nuove strategie terapeutiche, in grado di combattere efficacemente le infezioni in fibrosi cistica, è crescente e impellente. I peptidi antimicobici di origine naturale si stanno affermando sempre di più come molecole da cui partire per lo sviluppo di nuovi antimicobici. Il design di varianti sintetiche a maggiore efficacia o minore tossicità, da usare da sole o in combinazione con altri antibiotici, può rappresentare una strategia promettente e alternativa per combattere i ceppi multi resistenti.

**Ipotesi e obiettivi** Il presente progetto sarà focalizzato sulla messa a punto di nuove strategie terapeutiche nel trattamento di infezioni polmonari in fibrosi cistica, sulla base dell'utilizzo di peptidi antimicobici (AMP) di origine naturale: ibridi Cecropina A-Melittina (CA-M) e loro derivati sintetici, e polimixine. Ci poniamo come obiettivi: i) di esplorare i meccanismi di interazione di ibridi CA-M con la cellula batterica, al fine di definire i requisiti molecolari alla base della interazione e di eventi quali resistenza, adattamento e modulazione della risposta immunitaria ad opera di batteri opportunisti quali *Pseudomonas aeruginosa* e il Bcc; ii) di valutare, *in vitro* ed *in vivo*, l'attività di AMP quali ibridi Cecropina A-Melittina e derivati sintetici soli e in combinazione con altri antibiotici comunemente usati (come tobramicina) contro ceppi batterici multiresistenti di *P. aeruginosa* e del Bcc.

**Metodi:** ci occuperemo della produzione di CA-M attraverso metodologie sintetiche; della delucidazione della struttura e della attività infiammatoria di Lipopolisaccaridi, principali componenti della membrana esterna dei batteri Gram-negativi a seguito del trattamento antibiotico; dello studio delle caratteristiche sovramolecolari e delle proprietà chimico-fisiche di membrane batteriche ricostituite in laboratorio e studieremo la loro interazione con peptidi antimicobici attraverso moderne metodologie chimico-fisiche. Valuteremo, in condizioni di fibrosi cistica, l'attività di ibridi CA-M contro strain di *P. aeruginosa* e Bcc, anche in presenza di biofilm. Valuteremo la tossicità dei peptidi selezionati e la loro attività *in vitro* e *vivo* in topi CF.

**Risultati attesi e Possibili ricadute per ricerca e clinica** Tra gli obiettivi chiave del progetto: delucidare i meccanismi di interazione tra batteri opportunisti quali *P. aeruginosa* e il Bcc con peptidi antimicobici quali ibridi CA-M e derivati di sintesi, al fine di definire i requisiti molecolari alla base del riconoscimento e dello sviluppo dei fenomeni di resistenza batterica; valutare se e come i batteri, in presenza di AMP, modulino la struttura di determinanti di virulenza batterica quali lipopolisaccaridi; selezionare peptidi che *in vitro* ed *in vivo* siano dotati di attività antibiotica contro ceppi batterici multi resistenti, da soli o in combinazione con altri antibiotici, al fine di settare nuove strategie terapeutiche.

## 58. Early antibiotic treatment for MRSA eradication in cystic fibrosis patients: a randomised multicentre study

Taccetti G<sup>1</sup>, Costantini D<sup>2</sup>, Collura M<sup>3</sup>, Magazzù G<sup>4</sup>, Raia V<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Centro Regionale Fibrosi Cistica, AOU "A. Meyer", Firenze, <sup>2</sup>Centro FC, Lab. Patologia Clinica, Fondazione IRCCSS Ca' Granda, Milano, <sup>3</sup>Centro FC, Ospedale "G. Di Cristina", Palermo, <sup>4</sup>Centro FC, Messina, <sup>5</sup>Centro FC, Napoli (FFC Project#20/2012)



Giovanni Taccetti e due collaboratrici del progetto

**Background** The prevalence of infections due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is increasing in cystic fibrosis (CF) patients and is associated with a consistent decline in the patient's FEV1 and higher mortality. Although there are cases of spontaneous MRSA clearance, early eradication treatment could determine that a higher number of patients have a clinically relevant germ-free period.

**Hypothesis and objectives** Few studies have analysed the possibility of early MRSA eradication. There is no published data on a large number of CF patients comparing the efficacy of eradication treatment to observation only. The main objective of the present randomised, multicentre clinical trial is to evaluate the efficacy of early eradication treatment in comparison with observation only in a large number of CF patients. Microbiological studies will also be performed on MRSA strains responsible for early infections.

**Methods** This is a randomized, multicentre clinical study comparing the efficacy of early eradication treatment (cotrimoxazole and rifampin taken orally for 21 days combined with nasal mupirocin for 5 days) with an untreated control group of CF patients. The drugs used in this study are widely used in current clinical practice. From our previous studies, we have documented *in vitro* efficacy against MRSA isolates from CF patients.

**Expected results** This study will clarify whether early eradication treatment is more effective than no treatment in clearing MRSA from airways of CF patients. The efficacy of treatment on community-acquired and hospital-acquired MRSA will also be determined.

**Spin-off for research and clinical purposes** This study will clarify crucial aspects of natural history of initial MRSA infection in CF. Prevention of persistent MRSA infection by early eradication treatment could be a simple and efficacious method to improve CF patients' prognosis.

## Trattamento antibiotico precoce per l'eradicazione di *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA) in pazienti affetti da fibrosi cistica: uno studio randomizzato multicentrico.

**Background** La prevalenza delle infezioni da *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA) è in aumento nei pa-

zienti con fibrosi cistica (FC) e si associa ad un declino consistente della funzionalità respiratoria e ad un incremento di mortalità. Anche se il germe può essere spontaneamente eliminato dalle vie aeree, il trattamento precoce potrebbe incrementare la percentuale di eradicazione garantendo un periodo di libertà clinicamente rilevante ad un maggior numero di pazienti.

**Ipotesi e obiettivi** Pochi studi hanno analizzato la possibilità di eradicazione precoce di MRSA. Il presente studio (multicentrico randomizzato) ha come obiettivo primario la valutazione dell'efficacia di uno schema di trattamento eradicante rispetto alla sola osservazione clinica nei confronti dell'infezione iniziale da MRSA.

**Metodi** I pazienti FC con colonizzazione iniziale da MRSA verranno randomizzati in uno dei due bracci di studio: trattamento antibiotico dell'infezione versus sola osservazione clinica. I pazienti randomizzati nel gruppo di trattamento riceveranno rifampicina e TMP/SMX per os per 21 giorni. La definizione di eradicazione è l'assenza del germe in almeno

tre esami culturali consecutivi eseguiti nei sei mesi successivi al trattamento eradicante.

**Risultati attesi** Poiché non è noto se il trattamento eradicante determini la clearance di MRSA in una percentuale più alta di pazienti rispetto alla sola osservazione, il presente studio si propone di far chiarezza in quest'area critica. Verrà valutata anche l'efficacia del trattamento nei confronti dei diversi ceppi di MRSA (ospedalieri e comunitari) colonizzanti le vie aeree di pazienti FC.

**Possibili ricadute per ricerca e clinica** La persistenza di MRSA è un fattore prognostico negativo: l'eradicazione precoce e il seguente periodo di tempo libero dal germe appaiono clinicamente rilevanti. In prospettiva la prevenzione dell'infezione persistente da MRSA potrebbe rivelarsi come un metodo semplice e efficace per migliorare la prognosi a lungo termine. Lo studio potrebbe inoltre mettere in luce alcuni degli aspetti cruciali della storia naturale dell'infezione iniziale da MRSA nei pazienti affetti da fibrosi cistica.

## PLENARY SESSION 2

### Other antiinfectious and antiinflammatory proposals

#### 59. Evaluation of the usefulness of therapeutic approaches aiming at increasing glutathione levels in the airways of cystic fibrosis patients to control lung infections and bacterial-induced damage

Battistoni A<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dip. Biologia, Università Tor Vergata, Roma (FFCProject #15/2010)



Andrea Battistoni, al centro, con i collaboratori

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

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

*potential usefulness of pharmacological treatments able to increase GSH in the lung to treat or prevent inflammation and infections in CF.*

**Methods.** To reach our goals, we have: 1) investigated the role of extracellular GSH in controlling bacterial infections in cultured cells 2) analyzed the protective role of GSH against pyocyanin toxicity, 3) carried out a preclinical investigation in CF mice on the effects of the oral administration of N-acetylcysteine (NAC).

**Main results.** We have shown that extracellular GSH can drastically reduce *B. cenocepacia* ability to adhere and invade epithelial respiratory cells. This effect is correlated to a GSH-dependent increase in the number of free thiols on the surface of epithelial cells, suggestive of a change in the redox-reductive status of membrane proteins involved in *B. cenocepacia* recognition. Treatments with GSH led to a consistent reduction of the expression of IL-8, TNF- and IL-1 in response to *B. cenocepacia* infection. NAC treatments proved to be able to slightly increase GSH levels in the lung tissue either in wild type of CF mice, but not to increase GSH levels in the ASL. Moreover, we have found that extracellular GSH prevents apoptosis and cell growth arrest due to pyocyanin.

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

**Spin-off for research & clinical purposes** Our findings suggest that therapies aimed at restoring normal levels of GSH in the ASL might be beneficial to control lung damage caused by bacterial infections.

#### 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

**Ragioni dello studio.** Uno dei difetti che caratterizzano i pazienti affetti da Fibrosi Cistica (FC) è una marcata riduzione del contenuto di glutazione ridotta (GSH) nei liquidi che rivestono le superfici delle vie aeree. Le funzioni del GSH in questo compartimento non sono ben caratterizzate, ma è probabile che esso svolga un importante ruolo antinfiammatorio

grazie alla sua capacità di rimuovere le specie reattive dell'ossigeno che vengono generate in modo continuo nei polmoni. Il GSH potrebbe anche avere un ruolo importante nel contrastare i danni indotti dalla piocianina (PCN), un'esotossina rilasciata da *P. aeruginosa*, che genera radicali liberi e contribuisce alle alterazioni fisiopatologiche tipiche del polmone FC.

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

**Metodi.** Per raggiungere il nostro obiettivo abbiamo 1) studiato il ruolo del GSH nel controllare le infezioni batteriche in modelli cellulari, 2) analizzato il ruolo protettivo del GSH nei confronti della tossicità della PCN; 3) effettuato uno studio preclinico su topi FC per valutare l'utilità della somministrazione orale di N-acetilcisteina (NAC).

**Principali risultati.** Abbiamo dimostrato che il GSH extracellulare riduce la capacità di *B. cenocepacia* di aderire e penetrare nelle cellule epiteliali di origine respiratoria. Questo effetto è correlato con un aumento nel numero dei sulfidrili liberi presenti sulla superficie delle cellule, che suggerisce che il GSH cambi lo stato ossidoreduttivo di proteine di membrana coinvolte nel riconoscimento del patogeno. Inoltre, trattamenti con GSH riducono significativamente l'espressione di citochine proinfiammatorie in risposta alle infezioni.

I trattamenti con NAC sono invece risultati capaci di aumentare leggermente i livelli di GSH nel tessuto polmonare sia nei topi selvatici che CF, ma non la sua estrusione a livello dei liquidi di rivestimento dell'epitelia polmonare. Infine, abbiamo osservato che il GSH extracellulare previene l'arresto della crescita e la morte cellulare causati da PCN.

**Conclusioni.** Il GSH extracellulare può modulare l'interazione tra batteri e cellule dell'epitelia respiratorio e ridurre il danno cellulare da PCN.

**Possibili ricadute per ricerca e clinica.** I nostri studi suggeriscono che terapie mirate a ripristinare un normale livello di GSH nel polmone dei pazienti CF possano essere utili per controllare le infezioni polmonari.

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

Manco A<sup>1</sup>, Andrenacci D<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ist. Biochimica delle Proteine, CNR Napoli, <sup>2</sup>Ist. Genetica e Biofisica, CNR Napoli (FFC Project#10/2010)



Giuseppe Manco, seduto al centro, con i collaboratori del progetto

**Background** *Pseudomonas aeruginosa* is the major cause of clinically relevant infections in cystic fibrosis (CF) due to antibiotic resistance, which demands for new strategies of mi-

crobe proliferation control. Quorum sensing (QS) regulates the expression of several virulence factors, as well as the biofilm formation and QS mutant strains are attenuated for virulence in animal models. QS signalling can be disrupted by lactonases. We propose studying thermostable members of the newly identified family of phosphotriesterase-like lactonase (PLL) to counteract bacterial infections in cystic fibrosis.

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

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

**Results** We have demonstrated no effect of our thermostable enzymes on PAO1 growth but some effects were evident in reducing swarming and abolishing twitching motility. Furthermore, pyocyanin expression and elastase activity, two of the key factors of virulence in PAO1, were substantially reduced. We have generated transgenic flies to be used as animal models harbouring four lactonase genes to test the possibility of in vivo control of the infection. We have used a transgenic fly expressing human PON1 as a control and the transgenic flies expressing our thermostable lactonases and PON2; all are more protected from PAO1 induced lethality.

**Spin-off for research & clinical purposes** We have obtained encouraging results confirming our general idea that lactonases, that we have discovered in 2006, can be used to counteract PAO1 infections. From both the in vitro and in vivo approaches, we had evidences that our thermostable lactonases are effective against PAO1 infection. We were also able to produce in *E. coli* the human PON2 that is the most active enzyme against *Pseudomonas* in humans. Starting from these results and willing to proceed with studies in other mammalian models we have started to test toxicity of our enzymes against human epithelial cells. We would like to start similar experiments on specific CF epithelial human cells and other animal models (pig or rat).

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

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

**Ipotesi e obiettivi** Il nostro scopo generale è di sviluppare una nuova strategia di controllo dell'infezione di *Pseudomonas* basata sulla soppressione dei segnali del QS in grado di neutralizzare lo sviluppo del biofilm e la virulenza del batterio. Proponiamo di analizzare l'effetto in vitro ed in vivo delle PLLs termostabili sullo sviluppo e sull'infezione di *P. aeruginosa* rispetto alla lattonasi umana PON1.

**Metodi** Gli enzimi sono stati espressi e purificati con classiche procedure usate in laboratorio. Il batterio PAO1 è stato cresciuto in terreno liquido o solido con procedure pubbli-

cate. Mosche di Drosofila sono mantenute in laboratorio e trattate secondo procedure ben consolidate.

**Risultati** Abbiamo dimostrato che non c'è effetto dei nostri enzimi termostabili sulla crescita di PAO1 ma alcuni effetti sono evidenti nella riduzione di un tipo di motilità conosciuta come *swarming* e della motilità detta di *twiching*. Inoltre il trattamento con i nostri enzimi riduce sostanzialmente l'espressione della piocianina e l'attività dell'elastasi, due dei fattori chiave di virulenza in PAO1. Abbiamo generato mosche transgeniche, che portano quattro geni delle nostre lattonasi, da usare come modelli animali per verificare la possibilità di controllo *in vivo* dell'infezione. Usando come controllo una mosca transgenica che esprime la lattonasi umana PON1, abbiamo testato che le mosche transgeniche che esprimono le lattonasi termostabili o PON2 sono più resistenti all'infezione da *Pseudomonas aeruginosa*.

**Possibili ricadute per ricerca e clinica** A conclusione di questo progetto abbiamo ottenuto risultati incoraggianti che confermano la nostra idea generale che le lattonasi microbiiche termostabili possono essere usate contro PAO1. Da entrambi i test *in vitro* e *in vivo* abbiamo evidenze che gli enzimi termostabili sono efficienti nel ridurre l'infezione batterica ad opera di *Pseudomonas aeruginosa*. Siamo anche stati in grado di produrre in *E. coli* la PON2 umana che è l'enzima più attivo contro *Pseudomonas* nell'uomo. Questo può aprire la strada all'evoluzione *in vitro* dell'enzima con lo scopo di aumentarne la stabilità. Se dimostreremo che i nostri enzimi sono più efficienti e/o economici rispetto all'enzima umano PON1 nel proteggere dall'infezione batterica, potremmo avviare studi simili in un modello più complesso quale il maiale o il ratto. A partire dai risultati sperimentali ottenuti *in vitro* e *in vivo*, abbiamo iniziato a testare che i nostri enzimi non diano tossicità cellulare su cellule umane epiteliali. In futuro vorremmo effettuare esperimenti simili su specifiche cellule umane epiteliali da pazienti FC e modelli animali (maiale o ratto).

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

Polissi A<sup>1</sup>, Bolognesi M<sup>2</sup>, Dehò G<sup>2</sup>, Peri F<sup>1</sup>, De Castro C<sup>3</sup>, De Gioia L<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dip. Biotecnologie e Bioscienze, Università Bicocca Milano,

<sup>2</sup>Dip. Scienze Biomolecolari e Biotecnologie, Università di Milano,

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

(FFC Project#13/2010)



Alessandra Polissi, quarta da destra, con il suo gruppo di ricerca

**Background** Lipopolysaccharide (LPS) biogenesis is an ideal target for the development of novel antimicrobial com-

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

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

**Methods** Genetic, biochemical and biophysical methods are being employed to characterize the target LptA and LptC proteins and to obtain structural information. For structure-function studies of LptC we have exploited the fact that *E. coli* lptC mutants are not complemented by the orthologous *P. aeruginosa* gene. We have identified three sequence motifs in the LptC proteins exhibiting different degrees of conservation in the two species. By swapping *E. coli* and *P. aeruginosa* LptC motifs we constructed chimeric proteins and tested their ability to bind LptA.

**Preliminary results** By this approach we assessed that motif 3 seems to be involved in interaction to LptA thus defining the LptC region containing the determinants for binding to LptA. None of the chimeric constructs, however, complemented LptC-depleted *E. coli*, suggesting that other species-specific motifs may be required for a productive interaction with LptA and/or other components of the Lpt machine. We also produced radiolabelled LPS and performed LPS binding assays with LptA and LptC. Our results seem to reinforce the current view that LptC has a higher affinity for purified LPS than LptA in line with the sequential LPS recognition and transfer by Lpt proteins to the cell surface.

**Spin-off for research and clinical purposes** The structural information obtained on the proteins of the LPS transport machinery will be used for the design of potential LPS biogenesis inhibitors.

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

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

**Ipotesi e obiettivi** Il lipopolisaccaride è un componente essenziale della membrana esterna, la struttura di rivestimento dei batteri Gram-negativi. Esso media diverse interazioni con l'ambiente e l'organismo ospite ed è responsabile dell'elevata resistenza intrinseca agli antibiotici. In questi ultimi anni sono stati fatti molti progressi per comprendere come questa molecola venga trasportata dal sito di sintesi (citoplasma e membrana interna) verso la membrana esterna, sua destinazione finale. Grazie a recenti studi fatti nel nostro ed in altri laboratori è stato individuato e caratterizzato il macchinario proteico (Lpt) responsabile del trasporto del LPS alla membrana esterna. Pensiamo quindi che la biogenesi del lipopolisac-

caride rappresenti un bersaglio ideale non ancora sfruttato per sviluppare farmaci innovativi tramite progettazione razionale.

**Metodi** 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 interagiscono in modo specifico con il bersaglio stesso.

**Risultati preliminari** Il progetto di ricerca si concentra su due proteine, LptA e LptC da noi scoperte, che sono componenti del macchinario Lpt. Le due proteine, che legano il lipopolisaccaride ed interagiscono tra di loro, rappresentano quindi ottimi bersagli farmacologici dal momento che sono presenti in molti ceppi batterici clinicamente rilevanti ma sono assenti nell'uomo. Abbiamo cominciato ad ottenere informazioni strutturali su LptA e LptC di *P. aeruginosa* grazie all'utilizzo di tecniche biochimiche, biofisiche e di genetica molecolare. Inoltre abbiamo messo a punto un saggio quantitativo per misurare l'interazione di queste proteine con il LPS.

**Possibili ricadute per ricerca e clinica** Questi risultati rappresentano il prerequisito per progettare e disegnare piccole molecole in grado di inibire l'assemblaggio del complesso proteico Lpt ed il suo legame con il LPS.

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

Dechechchi MC<sup>1</sup>, Gambari R<sup>2</sup>

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



Maria Cristina Dechechchi, terza da destra, e il suo gruppo di ricerca

**Background** To date, anti-inflammatory approaches developed against CF lung pathology present several limitations, so identification of novel molecular targets is a major priority. Sphingolipids (SLs) are important bioeffector molecules which are rising interest because of their role in many pulmonary disorders including CF.

**Hypothesis and objectives** Recent findings suggest that the pathophysiology associated with CF may be at least partly corrected by interfering with SL metabolism. Miglustat, an inhibitor of the synthesis of GSLs, already used for treating type I Gaucher disease, produces an anti-inflammatory effect in bronchial epithelial cells (Dechechchi 2008). This project was aimed to extend the analysis of the anti-inflammatory effect of miglustat, by investigating the anti-inflammatory properties *in vitro* and defining the relevant targets of the anti-inflammato-

ry activity through the analysis of the effect of modulators of different steps of the SL metabolism, on the cellular response against *P. aeruginosa*.

**Methods** We infected CF bronchial epithelial cells with the *P. aeruginosa* strain PAO1 and measured the IL-8 mRNA expression as a read-out of the inflammatory response.

**Results** Thanks to the FFC funding, the anti-inflammatory effect of miglustat has been validated in CF primary human airway cells grown at ALI, a cell model which closely resembles the native epithelium (Dechechchi, 2011). Regarding the anti-inflammatory activity of miglustat, our data suggest that the non-lysosomal glucosylceramidase (GBA2) could be, at least one, of the relevant targets to reduce the inflammatory response to *P. aeruginosa*. In collaboration with S. Cheng, (Genzyme Corporation) we studied different modulators of the metabolism of SLs and we found that both inhibition of hydrolysis of GlcCer or biosynthesis of ceramide reduces the *P. aeruginosa* stimulated IL-8 transcription in CF bronchial cells.

**Spin-off for research and clinical purposes** The scientific objectives achieved in this study represent the starting point to develop novel and increasingly specific pharmacological agents able to reduce the inflammatory response by targeting SL metabolism. Developing of small-molecules and their mode of action is of utmost importance and gives rise to the hope that such compounds may provide real therapeutic options for CF lung pathology and can be used as starting points for a drug discovery campaign.

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

**Ragioni dello studio** Le cure attualmente disponibili per l'infiammazione polmonare cronica dei pazienti FC sono poco efficaci e le limitazioni emerse dall'uso dei tradizionali anti-infiammatori, quali corticosteroidi e ibuprofene, spingono la ricerca verso nuovi farmaci in grado di ridurre i danni provocati da una risposta persistente ed esagerata, senza compromettere le difese.

**Ipotesi ed obiettivi** 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 effettuati in diversi modelli murini e pazienti FC suggeriscono che la normalizzazione dello sfingolipide (SL) ceramide potrebbe essere uno strumento utile per ridurre l'infiammazione polmonare in FC. Il miglustat, inibitore della sintesi dei glicosfingolipidi (GSLs), già usato per il trattamento della malattia di Gaucher e di altre sfingolipidosi, produce un effetto anti-infiammatorio in cellule epiteliali bronchiali (Dechechchi 2008). Questo progetto di ricerca era finalizzato ad estendere la valutazione dell'attività anti-infiammatoria del miglustat, studiandone le proprietà *in vitro* e definendo i possibili bersagli molecolari, attraverso l'analisi dell'effetto di diversi inibitori del metabolismo degli SLs sulla risposta a *P. aeruginosa*.

**Metodi** Cellule epiteliali bronchiali di pazienti FC sono state infettate con il ceppo di laboratorio di *P. aeruginosa*, PAO1 ed è stata misurata l'espressione del mRNA della chemochina IL-8 come marcatore della risposta infiammatoria delle cellule.

**Risultati** Grazie ai finanziamenti da parte della FFC, abbiamo confermato l'effetto anti-infiammatorio del miglustat in colture primarie di pazienti FC, un modello di studio che richiama l'epitelio respiratorio *in vivo* (Dechechchi, 2011). Per quanto riguarda il possibile meccanismo d'azione del miglustat, i risultati di questo studio suggeriscono che l'enzima glucosilceramidasi non lisosomiale (GBA2) possa essere almeno uno dei bersagli rilevanti per ridurre la risposta infiammatoria a *P. aeruginosa*. In collaborazione con S. Cheng (Genzyme Corporation), abbiamo analizzato diversi inibitori del meta-

bolismo degli SLs e abbiamo osservato la riduzione della trascrizione di IL-8 in cellule bronchiali sia utilizzando inibitori dell'idrolisi di glucosil ceramide che inibitori della biosintesi della ceramide.

**Possibili ricadute per ricerca e clinica** Gli obiettivi scientifici raggiunti attraverso questo progetto rappresentano un punto di partenza per lo sviluppo di possibili nuovi farmaci in grado di ridurre specificamente l'infiammazione polmonare FC modulando la ceramide. È auspicabile che l'identificazione di alcuni bersagli molecolari e strutture chimiche rilevanti possano offrire nuove opportunità terapeutiche ai pazienti affetti da FC.

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

Gambari R<sup>1</sup>, Dall'Acqua F<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Biochemistry and Molecular Biology, University of Ferrara, <sup>2</sup>Dept. of Pharmaceutical Sciences, University of Padova (FFC Project#17/2010)



Roberto Gambari, al centro, con le sue collaboratrici

**Background** Therapeutic approaches to control inflammation and to potentiate/correct CFTR functions can result beneficial in the clinical management of cystic fibrosis (CF) patients.

**Hypothesis and Objectives** Characterization of the biological activity of 4,6,4'-trimethylangelicin (TMA) and synthesis/investigation of novel structurally-related molecules can help in identify the structural determinants required to inhibit NF-kB/DNA interactions and might help in designing novel molecules exhibiting improved activity. On the other hand, TMA should be analysed as potentiat or correctors of CFTR biological activity to verify possible dual or triple activity. Novel anti-inflammatory molecules might be proposed to perform combined treatment with TMA.

**Methods** The project is based on the design and production of TMA and TMA analogues, including compounds with chemical modifications facilitating solubility and release to target cells. The biological assays include RT-PCR, EMSA, SPR-based BIA, Bio-plex analysis of secretome.

**Results** A. We have generated photoproducts of bioactive furocoumarin derivatives to develop novel lead molecules. B. Binding site of 57 novel psoralen derivatives has been proposed through docking and 3D-QSAR studies and a structure-activity relationship established. C. We have further characterized the TMA-mediated inhibition of IL-8 gene expression,

and the potentiation of CFTR functions. D. We have demonstrated that TMA is a CFTR corrector. E. TMA activity *in vivo* is comparable to that of ibuprofen. F. Novel antinflammatory compounds were found from extracts of bergamot (citroptene and bergaptene), *Phyllanthus urinaria* (corilagin) and olive oil (apigenin). Among novel psoralen derivatives, we identified compound **29** as the most active and promising. In conclusion, TMA is a triple acting compound, a corrector and a potentiator of the CFTR functions and an antiinflammatory molecule inhibiting IL-8 expression. TMA can be used in synergism with other NF-kB inhibitors to potentiate its anti-inflammatory property.

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

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

**Ragioni dello studio** Strategie terapeutiche mirate al controllo del processo infiammatorio e/o baste su potenziatori/correttori della funzione del CFTR possono risultare importanti per trattamento terapeutico di pazienti affetti da fibrosi cistica (FC).

**Ipotesi e obiettivi** La caratterizzazione dell'attività biologica della 4,6,4'-trimethylangelicina (TMA) e la sintesi e lo studio di nuove molecole strutturalmente affini può aiutare a identificare i determinanti strutturali necessari per inibire le interazioni NF-kB/DNA e potrebbero aiutare nella progettazione di nuove molecole che presentino attività superiore. D'altra parte, è importante che TMA sia analizzato come potenziatore e/o correttore dell'attività biologica di CFTR per verificare possibilità che TMA abbia una duplice o una tripla attività. Nuove molecole anti-infiammatorie potrebbe essere proposte per effettuare un trattamento combinato con TMA.

**Metodi** Il progetto è basato sul disegno e la sintesi di TMA e analoghi strutturali, includendo molecole a maggiore solubilità e internalizzazione nelle cellule bersaglio. I saggi biologici sono basati su tecnologie biomolecolari (RT-PCR, SPR-BIA, EMSA) e di chimica analitica (Bio-plex).

**Risultati** A. Abbiamo generato fotoprodotti di derivati furocoumarinici bioattivi per sviluppare nuove molecole di interesse per la CF. B. Il legame di 57 nuovi derivati psoralenici è stato proposto attraverso studi bioinformatici e di una relazione struttura-attività è stata stabilita. C. Abbiamo ulteriormente caratterizzato l'inibizione TMA-mediatata di IL-8, e il potenziamento delle funzioni del CFTR. D. Abbiamo dimostrato che la TMA è anche un correttore di CFTR. E. L'attività *in vivo* di TMA è paragonabile a quella dell'ibuprofene. F. nuovi composti antinfiammatori sono stati trovati da estratti di bergamotto (citroptene e bergaptene), *Phyllanthus urinaria* (corilagina) e olio d'oliva (apigenina). Tra i nuovi derivati psoralenici, abbiamo identificato il composto **29** come il più attivo e promettente. In conclusione, TMA è un composto a tripla attività biologica, è un correttore e un potenziatore delle funzioni CFTR e una molecola antiinfiammatoria. TMA può essere utilizzato in sinergia con altri inibitori di NF-kB ad attività l'anti-infiammatoria.

**Possibili ricadute per ricerca e clinica** È atteso che la riduzione dell'infiammazione cronica in polmoni FC possa comportare un miglioramento della qualità e dell'aspettativa di vita di pazienti FC. La correzione e il potenziamento del CFTR rappresentano altri obiettivi di rilevanza terapeutica.

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

**Garlanda C<sup>1</sup>, Bragonzi A<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Fondazione Humanitas per la Ricerca, Rozzano, Milano, <sup>2</sup>Divisione di Immunologia, Trapianti e Malattie infettive – Istituto San Raffaele, Milano (FFC Project#18/2010)



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

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

**Hypothesis and objectives** Our aim was to pursue our pre-clinical studies on PTX3 in the context of infections extending the analysis of its therapeutic potential against *P. aeruginosa* in animals deficient in CFTR and to other pathogens infecting cystic fibrosis patients.

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

**Results** The results obtained allowed us to extend the knowledge on the interaction between the molecule under study and different strains of *P. aeruginosa* isolated from patients and better understand the biochemical mechanisms underlying the recognition of microbes relevant to cystic fibrosis. In addition,

we were able to develop new experimental models necessary to study the therapeutic potential of the molecule. In particular, we characterized a model of chronic infection by *P. aeruginosa* in mice deficient in CFTR that mimics the clinical situation. In this model, we validated the therapeutic properties of PTX3.

**Spin-off for research & clinical purposes** The results obtained in this and other studies are promising for the therapeutic potential of this molecule, both for the antimicrobial role and anti-inflammatory effects and paved the way for future clinical studies on the therapeutic or prophylactic role of PTX3 in cystic fibrosis patients.

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

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

**Ipotesi e obiettivi** Ci siamo proposti di proseguire gli studi di preclinici su PTX3 nell'ambito delle infezioni estendendo l'analisi sul suo potenziale terapeutico verso *Pseudomonas aeruginosa* in animali portatori della mutazione CF, e verso altri micro-organismi rilevanti nella fibrosi cistica.

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

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

**Possibili ricadute per ricerca e clinica** I risultati ottenuti da questo ed altri studi sono promettenti sulla potenzialità terapeutica di questa molecola, sia per il suo ruolo nel controllo delle infezioni, sia per il suo potenziale antiinfiammatorio e costituiscono la base per futuri studi clinici sull'attività profilattica e terapeutica di PTX3 nei pazienti con fibrosi cistica.

## APPENDICES

### Appendix 1

## *Publications and Congress Communications from the Studies Funded by Italian CF Research Foundation (2002-2012)*

## **Pubblicazioni e comunicazioni congressuali dagli studi finanziati dalla Fondazione Ricerca FC dal 2002 al 2012**

### **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 speriment. della FC - Osp. San Raffaele - Milano), Olga Zegarra (Lab. Gen. Molec. - Ist. Gaslini -Genova)

#### Publications

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

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

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

#### Publications

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

#### Abstracts

- Copreni E. et al. "Pseudomonas aeruginosa infection of airway epithelium in a human fetal respiratory xenograft model in view of lentiviral gene therapy of CF lung disease" Journal of Cystic Fibrosis 2 (2003) S19-S23 – 26<sup>th</sup> 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, 8<sup>th</sup> 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. 17<sup>th</sup> 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" 2<sup>nd</sup> European Conference & Practical Course, February 1-14<sup>th</sup>, 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" 3<sup>rd</sup> 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 18<sup>th</sup> 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 lenti-

virale in modelli di epitelio respiratorio in vitro e in vivo: efficienza e ruolo dell'eparsolfato" X Congresso Nazionale di Fibrosi Cistica – Palermo, 27 – 30 ottobre 2004.

- Copreni E. et al. "Valutazione dell'efficienza, efficacia e sicurezza di vettori lentivirali nel trasferimento del gene CFTR in sistemi modello di epitelio respiratorio con fibrosi cistica" I Convention d'Autunno dei Ricercatori Italiani per la fibrosi cistica – 14-15 novembre 2003, Verona

- Copreni E. et al. "Efficiency, efficacy and safety of Lentivirus vectors in CFTR gene transfer in model systems of airway epithelia with cystic fibrosis" II Convention d'Autunno dei Ricercatori Italiani per la fibrosi cistica – 19-20 novembre 2004, Verona

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

Valeria Casavola (Dipart. Fisiologia Gen. ed Amb. - Univ. Bari), Manuela Zaccolo (Ist. Veneto Med. Molecolare, Padova)

#### Publications

- Abrahamsen H. et al. "TCR – and CD28 Mediated Recruitment of Phosphodiesterase 4 to Lipid Rafts Potentiates T Cell Receptor Signaling" J Immunol. 2004 Oct 15;173(8):4847-58

- Zaccolo M. et al "Use of Chimeric Fluorescent Proteins and Fluorescence Resonance Energy Transfer to Monitor Cellular Responses" Circulation Research 2004;94:866-873

- Mongillo M. et al. "Fluorescence Resonance Energy Transfer-Based Analysis of cAMP Dynamics in Live Neonatal Rat Cardiac Myocytes Reveals Distinct Functions of Compartmentalized Phosphodiesterases" Circulation Research 2004; 95:67-75;

- Guerra L. et al. "Stimulation of Xenopus P2Y1 receptor activates CFTR in A6 cells" Eur J. Physiol. (2004) 449: 66-75;

- Cardone R. A. et al. "Protein kinase A gating of a pseudopodial-localized 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, 44<sup>th</sup> 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

- Galletta 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 17<sup>th</sup> Annual North American CF Conference, Anaheim, California 16-19 October 2003;
- Moran O. et al. "Searching for the CFTR- Openers binding site" 2004 ECFS Conference New Frontiers in Basic Science of Cystic Fibrosis 30 April – 3 May 2004 Tomar Portugal;
- Moran O. et al. "Identification of the CFTR – openers binding site" S.I.B.P.A. 2004 XVII Congresso Nazionale della Società di Biofisica Pura ed Applicata Pisa 23-25 settembre 2004;
- Zegarra O. et al. "Identification of New Drugs for the Modulation of Chloride Transport in CF. Advance in the HTS Programme" 2004 – ECFS Conference New Frontiers in Basic Science of Cystic Fibrosis 30 April – 3 May 2004 Tomar Portugal;
- Moran O. et al. "A quantitative interpretation of the activation and inhibition of chloride currents by CFTR activators: genistein" The Physiology of Anion Transport. (Bristol, UK) 23-24 July 2005.
- Zegarra-Moran O. et al. "Pharmacologic activation of chloride transport in CF mutants" ECFS Conference. New Frontiers in Basic Science of Cystic Fibrosis (Evora, Portugal). 14-17 April, 2005.
- Zegarra-Moran O. et al. "Role of NBD mutations on the putative binding site of potentiators" Pediatr. Pulm. S29:71. 20th Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Denver, 2-5 November 2006.
- Zegarra-Moran O. "CFTR potentiators and gating mutants" 29th European Cystic Fibrosis Conference (Copenhagen, Denmark), 15-18 June 2006.

• FFC Project#3/2003 **"Screening of drugs approved for human use to identify novel pharmacological tools for Cystic Fibrosis"**

Luis JVL Galietta (Lab. Gen. Molec. - Ist. Gaslini – Genova), Mauro Mazzei (Dipart. Scienze Farmaceutiche - Univ. Genova), Massimo Conese (Ist. per il Trattamento Speriment. della FC - Osp. San Raffaele – Milano)

Publications

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

Abstracts

- Pedemonte N. et al. "Screening of a chemical library containing approved drugs and natural compounds to identify small molecules for the functional correction of CFTR mutants" 2004 North American Cystic Fibrosis Conference
- Pedemonte N. et al. "Dual activity of aminoarylthiazoles on trafficking and gating defects caused by CF mutations" Pediatric pulmonology, Suppl. 31, 2008. 22<sup>nd</sup> 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
- Spirli C. et al. "Glibenclamide stimulates fluid secretion in rodent cholangiocytes through a cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-independent mechanism" Gastroenterology. 2005 Jul;129(1):220-33
- Strazzabosco M. et al. "Differentially expressed adenylyl cyclase isoforms mediate secretory functions in cholangiocyte subpopulation" Hepatology. 2009 Jul;50(1):244-52

Abstracts

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

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

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

Publications

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

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

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

Publications

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

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

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

Abstracts

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

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

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

Publications

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

Abstracts

- Tamanini A. et al. "Adenovirus Vector Receptor Interactions and Early Pro-Inflammatory Signalling" 2005 – European Cystic Fibrosis Conference – New Frontiers in Basic Science of Cystic Fibrosis – Evora, Portugal 14 – 17 April 2005;

- Tamanini A. et al. "Biosafety studies in CF gene transfer: role of vector-receptor interactions in pro-inflammatory signalling" Journal of Cystic Fibrosis 4 (2005) S26-S33; 28<sup>th</sup> European C.F. Conference, Heronissos, 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<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger regulatory factor isoform 1 overexpression 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 all "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

- Fanelli T. et al. "β-estradiol rescues ΔF508-CFTR functional expression in CFBE41o-cells via NHERF1 up-regulation" Workshop Transporters 2006, Parma 6-9 September 2006.

- Guerra L et al. "Rescue of deltaF508 CFTR in CFBE41O-cells is dependent on actin cytoskeleton interaction with ezrin and NHERF1" European CF Conference, Belek, Turkey, 13-16 June 2007; J. of Cystic Fibrosis June 2007, vol. 6, suppl. 1:S7

- Riccardi S.M. et al. "Rescue of deltaF508 CFTR in CFBE41O-cells is dependent on actin cytoskeleton interaction with ezrin and NHERF1" 58<sup>th</sup> 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

- Coprene E. et al. " Novel generation lentiviral vectors: evaluation of inflammatory potential in human respiratory epithelial cells" North American CF Conference 2006. Denver co, USA
- Bezzetti V. et al. " Selective modulation of P. aeruginosa-dependent induction of interleukin-8 by transcription factor decoy oligonucleotides in CF bronchial epithelial cells" The 20<sup>th</sup> 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 21<sup>st</sup> Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Anaheim Convention Center, Anaheim, California, October 3-6 2007
- Bezzetti V. et al. "Modulation of expression of genes involved in leukocyte chemotaxis by interfering with nuclear transcription factors" The 21<sup>st</sup> 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 Sanguolo (Dipart. Biopatologia e Diagnostica per imm. - Univ. Tor Vergata RM), Massimo De Felici (Dipart. Salute pubblica e Biologia cellulare - Univ. Tor Vergata RM), Lorenzo Guerra (Dipart. Fisiologia Gen. ed Amb. - Univ. Bari), Marco Lucarelli (Dipart. Biotecn. Cell. ed ematologia - Univ. La Sapienza Roma)

#### Publications

- Sanguolo 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" 13<sup>th</sup> 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. 22<sup>nd</sup> 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" 13<sup>th</sup> Italian Cystic Fibrosis Conference, Milan, 30 Nov. – 2 Dec. 2007, J. Cyst Fibrosis 2008; 7, suppl. 3: S16

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

Luis JV Galletta (Lab. Gen. Molec. - Ist. Gaslini – Genova), Maurizio 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<sup>-</sup> Channel Activity" J. Membrane Biol. (2007) DOI 10.1007/s00232-007-9066-4
- Moran O. et al. "On the measurement of the functional properties of the CFTR" Journal of Cystic Fibrosis, 7 (2008) 483-494
- Moran O. "Model of the cAMP activation of chloride transport by CFTR channel and the mechanism of potentiators" J. Theor. Biol. (2010) 262:73-79.
- Bisignano P. et al. "Molecular dynamics analysis of the wild type and ΔF508 mutant structures of the human CFTR-nucleotide binding domain 1" Biochimie (2010) 92:51-57.
- Melani R. et al. "Analysis of ion transport in the airway epithelium using RNA interference" Current Opinion in Molecular Therapeutics, 11 (3): 282-291, 2009
- Melani R et al. "Modulation of Cystic Fibrosis transmembrane conductance regulator activity and genistein binding by cytosolic pH" J of Biol Chem (2010) Vol 285, 53:41591-6
- Galeno L. et al. "Small-angle X-ray scattering study of the ATP modulation of the structural features of the nucleotide binding domains of the CFTR in solution" Eur Biophys J, 2011 Jul;40(7):811-24

#### Abstracts

- Bisignano P. "Dinamica molecolare della CFTR: stabilità strutturale e termodinamica del primo dominio legante il nucleotide (NBD1)" Università degli Studi di Genova, Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali, Corso di laurea specialistica in Biologia Cellulare e Molecolare, Tesi di laurea, a.a. 2008/2009.

- Galfre E. et al. "Biophysical characterisation of the interaction of recombinant nucleotide binding domains of the CFTR and potentiators" XIX Congresso Nazionale SIBPA, Roma, 17-20 settembre 2008

- Ferrera L. et al. "Modulation of CFTR activity by interactions between the UCCF-029 potentiator and ATP analogues" The 22<sup>nd</sup> Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Orlando, Florida, October 23-25, 2008

- Melani R. et al. "Interaction between CFTR and Genistein at different values of intracellular pH" 2009 ECFS Basic Science Conference, New Frontiers in Basic Science of Cystic Fibrosis, April 15-19, Tavira, Portugal

- Martorana V. et al. "A molecular dynamics study of the CFTR nucleotide binding domains interaction" European Biophysics Journal, 7<sup>th</sup> EBSA European Biophysics Congress, Genova, July 11-15, 2009

- Moran O., moderators "Pharmacology – how do correctors and potentiators work?" Special group discussion – IV, European CF Society, Tavira, Portugal, April 15-19, 2009

- Moran O. et al., Identification of the binding site of CFTR potentiators. Presented at the 51st Annual Meeting of the Biophysical Society (Baltimore, U.S.A.). 3-7 March, 2007.

- Galfre E. et al., Biophysical characterisation of the interaction of recombinant nucleotide binding domains of the CFTR and potentiators, XIX Congresso Nazionale della Società Italiana di Biofisica Pura ed Applicata (Roma, Italy) 2008

- Zegarra-Moran O. et al. "Pharmacologic activation of chloride transport in CF mutants" ECFS Conference. New Frontiers in Basic Science of Cystic Fibrosis (Regua, Douro, Portugal), 9-13 April, 2008.
- Moran O. et al., Pharmacology- how do correctors and potentiatotors work? New frontiers in basic science of cystic fibrosis. European Cystic Fibrosis Society Conference New Frontiers in Basic Science of Cystic Fibrosis (Tavira, Portugal), 15-19 April, 2009.
- Bisignano P. et al., Molecular dynamics of CFTR: Structural stability and thermodynamics of the first nucleotide binding domain (NBD1). BITS 2009 - Sixth Annual Meeting of the Italian Bioinformatics Society (Genova, Italy). 2009.
- Zegarra-Moran O. et al., Binding of potentiatotors to CFTR involves electrostatic interactions. *Pediatr. Pulm.* S33:234. 24th Annual North American Cystic Fibrosis Conference (Baltimore, U.S.A.). 21-23 October, 2010.
- Zegarra-Moran O., "CFTR potentiatotors: effects of pH and mutations". 33rd European Cystic Fibrosis Conference (Valencia, Spain). 16-19 June 2010.
- Galeno L. et al., Structural features of the nucleotide binding domains of the CFTR in solution. XX Congresso Nazionale della Società Italiana di Biofisica Pura ed Applicata 2008 (Arcidosso, Italy)
- Melani R. et al., CFTR Activity and Potentiatotors Binding Are Modulated By Cytosolic pH. ECFS Conference New Frontiers in Basic Science of Cystic Fibrosis.(Tirrenia, Italy). 30 March-2 April, 2011.

**• FFC Project#2/2007 "Cellular and molecular mechanisms of the actin cytoskeleton involvement in the NHERF1-dependent rescue of 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. "-estradiol rescues ΔF508CFTR functional expression in human cystic fibrosis airway CFBE41o-cells through the up-regulation of NHERF1" *Biol Cell.* –2008 Jul;100(7):399-412
- Favia M. et al. "NHERF1 overexpression-dependent increase of cytoskeleton organization is fundamental in the rescue of F508del-CFTR in human airway CFBE41o- cells" under revision for publication in *Mol. Biol. Cell*
- 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 F508 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 Galieta (Lab. Gen. Molec. - Ist. Gaslini – Genova)

Publications

- Cateni F. et al. "Synthesis of 4-thiophen-2'-yl-1,4-dihydropyridines as potentiatotors 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 allostericcontrol over the master kinase CK2" *Biochem. J.* (2010) 426, 19-29

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

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

Publications

- Favia M et al "Na<sub>+</sub>/H<sub>+</sub> Exchanger Regulatory Factor 1 Overexpression-dependent Increase of Cytoskeleton Organization Is Fundamental in the Rescue of F508del Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator in Human Airway CFBE41o- Cells", *Molecular Biology of the Cell* January 1, 2010, Vol. 21, 73–86

- Monterisi S. et al. "CFTR regulation in human airway epithelial cells requires integrity of the actin cytoskeleton and compartmentalized cAMP and PKA activity" *J Cell Sci.* 2012 Mar 1;125(Pt 5):1106-17  
Abstracts

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

- Monterisi S. et al., "CFTR regulation in human airway epithelial cells requires integrity of the actin cytoskeleton and compartmentalized cAMP and PKA activity" 8<sup>th</sup> ECFS Basic Science Conference, Tirrenia, Italy 30 March - 2 April 2011

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

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

Publications

- Ferrera L et al "Regulation of TMEM16A chloride channel properties by alternative Splicing" *J Biol Chem* 284:33360-33368, 2009
- Pedemonte N et al "Influence of cell background on pharmacological rescue of mutant CFTR" *Am J Physiol Cell Physiol* (2010) 298:C866-74
- Budriesi R. et al. "Cystic fibrosis: a new target for 4-Imidazo[2,1-b]thiazole-1, 4-dihydropyridines" *J Med Chem.* 2011 Jun 9;54(11):3885-94
- Pedemonte N. et al. "Dual activity of aminoarylthiazoles on the trafficking and gating defects of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) chloride channel caused by cystic fibrosis mutations" *J Biol Chem.* 2011 Apr 29;286(17):15215-26
- Ferrera L. et al. "A minimal isoform of the TMEM16A protein associated with chloride channel activity" *Biochim Biophys Acta* 1808 (2011) 2214-2223

- Sondo E. et al. "Rescue of the mutant CFTR chloride channel by pharmacological correctors and low temperature analyzed by gene expression profiling" *Am J Physiol Cell Physiol.* 2011 Oct;301(4):C872-85

- Scudieri P. et al. "The anoctamin family: TMEM16A and TMEM16B as calcium-activated chloride channels" *Exp Physiol.* 2012 Feb;97(2):177-83.
- Giampieri M. et al. "Asymmetric 4-Aryl-1,4-dihydropyridines potentiate mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)" *ChemMedChem.* 2012 Oct;7(10):1799-807

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

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

Publications

- Pedemonte N. et al. "Influence of cell background on pharmacological rescue of mutant CFTR" *Am J Physiol Cell Physiol* (2010) 298:C866-74
- Pedemonte N. et al. "Dual activity of aminoarylthiazoles on the trafficking and gating defects of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) chloride channel caused by cystic fibrosis mutations" *J Biol Chem.* 2011 Apr 29;286(17):15215-26

Abstracts

- Pedemonte N. et al "Dissection by rnai-mediated silencing of molecular mechanisms involved in DF508del-CFTR misprocessing" NACFC 2010, Baltimore, USA

- Pedemonte N. et al. "Identification of new targets for ΔF508-CFTR rescue by genome-wide short interfering RNA screening" NACFC 2012, Orlando, USA

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

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

#### Publications

- Ruzzene M et al "Assessment of CK2 Constitutive Activity in Cancer Cells" Methods in Enzymology 2010; 484:495-514
- Salvi M "Variable contribution of protein kinases to the generation of the human phosphoproteome: a global weblog 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#6/2009 **"Direct visualization of CFTR conformation by atomic force microscopy imaging"**

Massimo Vassalli (Istituto di Biofisica - Consiglio Nazionale delle Ricerche)

#### Abstracts

- Marasini C. et al. "Direct visualization of CFTR conformation by atomic force microscopy imaging" 8<sup>th</sup> EBSA European Biophysics Congress (August 23-27 2011, Budapest, Hungary) in Eur Biophys J 2011, 40 (Suppl 1):S3-S11

- FFC Project#7/2009 **"Strategies for the suppression of Na<sup>+</sup> and fluid hyperabsorption in cystic fibrosis airway disease"** Olga Zegarra-Moran (Laboratorio di Genetica Molecolare - Istituto "Giannina Gaslini" - Genova)

#### Publications

- Melani R. et al., "Analysis of ion transport in the airway epithelium using RNA interference" Curr Opin Mol Ther, 11:282-291, 2009.
- Auriche C. et al., "CFTR expression and activity from the human CFTR locus in BAC vectors, with regulatory regions, isolated by a single-step procedure" Gene Therapy, 17:1341-1354, 2010.
- Becq F. et al., "Pharmacological therapy for cystic fibrosis: from bench to bedside" J Cyst Fibros, 10:S129-45, 2011.
- Melani R. et al., "Airway surface fluid expansion by activating CFTR or silencing ENaC" In preparation.

#### Abstracts

- Gianotti A. et al. "Innovative strategies for the Suppression of Fluid Hyperabsorption and the Recovery of airways hydration in cystic fibrosis" 2011 ECFC Basic Science Conference 30 March – 2 April 2011, Tirrenia, Pisa, Italy
- Zegarra-Moran O., "Identification of components of innate defense in the airway surface fluid", ECFS Conference. New Frontiers in Basic Science of Cystic Fibrosis (2009, Tavira, Portugal).
- Zegarra-Moran O., "Binding of potentiators to CFTR is pH sensitive" 33rd European Cystic Fibrosis Conference" (2010, Valencia, Spain).
- Zegarra-Moran O., "Epithelial sodium channel inhibition in primary human bronchial epithelia by transfected siRNA" Ion Channel Research Network Meeting (2011, Cambridge, UK).
- Melani R. et al., "CFTR Activity and Potentiators Binding Are Modulated By Cytosolic pH" New Frontiers in Basic Science of Cystic Fibrosis .2011 (Tirrenia, Italy).

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

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

#### Publications

- Bezzerrini V. et al. "Phospholipase C-β3 is a key modulator of IL-8 expression in cystic fibrosis bronchial epithelial cells" J Immunol. 2011 Apr 15;186(8):4946-58
- Bezzerrini V. et al. "Mapping transcriptional machinery of IL-8 gene in human bronchial epithelial cells" J Immunol. 2011 Dec 1;187(11):6069-81

#### Abstracts

- Gambari R. et al. "Pharmacological modulation of chemotactic signalling in respiratory models" 2010 ECFS Conference – April 7-10, Carcavelos (Portugal)
- Bezzerrini V. et al. "Genetic regulatory network of Interleukin-8" 3rd European CF Young Investigator Meeting, Lille, France, 2009
- Cabrini G., "Modulazione farmacologica della infiammazione polmonare cronica", 1° Conferenza Aziendale sulla Ricerca, La patologia polmonare, Azienda Ospedaliera Universitaria di Verona, Verona, 2010
- Bezzerrini V. et al., "Role of PLCB3 in pro-inflammatory signaling in bronchial epithelial cells", 25th North American Cystic Fibrosis Conference, Anaheim, CA, USA

- FFC Project#5/2010 **"The search of HSP70/HSC70 complex inhibitors useful to correct the ΔF508-CFTR"**

Mauro Mazzei (Dip. Scienze Farmaceutiche, Università di Genova), Paola Fossa (Dip. Scienze Farmaceutiche, Università di Genova), Maria Caterina Turco (Dip. Scienze Farmaceutiche, Università di Salerno)

#### Publications

- Cichero E. et al. "Scouting new molecular targets for CFTR therapy: the HSC70/BAG-1 complex. A computational study" MedChemRes, February 2012

- Basile A. et al. "Matrine modulates HSC70 levels and rescue ΔF508-CFTR" J Cell Physiol. 2012 Sep;227(9):3317-23

- FFC Project#6/2010 **"Novel biomarkers for evaluation of efficacy of new therapies in cystic fibrosis"**

Paola Melotti (Centro Regionale Fibrosi Cistica, OCM Verona), Claudio Sorio (Dip. Patologia, Sez. Patologia Generale, Università di Verona)

#### Publications

- Sorio C. et al. "Defective CFTR expression and function are detectable in blood monocytes: development of a new blood test for cystic fibrosis" PLoS One, 2011; 6(7): e22212. Published online 2011 July 21

#### Abstracts

- Sorio C. et al., "Defective CFTR expression and function are detectable in blood monocytes: development of a new blood test for cystic fibrosis" 2011 ECFC Basic Science Conference 30 March – 2 April 2011, Tirrenia, Pisa, Italy

- Rizzo R. et al., "Ruolo della molecola HLA-G come marcatore dello stato infiammatorio nella CF", VII Meeting Nazionale SIFC, Latina, 14-15 Aprile 2011

- Sorio C. et al. "Impaired CFTR function in mild CF associated with the S977F/T5TG12 complex allele" NACFC 2012, Orlando, USA

- Rizzo R. et al. "Relevance of HLA-G in CF" NACFC 2012, Orlando, USA

- FFC Project#7/2010 **"Structural features of the intracellular domains of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator"**

Oscar Moran (Istituto di Biofisica CNR, Genova)

#### Publications

- Galeno L. et al. "Small-angle X-ray scattering study of the ATP modulation of the structural features of the nucleotide binding domains of the CFTR in solution" Eur Biophys J. 2011, 40:811-824.

- Galfrè E. et al. "A potentiator induces conformational changes on the recombinant CFTR nucleotide binding domains in solution" Cell Mol Life Sci. 2012 Nov;69(21):3701-13

- Marasini C. et al. "Thermodynamic study of the native and phosphorylated regulatory domain of the CFTR", 2012, Biochem Biophys Res Commun. 423:549-552.

- Marasini C. et al. "A SAXS-based ensemble model of the native and phosphorylated regulatory domain of the CFTR", 2012, Cell Mol Life Sci. Oct 4. [Epub ahead of print]

#### Abstracts

- Galeno L. et al. "Structural Features of the Nucleotide Binding Domains of the CFTR in Solution" XX Congresso Nazionale SIBPA 11-14 settembre 2010, Arcidoso

- Galeno L. et al. "Structural Features of the Nucleotide Binding Domains of the CFTR in Solution" At XV school of Pure and applied Biophysics, Venezia, 24-28 January 2011

- Galeno L. et al. "Structural Features of the Nucleotide Binding Domains of the CFTR in Solution" ECFS- Basic Sciences 30 March- 2 April 2011, Tirrenia (Abstract, Poster and Oral Presentation)

- Moran O. "Model of the cAMP Activation of Chloride Transport by CFTR Channel and the Mechanism of Potentiators" ECFS- Basic Sciences 30 March- 2 April 2011, Tirrenia (Abstract, Poster and oral presentation)

- Marasini C. et al. "Direct visualization of CFTR conformation by atom-

- ic force microscopy" ECFS- Basic Sciences 30 March- 2 April 2011, Tirrenia (Poster)
- Moran O. "ATP-Dependent Conformational Changes of the NBD" The 34th European CF conference, Symposium CFTR Structure, Function and Therapy 8-11 June 2011, Hamburg (Oral Presentation)
  - Galeno L. "Structural features of the intracellular domains of the Cystic Fibrosis transmembrane Conductance Regulator" Scuola di Dottorato in Bioscienze e Biotecnologie, Biochimica e Biofisica, Università di Padova, November 2011 (Abstract, Oral presentation)
  - Marasini C. et al. "Conformational study of an intrinsic disordered protein by molecular dynamics" Giornata Ligure di Bioinformatica, Rete Ligure di Bioinformatica, 16 Dicembre 2011, Genova (Poster)
  - Moran O. "On the structure of the regulatory domain of the CFTR" ECFS Basic Science Conference, 28 March - 1 April 2012. Sainte Maxime (Abstract, Oral Presentation)
  - Marasini C. "Conformational and structural study of an intrinsic disordered protein" HERCULES - Higher European Research Course for Users of Large Experimental Systems. February 26- March 27 2012, Grenoble, Paris and Villigen (Poster)
  - Marasini C. et al. "Structural study of R domain of CFTR: an intrinsically unstructured protein" Open mind 2012, Bioingegneria, Università di Genova, 13 September 2012. (Oral Presentation)
  - Galeno L. "Regulatory domain: structural characterization of an intrinsic disordered protein" Scuola di Dottorato in Bioscienze e Biotecnologie, Biochimica e Biofisica, Università di Padova, June 2012 (Poster)
  - Marasini C. et al. "Structural study of R domain of CFTR: an intrinsically unstructured protein" XXI Congresso Nazionale della Società Italiana di Biofisica Pura ed Applicata SIBPA, September 17-20 2012, Ferrara (Abstract and Oral presentation)
  - Marasini C. et al. "Thermodynamical and structural changes in two functional states of regulatory domain of CFTR" The 11th Croatian School of Biophysics, Biomacromolecular Complexes and Assemblies, October 1–10, 2012 Primošten (Abstract, Poster and Oral presentation)
  - Moran O. "SAXS study of the ATP-modulation of the structural features of the nucleotide binding domains of the CFTR in solution. At Area della Ricerca di Palermo, CNR, Palermo 11 May 2011
  - Moran O. "On the molecular structure of the intracellular domains of the CFTR" At Faculté de Médecine Paris - Descartes, Site Necker, Paris, 23 January 2012

## 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
- Sangiuolo F. et al. "Toward the pharmacogenomics of Cystic Fibrosis – an update" Future Medicine – Pharmacogenomics, 2004 Oct., 5 (7), pp. 861-878
- Salvatore D. et al. "Isolated elevated sweat chloride concentrations in the presence of the rare mutation S1455X: an extremely mild form of CFTR dysfunction" Am J Med Genet A. 2005 Mar 1;133A(2):207-8
- Castaldo G. et al. "Phenotypic discordance in three siblings affected by atypical cystic fibrosis with the F508del/D614G genotype" J Cyst Fibros. 2006 Aug;5(3):193-5
- Gambardella S. et al. "Gene expression profile study in CFTR mutated bronchial cell lines" Clin Exp Med (2006) 6:157-165

Abstracts

- Gambardella S. et al. "CAP70 as a possible modifier gene of Cystic fibrosis phenotype" 54<sup>th</sup> 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" 28<sup>th</sup> European CF Conference, Crete, Greece 22-25 June 2005;

- FFC Project#8/2010 **"Decrease apical infection of CFTR by Pseudomonas aeruginosa infection: role of NHERF1 phosphorylation"** Anna Tamanini (Laboratorio Patologia Molecolare, Laboratorio Analisi Cliniche ed Ematologiche, OCM Verona), Stephan Reshkin (Dip. Fisiologia Generale ed Ambientale, Università di Bari)

Abstracts

- Tamanini A. et al. "Decreased apical expression of CFTR by Pseudomonas Aeruginosa infection in respiratory cells: role of NHERF1 phosphorylation" 2011 ECFC Basic Science Conference 30 March – 2 April 2011, Tirrenia, Pisa, Italy

- FFC Project#3/2011 **"Subverted signalling by protein kinase CK2 in ΔF508 CFTR expressing cells. Functional aspects and prospects in therapy"**

Lorenzo Pinna (Dip. Chimica Biologica, Università di Padova)

Publications

- Tosoni K. et al. "CFTR mutations altering CFTR fragmentation" Biochem J. 2012 Oct 15. [Epub ahead of print]

- FFC Project#4/2011 **"Role of spatial cAMP/PKA compartmentalization and activity in regulating CFTR function"**

Stephan Reshkin (Dip. Fisiologia generale ed ambientale, Università di Bari)

Publications

- Monterisi S. et al. "Local modulation of Cystic Fibrosis Conductance Regulator: cytoskeleton and compartmentalized cAMP signalling" Br J Pharmacol. 2012 Oct 16.

- FFC Project#3/2012 **"Study of the pathogenetic and therapeutic role of the Epithelial Na<sup>+</sup> channel (ENaC) in CF and CF-like disease"**

Marco Lucarelli (Dip. Biotecnologie cellulari ed Ematologia, Università "La Sapienza", Roma), Cristina Bombieri (Dip. Scienze della Vita e della Riproduzione, Università di Verona), Massimo Conese (Dip. Scienze Biomediche, Università di Foggia)

Abstracts

- Lucarelli M et al. "Espressione e metilazione dei geni ENaC" Congresso Società Italiana di Biochimica Clinica (SIBIOC), Roma 5-8 ottobre 2010.

- Lucarelli M. et al. "Expression and DNA methylation of ENaC genes" European Cystic Fibrosis Conference (ECFC), Valencia 16-19 June 2010

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

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

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

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

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

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

Franco Pagani (ICGEB – Trieste)

Publications

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

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

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

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

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

Publications

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

Abstracts

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

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

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

Publications

- Bombieri C. et al. "Frequency of large CFTR gene rearrangements in Italian CF patients" European Journal of Human Genetics (2005) 13, 687 – 689;
- Salvatore D. et al. "Cystic fibrosis presenting as metabolic alkalosis in a boy with the rare D579G mutation" Journal of Cystic Fibrosis 3 (2004) 135-136
- Tomaiuolo R. et al. "Epidemiology and a novel procedure for large scale analysis of CFTR rearrangements in classic and atypical CF patients: a multicentric Italian study" J Cyst Fibrosis 7 (2008) 347-351

Abstracts

- Bombieri C. et al. "Ricerca di riarrangiamenti del gene CFTR in pazienti italiani con Fibrosi Cistica" 7° Congresso Nazionale S.I.G.U. 13 – 15 ottobre 2004, Pisa;
- Bombieri C. et al. "Screening of CFTR gene rearrangements in Italian CF patients" Poster: Molecular Basis of Mendelian Disorder – The American Society of Human Genetics, 54<sup>th</sup> 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
- Raia V. et al. "La mutazione D1152H si associa a forme non classiche di CF" XII Congresso italiano della Fibrosi Cistica, Firenze, 23-25 novembre 2006

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

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

Abstracts

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

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

Publications

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

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

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

Publications

- Lucarelli M. et al. "A 96-well formatted method for exon and exon/intron boundary full sequencing of the CFTR gene" Anal. Biochem. 2006 Jun 15; 353(2): 226-35

- Narzi L. et al. "Does cystic fibrosis neonatal screening detect atypical CF forms? Extended genetic characterization and 4-year clinical follow-up" Clin Genet. 2007; 39-46

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

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

Publications

- Bruno F. et al. "High-sensitive microarrays substrates specifically designed to improve sensitivity for the identification of fetal paternally inherited sequences in maternal plasma" Clin Chem Lab Med 2009, 47:818-823

- Mari C. et al. "Application of pyrosequencing to the identification of sequence variations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene." Clin Chem Lab Med 2009; 47:1051-4

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

Franco Pagani (ICGEB, Trieste)

Publications

- Youhna M. A. et al. "TDP43 depletion rescues aberrant CFTR exon 9 skipping" FEBS Letters 580 (2006) 1339-1344.

- Raponi M. et al. "Reduced splicing efficiency induced by synonymous substitutions may generate a substrate for natural selection of new splicing isoforms: the case of CFTR exon 12" Nucleic Acids Research, 2007, Vol. 35, No. 2, pp. 606-613

- FFC Project#24/2006 **"Characterization of the unknown mutations in Italian patients and assessment of their pathogenic role: a prerequisite for prevention of Cystic Fibrosis by carrier screening and prenatal diagnosis"** Maria Cristina Rosatelli, (Dipart. Scienze Biom. e Biotecn. Lab. Genetica Molecolare - Univ. Cagliari), M. Baffico (Ospedali Galliera, Laboratorio di Genetica, Genova), Carlo Castellani (Centro FC – Ospedale Civile Maggiore - Verona), Manuela Seia (Lab. Genetica Molecolare ICP – Milano)

Publications

- Faa V. et al. "A Synonymous Mutation in the CFTR Gene Causes an Aberrant Splicing in an Italian Affected by a Mild Form of Cystic Fibrosis" J Mol Diagn. 2010 May;12(3):380-3. Epub 2010 Feb 26

- FFC Project#19/2007 **"Molecular analysis of genes encoding CFTR interactors of SLC26 family in CF patients"**

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

Publications

- Elce A. et al. "Three novel CFTR polymorphic repeats improve segregation analysis for cystic fibrosis" Clin Chem. 2009 Jul;55(7):1372-9
- Amato F. et al. "Extensive molecular analysis of patients bearing CFTR-

- related disorders" J Mol Diagn. 2012 Jan;14(1):81-9. Epub 2011 Oct 20.
- Tomaiuolo R. et al. "An MBL2 haplotype and ABCB4 variants modulate the risk of liver disease in cystic fibrosis patients: a multicentre study." Dig Liver Dis. 2009 Nov;41(11):817-22. Epub 2009 May 20.

Abstracts

- Elce A. et al. "Direct sequencing of CSTs in Cystic Fibrosis patients bearing indefinite genotype" 13<sup>th</sup> 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" 13<sup>th</sup> Italian Cystic Fibrosis Conference, Milan, 30 Nov. – 2 Dec. 2007, J. Cyst Fibrosis 2008; 7, suppl. 3: pp. S12-S13
- Elce A. et al. "L'analisi di tre nuovi marcatori polimorfici del gene CFTR rende più efficiente l'analisi molecolare indiretta della fibrosi cistica" XI Congresso nazionale SIGU, 23-25 novembre 2008, Genova
- Elce A. et al. "La caratterizzazione di tre nuovi polimorfismi nel gene CFTR permette il potenziamento dell'analisi di linkare nella fibrosi cistica" XIV Congresso italiano della fibrosi cistica – IV Congresso SIFC, Torino 27-29 novembre 2008

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

Franco Pagani (ICGEB – Trieste)

Publications

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

- FFC Project#3/2008 **"Genetic factors influencing pulmonary disease in Cystic Fibrosis (CF) patients"**

Paolo Gasparini (Dip. Scienze dello Sviluppo e Riproduttive - Università di Trieste), Giulio Cabrini (Lab. Patologia Molecolare - Azienda Ospedaliero - Universitaria - Verona)

Publications

- Crovella S. et al. "A polymorphism in the 5' UTR of the DEFB1 gene is associated with the lung phenotype in F208del homozygous Italian cystic fibrosis patients" Clin Chem Lab Med 2011;49(1):49-54

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

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

Abstracts

- Cozzolino F. et al. "Identification of novel CFTR promoter regulatory elements" Italian Proteomics Association, 4<sup>th</sup> Annual National Conference, Milano, June 22-25, 2009.
- Lo Presti A. et al. "Ricerca di mutazioni nel promotore del gene CFTR in soggetti affetti da Fibrosi Cistica" XII Congresso Nazionale di Genetica Umana: - SIGU - Torino, 8th -11th November 2009

- Iannone C et al "Identification of novel CFTR expression regulatory elements" ITPA 2010 - Florence, 9 th -12 th June 2010
- Giordano S. et al. "Il ruolo del promotore del gene CFTR: da elemento regolatore a possibile protagonista della patogenesi della malattia" 42° Congresso Nazionale SIBioC. Riassunti Poster Biochimica Clinica, 2010, vol. 34, n. 5, pag 419, n°061 - Rome, 5th – 8th October 2010

- FFC Project# 5/2008 **"Feasibility of a screening program for the 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
- Coiana A. et al. "Preconceptional identification of cystic fibrosis carriers in the Sardinian population: a pilot screening program", J Cyst Fibros. 2011 May;10(3):207-11

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

Franco Pagani (International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, ICGEB, Trieste)

Publications

- Goina E. et al. "Approaches to study CFTR pre-mRNA splicing defects" in Amaral MD & Kunzelmann K (Ed.), Cystic Fibrosis, Methods in Molecular Biology, 2010, 741 (2): 155-159.
- Alanis E. F. et al. "An exon-specific U1 small nuclear RNA (snRNA) strategy to correct splicing defects" (in preparation)
- Alanis E. F. et al. "An exon-specific U1 small nuclear RNA (snRNA) strategy to correct splicing defects" Hum Mol Genet. 2012 Jun 1;21(11):2389-98

Abstracts

- Alanis E. F. et al. "Shift U1 snRNAs Targeted to an Intronic Splicing Silencer correct aberrant CFTR exon 12 skipping" 8th European Cystic Fibrosis Society Basic Science Conference, Tirrenia, Italy, Mar.-Apr. 2011
- Alanis E. F. et al. "Shift U1 snRNAs targeting to ISS in splicing correction" 2nd International EURASNET Conference on Alternative Splicing, Granada, Spain, Feb.-Mar. 2011
- Alanis E. F. et al. "Defective Donor Splice Sites: Molecular analysis and therapeutic approaches" EURASNET Focus Meeting on RNA Mis-Splicing, Cambridge, UK, Churchill College, Univ. Of Cambridge, Jul. 2010

- FFC Project#6/2011 **"CFTR mRNA analysis as a key step to understand the role of CFTR gene mutations in cystic fibrosis disease expression"** Stefano Duga (Dip. Biologia e Genetica per le Scienze Mediche, Università di Milano)

Abstracts

- Rusconi D. et al. "Fine characterization of the recurrent c1584+18672A>G deep-intronic mutation in the CFTR gene" European Human Genetics Conference 2012

### 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" 12<sup>th</sup> 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" 25<sup>th</sup> 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" 26<sup>th</sup> 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" 11<sup>th</sup> 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. Hygen - 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. (19<sup>th</sup> North American Cystic Fibrosis Conference. Baltimore, USA)
- Paroni M. et al. "Pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* clonal strains isolated from CF patients in a murine model of chronic pulmonary infection" 20th Annual North American CF Conference; Denver – Colorado, 2-5 Nov. 2006
- Montanari S. et al. "Cost versus benefit of *Pseudomonas Aeruginosa* hypermutation in the absence or presence of antibiotic treatment" 20th Annual North American CF Conference; Denver – Colorado, 2-5 Nov. 2006
- Montanari S. et al. "Evaluation of the biological cost of hypermutation in *Pseudomonas aeruginosa* from patients with cystic fibrosis" 2nd FEMS Congress of European Microbiologists, Madrid, July 4-8, 2006

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

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

**Publications**

- Tabacchioni S. et al. "Use of the *gyrB* gene to discriminate among species of the *Burkholderia cepacia* complex" FEMS Microbiol. Lett (2008) 1-8
- Papaleo M.C. et al. " Structural, evolutionary and genetic analysis of the histidine biosynthetic "core" in the genus *Burkholderia*" Gene 448 (2009) 16-28
- Perrin E. et al. "Exploring the HME and HAE1 efflux systems in the genus *Burkholderia*" BMC Evol Biology (2010), 10:164
- Ferri L. et al. "Application of multiplex single nucleotide primer extension (mSNuPE) to the identification of bacteria: The *Burkholderia cepacia* complex case" J. of Microbiol. Methods (2010) In press

**Abstracts**

- Cocchi P. et al. "Identification of *Burkholderia cepacia* complex species by SNuPE analysis of *recA* and *gyrB* genes" 28<sup>th</sup> 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, 10<sup>th</sup> International Congress, Marsiglia, 27-31 Aug. 2005

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

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

**Abstracts**

- Vidal Aroca F. et al. "Functional genomics of the opportunistic pathogen *Pseudomonas Aeruginosa* by interfering antisense RNA" 25° Congresso Nazionale della SIMGBM, Orvieto 8- 10 giugno 2006;
- Vidal Aroca F. et al. "Functional genomics of the opportunistic pathogen *Pseudomonas Aeruginosa* by interfering antisense RNA" Summer School – International Univ. Bremen, 28 luglio – 4 agosto 2006;
- Milani A. et al. "Functional genomics of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* by interfering antisense RNA" 1<sup>st</sup> 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 Ascenzianni (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" 19<sup>th</sup> Annual North American CF Conference, Baltimore; October 20 – 23 2005
- Pirone L. et al. "In vitro and in vivo pathogenicity of clinical and environmental *Burkholderia cenocepacia* isolates" FISV, 2005, Environmental Microbiology and Ecology

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

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

**Publications**

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

- FFC Project#6/2005, #12/2006, #11/2007 **"Community-acquired MRSA and hospital- acquired MRSA in cystic fibrosis patients: a multicentre study regarding antibiotic susceptibility, epidemiology, natural history and clinical relevance"**

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

**Publications**

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

- Taccetti G. et al. "Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Cystic Fibrosis", European Infectious Diseases, 2008, vol. 2, issue 2.

- Taccetti G. et al. "Staphylococcus aureus meticillino-resistente comunitario e nosocomiale in fibrosi cistica: uno studio di epidemiologia molecolare" Medico e Bambino (2010)

- Cocchi P. et al. "Molecular epidemiology of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Italian cystic fibrosis patients: a National overview" J Cyst Fibros. 2011 Dec;10(6):407-11. Epub 2011 Jul 12.

**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" 30<sup>th</sup> 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. 22<sup>nd</sup> 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-as-

sociated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) pantone-valentine leukocidin (PVL) negative in cystic fibrosis patients" Pediatric pulmonology, Suppl. 31, 2008. 22<sup>nd</sup> Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Orlando, Florida, 22-25 October 2008, p. 348  
 - Campana S. et al. "Community-Acquired MRSA cause earlier infection than Hospital Acquired MRSA in patients with cystic fibrosis" 32<sup>nd</sup> 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" 32<sup>nd</sup> 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" 23<sup>rd</sup> 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" 23<sup>rd</sup> Annual North American Cystic Fibrosis Congress, Minneapolis, Minnesota, 15-17 October 2009.

- FFC Project#7/2005 "***Stenotrophomonas maltophilia*, an emergent pathogen associated to cystic fibrosis: identification and molecular characterization of virulence determinants as potential targets for new therapeutic strategies"**

Bianca Colonna (Dipart. Biologia Cellulare e dello Sviluppo - Lab. Microbiologia Molecolare - Univ. La Sapienza - Roma), Maurizio Sanguinetti (Ist. Microbiologia - Univ. Sacro Cuore - Roma), Mauro Nicoletti (Dipart. Scienze Sanità Pubblica - 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. Roscetto et al. "PCR-based rapid genotyping of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates" BMC Microbiol 2008 Nov 24;8:202.

#### Abstracts

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

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

Graziana Manno (Dipart. Pediatria - Osp. "G. Gaslini" - Genova), Roberto Biassoni (Lab. Medicina Molecolare - Ist. Gaslini - Genova), Eugenio Agenore Debbia (DISCAT - Sez. Microbiologia "C.A. Romanzi" - Genova), Angela Sanguolo (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" 30<sup>th</sup> 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" 30<sup>th</sup> 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 *lasl* Promoter" Journal of Bacteriology (2006), vol. 188, No. 2, pp. 815-819.
- Solis R. et al. "Involvement of quorum sensing and RpoS in rice see-

dling 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
- Devescov 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): 228-34
- 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" 1<sup>st</sup> 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 Bevvivino (Dipart. Biotecnologie Agroindustr. e protezione della salute - ENEA - Casaccia - Roma), Fiorentina Ascenzioni (Dipart. Biologia cellulare e dello sviluppo - Univ. La Sapienza Roma), Alessandra Bragonzi (Ist. per il Trattamento speriment. della FC - Osp. San Raffaele - Milano)

#### Publications

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

#### Abstracts

- Pirone L. et al. "Influence of *Pseudomonas aeruginosa* on the growth rate and internalization of *Burkholderia cenocepacia*" 9° Convegno Nazionale FISV, Riva del Garda (TN), 26- 29 Sett. 2007

- Bevvivino A. et al. "Influence of *Pseudomonas aeruginosa* on the growth rate and internalization of *Burkholderia cenocepacia*" 13<sup>th</sup> Italian Cystic Fibrosis Conference, Milan, 30 Nov. – 2 Dec. 2007, J. Cyst Fibrosis 2008; 7, suppl. 3: S16

- Pirone L. et al. "Influence of *Pseudomonas aeruginosa* on biofilm formation and internalization of *Burkholderia cenocepacia* strains" Florence conference on Phenotype MicroArray Analysis of Microorganism – The Environment, Agriculture and Human Health" Polo Scientifico di Sesto Fiorentino, Firenze, 19-21 marzo 2008

- Paroni M. et al. "Pathogenicity of environmental Burkholderia cenocepacia strains" International Burkholderia cenocepacia Working group, Ca' Tron di Roncade, Treviso, Italy, 14-17 aprile 2008

- Paroni M. et al. "Pathogenicity of environmental Burkholderia cenocepacia strains" Poster + Oral communication: 10<sup>th</sup> Convegno FISV – Federazione italiana scienze della vita, Riva del Garda (Trento), 24-27 settembre 2009

- Pirone L. et al. "Dual-species biofilm formation and cell invasion of *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cenocepacia*" 10<sup>th</sup> Convegno FISV – Federazione italiana scienze della vita, Riva del Garda (Trento), 24-27 settembre 2009

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

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

### Abstracts

- Bragonzi A. et al. " *Pseudomonas aeruginosa* pathogenecity within clonal strains from patients with cystic fibrosis" 13<sup>th</sup> 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 pulmunology, Suppl. 31, 2008. 22<sup>nd</sup> 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 pulmunology, Suppl. 31, 2008. 22<sup>nd</sup> Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Orlando, Florida, 22-25 October 2008, p. 342
- Bianconi I. et al. "Positive signature-tagged mutagenesis in *Pseudomonas aeruginosa*: tracking patho-adaptive mutations promoting airways chronic infection" PLoS Pathog. 2011 Feb 3;7(2):e1001270.
- Alcalà-Franco B. et al. "Antibiotic pressure compensates the biological cost associated with *Pseudomonas aeruginosa* hypermutable phenotypes in vitro and in a murine model of chronic airways infection" J Antimicrob Chemother. 2012 Apr;67(4):962-9. Epub 2012 Feb 1.

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

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

### Publications

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

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

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

### Publications

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

### Abstracts

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

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

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

### Publications

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

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

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

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

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

- Foschiati 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

- Kuttel M. et al. "Conformational properties of two exopolysaccharides produced by *Inquilinus limosus*, a cystic fibrosis lung pathogen" Carbohydr Res. 2012 Mar 1;350:40-8.

### Abstracts

- Furlanis L. et al. "Determinazione dell'unità ripetitiva del cepaciano traslocata nello spazio periplasmico da una flippasi codificata dal gene bceQ" 37<sup>o</sup> Congresso Nazionale di Microbiologia, Torino 11 - 14 Ottobre 2009

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

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

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

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

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

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

- T. 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*" 36<sup>o</sup> Congresso Società italiana di Microbiologia, Roma (Italy) 12-15 ottobre 2008

- Cescutti P. et al. "Structure-function relationships in cepacian biofilm formation" 14th European Carbohydrate Symposium, Lubeck 3-7 September 2007

- Cescutti P. et al. "Structure-function relationships in cepacian biofilm formation" XVIII convegno dell'Associazione Italiana di Scienza e Tecnologia delle Macromolecole, Catania 16-20 September 2007

- Cescutti P. et al. "Exopolysaccharides as bacterial defence tools: the case of *Burkholderia cepacia*"

Complex" XIV European Meeting on Carbohydrates, Lubeck, September 3-7, 2007

- FFC Project#14/2006 **"Longitudinal study of *Pseudomonas aeruginosa* resistance: selection and evolution of resistance mechanisms in relation to antibiotic treatment in cystic fibrosis patients"**

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

### Abstracts

- Campana S. et al. "Pseudomonas aeruginosa e metallo beta-lattamasi in pazienti affetti da fibrosi cistica: prevalenza e persistenza nel tempo" XII Congresso Italiano della Fibrosi Cistica, Firenze 23-25 Nov. 2006

- Campana S. et al. "Persistence of metallo -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients" 30<sup>th</sup> European CF Conference, Belek, Turkey; 13-16 June 2007

- Pollini S. et al. "Pseudomonas aeruginosa e metallo -lattamasi in pazienti con fibrosi cistica: prevalenza e persistenza" XXXVI Congresso Nazionale - Associazione Microbiologi Clinici Italiani, Rimini; 2-5 Ottobre 2007.

- Mugnaioli C. et al. "Meccanismi di resistenza acquisita in *Pseudomonas Aeruginosa* da pazienti con fibrosi cistica cronicamente colonizzati" XXXVII AMCLI, 2008, Stresa (VB), 5-8 Ottobre; NACFC, 2008, Orlando (Florida, USA), 23-25 October

- Mugnaioli C. et al. "Evolution of acquired resistance mechanism in *Pseudomonas Aeruginosa* isolated from chronically-infected cystic fibrosis patients" XXXVII AMCLI, 2008, Stresa (VB), 5-8 Ottobre; NACFC, 2008, Orlando (Florida, USA), 23-25 October

• FFC Project#6/2007 **"Dissecting a surface target candidate for the rational design of novel antibacterial drugs against *Pseudomonas aeruginosa*"**

Francesco Bonomi (Dipartimento di Scienze Molecolari Agroalimentari, Università degli Studi di Milano), Giovanni Bertoni (Dipartimento di Scienze Biomolecolari e Biotecnologie, Università degli Studi di Milano)

**Abstracts**

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

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

Bianca Colonna (Dipart. Biologia Cellulare e dello Sviluppo - Lab. Microbiologia Molecolare - Univ. La Sapienza – Roma), Maurizio Sanguinetti (Ist. Microbiologia - Univ. Sacro Cuore – Roma), Mauro Nicoletti (Dipart. Scienze Sanità Pubbli. - 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
- Nicoletti M. et al. "Stenotrophomonas maltophilia strains from cystic fibrosis patients: genomic variability and molecular characterization of some virulence determinants" Int J of Med Microbiol 301 (2011):34-43
- De Carolis E. et al. "Analysis of heat-induced changes in protein expression of *Stenotrophomonas maltophilia* K279a reveals a role for GroEL in the host-temperature adaption" Int J Med Microbiol. 2011 Apr;301(4):273-81
- Pompilio A. et al. "Phenotypic and genotypic characterization of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from patients with cystic fibrosis: genome diversity, biofilm formation, and virulence" BMC Microbiol. 2011 Jul 5;11:159.

**Abstracts**

- Di Bonaventura G. et al. "Effetto di concentrazioni subinibenti di moxifloxacina su *Stenotrophomonas maltophilia* isolati da fibrosi cistica" 34<sup>th</sup> Congresso nazionale della Società Italiana di Microbiologia, Genova 15-18 ottobre 2006.
- Prosseda G. et al. "Virulence factors of *Stenotrophomonas maltophilia*, an emergent pathogen associated to cystic fibrosis" 9<sup>th</sup> Convegno Nazionale FISV, Riva del Garda (TN), 26- 29 Sett. 2007
- Casalino M. et al. "Molecular characterization of *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from cystic fibrosis patients" 9<sup>th</sup> Convegno Nazionale FISV, Riva del Garda (TN), 26- 29 Sett. 2007
- Di Bonaventura G. et al. "Interazione in vitro tra *Stenotrophomonas maltophilia* e cellule epiteliali bronchiali IB3-1: implicazioni in fibrosi cistica" 35<sup>th</sup> Congresso nazionale della Società Italiana di Microbiologia, Catania 30 settembre – 3 ottobre 2007
- Fiscarelli E. et al. "Stenotrophomonas maltophilia isolated from pa-

tients affected by cystic fibrosis: genotyping analysis and molecular characterisation of virulence determinants" 18<sup>th</sup> 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" 18<sup>th</sup> 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" 36<sup>th</sup> Congresso nazionale della Società Italiana di Microbiologia, Roma 12-15 ottobre 2008.

- Di Bonaventura G. et al. "Caratterizzazione fenotipica e genotipica della formazione di biofilm da parte di *Stenotrophomonas maltophilia* isolati da pazienti con fibrosi cistica" 36<sup>th</sup> Congresso nazionale della Società Italiana di Microbiologia, Roma 12-15 ottobre 2008.

- Di Bonaventura G. et al. "Patogenesi microbica in fibrosi cistica: clearance di *Stenotrophomonas maltophilia* ed infiammazione in un modello murino di infezione polmonare" 36<sup>th</sup> 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" 7<sup>th</sup> Louis Pasteur Conference on Infectious Disease, 11-13 Novembre 2008, Paris, France.

- Cipresso R. et al. "Epidemiology of health care-associated *Stenotrophomonas maltophilia* infections in CF and ICU patients: role of biofilm formation. Clinical Microbiology and Infection" 2009; 15(s4):S401. Proceedings of the 19th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID), Helsinki, Finland.

- Iacobino A. et al. "Analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* virulence factors" SIMGBM 11-13 giugno 2009, Spoleto.

- Barchitta M. et al. "Ruolo epidemiologico del biofilm in isolati di *Stenotrophomonas maltophilia* da pazienti con fibrosi cistica e da pazienti ricoverati in unità di terapia intensiva" XI<sup>th</sup> Conferenza Nazionale di Sanità Pubblica, Napoli 2009

- Iacobino A. et al. "Virulence factors of *Stenotrophomonas maltophilia*: an opportunistic pathogen" FISV2009 11th Annual Congress Riva del Garda, 23-25 Sept.2009.

- Ciavardelli D. et al. "Alterazione dei livelli tessutali di ioni metallici in un modello murino di infezione polmonare da *Stenotrophomonas maltophilia*" XXXVII Congresso Nazionale della Società Italiana di Microbiologia, Torino 11-14 Ottobre 2009.

- Picciani C et al. "Analisi proteomica del biofilm formato da un ceppo di *Stenotrophomonas maltophilia* isolato da fibrosi cistica" XXXVII Congresso Nazionale della Società Italiana di Microbiologia, Torino 11-14 Ottobre 2009.

- Nicoletti M. et al. "Analisi genotipica e caratterizzazione molecolare di determinanti di virulenza espressi da ceppi di *Stenotrophomonas maltophilia* isolati da pazienti affetti da fibrosi cistica" XXXVII Congresso Nazionale della Società Italiana di Microbiologia, Torino 11-14 Ottobre 2009.

- De Carolis E. et al. "Caratterizzazione e analisi molecolare dell'espressione dell'operone groESL di *Stenotrophomonas maltophilia*" XXXVII Congresso Nazionale della Società Italiana di Microbiologia, Torino 11-14 Ottobre 2009.

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

Vittorio Venturi (ICGB Trieste)

**Publications**

- Rampioni G. et al. "RsaL provides quorum sensing homeostasis and functions as a global regulator of gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*" Molec. Microbiol. (2007) 66 (6), 1557-1565

- Licciardello G. et al. "*Pseudomonas corrugata* contains a conserved N-acyl homoserine lactone quorum sensing system; its role in tomato pathogenicity and tobacco hypersensitivity response" FEMS Microbiol Ecol 61 (2007) 222-234.

- Steindler L. et al. "The presence, type and role of N-acyl homoserine lactone quorum sensing in fluorescent *Pseudomonas* originally isolated from rice rhizospheres are unpredictable" FEMS Microbiol. Lett. 288 (2008) 102-111.

- Steindler L. et al. "LasL/R and RhlL/R Quorum Sensing in a strain of *Pseudomonas aeruginosa* beneficial to plants" Appl. Environ. Microbiol., August 2009, p. 5131-5140.

- Netotea 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 Mu-ropeptides Modification as a Strategy to Lower Innate Immunity during Cystic Fibrosis Lung Infection" PLoS ONE, December 2009, Vol. 4, Issue 12, e8439

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

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

#### Publications

- Gaines J. M. et al. "Regulation of the Pseudomonas aeruginosa *toxA*, *regA* and *ptxR* genes by the iron-starvation sigma factor *PvdS* under reduced levels of oxygen" Microbiology (2007) Vol 153: 4219-33
- Tiburzi F. et al. "Intracellular levels and activity of *PvdS*, the major iron starvation sigma factor of Pseudomonas aeruginosa" Mol. Microbiol. (2008) Vol. 67: 213-227
- Rampioni G. et al. "RsaL provides quorum sensing homeostasis and functions as a global regulator of gene expression in Pseudomonas aeruginosa" Mol. Microbiol. (2007) Vol. 66: 1557-1565
- Imperi F. et al. "Membrane-association determinants of the -amino acid monooxygenase *PvdA*, a pyoverdine biosynthetic enzyme from Pseudomonas aeruginosa" Microbiology, 2008 Sept., 154(Pt 9):2804-13
- Tiburzi F. et al. "Is the host heme incorporated in microbial heme-proteins?" IUBMB Life, 61(1):80-83 January 2009
- Imperi F. et al. "Analysis of the periplasmic proteome of Pseudomonas aeruginosa, a metabolically versatile opportunistic pathogen" Proteomics 2009, 9, 1901-1915
- Imperi F. et al. "Transcriptional control of the *pvdS* iron starvation sigma factor gene by the masterregulator of sulphur metabolism *CysB* in Pseudomonas aeruginosa" Environ. Microbiol. (2010) Vol. 12(6): 1630-1642
- Imperi F. et al. "Molecular basis of pyoverdine siderophore recycling in Pseudomonas aeruginosa" Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Dec 1;106(48):20440-5

#### Abstracts

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

- FFC Project#6/2008 **"Design of non-conventional antibiotics against cystic fibrosis-related pathogens"**

Giovanni Bertoni (Dipartimento di Scienze Biomolecolari e Biotecnologie, Università degli Studi di Milano), Stefano Maiorana (Dip. Chimica Organica e Industriale, Università degli Studi di Milano)

#### Degree thesis

Luca Sorrentino "Disegno ed utilizzo di oligomeri antisenso nel batterio patogeno opportunista Pseudomonas aeruginosa" Università degli Studi di Milano – A.A. 2009-2010

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

Annamaria Bevivino (ENEA C.R. Casaccia - Biotecn. Agroindustriale e Protezione della Salute), Fiorentina Ascenzioni (Dip. Biologia Cellulare e dello Sviluppo - Univ. La Sapienza)

#### Publications

- Bevivino A. et al. "Interaction of environmental Burkholderia cenocepacia strains with cystic fibrosis and non-cystic fibrosis bronchial epithelial cells *in vitro*" Microbiology. 2012 May;158(Pt 5):1325-33

#### 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" 23<sup>rd</sup> Annual North American Cystic Fibrosis Congress, Minneapolis, Minnesota, 15-17 October 2009.

- Farulli 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

- Bevivino A. et al. "Environmental Burkholderia cenocepacia strains can disrupt epithelial integrity in bronchial epithelial cells *in vitro* and have a more profound effect on ZO-1 in CF cells" 35th European Cystic Fibrosis Conference (ECFS 2012), Dublin, June 6-9, 2012.

- FFC Project#8/2008 **"Development and validation of a novel screening system for the identification of Pseudomonas aeruginosa virulence inhibitor"**

Livia Leoni (Lab. Microbiologia molecolare e Biotecnologie dei microrganismi, Dip. Biologia, Università "Roma 3"), Paolo Visca (Lab. Microbiologia clinica e Virologia, Dip. Biologia, Università "Roma Tre")

#### Publications

- Rampioni G. et al. "Contribution of the RsaL global regulator to Pseudomonas aeruginosa virulence and biofilm formation" FEMS Microbiol Lett 301 (2009): 210-217

- Imperi F et al "Molecular basis of pyoverdine siderophore recycling in Pseudomonas aeruginosa" Proc Natl Acad Sci U S A. 2009. 48:20440-5.

- Imperi F et al "Transcriptional control of the *pvdS* iron starvation sigma factor gene by the master regulator of sulfur metabolism *CysB* in Pseudomonas aeruginosa" Environ Microbiol. 2010. 6:1630-42.

- Massai F. et al "A multitask biosensor for micro-volumetric detection of N-3-oxo-dodecanoyl-homoserin lactone quorum sensing signal" Biosensors and Bioelectronics. 2010. Submitted.

#### Abstracts

- Rampioni G. et al. "Role of the RsaL quorum sensing regulator in Pseudomonas aeruginosa pathogenic potential" 28<sup>th</sup> 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" 28<sup>th</sup> 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" 28<sup>th</sup> National Meeting Società Italiana di Microbiologia generale e Biotecnologie microbiche, Spoleto, June 11-13, 2009

- FFC Project#10/2008 **"Essential proteins of Pseudomonas aeruginosa other membrane biogenesis as novel targets for new antimicrobial drugs design and synthesis"**

Alessandra Polissi (Dipartimento Biotecnologie e Bioscienze - Università Bicocca Milano), Gianni Dehò (Dipartimento Scienze Biomolecolari e Biotecnologie – Università di Milano), Cristina De

Castro (Dipartimento di Chimica e Biochimica Organica – Università di Napoli “Federico II”), Martino Bolognesi (Dipartimento Scienze Biomolecolari e Biotecnologie – Università di Milano), Laura Cipolla (Dipartimento Biotecnologie e Bioscienze - Università Bicocca Milano), Luca De Gioia (Dipartimento Biotecnologie e Bioscienze - Università Bicocca Milano).

#### Publications

- Sommaruga S. et al. “Structure prediction and functional analysis of KdsD, an enzyme involved in lipopolysaccharide biosynthesis” *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 388 (2009) 222-227
- Airoldi C. et al “Targeting Bacterial Membranes: Identification of *Pseudomonas aeruginosa* d-Arabinose-5P Isomerase and NMR Characterisation of its Substrate Recognition and Binding Properties” *ChemBioChem* DOI: 10.1002/cbic.201000754.

#### Abstracts

- Airoldi C. et al. “D-arabinose-5-phosphate isomerase: NMR characterisation of natural substrates recognition and binding requirements” *Biotech.org - Chimica Organica e Biotecnologie: Sfide e Opportunità*, May 20-23, 2009, Forte dei marmi (Lucca)
- Sommaruga S. et al. “3D structure by homology modeling of the *Escherichia coli* KdsD, an enzyme involved in lipopolysaccharide biosynthesis” *FISV 2008 10th Annual Congress* (Riva del Garda – TN, 24-27 Settembre 2008)
- Airoldi C. et al. “NMR as tool for the characterization of carbohydrate processing enzymes: the example of *E. coli* arabinose 5-phosphate isomerase (API)” *XI Convegno-Scuola sulla Chimica dei Carboidrati*, 22-26 Settembre 2008, Pontignano (Siena)
- Sommaruga S. et al. “Structural and biochemical characterization of KdsD, an enzyme involved in lipopolysaccharide biosynthesis” *XXVIII Convegno nazionale SIMGBM, Società Italiana di Microbiologia generale e Biotecnologie 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#10/2009 **“Validation of novel vaccine candidates of *Pseudomonas aeruginosa*”**

Alessandra Bragonzi (Unità di Infezione e fibrosi cistica - Divisione di Immunologia, Trapianti e Malattie infettive - Istituto San Raffaele - Milano), Giovanni Bertoni (Dipartimento di Scienze Biomolecolari e Biotecnologie, Università degli studi di Milano)

#### Abstracts

Bianconi I. et al. “Genome sequence and functional comparative genomics of *P. aeruginosa* RP73: defining host-bacterial interactions in a persistent lifestyle” *NACFC 2012*, Orlando, Florida, USA

- 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
- Cocchi P. et al. “Genetic background of MRSA collected from cystic fibrosis (CF) patients versus MRSA collected from intensive care unit (ICU) patients: does any difference exist?” *NACF 2012*, Orlando, Florida, USA

- FFC Project#12/2009 **“Novel strategies for respiratory infection therapy in CF. Use of natural and designed antibacterial peptides”**

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

#### Publications

- Pompilio A. et al. “Antibacterial and anti-biofilm effects of cathelicidin peptides against pathogens isolated from cystic fibrosis patients” *Peptides*. 2011 Sep;32(9):1807-14. Epub 2011 Aug 7.
- Pompilio A. et al. “Potential novel therapeutic strategies in cystic fi-

brosis: antimicrobial and anti-biofilm activity of natural and designed  $\alpha$ -helical peptides against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Stenotrophomonas maltophilia*” *BMC Microbiol*. 2012 Jul 23;12:145

#### Abstracts

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

- Di Bonaventura G. et al. “*In vitro* bactericidal and anti-biofilm activity of bovine myeloid antimicrobial peptides against multidrug-resistant bacteria from patients with cystic fibrosis” poster at 21 st ECCMID – 27 th ICC, Milan, Italy 7-10 May 2011.

- Pompilio A. et al., “Attività’ antibatterica ed anti-biofilm del peptide P19(9/B) verso isolati multi resistenti da pazienti affetti da fibrosi cistica” XXXIX Congresso Nazionale della Società Italiana di Microbiologia, Riccione, 3-6 ottobre 2011.

- FFC Project#13/2009 **“Prevention of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation by inhibition of cyclic-di-GMP (c-di-GMP) metabolism”**

Paolo Landini (Dipartimento Scienze Biomolecolari e Biotecnologia - Università degli Studi di Milano), Pierfausto Seneci (Dipartimento Chimica organica e industriale - Università degli Studi di Milano), Anna Bernardi (Dipartimento Chimica organica e industriale - Università degli Studi di Milano), Francesca Cutruzzola (Dipart. Scienze Biochimiche - Università “La Sapienza” Roma)

#### Publications

- Antoniani D. et al. “Discovery of novel inhibitors of bacterial biofilm formation targeting enzymes involved in the metabolism of the second messenger cyclicdi-GMP” 2010, Special Abstracts / *Journal of Biotechnology* 150S-S101 (Published Meeting Abstract).

- Stelitano V. et al. “Structure and function of representative HD-GYP proteins controlling biofilm formation” Manuscript in preparation.

#### Abstracts

- Antoniani D. et al. “Inhibition of metabolism of the signal molecule cyclic-di-GMP affects biofilm formation in *Escherichia coli*”, Cortona, Procarioti 2010, 14-15 April 2010, Cortona (AR) (oral presentation)

- Antoniani D. et al. “Discovery of novel inhibitors of bacterial biofilm formation targeting enzymes involved in the metabolism of the second messenger cyclicdi-GMP” 14th International Biotechnology Symposium and Exhibition, 14-18 September 2010, Rimini (oral presentation)

- Stelitano V. et al. “Characterization of proteins from *Pseudomonas aeruginosa* involved in c-di-GMP turnover” 36th FEBS Congress “Biochemistry for Tomorrow’s Medicine” Torino, 25-30 June 2011 (oral presentation)

- Stelitano V. et al. “*In vitro* characterization of the two HD-GYP phosphodiesterases from *Pseudomonas aeruginosa* involved in c-di-GMP-dependent biofilm formation” EMBO Meeting 2011, Vienna (Austria) 10-13 September 2011 (poster presentation)

- Stelitano V. et al. “*In vitro* characterization of the two HD-GYP phosphodiesterases from *Pseudomonas aeruginosa* involved in c-di-GMP-dependent biofilm formation” 29° SIMGBM meeting 20-23 September 2011, Pisa (poster presentation)

- Rinaldo S. et al. “Inhibition of bacterial biofilms: new molecular strategies targeting diguanylate cyclase” 29° SIMGBM meeting 20-23 September 2011, Pisa (poster presentation)

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

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

#### Publications

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

- Pini A. et al. “Efficacy and toxicity of the antimicrobial peptide M33 produced with different counter-ions” *Amino Acids*. 2012 Jul;43(1):467-73

#### 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*” 12th Naples Workshop on bioactive peptides-2nd Italy-Korea Symposium on antimicrobial peptides. 4-7 June 2010, Naples, Italy

zes bacterial lipopolysaccharide and prevents septic shock in vivo" 31st European Peptide Symposium, 5-7 September 2010, Copenhagen, DK

- FFC Project#15/2009 **"The role of RND transporters in *Burkholderia cenocepacia* life by microarray analysis"**

Giovanna Riccardi (Dipart. Genetica e microbiologia – Università degli Studi di Pavia)

Publications

- Perrin E. et al. "Exploring the HME and HAE1 efflux systems in the genus *Burkholderia*" BMC Evolutionary Biol (2010), 10:164
- Coenye T. et al., "Molecular mechanisms of chlorhexidine tolerance in *Burkholderia cenocepacia* biofilms" Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 55: 1912-1919
- Bazzini S. et al. "Deciphering the role of RND efflux transporters in *Burkholderia cenocepacia*" PLoS One. 2011 Apr 19;6(4):e18902
- Pasca M. et al. "Evaluation of fluoroquinolone resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* MDR clinical isolates" Microbial Drug Resistance, 2012 Feb;18(1):23-32. Epub 2011 Jul 28
- Bazzini S. et al. "Molecular approaches to pathogenesis study of *Burkholderia cenocepacia*, an important cystic fibrosis opportunistic bacterium" Appl Microbiol Biotechnol. 2011 Dec;92(5):887-95. Epub 2011 Oct 14.

Abstracts

- Perrin E. et al., "Exploring the HME and HAE1 efflux systems in the genus *Burkholderia*" Cortona, Procarioti 2010, Cortona (AR), 14-15 Aprile 2010
- Perrin E. et al., "Evolution of the HME and HAE1 efflux systems in the genus *Burkholderia*" Convegno SIBE, Milano, 2-4 sett. 2010
- Fani R. et al., "Genomic, transcriptomic, and phenomic analysis of *Burkholderia cepacia* mutants impaired in HAE efflux pumps" 2nd Florence Conference on Phenotype MicroArray Analysis of Microorganisms, Firenze, 13-15 Settembre 2010
- Pasca MR. et al., "Pompe di efflusso e farmaco resistenza di stitipi di *Pseudomonas aeruginosa* isolati presso la fondazione IRCCS S. Matteo di Pavia" XXXIX Congresso Nazionale AMCLI, Rimini, 20-22 Ottobre 2010
- Bazzini S. et al., "Deciphering the role of RND efflux transporters in *Burkholderia cenocepacia*" Convegno Congiunto DGM-CNR, Pavia, 22-23 Febbraio 2011
- Buroni S. et al., "The role of RND efflux transporters in *Burkholderia cenocepacia* life" International Burkholderia cepacia Working Group-15th Annual Meeting, Praga (Repubblica Ceca), 13-16 Aprile 2011.
- Bazzini S. et al., "Deciphering the role of RND efflux transporters in *Burkholderia cenocepacia*" I discepoli di Adriano Buzzati-Traverso: la Genetica Molecolare tra Università e CNR, Pavia, 24 Maggio 2011.
- Buroni S. et al., "Deciphering the role of RND efflux transporters in *Burkholderia cenocepacia*" FEMS 2011, 4th Congress of European Microbiologists, Geneva (Switzerland), 26-30 Giugno 2011.
- Bazzini S. et al., "New insight into *Burkholderia cenocepacia* RND efflux systems" SIMGBM 29th Annual Meeting, Pisa, 21-23 Settembre 2011.
- Perrin E. et al., "In silico analysis of RND superfamily in the *Burkholderia* genus" SIMGBM 29th Annual Meeting, Pisa, 21-23 Settembre 2011.
- Papaleo M.C. et al., "Analyzing the role of RND efflux transporters in *Burkholderia cenocepacia*: a proteomic analysis" SIMGBM 29th Annual Meeting, Pisa, 21-23 Settembre 2011.
- Bazzini S. et al., "Two different approaches to fight *Burkholderia cenocepacia* infections" FISV 2012, 12<sup>th</sup> Congress, Università La Sapienza, Roma

- FFC Project#16/2009 **"In vitro and in vivo studies of novel antimicrobials targeting bacterial cytoskeleton and cell surface virulence markers in the treatment of *Burkholderia cepacia* complex infection"**

Alba Silipo (Dipartimento di Chimica Organica e Biochimica - Università degli Studi "Federico II" - Napoli), Anthony De Soza (Dipartimento di Medicina Respiratoria, Freeman Hospital - Gruppo di Immunobiologia Applicata e Trapianti, Istituto di Medicina cellulare - The Medical School University of Newcastle)

Publications

- Nicholson A. et al. "In vitro activity of S-(3,4-dichlorobenzyl)isothiourea hydrochloride and novel structurally related compounds against multi-drug resistant bacteria including *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* complex" Int J Antimicrob Agents. 2012 Jan;39(1):27-32. Epub 2011 Oct 10.

Abstracts

- Carnell S. et al., "The bacterial cytoskeleton-A new antimicrobial target in cystic fibrosis pathogens?" In: Thorax: British Thoracic Society Winter Meeting. 2010, Westminster, UK: BMJ Group

- Carnell S. et al., "The bacterial cytoskeleton – a new antimicrobial target in cystic fibrosis pathogens?" International *Burkholderia cepacia* Working Group Annual Meeting, Prague, April 2011
- Carnell S. et al. "The bacterial cytoskeleton-complexities with a new antimicrobial target in cystic fibrosis pathogens"- British Association for Lung Research conference, Newcastle-upon-Tyne, July 2011

- FFC Project#9/2010 **"Pathogenicity of *Staphylococcus aureus* and its role in the progression of *Pseudomonas aeruginosa* chronic lung infection"**

Daniela Maria Cirillo (Emerging Bacterial Pathogens Unit, Div. of Immunology, Transplantation and Infectious Disease, Scientific Institute H. S. Raffaele, Milano), Alessandra Bragonzi (Infections and Cystic Fibrosis Unit, Division of Immunology, Transplantation and Infectious Disease, H. S. Raffaele, Milano), Barbara Kahl (UniversitätsKlinikum Münster, Institute für Medizinische Mikrobiologie, Münster)

Publications

- Baldan R. et al. "Factors contributing to epidemic MRSA clones replacement in a hospital setting" PLoS One. 2012;7(8):e43153.

- FFC Project#10/2010 **"Exploring thermostable quorum quenching lactonases to counteract bacterial infections in cystic fibrosis"**

Giuseppe Mancuso (Istituto di Biochimica delle Proteine CNR, Napoli); Davide Andrenacci (Istituto di Genetica e Biofisica CNR, Napoli)

Publications

- Porzio E. et al. "Mn<sup>2+</sup> modulates the kinetic properties of an archaeal member of the PLL family" Chem Bio Int, submitted (2012)

- Mandrich L. et al. "Exploring thermostable quorum quenching lactonases to counteract bacterial infections in cystic fibrosis" in Science and Technology against microbial pathogens. Research, Development and Evaluation, pp. 150-154 (2011)

Abstracts

- Porzio E. et al., "Exploring thermostable quorum quenching lactonases as a tool to interfere with *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis" Cell Biology and Pharmacology of Mendelian Disorders, 7-11 October 2011, Vico Equense, Italy

- Porzio E. et al. "Exploring paraoxonases/lactonases to counteract *Pseudomonas* infection" Fifth International Conference on Paraoxonases (5PON), July 15-18 2012, Columbus, Ohio, USA. (Poster) P56

- FFC Project #13/2010 **"*Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide cell surface transport is a target process for developing new antimicrobials"**

Alessandra Polissi (Dip. Biotecnologie e Bioscienze, Università Milano-Bicocca), Martino Bolognesi (Dip. Scienze Biomolecolari e Biotecnologie, Università di Milano), Gianni Dehò (Dip. Scienze Biomolecolari e Biotecnologie, Università di Milano), Francesco Peri (Dip. Biotecnologie e Bioscienze, Università Milano-Bicocca), Cristina De Castro (Dip. Chimica Organica e Biochimica, Università di Napoli), Luca De Gioia (Dip. Scienze Biomolecolari e Biotecnologie, Università di Milano)

Publications

- Sperandeo P. et al. "Lipopolsaccharide export to the outer membrane" In "Bacterial Lipopolysaccharide: structure, chemical synthesis, biogenesis and interaction with host cells" Knirel Y.A. and Valvano M.A. Eds., Springer WienNewYork pp. 311-337

- Villa R. et al. "The Lpt transenvelope protein complex for lipopolysaccharide export is assembled via conserved structurally homologous domains" (submitted)

- Sperandeo P. et al. "The outer membrane of Gram-negative bacteria: lipopolysaccharide biogenesis and transport" In "Bacterial Membranes: Structural and Molecular Biology" Remaut H. and Fronzes R. Eds., Horizon Scientific Press (in press)

Abstracts

- Martorana A. et al. "New insights into the Lpt Machinery for Lipopolysaccharide tran sport to the cell surface: functional dissection of LptC protein" 12<sup>th</sup> FISV Congress, Rome, September 24-27, 2012

- FFC Project #14/2010 **"Non-conventional strategies against *Pseudomonas aeruginosa* infection: interference with iron homeostasis and quorum sensing"**

Paolo Visca (Dipart. Biologia, Università Roma Tre, Roma); Livia Leoni (Dipart. Biologia, Università Roma Tre, Roma)

Publications

- Bazzini S. et al., "Deciphering the role of RND efflux transporters in *Burkholderia cenocepacia*" 2011. PLoS One. 6:e18902.

- Venturi V. et al., "The virtue of temperance: built-in negative regulators of quorum sensing in *Pseudomonas*" Mol. Microbiol., 2011, submitted

- Rampioni G. et al., "Functional characterization of the Quorum Sensing Regulator RsaL in the plant-beneficial strain *Pseudomonas putida*

WCS358" Appl Environ Microbiol. 2012 Feb;78(3):726-34. Epub 2011 Nov 23

#### Abstracts

- Buroni S. et al., "The role of RND efflux transporters in Burkholderia cenocepacia life" International Burkholderia cepacia working group – 15<sup>th</sup> annual meeting, Praga, 13-16 Aprile 2011
- Longo F. et al., "Picking up novel *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing regulators" FEMS 2011- 4<sup>th</sup> Congress of European Microbiologists. Geneva, 26-30 giugno 2011
- Buroni S. et al., "Deciphering the role of RND efflux transporters in Burkholderia cenocepacia. FEMS 2011- 4<sup>th</sup> Congress of European Microbiologists. Geneva, 26-30 giugno 2011
- Imperi F. et al. "A new biosensor provides fast and cost-effective identification of *Pseudomonas aeruginosa* virulence inhibitors" FEMS 2011- 4<sup>th</sup> Congress of European Microbiologists. Geneva, 26-30 giugno 2011
- Bazzini S. et al. "New insight into Burkholderia cenocepacia RND efflux systems" SIMGBM 2011- 29<sup>th</sup> Congress of Italian Microbiologists. Pisa, 21-23 settembre 2011
- Longo F. et al. "Picking up novel *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing regulators" SIMGBM 2011- 29<sup>th</sup> Congress of Italian Microbiologists. Pisa, 21-23 settembre 2011
- Ramachandran Pillai C. et al., "Non conventional strategies against *Pseudomonas aeruginosa*: evaluation of efflux pumps inhibitors as anti-virulence drugs" SIMGBM 2011- 29<sup>th</sup> Congress of Italian Microbiologists. Pisa, 21-23 settembre 2011

- FFC Project #10/2011 **"Pulmonary delivery of inhaled peptidomimetic as novel antibiotics to control *Pseudomonas aeruginosa* infection in murine models"**

Alessandra Bragonzi (Infection and Cystic Fibrosis Unit, Division of Immunology, Transplantation and Infectious Disease, San Raffaele Scientific Institut, Milano), Daniel Obrecht (Polyphor Ltd, Switzerland)

#### Abstracts

- Bragonzi A. et al., "Evaluation Of Efficacy of POL7001 Against *Pseudomonas aeruginosa* in Lung Infection Models" 35<sup>th</sup> European Cystic Fibrosis Conference- 6-9 June 2012, Dublin

- FFC Project #12/2011 **"New drugs for *Burkholderia cepacia* from Antarctic bacteria"**

Renato Fani (Dip. Biologia dell'Evoluzione, Università di Firenze); Maria Luisa Tutino (Dip. Chimica Organica e Biochimica, Universi-

tà Federico II, Napoli); Paolo Rovero (Dip. Scienze Farmaceutiche, Università di Firenze)

#### Publications

- Romoli R. et al. "Characterization of the volatile profile of Antarctic bacteria by using solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry" J Mass Spectrom. 2011 Oct;46(10):1051-9.
- Papaleo MC. et al. "Sponge-associated microbial Antarctic communities exhibiting antimicrobial activity against *Burkholderia cepacia* complex bacteria" Biotechnol Adv. 2012 Jan-Feb;30(1):272-93. Epub 2011 Jun 29
- Fondi M. et al. "Draft Genome Sequence of the Volatile Organic Compound-Producing Antarctic Bacterium Arthrobacter sp. Strain TB23, Able To Inhibit Cystic Fibrosis Pathogens Belonging to the Burkholderia cepacia Complex" J Bacteriol. 2012 Nov;194(22):6334-5

#### Abstracts

- Papaleo MC. et al. "Volatile organic compounds (VOCs) from antarctic communities bacteria inhibiting cystic fibrosis pathogens" 12<sup>th</sup> FIVS Congress: 70, Roma 24-27 settembre, 2012
- Papaleo MC. et al. "Bioactive volatile organic compounds (VOCs) from antarctic sponges bacteria" EMB 2012, Bologna, Italy, April 10-12, 2012

- FFC Project #13/2011 **"Identification and characterization of novel drugs suppressing *Pseudomonas aeruginosa* virulence in chronic infection"**

Livia Leoni (Dip. Biologia, Università di Roma Tre, Lab. Microbiol. Molecolare e Biotec. Microrganismi), Francesco Imperi (Dip. Biologia e Biotecnologie, Università "La Sapienza", Roma)

#### Publications

- Venturi V. et al. "The virtue of temperance: built-in negative regulators of quorum sensing in *Pseudomonas*" Mol Microbiol. 2011 Dec;82(5):1060-70
- Stano P. et al. "Semi-synthetic minimal cells as a tool for biochemical ICT" BioSystems, Biosystems. 2012 Jul;109(1):24-34

- FFC Project#24/2011 **"Preclinical development of the antimicrobial peptide M33. Efficacy against *P. aeruginosa* lung infections and pharmacokinetics studies in animals"**

Alessandro Pini (Dipartimento di Biotecnologie, Università di Siena)

#### Publications

- Falciani C. et al. "Isomerization o fan Antimicrobial peptide broadens antimicrobial spectrum to Gram-Positive bacterial pathogens" PloS One. 2012;7(10):e46259

## 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 20<sup>th</sup> 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" 30<sup>th</sup> European Cystic Fibrosis Conference, Belek, Turkey, 13-16 June 2007

- Cigana C. et al. "Possible mechanisms of action of azithromycin in cystic fibrosis" 15<sup>th</sup> ERS Annual Congress. Copenhagen, Denmark – September 17-21 2005.

- Cigana C. et al. "Anti-inflammatory effects of azithromycin in cystic fibrosis airway epithelial cells" 16<sup>th</sup> 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, 29<sup>th</sup> European Cystic Fibrosis Conference. Copenhagen, 15-18 June 2006.

- Nicolis E. et al. "Analisi della ripetizione GCC nel promotore del gene Multidrug Resistance-Associated Protein 1 (MRP1) in pazienti con Fibrosi Cistica (FC) 6° Congresso Nazionale S.I.G.U. Società Italiana di Genetica Umana – Verona 24 – 27 settembre 2003;

- Cigana C. et al. "Differential expression of the multidrug resistance-associated protein 1 in isogenic CF and non-CF human bronchial epithelial cells" Journal of Cystic Fibrosis 3 (2004) S4-S9 27<sup>th</sup> 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 27<sup>th</sup> 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 18<sup>th</sup> 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<sup>o</sup> Congresso Nazionale S.I.G.U. – Pisa 13-15 ottobre 2004;

- Nicolis E. et al. "Is the GCC repeat polymorphic length in the Multi-drug resistance-associated protein 1 (MRP1) gene relevant for regulating transcriptional activity constitutively and in response to azithromycin (AZM)?" 28<sup>th</sup> European CF Conference – Crete. Greece: 22-25 June 2005;
- Cigana C. et al. "Azithromycin (AZM) inhibits Nuclear Factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) activity and expression of interleukin 8 (IL8) in CF airway epithelial cells" Journal of Cystic Fibrosis 4 (2005) S26-S33; 28<sup>th</sup> 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" 4<sup>th</sup> 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" 13<sup>th</sup> 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" 31<sup>st</sup> European CF Conference, Prague, June 11-14, 2008
- Melotti P. et al. "Effects of Azithromycin on regulation of metalloproteases released by *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) clinical strains" NACFC 2012, Orlando, Florida, USA

• FFC Project# 7/2003 **"Proteomics of the airway surface liquid: implications for cystic fibrosis"**

Olga Zegarra Moran (Lab. Gen. Molec. – Ist. Gaslini – Genova), Giovanni Candiano (Lab. Nefrologia – Ist. "G. Gaslini" – Genova), Luca Bini (Dipart. Biologia Molecolare – Univ. Siena)

*Publications*

- Candiano G. et al. "Gelsolin secretion in interleukin 4 treated bronchial epithelia and in asthmatic airways" Am J Respir Crit Care Med. 2005; Vol 172 pp 1-7

- Candiano G. et al. "Proteomic analysis of the airway surface liquid: modulation by proinflammatory cytokines" Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2007 Jan;292(1):L185-98

*Abstracts*

- Zegarra-Moran O. et al., Proteomic analysis of the periciliary fluid in cultured human bronchial epithelial cells. Pediatr. Pulm. S25:182, Presented at the 17<sup>th</sup> Annual North American Cystic Fibrosis Conference, 2003 (Anaheim, U.S.A.)

- Zegarra-Moran O. et al., Increased gelsolin secretion in interleukin-4 treated bronchial epithelial cells and in asthmatic patient airways. Pediatr. Pulm. S27:146. 18<sup>th</sup> Annual North American Cystic Fibrosis Conference. 2004 (St. Louis, U.S.A.)

- Zegarra-Moran O., "Identification of components of innate defense in the airway surface fluid". ECFS Conference New Frontiers in Basic Science of Cystic Fibrosis (Tavira, Portugal), 15-19 April, 2009.

• FFC Project# 14/2004 **"Interaction in vitro between CF pathogens and epithelial cells expressing the CF transmembrane conductance regulator (CFTR)"**

Maria Cristina Dechechi (Lab. Patologia Molecolare – Centro FC – Ospedale Civile Maggiore – Verona)

*Abstracts*

- Dechechi M. C. et al. "Uso di correttori del difetto di maturazione di CFTR come strategia per controllare la risposta infiammatoria all'infezione da *P. aeruginosa* in cellule epiteliali respiratorie" XII Congresso Italiano della Fibrosi Cistica, Montepaone (CZ), 29-31 maggio 2006

- Dechechi M.C. et al. "Defective CFTR enhances PAO1-stimulated in-

flammatory response in epithelial cells" 2005 ECFS Conference – New frontiers in Basic Science of Cystic Fibrosis – 14 – 17 April, Portugal;

- Dechechi M.C. et al. "Increased *Pseudomonas aeruginosa* induced inflammatory response in epithelial cells expressing mutated CFTR" Journal of Cystic Fibrosis 4 (2005) S17-S25; 28<sup>th</sup> European CF Conference, Heronissos, Crete, Greece; 22-25 June 2005

- Dechechi M.C. et al. "The inflammatory response of CF airway cells to *pseudomonas Aeruginosa* is reduced by benzoquinolizinium 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*

- Bezzerra V. et al. "Transcription factor oligodeoxynucleotides to NF- $\kappa$ B 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- $\kappa$ B transcription factor: correlation with inhibition of NF- $\kappa$ B/DNA interactions and inhibitory effects on IL-8 gene expression" BMC Structural Biology, 2008 Sep 3;8:38

*Abstracts*

- Bezzerra V. et al. "Selective modulation of *P. aeruginosa* dependent induction of interleukin-8 by transcription factor decoy oligonucleotides in CF bronchial epithelial cells" XX North American CF Conference, Denver 2-4 Nov. 2006

• FFC Project# 16/2004 **"Nasal polyps of Cystic Fibrosis patients as an ex vivo model to study inflammation and its modulation via the inhibition of the p-38 MAP-kinase pathway: implications for therapy"**

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

*Publications*

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

• FFC Project# 11/2005 **"Chronic oxidative lung injury during cystic fibrosis – protective roles of gamma-glutamyltransferase and ascorbic acid"**

Alfonso Pompella (Dipart. Patologia Sperimentale, Biotec. Mediche, Infettivologia ed Epidemiologia – Univ. Pisa)

*Publications*

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

• FFC Project# 15/2006 **"Contribution of alterations in metal and glutathione homeostasis to the bacterial infections typical of Cystic Fibrosis and examination of the possible protective role of lactoferrin and antioxidants"**

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

*Publications*

- Berluti F. et al. "Bovine lactoferrin inhibits the efficiency of invasion of respiratory A549 cells of different iron-regulated morphological forms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia 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 Dechechi (Lab. Patologia Molecolare – Centro FC – Ospedale Civile Maggiore – Verona), Frederic Becq (Inst. De Physiologie et Biologie Cellulaires – Poitiers (France), Roberto Gambari (Dipart. di Biochimica e Biologia Molecolare – Università di Ferrara)

*Publications*

- Dechechi M. C. et al. "MPB-07 reduces the inflammatory response to *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic fibrosis bronchial cells" Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. May 2007, Vol. 36 PP. 615-624,

- Dechechi M. C. et al. "Anti-inflammatory effect of miglustat in bronchial epithelial cells" Journal of Cystic Fibrosis, 7 (2008) pp. 555-565.

### Abstracts

- Dechechchi M. C. et al. "Miglustat and DGJ reduce the inflammatory response to Pseudomonas aeruginosa, TNF-alpha and IL-1beta in bronchial epithelial cells" NACFC, 2007, Anaheim, California
- Dechechchi M. C. et al. "Correctors of F508del CFTR reduce the inflammatory response to Pseudomonas aeruginosa in CF respiratory epithelial cells" ECFS Conference 2007, Tavira, Algarve (Portugal), April 25-29
- Dechechchi M. C. et al. "Miglustat, an inhibitor of the synthesis of glycosphingolipids, has an anti-inflammatory signal *in vitro* and *in vivo*" Pediatric pulmonology, Suppl. 31, 2008. 22<sup>nd</sup> Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Orlando, Florida, 22-25 October 2008, pp. 257-258.
- Dechechchi M. C. et al. "Uso di correttori del difetto di maturazione di CFTR come strategia per controllare la risposta infiammatoria all'infezione da *P. aeruginosa* in cellule epiteliali respiratorie" XII Congresso Italiano della Fibrosi Cistica, 2006, Firenze, November 23-25.
- Dechechchi M. C. et al. "Anti-inflammatory effect of miglustat in bronchial cells" 13<sup>th</sup> 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" 13<sup>th</sup> Italian Cystic Fibrosis Conference, Milan, 30 Nov. - 2 Dec. 2007, J. Cyst Fibrosis 2008; 7, suppl. 3: p. S18
- Dechechchi M. C. et al. "Anti-inflammatory effect *in vitro* and *in vivo* of miglustat, an inhibitor of the synthesis of glycosphingolipids" XIV Congresso italiano della fibrosi cistica - IV Congresso nazionale Sifc, Torino, 27-29 novembre 2008

### **• FFC Project#5/2007 "Novel particulate systems for the delivery of an oligonucleotide decoy to Nuclear Factor-kB: a potential strategy for treating cystic fibrosis"**

Fabiana Quaglia (Dipart. Chimica Tossicolo. E Farmaceutica - Univ. Federico II Napoli), Rosa Carnuccio (Dip.to di Farmacologia Sperimentale, Università di Napoli Federico II)

#### Publications

- Ungaro F. et al. "Engineering gas-foamed large porous particles for efficient local delivery of macromolecules to the lung" Eur J Pharm Sci. 2010 Sep 11;41(1):60-70
- De Stefano D. et al. "Sustained inhibition of IL-6 and IL-8 expression by decoy ODN to NF- B delivered through respirable large porous particles in LPS-stimulated cystic fibrosis bronchial cells" J Gene Med. 2011 Apr;13(4):200-8

#### Abstracts

- Giovino C. et al. "Large Porous Particle for lung delivery of hydrophilic macromolecules: preliminary technological studies" 49<sup>th</sup> Simposio AFI, Rimini 10-12 giugno 2009
- Giovino C. "Veicolazione polmonare di un oligonucleotide decoy contro NF-Kb per il trattamento della fibrosi cistica: progettazione e sviluppo di Large Porous Particles a base di PLGA" 8<sup>th</sup> Scuola avanzata per Dottorandi di ricerca del settore farmaceutico tecnologico applicativo, Recent ignali in vesicle drug carriers, Università della Calabria, Arcavacata di Rende, 22-27 settembre 2008
- Giovino C. et al. "Design and development of microsphere-loaded drug eluting stents for the controlled release of the antirestenosis agents" AAPA Italian University Network, Fisciano, March 6-7, 2009
- De Stefano D. Et al. "ODN decoy to NF-KB released from respirable PLGA large porous particles: a potential for treating cystic fibrosis?" 34<sup>th</sup> National Congress of the Italian Pharmacology Society, Rimini, October 14-17, 2009
- Govino C. et al. "A new approach for cystic fibrosis treatment: large porous particles for local and prolonged delivery of an oligonucleotide decoy to Nuclear Factor-kB in the lung" AAPS Annual Meeting and Exposition, Los Angeles, California, November 8-12, 2009
- Ungaro F. et al. "Biodegradable particles for local and prolonged delivery of an oligonucleotide decoy to nuclear factor- B in the lung" In Dalby, R.N., Byron, P.R., Peart, J., Suman, J.D., Young, P.M. (Eds.) *RDD Europe 2011, Book 2*, pp. 511-513. Poster on the podium" at RDD Europe 2011, Berlin, Germany
- Giovino C. et al. "Inhalable large porous particles for local and prolonged delivery of an oligonucleotide decoy to NF- B in cystic fibrosis" 4<sup>th</sup> AitUN Annual Meeting – Innovation in Pharmaceutics: a glimpse in the Biotech world, Napoli
- Giovino C. et al. "Respirable large porous particles for local and prolonged delivery of an oligonucleotide decoy to nuclear factor-kb: *in vitro/in vivo* potential in cystic fibrosis" International Meeting on "Lactose as a Carrier for Inhalation Products", September 26-28, 2010, Parma, Italy

### **• 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

- Bezzerrini 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. "Docking 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
- Cabrini G. et al. "Targeting transcription factor activity as a strategy to inhibit pro-inflammatory genes involved in Cystic Fibrosis: decoy oligonucleotides and low-molecular weight compounds" Current Medicinal Chemistry, 2010, 17(35):4392-404
- Finotti A. et al. "Effects of decoy molecules targeting NfkappaB transcription factors in cystic fibrosis UB3-1 cells" Artif DNA PNA XNA. 2012 April 1; 3(2): 97–296.

#### Abstracts

- Bezzerrini V. Et al. "Transcription factor (TF) decoy strategy to silence expression of pro-inflammatory genes in cystic fibrosis (CF) bronchial epithelial cell line" 2<sup>nd</sup> 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" 13<sup>th</sup> 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. 22<sup>nd</sup> Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Orlando, Florida, 22-25 October 2008, p. 259.
- Tamanini A. et al. "Effect of furucumarin derivatives on *P. aeruginosa*-dependent pro-inflammatory response in bronchial epithelial cells" Pediatric pulmonology, Suppl. 31, 2008. 22<sup>nd</sup> 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. 22<sup>nd</sup> 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 furucoumarin database against NF-kB" 23<sup>rd</sup> 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" 23<sup>rd</sup> Annual North American Cystic Fibrosis Congress, Minneapolis, Minnesota, 15-17 October 2009.
- Tamanini A. et al. "Combined effects of furucoumarin compounds as anti-inflammatory and CFTR potentiation in CALU-3 epithelial cells" 23<sup>rd</sup> 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 Ascenzi (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" 32<sup>nd</sup> 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-MS<sup>E</sup> and 2DE: a comparative study" *Mol BioSystems* 12 Nov 2010 doi:10.1039/COMB00135
- Simiele F. et al. "Transcriptional regulation of the human FPR2/ALX gene: evidence of a heritable genetic variant that impairs promoter activity" *FASEB J.* 2012 Mar;26(3):1323-33. Epub 2011 Nov 30.

- FFC Project# 11/2008 **"Effect of glutathione and lactoferrin on redox regulation, metal homeostasis and inflammatory responses of Cystic Fibrosis bronchial cells upon infection with Burkholderia cenocepacia"**

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

Publications

- Valenti P et al "Lactoferrin decreases inflammatory response in cystic fibrosis bronchial cells invaded by iron modulated biofilm of Burkholderia cenocepacia strains" Submitted to *Microbes and Infections* (Manuscript Number: MICINF-D-10-00030)

Abstracts

- Berluttì F. et al "Lactoferrin modulates gene expression of cystic fibrosis bronchial cells invaded by iron and zinc modulated biofilm of Burkholderia cenocepacia clinical isolates" IX<sup>th</sup> International Lactoferrin Conference, Beijing, China, October 18-22, 2009.
- Ammendolia MG. et al "Bovine lactoferrin interacts with cable pili of Burkholderia cenocepacia" IX<sup>th</sup> International Lactoferrin Conference, Beijing, China, October 18-22, 2009
- Ciavardelli D. et al. "Proteomics and ionomics profiling reveals significant alteration of 14-3-3 signalling pathway and calcium homeostasis in cystic fibrosis cells" VII Italian Proteomic Association (ItPA) Annual Congress, Viterbo, June 12-15, 2012

- FFC Project#12/2008 **"Anti-inflammatory effect of miglustat: sphingolipid ceramide metabolism as a therapeutic target for CF lung disease"**

Maria Cristina Dechechchi (Lab. di Patologia Molecolare, Lab. Analisi Chimico-Cliniche ed Ematologiche, Università di Verona), Roberto Gambari (Dipart. di Biochimica e Biologia Molecolare, Università di Ferrara)

Publications

- Dechechchi MC. et al. "Anti-inflammatory effect of miglustat in bronchial epithelial cells" *J Cyst Fibros.* 2008 Nov;7(6):555-65
- Dechechchi MC. et al. "Modulators of Sphingolipid metabolism reduce lung inflammation" *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2011 Oct;45(4):825-33

Abstracts

- Dechechchi M.C. et al. "Anti-inflammatory effect of miglustat: sphingolipid metabolism as a therapeutic target for CF lung inflammation" 23<sup>rd</sup> 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" 23<sup>rd</sup> 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 24<sup>th</sup> 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*" 1° 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. Bioc. 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
- 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
- Moalli F. et al. "Role of Complement and Fc R in the protective activity of the long pentraxin PTX3 against *Aspergillus fumigatus*" *Blood*. 2010 Dec 9;116(24):5170-80
- Moalli F. et al. "Therapeutic potential of the humoral pattern recognition receptor PTX3 in chronic lung infection by *Pseudomonas aeruginosa*" (manuscript in preparation)
- Bottazzi B. et al. "The long pentraxin PTX3 as a prototypic humoral pattern recognition receptor: interplay with cellular innate immunity" *Immunol Rev*. 2009 Jan; 227 (1):9-18
- Bottazzi B. et al "An integrated view of humoral innate immunity: pentraxins as a paradigm" *Annu Rev Immunol* 2010 Mar; 28:157-83

Abstracts

- Moalli F. et al. "Role of the long pentraxin PTX3 in chronic lung infection by *Pseudomonas aeruginosa*", Bari 2010
- Moalli F et al "The opsonic activity of the long pentraxin PTX3 for *Aspergillus fumigatus* conidia is complement-dependent and mediated by FcgammaR-dependent CR3 integrin activation"
- Moalli F et al "Therapeutic potential of the humoral pattern recognition receptor PTX3 in chronic lung infection by *Pseudomonas aeruginosa*" *Innochem*
- Moalli F et al "Therapeutic potential of the humoral pattern recognition receptor PTX3 in chronic lung infection by *Pseudomonas aeruginosa*" Roma
- Moalli F et al "Potenziale terapeutico della pentrassina lunga PTX3 nelle infezioni croniche indotte da *Pseudomonas aeruginosa*" Firenze
- Moalli F et al "Role of the long pentraxin PTX3 in chronic lung infection by *Pseudomonas aeruginosa*" Capo Caccia 2010
- Moalli F et al "Role of complement and FcgammaR in the protective activity of the long pentraxin PTX3 against *Aspergillus fumigatus*" Rome, 4-6 February 2010
- Paroni M et al "Therapeutic potential of the humoral pattern recognition protein PTX3 in a murine model of *Pseudomonas aeruginosa* chronic infection" The 22<sup>nd</sup> Annual NACFC, Orlando October 23-25 2008

- FFC Project#15/2008 **"Effects of azithromycin (AZM) on Pseudomonas-induced chronic lung inflammation in cystic fibrosis"**

Teresinha Leal (Department of Clinical Chemistry, Université Catholique de Louvain, St. Luc University Hospital) Pierluigi Mauri (Ist. Tecnologie Biomediche CNR, Segrate Milano), Claudio Sorio (Dipart. Patologia, Patologia Generale, Università di Verona)

Publications

- Sorio C. et al. "The role of macrophages and their scavenger receptors in cystic fibrosis", 2009 *J Leukoc 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
- Bergamini G. et al. "MudPIT analysis of released proteins in *Pseudomonas aeruginosa* laboratory and clinical strains in relation to pro-inflammatory effects" *Integr Biol (Camb)*. 2012 Mar;4(3):270-9

Abstracts

- Cigana C. et al. "Proteins released from *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) referent and clinical strains under microaerobiosis and their effects on cystic fibrosis airways" 31<sup>st</sup> European Cystic Fibrosis Conference, 11-14 June 2008, Prague, Czech Republic, *J Cyst 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" 31<sup>st</sup> 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" 23<sup>rd</sup> 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.

- Melotti P. et al. "Effects of Azithromycin on regulation of metalloproteases released by *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) clinical strains" NACFC 2012, Orlando, Florida, USA

• 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

- Sorio C. et al. "Defective CFTR expression and function are detectable in blood monocytes: development of a new blood test for cystic fibrosis" PLoS One, 2011; 6(7): e22212. Published online 2011 July 21.

Abstracts

- Sorio C. et al. "Defective CFTR expression and function are detectable in blood monocytes: development of a new blood test for cystic fibrosis" Young Investigators Meeting, Lille (France) August 2010

- Sorio C. et al. "Analysis of CFTR function in human monocytes" European Respiratory Society Annual Congress held in Barcelona (Spain) in September 2010, abstract # 251869

- Sorio C. et al. "Functional evaluation of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) in human monocytes" J Cystic Fibrosis vol. 8, suppl. 2, June 2009: S22, abstract # 86.

-Sorio C. et al. "Measurement of CFTR expression and function in human leukocytes: new assays for the management of Cystic Fibrosis" Pediatric Pulmonology suppl. 33, 2010: 287, abstract # 192

- Sorio C. et al. "Defective CFTR expression and function are detectable in human monocytes: a potential new blood test for cystic fibrosis" FEBS Workshop on "Cell Biology and Pharmacology of Mendelian Disorders", Vico Equense, Napoli, Italy, 7-11 October 2011

• FFC#17/2009 **"Immune evasion strategies underlining the adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients"**

Maria Lina Bernardini (Dipartimento di Biologia Cellulare e dello Sviluppo Università "La Sapienza" Roma), Antonio Molinaro (Dipartimento di Chimica organica e Biochimica – Università degli Studi di Napoli), Allaoui Abdelmounaaim (Laboratorio di Batteriologia Molecolare – Facoltà di Medicina – Libera Università di Bruxelles)

Publications

- Cigana C. et al. "Dampening Host Sensing and Avoiding Recognition in *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia" J Biomed Biotechnol. 2011;2011:852513

• 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 Debecchi (Lab. di Patologia Molecolare, Lab. Analisi Chimioco-Cliniche ed Ematologiche, Azienda Ospedaliero Universitaria di Verona)

Publications

- Scheckenbach KE L. et al. "PGE2 Regulation of CFTR activity and air surface liquid volume requires Gap Junctional Communication" doi: 10.1165/rcms.2009-0361OC

- Losa D. et al., "Connexins as therapeutic targets in lung disease" Expert Opin Ther Targets 2011;15:989-1002. Review

Abstracts

- Losa D. et al., "Gap Junctions Contribute To Airway Surface Liquid Homeostasis in Human Airway Epithelial Cells" April 07-10 2010 Carcavelos, Portugal. ECFS Basic Science Conference, oral presentation by Losa Davide (Novartis Young Fellows Travel Award)

- Chanson M. et al., "PGE2 Regulation of CFTR Activity and Airway Surface Liquid Volume Requires Gap Junctional Communication" August 08-13 2010 Saxtons River, Vermont, USA. FASEB Summer Research Conferences "The Lung Epithelium in Health and Disease", poster presentation

- Losa D. et al., "Pseudomonas aeruginosa Increase Gap Junction Channels In Calu-3 Cells By A TLR5-Dependent Mechanism" March 30 to April 2 2011 Tirrenia-Pisa, Italy. ECFS Basic Science Conference, poster presentation

- Losa D. et al., "Cx43 participates in the airway epithelium defense against *Pseudomonas aeruginosa* infection by a TLR5-dependent mechanism" August 6-11 2011 Ghent, Belgium. International Gap Junction Conference, oral presentation

- Losa D. et al., "Cx43 participates in the airway epithelium defense against *Pseudomonas aeruginosa* infection by a TLR5-dependent mechanism" September 6 2011 Bern, Switzerland. Annual Meeting of the Swiss Physiological Society, oral presentation by Losa Davide ("Asher-Hess Prize – Young Investigator Award" for the best oral presentation).

• FFC Project# 21/2009 **"Mechanisms of bactericidal activity of human macrophages and influence of CFTR mutations"**

Paola Del Porto (Dipartimento di Biologia cellulare e dello Sviluppo – Università degli Studi "La Sapienza" – Roma); Fiorentina Ascenzioni (Dipartimento di Biologia cellulare e dello Sviluppo – Università degli Studi "La Sapienza" – Roma); Serena Quattrucci (Centro Fibrosi Cistica, Dip. Pediatria – Università di Roma "La Sapienza")

Publications

- Del Porto P. et al., Dysfunctional CFTR Alters the Bactericidal Activity of Human Macrophages against *Pseudomonas aeruginosa*, PLoS One.6(5):e19970

Abstracts

- Cifani N. et al., Bactericidal activity of human CF macrophages against *Pseudomonas aeruginosa*. 34<sup>th</sup> European Cystic Fibrosis Conference; 8-11 June 2011; Hamburg Germany

• FFC Project# 22/2009 **"Origin of lung fluid gamma-glutamyltransferase and its effects in modulation of antioxidant balance, inflammation and CF respiratory dysfunction"**

Alfonso Pompella (Dipart. Patologia Sperimentale, Biotec. Mediche, Infettivologia ed Epidemiologia – Univ. Pisa)

Publications

- Bergamini G et al "Effects of azithromycin (AZM) on glutathione-s-transferases (GST)s in cystic fibrosis airway cells" Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 41: 199-206, 2009

- Bramanti E et al "Exogenous vs. endogenous -glutamyltransferase activity: implications for the specific determination of S-nitrosoglutathione 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)

- Corti A. et al. "Contribution by plasmacytoid dendritic cells to elevated Gamma-glutamyltransferase in cystic fibrosis sputum" PLoS One. 2012;7(4):e34772. Epub 2012 Apr 4.

• FFC Project# 11/2010 **"Development of new therapeutic approaches against microbial infection in cystic fibrosis patients: biochemical analysis of cell wall fragments"**

Antonio Molinaro (Dip. Chimica Organica e Biochimica, Università di Napoli), Maria Lina Bernardini (Dip. Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Università La Sapienza, Roma), Gerd Döring (Institute of Medical Microbiology and Hygiene, University of Tübingen)

Publications

- Ieranò T. et al. "Molecular Modeling Study of the Carbohydrate region of the Endotoxin from *Burkholderia cenocepacia* ET-12", Eur. J. Org. Chem. 2011, 5114-5122

- Loutet S. A. et al. "Transcriptional responses of *Burkholderia cenocepacia* to polymyxin B in isogenic strains with diverse polymyxin B resistance phenotypes", BMC Genomics 2011, 12:472

- De Castro C. et al. "Bacterial Lipopolysaccharides in plant and mammalian innate immunity" Protein Pept Lett. 2012 Oct 1;19(10):1040-4

- Hamad MA. Et al. "Aminoarabinose modification of the *Burkholderia cenocepacia* lipopolysaccharide (LPS) is essential for intrinsic antimicrobial peptide resistance and proper functioning of the LPS export

pathway" Mol Microbiol. 2012 Sep;85(5):962-74

- Marchetti R. et al. "Burkholderia cenocepacia lectin A binding to heptoses from the bacterial lipopolysaccharide" Glycobiology, 2012 Oct;22(10):1387-98

- FFC Project#12/2010 **"Calcium signal and PKC as targets of Pseudomonas aeruginosa infection"**

Paolo Pinton (Dip. Medicina Sperimentale e Diagnostica, Univ. Ferrara)

Publications

- Paterniani S. et al. "Calcium signaling around Mitochondria Associated Membranes (MAMs)" Cell Commun Signal 2011, 9:19
- Giorgi C. et al. "Mitochondria associated membranes (MAMs) as critical hubs for apoptosis" Communicative&Integrative Biology 4:3, 334-335; May-June 2011
- Giorgi C. et al. "Mitochondrial calcium homeostasis as potential target for mitochondrial medicine" Mitochondrion. 2012 Jan;12(1):77-85
- Bononi A. et al. "Protein Kinases and phosphatase in the Control of cell fate" Enzyme Research 2011;2011:329098. Epub 2011 Sep 4.
- Suski J. Et al. "p66Shc aging protein in control of fibroblasts cell fate" Int. J. Mol. Sci. 2011;12(8):5373-89. Epub 2011 Aug 22.
- Giorgi C. et al. "Translocation of signaling proteins to the plasma membrane revealed by a new bioluminescent procedure" BMC Cell Biology 2011, 12:27
- Suski J. et al. "Mitochondrial tolerance to drugs and toxic agents in ageing and disease" Current Drug Targets, 2011, 12, 827-849
- Pinton P. et al. "The role of PML in the control of apoptotic cell fate: a new key player at ER-mitochondria sites" Cell Death and Differentiation (2011) 18, 1450-1456
- Bezzerra V. et al. "Phospholipase C-[beta]3 is a key modulator of IL-8 expression in cystic fibrosis bronchial epithelial cells" J Immunol 186(8):4946-58
- Bononi A. et al. "Mitochondria-associated membranes (MAMs) as hotspot Ca<sup>2+</sup> Signaling units" Adv Exp Med Biol 740:411-38
- Marchi S. et al. "Mitochondria-ROS crosstalk in the control of cell death and aging" J Signal Transduct 2012;329635
- Rimessi A. et al. "The selective inhibition of nuclear PKCζ restores the effectiveness of chemotherapeutic agents in chemoresistant cells" Cell Cycle 11(5):1040-48
- Anelli T. et al. "Ero1α Regulates Ca<sup>2+</sup> Fluxes at the Endoplasmic Reticulum-Mitochondria Interface (MAM)" Antioxid Redox Signal 16(10):1077-87
- Bonora M. et al. "ATP synthesis and storage" Purinergic Signalling, 8:343-357
- Giorgi C. et al. "Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> and apoptosis" Cell Calcium 52:36-43.
- Marchi S. et al. Selective modulation of subtype III IP3R by Akt regulates ER Ca<sup>2+</sup> release and apoptosis" Cell Death Dis 3:e304
- Diogo C.V. et al. "Cardiac mitochondrial dysfunction during hyperglycaemia: the role of oxidative stress and p66Shc signaling" Int J Biochem Cell Biol. 2012 Jul 31
- Lebedzinska M. et al. "Disrupted ATP synthase activity and mitochondrial hyperpolarisation-dependent oxidative stress is associated with p66Shc phosphorylation in fibroblasts of NARP patients" Int J Biochem Cell Biol. 2012 Jul 31
- Bressan E. et al. "Donor age-related biological properties of human dental pulp stem cells change in nanostructured scaffolds" Plos One (in press)
- Suski JM et al. "Guanosine diphosphate exerts a lower effect on superoxide release from mitochondrial matrix in the brains of uncoupling protein-2 knockout mice: New evidence for a putative novel function of uncoupling proteins as superoxide anion transporters" Biochem Biophys Res Commun (in press)

- FFC Project#15/2010 **"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"**

Andrea Battistoni (Dip. Biologia, Università di Roma Tor Vergata, Roma)

Publications

- D'Orazio M. et al. "Extracellular Glutathione Decreases the Ability of Burkholderia cenocepacia to Penetrate into Epithelial Cells and to Induce an Inflammatory Response" PLoS One, 2012;7(10):e47550

Abstracts

- Ciavardelli D. et al. "Proteomics and ionomics profiling reveals significant alterations of 14-3-3 signalling pathway and calcium homeostasis in cystic fibrosis cells"

- FFC Project#16/2010 **"Modulation of sphingolipid metabolism as a strategy for the treatment of CF lung inflammation"**

- Maria Cristina Dechechchi (Lab Patologia Molecolare, Lab Analisi chimico Cliniche ed Ematologiche, Az Osp Univ, Verona); Roberto Gambari (Dip. Biochimica e Biologia Molecolare – Univ Ferrara)

Publications

- Dechechchi MC. et al., "Modulators of Sphingolipid Metabolism Reduce Lung Inflammation" Am J Respir Cell Mol Biol, *In press*

- Dechechchi MC. et al., "Pharmacological modulators of sphingolipid metabolism for the treatment of cystic fibrosis lung inflammation" In: Cystic Fibrosis. ISBN 979-953-307-059-8, edited by: Dr. Dinesh D. Sriramulu, Germany

- Galli F. et al. "Oxidative stress and antioxidant therapy in cystic fibrosis" Biochim Biophys Acta. 2012 May;1822(5):690-713

Abstracts

- Dechechchi MC. et al., "Down modulation of neutrophil chemotactic signalling by targeting the metabolism of sphingolipids" Pediatr. Pulmonol.2010, 24th Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Baltimore, MD, U.S.A., 2010 (poster)

- Dechechchi MC et al., "Down modulation of neutrophil chemotactic signalling by targeting the metabolism of sphingolipids" Pediatr. Pulmonol.2010 24th Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Baltimore, MD, U.S.A., 2010

- Dechechchi MC et al. "Down modulation of neutrophil chemotactic signalling by targeting the metabolism of sphingolipids" Pediatr. Pulmonol.2010 24th Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Baltimore, MD, U.S.A., 2010

- Dechechchi MC. et al. "Inhibitors of glucosylceramide synthase (GlcCerT) reduce the transcription of IL-8 induced by *P. aeruginosa* in CF bronchial cells" ECFS Basic Science Conference Tirrenia - Pisa, Italy 30 March - 2 April 2011

- Dechechchi MC et al., "Inhibitors of glucosylceramide synthase (GlcCerT) reduce the transcription of IL-8 induced by *P. aeruginosa* in CF bronchial cells" New Frontiers in Basic Science of Cystic Fibrosis, Tirrenia (Pisa), 30 March-2 April 2011

- Tebon M. et al. "Miglustat reduces lung inflammation in vitro and in vivo", 5th European CF Young Investigator Meeting, Lille, France, 23-26 August 2011

- Dechechchi MC et al., "Anti-inflammatory effect of miglustat: sphingolipid metabolism as a therapeutic target for cystic fibrosis lung inflammation" FEBS Workshop: Cell Biology and Pharmacology of Mendelian Disorders, Vico Equense (Naples), 7-11 october 2011.

- Dechechchi MC. et al., "Inhibitors of glucosylceramide synthase (GlcCerT) reduce the transcription of IL-8 induced by *P. aeruginosa* in CF bronchial cells" New Frontiers in Basic Science of Cystic Fibrosis, Tirrenia (Pisa), 30 March-2 April 2011

- Tebon M. et al., "Miglustat reduces lung inflammation in vitro and in vivo" 5th European CF Young Investigator Meeting, Lille, France, 23 – 26 August 2011

- Dechechchi MC. et al., "Anti-inflammatory effect of miglustat: sphingolipid metabolism as a therapeutic target for cystic fibrosis lung inflammation" FEBS Workshop: Cell Biology and Pharmacology of Mendelian Disorders, Vico Equense (Naples), 7-11 october 2011.

- Tebon M. et al. "Targeting enzymes involved in the metabolism of glucosylceramide to modulate transcription of IL-8 gene in CF epithelial cells" 9th ECFS Basic Science Conference, Sainte-Maxime, France from 28 March - 1 April 2012

- Dechechchi C. et al. "Inhibitors of glucosylceramide synthase (GlcCerT) reduce the transcription of IL-8 induced by *P. aeruginosa* in CF bronchial cells" 9th ECFS Basic Science Conference, 24 March-1 April 2012, Sainte-Maxime, France

- Dechechchi C. et al. "Iminosugar-based inhibitors of ceramide glucosyl-transferase (GlcCerT) and non-lysosomal glucosylceramidase (GBA2) reduce the inflammatory response to *P. aeruginosa* in CF bronchial epithelial cells" NACFC 2012, Orlando, USA

- FFC Project# 17/2010 **"Molecular characterization of trimethylangelicin (TMA) and structurally-related compounds in CF lung disease: anti inflammatory effects and potentiation of the CFTR biological activity"**

Roberto Gambari (Dip. Biochimica e Biologia Molecolare, Università di Ferrara); Francesco Dall'Acqua (Dip. Scienze Farmaceutiche, Università di Padova)

Publications

- Borgatti M. et al. "Development of a novel furocumarin derivative inhibiting NF-κB dependent biological functions: desing, synthesis and biological effects" Eur J Med Chem 2011, Oct;46(10):4870-7

- Borgatti M. et al. "Bergamot (*Citrus bergamia* Risso) fruit extract and identified components alter expression of interleukin 8 gene in cystic fibrosis

- bronchial epithelial cells lines" BMC Biochem, 2011 Apr 15; 12:15
- Mazzitelli S. et al. "Encapsulation of eukaryotic cells alginate microparticles: cell signaling by TNF-alpha through capsular structure of cystic fibrosis cells" J Cell Commun Signal, 2011 Jun;5(2):157-65 Epub 2010 Nov 25
  - Tamanini A. et al. "Trimethylangelicin Reduces IL-8 Transcription and Potentiates CFTR Function" Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2011 Mar;300(3):L380-90
  - Hau D. K. et al. "In vivo anti-tumoral activity of corilagin on Hep3B hepatocellular carcinoma" Phytomedicine, 2010 Dec 15;18(1):11-5
  - Piccagli L. et al. "Virtual screening against nuclear factor κB (NF-κB) of a focus library: identification of bioactive furocoumarin derivatives inhibiting NF-κB dependent biological functions involved in cystic fibrosis" Bioorg Med Chem, 2010 Dec 1;18(23):8341-9
  - Borgatti M. et al. "Induction by TNF-α of IL-6 and IL-8 in cystic fibrosis bronchial IB3-1 epithelial cells encapsulated in alginate microbeads" J Biomed Biotechnol, 2010; 2010. pii:907964. Epub 2010 Sep 8
  - Gambari G. "Recent patents on the therapy based on the transcription factor decoy approach" Expert Opinion on Therapeutic Patents, in press

- FFC Project# 18/2010 **"Infections in cystic fibrosis: role of the long pentraxin PTX3 in host resistance and as therapeutic agent"**

Cecilia Garlanda (Fondazione Humanitas per la Ricerca, Milano); Alessandra Bragonzi (Infections and Cystic Fibrosis Unit, Division of Immunology, Transplantation and Infectious Disease, H. S. Raffaele, Milano)

*Publications*

- Moalli F. et al. "The therapeutic potential of the humoral pattern recognition molecule PTX3 in chronic lung infection caused by *Pseudomonas aeruginosa*", J Immunol, 2011 May 1;186(9):5425-34
- Chiarini M. et al. "PTX3 genetic variations affect the risk of *Pseudomonas aeruginosa* airway colonization in cystic fibrosis patients" Genes Immun. 2010 Dec;11(8):665-70.
- Inforzato A. et al., "The long pentraxin PTX3 at the crossroads between innate immunity and tissue remodeling" Tissue Antigens. 2011 Apr;77(4):271-82.
- Moalli F. et al., "Pathogen recognition by the long pentraxin PTX3" J Biomed Biotechnol, 2011;2011:830421. Epub 2011 Jun 2.
- Moalli F. et al. "Role of complement and FCy receptors in the protective activity of the long pentraxin PTX3 against *Aspergillus fumigatus*" Blood, 2011 116:5170-5180
- Garlanda C. et al., "Role of Complement and FCy Receptors in the protective activity of the long pentraxin PTX3 against *Aspergillus fumigatus* and *Pseudomonas aeruginosa*" Innate Immunity: Mechanisms Linking with Adaptive Immunity. June 7 - 12, 2010. Trinity College Dublin, Ireland
- Garlanda C., "Infections in cystic fibrosis: role of the long pentraxin PTX3 in host resistance and as therapeutic agent", VIII Italian Convention of Researchers in Cystic Fibrosis, Verona, Italy, December 2-4, 2010
- Garlanda C., "Role of the long pentraxin PTX3 in chronic lung infection by *Pseudomonas aeruginosa*" SIICA 7th National Conference", Bari, Italy, May 26-29, 2010
- Garlanda C., "The therapeutic potential of the humoral pattern molecule PTX3 in chronic lung infection caused by *Pseudomonas aeruginosa*" 5th ENII EF/EJI Summer School in advanced immunology", Capo Caccia, Sardinia, Italy, May 9-16, 2010
- Moalli F. et al. "Role of Complement and FCy Receptors in the protective activity of the long pentraxin PTX3 against *Aspergillus fumigatus*" Innate Immunity: Mechanisms Linking with Adaptive Immunity, Trinity College Dublin, Dublin, Ireland, June 7-12, 2010
- Paroni M. et al. "Therapeutic potential of the long pentraxin PTX3 in a murine model of *Pseudomonas aeruginosa* chronic lung infection" 24th Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Baltimore, USA, October 21-23, 2010
- Moalli F. et al. "Role of Complement and FCy Receptors in the protective activity of the long pentraxin PTX3 against *Aspergillus fumigatus* and *Pseudomonas aeruginosa*", Toll2011 Meeting, Decoding Innate Immunity, Riva del Garda, Italy, May 4-7, 2011
- Garlanda C. et al., "Role of Complement and FCy Receptors in the protective activity of the long pentraxin PTX3 against *Aspergillus fumigatus* and *Pseudomonas aeruginosa*", Toll2011 Meeting, Decoding Innate Immunity, Riva del Garda, Italy, May 4-7, 2011
- Doni A. et al. "Interactions of the humoral pattern recognition molecule PTX3 with the complement system" Immunobiology. 2012 Nov;217(11):1122-8
- Inforzato A. et al. "Pentraxin in humoral innate immunity" Adv Exp Med Biol. 2012;946:1-20
- Paroni M. et al. "Response of CFTR-deficient mice to long-term *Pseudomonas aeruginosa* chronic infection and PTX3 therapeutic treatment" J Infect Dis. 2012 Oct 18. [Epub ahead of print]

- Véliz Rodriguez T. et al. "Role of Toll interleukin-1 receptor (IL-1R) 8, a negative regulator of IL-1R/Toll-like receptor signaling, in resistance to acute *Pseudomonas aeruginosa* lung infection" Infect Immun. 2012 Jan;80(1):100-9

- FFC Project# 20/2010 **"Identification of agents with multiple favourable activities as potential treatments for cystic fibrosis"**
- Annamaria Naggi (Ist. di Ricerche Chimiche e Biochimiche "G. Ronzoni", Milano), Edwin A. Yates (School of Biological Science, University of Liverpool), Janis Shute (Div. Pharmacol. Pharmacy and Biomolecular Science, Univ. Portsmouth)

*Abstracts*

- Veraldi N. et al. "Heparin derivatives as potential anti-inflammatories in cystic fibrosis treatment" XIII CSCC, Certosa di Pontignano, June 24-27, 2012

- FFC Project# 21/2010 **"Th17 responses in Cystic fibrosis: paving the way for novel anti-inflammatory strategies and immunogenetic screening"**

Luigina Romani (Dip. Medicina Sperimentale e Scienze Biomediche, Università di Perugia)

*Publications*

- Sorci G. et al. "The danger signal S100B integrates pathogens- and danger-sensing pathways to restrain inflammation" PLoS Pathog. 2011 Mar;7(3):e1001315

- Romani L. "Immunity to fungal infections" Nat Rev Immunol. 2011 Apr;11(4):275-88

- Zelante T. et al. "IL-22 in antifungal immunity" Eur J Immunol. 2011 Feb;41(2):270-5

- Cunha C. et al. "Genetically-determined hyperfunction of the S100B/RAGE axis is a risk factor for Aspergillosis in Stem Cell transplant recipients" PLoS One. 2011;6(11):e27962. Epub 2011 Nov 17.

- Cunha C. et al. "Immunogenetic profiling to predict risk of invasive fungal diseases: where are we now?" Immunol Invest. 2011;40(7-8):723-34.

- Carvalho A. et al. "Immunotherapy of aspergillosis" Clin Microbiol Infect. 2012 Feb;18(2):120-5.

- Zelante T. et al. "Sensing of mammalian IL-17 regulates fungal adaptation and virulence" Nat Commun. 2012 Feb 21;3:683. doi: 10.1038/ncomms1685

- Cunha C. et al. "Host genetics and invasive fungal diseases: towards improved diagnosis and therapy?" Expert Rev Anti Infect Ther. 2012 Mar;10(3):257-9.

- Carvalho A. et al. "Host defense pathways against fungi: the basis for vaccines and immunotherapy" Front Microbiol. 2012;3:176.

- Cunha C. et al. "DAMP signaling in fungal infections and diseases" Front Immunol. 2012;3:286.

*Abstracts*

- Iannitti RG. et al. "Aspergillosis in Cystic Fibrosis: a multifactorial disease?" "5th Advances Against Aspergillosis" Istanbul, 2012 January 26-28

- Romani L. "Controversies in immunology: excessive inflammation in Aspergillosis" "5th Advances Against Aspergillosis" Istanbul, 2012 January 26-28

- Carvalho A. "Cracking the genetic code for susceptibility to aspergillosis in immunodeficient patients" Gordon Research Conference – Immunology of fungal infections, Galveston (Texas), January 15-22, 2011

- Romani L. "Immunity to fungi: what is required?" EBMT Annual Meeting, Paris (France), April 3-6, 2011

- FFC Project# 20/2011 **"Host Response to *Pseudomonas aeruginosa* adaptation during airway chronic infection"**

Cristina Cigana (Divisione di Immunologia, Trapianti e Malattie infettive – Istituto San Raffaele, Milano)

*Publications*

- Lorè N. I. et al. "Cystic fibrosis-niche adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* reduces virulence in multiple infection hosts" PLoS One. 2012;7(4):e35648. Epub 2012 Apr 25

*Abstracts*

- Cigana C. et al. "Adaptation of *P. aeruginosa* in cystic fibrosis airways affects the host immune-response" NACFC, 2011, Anaheim, California, USA

- Cigana C. et al. "Cystic fibrosis adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* modulates innate immune system and tissue damage control" Cytokines 2012, 10<sup>th</sup> Joint Annual Meeting, 11-14 September 2012, Geneva, Switzerland

- Cigana C. et al. "Host response to *Pseudomonas aeruginosa* adaptation during chronic infection" 35<sup>th</sup> European Cystic Fibrosis Conference, 6-9 June 2012, Dublin, Ireland

- Lorè N.I. et al. "Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis airways affects the host immune-response" VI European CF Young investigator meeting, Paris, France, 2012
- Cigana C. et al. "Cystic fibrosis-adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* modulates innate immune system detection and tissue damage control" NACFC 2012, Orlando, Florida, USA

- FFC Project#23/2011 **"Polyethylenimine-engineered respirable particles delivering a decoy oligonucleotide to NF-κB: a novel combination therapy for cystic fibrosis?"**

Fabiana Quaglia (Dip. Chimica Farmacologica e Tossicologica, Università "Federico II", Napoli), Rosa Carnuccio (Dip. Farmacologia Sperimentale, Università "Federico II", Napoli)

Publications

- Ungaro F. et al. "PEI-Engineered Respirable Particles Delivering a Decoy Oligonucleotide to NF-κB: Inhibiting MUC2 Expression in LPS-

Stimulated Airway Epithelial Cells" PLoS One. 2012;7(10):e46457

- Ungaro F. et al. "Engineered PLGA nano- and micro-carriers for pulmonary delivery: challenges and promises" J Pharm Pharmacol. 2012 Sep;64(9):1217-35

Abstracts

- De Stefano D. et al. "NF-κB decoy ODN release from respirable and biodegradable PEI/PLGA particles inhibits MUC2 expression il LPS-stimulated human lung cells" 35° Congresso Nazionale della Società Italiana di Farmacologia, Bologna, 2011

- Ungaro F. et al. "Engineering inhalable particles for local and prolonged delivery of an oligonucleotide decoy to nuclear factor-κB" 8th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, March 19-22, 2012, Istanbul, Turkey.

- Ungaro F. et al. "Engineered respirable carriers for the sustained delivery of drugs to the lungs" XXII Simposio ADRITELF "1972-2012: 40 anni di Tecnologia Farmaceutica", September 13-16, 2012, Firenze, Italy

## 5. CLINICAL RESEARCH

### Ricerca clinica

- FFC Project 2005 **"Infection Control"**

Roberto Buzzetti (Componente del Comitato di Consulenza Scientifica della Fondazione per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica)

Publications

- Buzzetti R. et al. "Controllo e prevenzione delle infezioni respiratorie nel paziente affetto da fibrosi cistica" Edit. Fondazione per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica. Verona, 2005
- Festini F. et al. "Isolation measures for prevention of infection with respiratory pathogens in cystic fibrosis: a systematic review" Journal of Hospital Infection (2006) 64, 1-6

- FFC Project#18/2004 **"Early eradication of *P. aeruginosa* and subsequent colonization in cystic fibrosis patients"**

Giovanni Taccetti (Dipart. di Pediatria, Centro Regionale FC, Azienda Ospedaliera Universitaria Meyer)

Publications

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

- FFC Project# 19/2004 **"Quality control and update of follow-up data in the Italian cystic fibrosis registry: a starting point for the analysis of clinical data and the dissemination of results"** Anna Bossi (Ist. Statistica e Biometria - Univ. Milano)

Abstracts

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

- FFC Project#16/2005 **"Diabetes, glucose intolerance and hypoglycemia in Cystic Fibrosis"**

Carla Colombo (Dipart. Pediatria - Centro FC - Fond. IRCCS Osp. Maggiore Polic. Mangiagalli e Regina Elena - Milano), Alberto Battizzatti (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
- Battezzati A. et al. "Identification of insulin secretory defects and insulin resistance during oral glucose tolerance test in a cohort of cystic fibrosis patients" Eur J Endocrinol. 2011 Jul;165(1):69-76. Epub 2011 Apr 18.

Abstracts

- Battezzati A. et al. "Cystic fibrosis related diabetes in anticipated by reduced insulin secretion during OGTT" 13<sup>th</sup> 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. 22<sup>nd</sup> Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Orlando, Florida, 22-25 October 2008, p. 344-345

- FFC Project 2006 **"The CAIRO Project" (Analysis and review of the international scientific literature from the CF registries)**

Roberto Buzzetti (Componente del Comitato di Consulenza Scientifica della Fondazione per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica), Donatello Salvatore (U. O. Pediatria, Azienda Ospedaliera San Carlo, Potenza)

Publications

- Buzzetti R. et al. "An overview of international literature from cystic fibrosis registries: 1. Mortality and survival studies in cystic fibrosis", Journal of Cystic Fibrosis 9 (2010) 75-83

- Salvatore D. et al. "An overview of international literature from cystic fibrosis registries: 2. Neonatal screening and nutrition/growth", Journal of Cystic Fibrosis 9 (2010) 75-83

- Salvatore D. et al. "An overview of international literature from cystic fibrosis registries: 3. Disease incidence, genotype/phenotype correlation, microbiology, pregnancy, clinical complications, lung transplantation, and miscellanea", Journal of Cystic Fibrosis 10 (2011) 71 - 85

Abstracts

- Buzzetti R. et al. "Analysis and review of the international scientific literature from the CF registries" NACF, Anaheim, California, October 3-6, 2007

- Salvatore D. et al. "The CAIRO Project (Comparative analysis of international CF registries overviewed): analysis and review of the scientific literature from CF registries" 13<sup>th</sup> 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" 13<sup>th</sup> 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. 22<sup>nd</sup> Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Orlando, Florida, 22-25 October 2008, pp. 130-131.

- FFC Project#21/2006 “**Efficacy of slow release insulin in cystic fibrosis patients with glucide intolerance and clinical decay**” Laura Minicucci (Istituto G. Gaslini - Dip.to Pediatria - Centro FC, Genova); Riccardo Haupt (Istituto Gaslini, Sezione di Epidemiologia e Biostatistica, Genova)

Publications

Minicucci L. et al. “Slow-release insulin in cystic fibrosis patients with glucose intolerance: a randomized clinical trial” Pediatr Diabetes. 2011 Nov 8.

- 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)

Publications

- Taccetti G. et al. “Early antibiotic treatment for *Pseudomonas aeruginosa* eradication in patients with cystic fibrosis: a randomised multicentre study coming two different protocols” Thorax. 2012 Oct;67(10):853-859. Epub 2012 Feb 29.

Abstracts

- Taccetti G. et al. “Early antibiotic treatment for *Pseudomonas aeruginosa* eradication in cystic fibrosis patients: a randomised multicenter study of two different protocols” 23<sup>rd</sup> 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 24<sup>th</sup> 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 24<sup>th</sup> 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 24<sup>th</sup> Annual North American CF Conference, October 21-23, 2010, Baltimore, Maryland

- Dolce D. et al. “Evaluation of antibody titer anti-*P. aeruginosa* in patients undergoing eradication therapy” NACFC 2012, Orlando, USA

- 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

- Dal Molin A. et al. “Totally implantable central venous access ports in patients with cystic fibrosis: a multicenter prospective cohort study” J Vasc Access. 2012 Jan 10:0.

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” 23<sup>rd</sup> Annual North American Cystic Fibrosis Congress, Minneapolis, Minnesota, 15-17 October 2009.

- Dal Molin A et al “Multicenter prospective study about complications of totally implantable central venous access ports in Italian people with CF: preliminary results” J Cyst Fibros. 2009; 8 (Suppl.2):S95

- FFC Project#17/2008 “**Extracorporeal lung assist as bridge to lung transplantation for patients with cystic fibrosis**”

Vito Marco Ranieri (Dip. Discipline Medico Chirurgiche Università degli studi di Torino Sez. Anestesi e Rianimazione)

Publications

- Ricci D. et al. “The use of CO<sub>2</sub> removal devices in patients awaiting lung transplantation: an initial experience” Transplant Proc. 2010 May;42(4):1255-8

- FFC Project#23/2009 “**Modulation of intestinal and extraintestinal inflammation in infants with cystic fibrosis by early modification of intestinal microflora**”

Alfredo Guarino (Dipartimento di Pediatria - Università degli Studi “Federico II” Napoli), Cesare Braggion (Centro Regionale Fibrosi Cistica - Dipart. Medicina Pediatrica - Azienda Ospedaliera Universitaria Meyer - Firenze) Francesca Pardo (Centro Regionale Fibrosi Cistica - 2<sup>o</sup> U.O. di Pediatria, Ospedale dei Bambini “G. Di Cristina” - Palermo), Lorenzo Morelli (Istituto di Microbiologia - Università Cattolica del Sacro Cuore - Piacenza)

Abstracts

- Roberto E. et al. “Intestinal inflammation and intestinal microbiota composition in children with cystic fibrosis” XVII National Congress of SIGEN, Pescara, Italy, 7-9 October 2010.

- Roberto E. et al. “Intestinal inflammation and intestinal microbiota composition in children with cystic fibrosis” Digestive and Liver Disease, 42S (2010), S321-S376.

- Buzzese E. et al. “Age-Relation pattern of intestinal microflora in children with cystic fibrosis”, 44<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN), Sorrento, Italy, 25-28 May 2011.

- FFC Project#23/2010 “**The cystic fibrosis newborn screening in Italy. Survey for assessment of technical-scientific, organizational and psycho-relational issues**”

Teresa Repetto (A.O.U. “A. Meyer”, Centro Regionale Toscano Fibrosi Cistica, Firenze)

Abstracts

- Repetto T. et al. “Screening neonatale per fibrosi cistica in Italia: studio di audit sugli aspetti tecnici-scientifici, organizzativi e relazionali” SIMMENS SIMePeD, 28 ottobre 2011

- Repetto T. et al. “The cystic fibrosis newborn screening in Italy. Survey for assessment of technical-scientific and organizational issues” 35<sup>th</sup> ECFC, 6-9 June, 2012, Dublin, Ireland

- Repetto T. et al. “Cystic fibrosis newborn screening in Italy: educational aspect”, NACFC 2012, Orlando, Florida, USA

- FFC Project#25/2011 “**DWI (Diffusion weighted Imaging) a new tool to assess inflammation in CF population with pulmonary exacerbation**”

Giovanni Morana (Servizio Fibrosi Cistica, Ospedale Ca’ Foncello, Treviso)

Abstracts

- De Leo F. et al. “Functional MR to monitoring cystic fibrosis (CF) lung disease” Chicago RNSA (25-30 novembre 2012)

- De Leo F. et al. “Functional MR to monitoring cystic fibrosis (CF) lung disease” Congresso ESMRMB, 4-6 ottobre 2012, Lisbona

- De Leo F. et al. “Ruolo del Diffusion Weighted Imaging (DWI) nel follow-up di pazienti affetti da fibrosi cistica (FC), 3 Congresso annuale dell’Italian Chapter dell’ISMRM, Napoli, 19 aprile 2012

## FFC Facilities

- FFC Project#**CFaCore**

Alessandra Bragonzi (Divisione di Immunologia, Trapianti e Malattie infettive – Istituto San Raffaele, Milano)

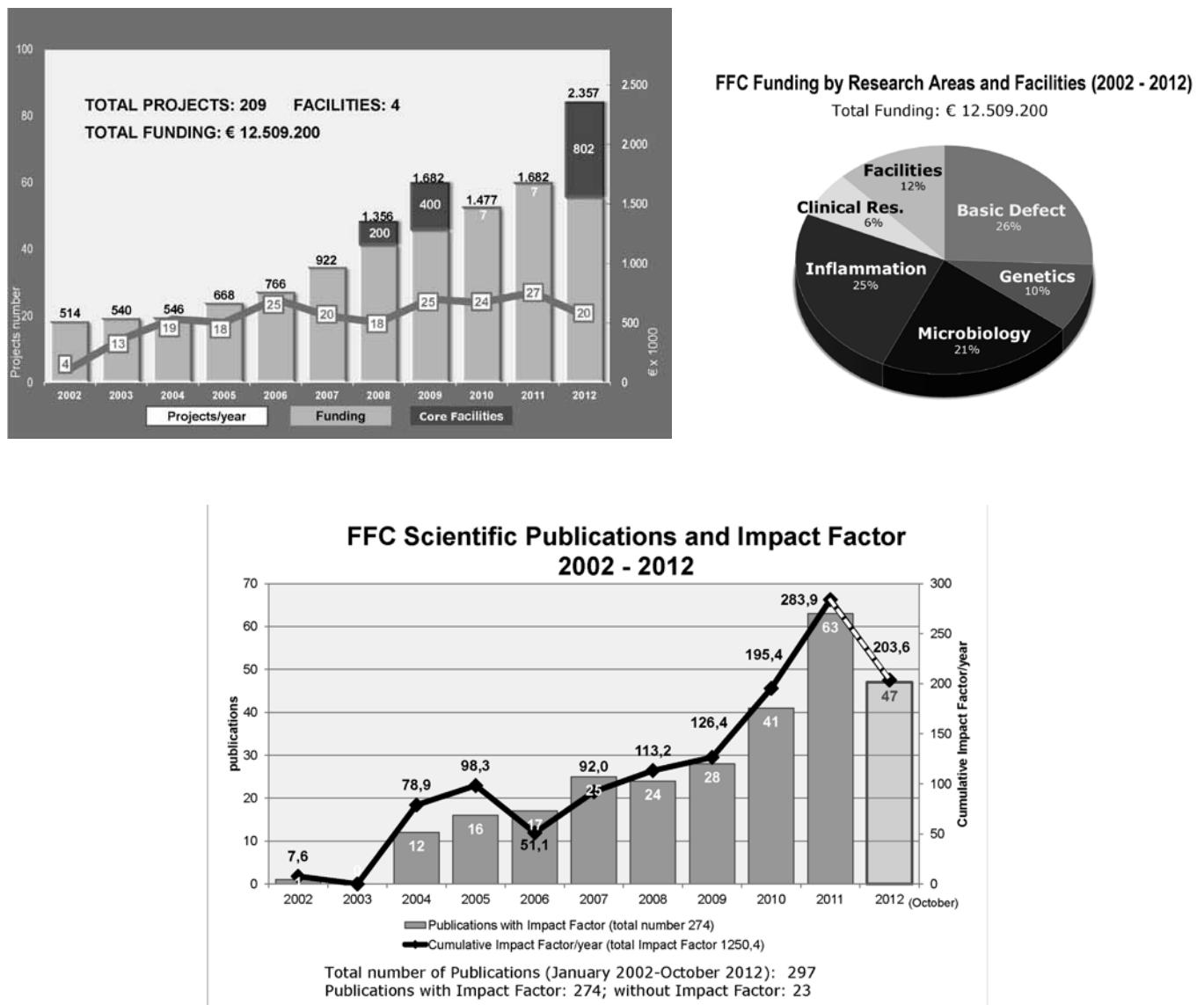
Publications

- Bragonzi A et al “Murine models of acute and chronic lung infection with cystic fibrosis pathogens” Int J Med Microbiol. 2010 Dec;300(8):584-93. Epub 2010 Oct 14. Review.

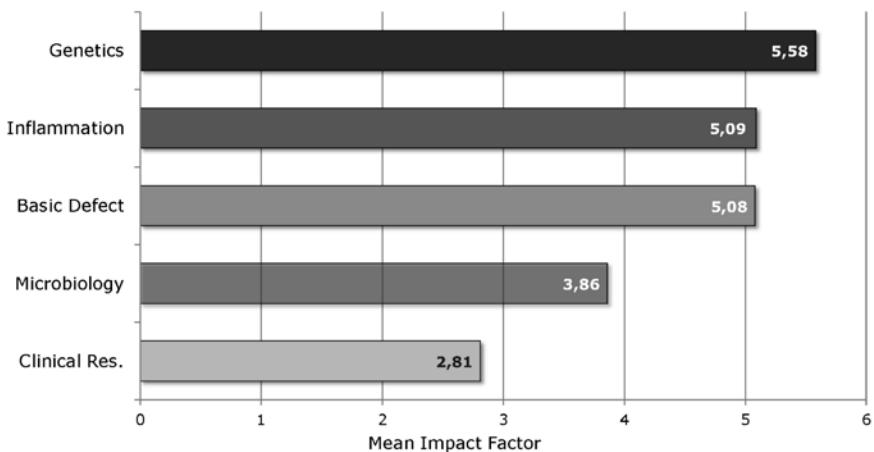
## Appendix 2

### *Projects 2002-2012 FFC funded, publications and impact factor*

### Progetti finanziati da FFC 2002-2012, pubblicazioni e impact factor



#### Impact Factor Mean Value by Research Areas



## ***FFC Institute and Laboratory Network***

### **La rete FFC di Istituti e Laboratori di ricerca**

#### **ABRUZZO**

- Dip. Scienze Biomediche , Lab Medicina Molecolare, Università "G. D'Annunzio", Chieti
- Dip. Medicina Sperimentale, Università dell'Aquila, L'Aquila
- Dip. Biologia Cellulare ed Oncologia, Consorzio Mario Negri Sud, S. Maria Imbaro (Chieti)
- Dip. Farmacologia Translazionale, Consorzio Mario Negri Sud, Chieti
- Lab. di Biologia e Farmacologia Vascolare, Consorzio Mario Negri Sud, Chieti
- Lab. Medicina Molecolare, Ce.S.I., Universita Chieti-Pescara
- Centro FC, Teramo

#### **CALABRIA**

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

#### **CAMPANIA**

- Dip. Biochimica e Biotecnologie Mediche, CEINGE Biotecnologie Avanzate s.c.a.r.l. , Università Federico II, Napoli
- Dip. di Pediatria, Università Federico II, Napoli
- Lab. Microbiologia Funzionale, Università Federico II, Napoli
- Dip. Chimica Tossicologica e Farmaceutica, Univ. Federico II, Napoli
- Dip. Farmacologia Sperimentale, Napoli
- Dip. Chimica e Biochimica organica, Univ. Federico II, Napoli
- TIGEM, Telethon, Napoli
- Dip. Scienze Farmaceutiche, Università di Salerno
- Istituto di Biochimica delle Proteine, CNR, Napoli
- Istituto di Genetica e Biofisica, CNR, Napoli
- Istituto di Chimica Molecolare, CNR, Napoli
- Dip. Biologia Strutturale e Funzionale, Università "Federico II", Napoli

#### **EMILIA ROMAGNA**

- Plesso Bio,Tecnologico Integrato, Università di Parma, Parma
- Dip. Pediatria, Università di Parma, Parma
- Dip. di Biochimica e Biologia Molecolare, Università di Ferrara, Ferrara
- Dip. Medicina Sperimentale e Diagnostica, Università di Ferrara
- Dip. Biochimica , Istituto Nazionale Ricerca Cardiovascolare, Università di Bologna e Cesena
- Dip. Tecnologie Analitiche Avanzate, Piacenza
- Dip. Scienze cliniche, Università degli Studi di Parma
- Dip. Oncologia, Ematologia e Malattie respiratorie, Università degli Studi di Modena

#### **FRIULI VENEZIA GIULIA,**

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

#### **LAZIO**

- Dip. Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Università La Sapienza, Roma
- Dip. di Biopatologia e Diagnostica per Immagini, Università Tor Vergata, Roma
- Dip. di Biologia, Università Tor Vergata, Roma
- Dip. Biotecnologie Cellulari ed Ematologia, Università La Sapienza, Roma
- Istituto di Clinica Pediatrica, Centro Regionale FC, Università Roma 1, Roma
- Dip.di Fisiopatologia Medica Università La Sapienza, Roma
- Dip. di Biotecnologie, Protezione della Salute e degli Ecosistemi, ENEA Casaccia, S. Maria di Galeria, Roma
- Lab. di Microbiologia,Ospedale Bambin Gesù,Roma
- Lab. Microbiologia Molecolare, Università La Sapienza, Roma
- Istituto di Microbiologia,Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma
- Dip. Farmacologia, Facoltà di Medicina , Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma
- Dip. Microbiologia ,Università di Roma 3, Roma
- Dip. Salute Pubblica e Biologia Cellulare, Università Tor Vergata, Roma
- Dip. Neuroscienze Sperimentalni, Fondazione S. Lucia, Roma
- Dip. Scienze di Sanità Pubblica, Università "La Sapienza", Roma
- Dip. di Medicina Interna e Vascolare, Università "La Sapienza", Roma
- Lab. di Microbiologia Ospedale Pediatrico Bambin Gesù, Roma
- Serv. Supporto FC, Osp. Bambin Gesù, Roma
- Lab. Microbiologia Molecolare e Biotecnologia dei Microrganismi, Dip. Biologia, "Università Roma Tre"
- Lab. Microbiologia Clinica e Virologia, Dipartimento di Biologia, "Università Roma Tre", Roma;
- Dip. Scienze Biochimiche, Università "La Sapienza", Roma
- Dip. Pediatria e Neuropsichiatria Infantile, Università "La Sapienza"
- Centro fibrosi cistica, Policlinico Umberto I
- Dip. Salute pubblica e Malattie Infettive, Università "La Sapienza", Roma
- Dip. Biologia e Biotecnologie, Università "La Sapienza", Roma
- IRBM Science Park, 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. Protez. Ambiente Ligure), Genova
- Lab. Diagnostica e Ricerca Malattie Infettive, Dip. Pediatria,Istituto G. Gaslini, Genova
- Dip. Pediatria, Lab. Microbiologia, Istituto G. Gaslini, Genova

- Dip. Pediatria, Centro Fibrosi Cistica, Istituto G. Gaslini, Genova
- Sezione di Epidemiologia e Biostatistica, Istituto G. Gaslini, Genova
- Dip. Medicina Sperimentale , Istituto G. Gaslini, Genova
- Dip. Medicina Sperimentale , Università degli Studi di Genova
- Lab. Fisiopatologia Molecolare dei Canali Ionici, Centro Biotecnologie Avanzate, Genova

#### **LOMBARDIA**

- Istituto Statistica e Biometria, Università di Milano, Milano
- Istituto per il Trattamento Sperimentale della Fibrosi Cistica, Ospedale S. Raffaele, Milano
- Dip. Medicina Specialistica e dei Trapianti, Ospedali Riuniti, Bergamo
- Dip. Immunologia e Clinica dei Trapianti, Ospedali Riuniti, Bergamo
- Lab. di Genetica Medica A. O. Istituti Clinici di Perfezionamento, Milano
- Dip. di Scienze Biomolecolari e Biotecnologie, Università degli Studi di Milano, Milano
- Dip. di Genetica e Microbiologia, Università di Pavia, Pavia
- Dip. di Pediatria, Centro Fibrosi Cistica, Fondazione IRCCS, Policlinico Mangiagalli e Regina Elena, Milano
- Lab. di Microbiologia, Centro Fibrosi Cistica, Milano
- Unità di Genomica per Diagnosi di Patologie Umane, Fondazione Centro San Raffaele, Milano
- Istituto per le Tecnologie Biomediche, CNR, Segrate (MI)
- Lab. di Ricerca Clinica, Istituto per la Ricerca Farmacologica "M. Negri", Milano
- Dip. Chimica Organica ed Industriale, Milano
- Dip. Scienze Molecolari Agroalimentari, Milano
- Dip. Biotecnologie e Bioscienze, Università Bicocca, Milano
- Fondazione Humanitas per la Ricerca, Rozzano (Milano)
- Div. Immunologia, Trapianti e Malattie infettive, Istituto "San Raffaele", Milano
- Istituto di Ricerche Chimiche e Biochimiche, Istituto "G. Ronzoni", Milano
- Dip. Biologia e Genetica per le Scienze Mediche, Università degli Studi di Milano
- Lab. Biologia Clinica Molecolare e Citogenetica, Università Vita-Salute HSR, Milano
- Istituto Ricerche Farmacologiche Mario Negri, Lab. for medical research and consumer involvement
- Dip. Medicina Clinica e Prevenzione, Università Bicocca, Milano
- Lab. Biochimica e Biologia Molecolare, Dip. Medicina, Ospedale S. Paolo, Università degli Studi di Milano
- Dip. Scienze Farmacologiche, Università degli Studi di Milano
- Dip. Ingegneria Strutturale, Politecnico di Milano
- Centro FC, Lab. Patologia Clinica, Fondazione IRCCS, Ca' Granda, Milano

#### **MARCHE**

- Centro Regionale Fibrosi Cistica, Ospedali Riuniti, Ancona

#### **PIEMONTE**

- Centro FC Adulti Divisione Malattie Respiratorie, Dip. di Scienze Biologiche e Cliniche, Università di Torino, Ospedale S. Luigi Gonzaga, Orbassano, Torino
- Dip. di Genetica, Biologia e Biochimica, Università di Torino, Torino
- Dip. di Patologia Clinica, S.S. di Diagnostica Molecolare e Test Genetici Integrati, Torino
- Dip. Discipline Medico Chirurgiche, Sez. Anestesia e Rianimazione, Univ. Torino
- Dip. di Scienza e Tecnologia del Farmaco, Università di Torino
- Dip. di Scienze Cliniche e Biologiche, Univ. di Torino
- Centro di Biotecnologia Molecolare, Università di Torino

#### **PUGLIA**

- Dip. Fisiologia Generale ed Ambientatale , Università di Bari, Bari
- Servizio di Supporto Fibrosi Cistica, Ospedale di Cerignola, Cerignola
- Dip. Scienze Biomediche, Lab. Patologia Generale, Università di Foggia
- Dipartimento di Pediatria, Policlinico , Università di Bari
- Istituto Biomembrane e Bioenergetica, CNR, Bari

#### **SARDEGNA**

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

#### **SICILIA**

- Istituto di Biofisica, CNR, Palermo
- Centro Regionale Fibrosi Cistica,Policlinico, Messina,
- Centro Regionale Fibrosi Cistica, Ospedale dei Bambini "G. di Cristina", Palermo
- Istituto per lo Studio dei Materiali Nanostrutturati, CNR, Palermo
- Dipartimento Scienze e Biotecnologie Molecolari e Biomolecolari, Università degli Studi di Palermo

#### **TOSCANA**

- Dip. di Biologia Animale e Genetica, Università di Firenze, Firenze
- Lab. di Proteomica Funzionale, Dip. di Biologia Molecolare, Università di Pisa, Pisa
- Dip. di Pediatria,Centro Fibrosi Cistica, Ospedale Meyer, Firenze
- Servizio di supporto Fibrosi Cistica,Ospedale di Livorno, Livorno
- Dip. Patologia Sperimentale, Biotecnologie Mediche, Infettivologia ed Epidemiologia ,Università di Pisa, Pisa
- Unità Bioinformatica, Centro di Ricerche Novartis, Siena
- Lab. Fisiologia Microbica e Biotecnologia, Dip. Biologia Molecolare, Policlinico "Santa Maria alle Scotte", Siena
- Dipartimento Diagnostica di Laboratorio Servizio di Diagnostica Genetica, Azienda Ospedaliera Universitaria Careggi, Firenze
- Dip. Biologia Molecolare, Sez. Chimica Biologica, Università di Siena
- Dip. Scienze Farmaceutiche, Università degli Studi di Firenze
- Dip. Biologia dell'Evoluzione, Università degli Studi di Firenze

#### **UMBRIA**

- Dipart. Med. Interna, Sez. Bioch. Appl. e Scienze Nutrizionali, Univ. Perugia
- Dipart. Med. Interna, Sez. Biochimica, Univ. Perugia
- Dip. Medicina Sperimentale e Scienze Biomediche, Univ di Perugia
- Dip. Biotecnologie, Università di Siena

#### **VENETO**

- Medicina Interna, Università di Verona, Verona
- Istituto Veneto Medicina Molecolare, Padova
- Servizio Clinico di Genetica e Screening Neonatale,Centro Fibrosi Cistica, Verona
- Dip. di Patologia, Sezione immunologia, Università di Verona, Verona
- Sezione di Anatomia ed Istologia, Dip. di Scienze Morfologico,Biomediche, Università di Verona, Verona
- Lab. Patologia Molecolare, Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata, Verona
- Dip. Scienze della Vita e della Riproduzione, Sezione di Biologia e Genetica, Università di Verona,
- Dip. Scienze Biomediche e Chirurgiche, Divisione di Nefrologia ,Università di Verona, Verona

- Dip. di Patologia, Patologia Generale, Università di Verona
- Lab. di Microbiologia, Istituti Ospitalieri, Verona
- Facoltà di Scienze della Formazione, Università di Verona
- Dip. Scienza e Tecnologia del Farmaco, Università di Verona
- Dip. Scienze Farmaceutiche, Università di Padova
- Dip. Chimica Biologica, Università di Padova
- Dip. Scienze Neurologiche e della Visione, Università di Verona
- Centro fibrosi cistica, Ospedale Ca' Foncello, Treviso
- Clinica Pediatrica, AO Padova

#### **BELGIUM**

- Department of Clinical Chemistry, Université Catholique de Louvain, St Luc University Hospital, Brussels
- Molecular Bacteriology Laboratory Faculty of Medicine, Free University of Brussels(Ulb)

#### **CANADA**

- Department of Microbiology and Immunology, University of Western Ontario, London, Ontario, Canada

#### **FRANCE**

- Institut de Physiologie et Biologie Cellulaires, Université de Poitiers, France
- Pediatric Cystic Fibrosis Center of Trousseau Hospital - Inserm U938 / UPMC

#### **GERMANY**

- Institute of Medical Microbiology and Hygiene, Eberhard-Karls University of Tuebingen, Tuebingen, Germany
- Institute für Medizinische Mikrobiologie, Universitätsklinikum, Münster

#### **IRELAND**

- Queen's University Belfast, Respiratory Medicine Research Group, Microbiology Building, Belfast, Northern Ireland

#### **ISRAEL**

- Schulich Faculty of Chemistry Technion – Israel Institute of Technology, Haifa
- Dep. of Biological Chemistry, The Weizmann Institute of Science, Haifa

#### **SWITZERLAND**

- Dept. of Pediatrics, Geneva University Hospitals, Laboratory of Clinical Investigation III, Geneva, Switzerland
- Polyphor Ltd, 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
- Div. of Pharmacology, Pharmacy and Biomedical Science, Univ. of Portsmouth

#### **UNITED STATES**

- Dep. Pediatrics, Respiratory Medicine, Yale University School of Medicine

## Appendix 4

### ***International reviewers of FFC projects***

### **International reviewers of FFC projects**

#### **ASIA**

##### **Hong Kong**

Dennis Lo Yuk Ming

##### **India**

Amit Misra

##### **Israel**

Batsheva Kerem  
Orit Reish  
Hanoch Senderowitz

#### **AUSTRALIA**

Scott Bell  
Tim Kidd  
Manohar Garg  
Allan Glanville  
John Massie  
John Mattick  
David Reid  
Cynthia Withchurch

#### **CANADA**

Adré Cantin  
Tom Clandinin  
Peter Durie  
Hartmut Grasemann  
Bob Hancock  
Yeger Herman  
Sheila Innis  
Roger Levesque  
Paul Linsdell  
Gergerly Lukacs  
Liu Mingyao  
Robert Newton  
Michael Parkins  
Grace Parraga  
Paul Pencharz  
Danuta Radzioch  
Felix Ratjen  
Andrew Sandford  
Molly Schmid  
Aaron Shawn  
Christopher Sibley  
Pamela Sokol  
David Speert  
Miguel Valvano  
Michael Wheeler  
Herman Yeger  
Julian Zielenksy

#### **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  
Laurence Delhaes  
Isabelle Durieu  
Alexander Edelman  
Brigitte Fauroux  
Claude Ferec  
Chantal Gauthier  
Emanuelle Girodon  
Vincent Goffin  
Aurélie Goyenvalle  
Jacky Jaquot  
Jean Paul Latgé  
Patricia Lemarchand  
Christine Linard  
Anne Munck  
Patrizia Paterlini-Bréchot  
Jean-Marc Rolain  
Marie Catherine Romey  
Juliet Royet  
Isabelle Sermet  
Clarisse Vandebrouck

#### **Germany**

RRobert Bals  
Michael De Vrese  
Jahn Dieter  
Gerd Döring  
Stephan Fischer  
Christoph Freiberg  
Matthias Griese  
Erick Gulbins  
Dominik Hartl  
Jürgen Heesemann  
Barbara Kahl  
Winfried Kern  
Wolfgang Kuebler  
Karl Kunzelmann  
Frank-Michael Müller  
Hermann Schillers  
Ursula Seidler  
Stefan Stamm  
Gratiana Steinkamp  
Burkhard Tuemmler  
Christiane Wolz

#### **Greece**

George Makrydimas

#### **Italy**

Giovanna Batoni  
Flavia Bazzoni  
Antonio De Flora  
Fabrizio De Ponti  
Silvio Garattini  
Marco Lucarelli  
Marco Trabucchi

#### **Portugal**

Margarida Amaral  
Jorge Leitão

#### **Spain**

Raquel Barrio  
Jaume Bertranpetti  
Ana Bustamante-Aragones  
Xavier Estivill

#### **Sweden**

Ute Romling  
Birgitta Strandvik

#### **Switzerland**

Leo Eberl  
Hans Peter Fisher  
Bernard Rossier

#### **The Netherlands**

Touw Daan  
Hugo De Jonge  
Peter Klijn  
Lidewiji Henneman  
Charlotte Robroeks  
Bernt Van Der Blink

#### **U.K. – Northern Ireland**

Matthew Avison  
James Birchall  
Marina Botto  
Alan R. Brown  
Andrew Bush  
Philip Calder  
Steven Conway  
Jane Davies  
Louise Donnelly  
Robert Dorner  
Alistair Duff  
Madeleine Ennis  
Glenda Esmond  
Alain Filloux  
Claire Glasscoe  
John Govan  
Michael Gray  
Robert Gray  
Catherine Greene  
Andrew Greening  
Uta Griesenbach  
Anil Mehta  
Maurice Hallett  
Andrew Jones  
Julian Parkhill  
Mauro Perretti  
Tyrone Pitt  
Daniela Riccardi  
Geraint Rogers  
Martin Savage  
David Sheppard  
Maurice Super  
Paola Vergani  
John Widdicombe  
Craig Winstanley

**SUD AMERICA****Brazil**

Margaret Cristina da Silva Boguszewski  
Veralice Meireles Sales de Bruin  
Mauro M. Teixeira

**Costa Rica**

Arturo Solis

**Venezuela**

Juan Bautista De Sanctis

**U.S.A.****Alabama**

Bakhrom K. Berdiev  
John Paul Clancy  
Lisa Schwiebert

**California**

William Balch  
Annelise Barron  
Carroll Cross  
Beate Illek  
Ryan Hunter  
Ronald Kopito  
Terry Machen  
Richard Moss  
Malla M. Reddy  
Charles M. Strom  
Alan Verkman  
Jeffrey Wine  
Colorado  
Frank Accurso  
Brian Day  
Brian Doctor  
Jerry A. Nick  
Herbert Schweizer

**Connecticut**

Nadia Ameen  
Diane Krause  
Li Tianbo

**Florida**

Alexander Cole  
Alexandra Quittner

**Georgia**

Scott Grosse

**Illinois**

John Christman  
Ann Harris  
Anver Kuliev  
Le Shen  
Lee Shulman  
Jerrold Turner

**Indiana**

Roman Dziarski  
Won Kyoo Cho  
Irina Petrache

**Iowa**

Dwight C. Look  
Joseph Zabner

**Kansas**

John Gatti

**Kentucky**

Stefan Stamm  
Jay Zwischenberger  
Joseph Zwischenberger

**Louisiana**

Jay K. Kolls  
Guoshun Wang

**Maine**

Robert Owens

**Maryland**

Gary Cutting  
Robert K. Ernst  
William Guggino  
Sam Lai  
Gary Mansfield  
Christian Merlo  
Kenneth N. Olivier  
Jonathan Orens  
Harvey Pollard  
Jerry Wright  
Pamela Zeitlin

**Massachusetts**

Joyce Marty Brady  
Terence Flotte  
Steven Freedman  
Bryan Hurley  
Robert Kolter  
John Ladias  
Stephen Lory  
Gerald Pier  
Stefan Ryter  
Gregory Sawiki  
Charles Serhan

**Michigan**

John Li Puma  
Mary O'Riodan  
Kathleen Stringer

**Minnesota**

Antoinette Moran

**Missouri**

Carolyn Cannon  
Thalachallour Mohanakumar

**New Hampshire**

Dean Madden

**New York**

Isabel Aznarez  
Nazzareno Ballatori  
David Goldfarb  
Alice Prince  
Lisa Saiman  
Stefan Worgall  
Tilla S. Worgall

**North Carolina**

Robert Aris  
Michael Boyle  
Charles Esther  
Andrew Ghio  
Michael Knowles  
John Riordan  
Gabriel Sherif

**Ohio**

Amal Amer  
Melvin Berger  
Maria Britto  
James Chmiel  
Mitchell Drumm  
Dana S. Hardin  
Daniel Hassett  
Scott Herness  
Lloyd Horrocks  
Valerie Hudson  
Christopher Karp  
Thomas J. Kelley  
Michael Konstan

**Oregon**

Bruce L. Geller  
Xuheong Liu

**Pennsylvania**

Robert Bucki  
Raymond Frizzell  
Douglas Wilson

**Tennessee**

John Christman  
Michael Laposata

**Texas**

Carolyn Cannon  
Philip Thomas

**Utah**

Valerie Hudson  
Guy Zimmerman

**Vermont**

Daniel J. Weiss

**Virginia**

Joanna Goldberg  
Dennis E. Ohman

**Washington**

Moira Aitken  
Jane Burns  
Chris Goss  
E. Peter Greenberg  
Lucas Hoffmann  
Samuel I. Miller  
Matt Parsek  
Margaret Rosenfeld

**Wisconsin**

Philip Farrel

## ***FFC Research Funding***

### Finanziamento della ricerca FFC 2002-2012

#### Appendix 5

Research area	CF research costs borne by FFC Foundation (€)											
	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2002-2012
1. CFTR physiopathology & new therapy	263.000 2 proj.	238.000 5 proj.	76.000 4 proj.	205.000 5 proj.	205.000 5 proj.	220.000 5 proj.	195.000 2 proj.	375.000 7 proj.	470.000 8 proj.	235.000 4 proj.	565.000 6 proj.	<b>3.047.000</b> 53 proj.
2. Genetics	90.000 3 proj.	113.000 4 proj.	110.000 2 proj.	80.000 3 proj.	113.000 2 proj.	195.000 3 proj.	130.000 2 proj.			310.000 5 proj.		<b>1.141.000</b> 24 proj.
3. Microbiology	18.000 1 proj.	105.000 3 proj.	95.000 3 proj.	145.000 4 proj.	232.000 9 proj.	291.000 7 proj.	260.000 5 proj.	270.000 6 proj.	395.000 6 proj.	373.000 8 proj.	343.000 7 proj.	<b>2.527.000</b> 59 proj.
4. Inflammation	211.000 1 proj.	55.000 1 proj.	163.000 5 proj.	123.000 4 proj.	113.000 3 proj.	163.000 3 proj.	345.000 5 proj.	295.000 6 proj.	485.000 8 proj.	520.000 7 proj.	440.000 5 proj.	<b>2.913.000</b> 48 proj.
5. Epidemiology & Clinical Res	20.000 1 proj.	53.000 3 proj.	31.000 3 proj.	75.000 5 proj.	70.000 3 proj.	85.000 2 proj.	130.000 3 proj.	35.000 1 proj.	140.000 2 proj.	120.000 2 proj.		<b>759.000</b> 25 proj.
Core facilities							200.000 Quantigen&	400.000 CFaCore	6.500 Primary Cult.	7.200 Primary Cult.	802.000 4 Facilities	<b>1.415.700</b> 4 Facilities
Partial costs	492.000	508.000	500.000	614.000	705.000	857.000	1.280.000	1.600.000	1.391.500	1.585.200	2.270.000	<b>11.802.700</b>
Research projects							20 proj.	17 proj.	24 proj.	23 proj.	26 proj.	209 projects
General costs	21.500	32.000	46.000	54.000	61.000	65.000	76.000	82.000	85.000	97.000	87.000	<b>706.500</b>
<b>TOTAL COSTS</b>	<b>513.500</b>	<b>540.000</b>	<b>546.000</b>	<b>668.000</b>	<b>766.000</b>	<b>922.000</b>	<b>1.356.000</b>	<b>1.682.000</b>	<b>1.476.500</b>	<b>1.682.200</b>	<b>2.357.000</b>	<b>12.509.200</b>

Research support at Verona CF centre 1997 - 2002: € 777.217

Total research investment 1997 - 2012: **€ 13.286.417**

# **FFC projects 2010-2012 adopted by supporters**

## **Progetti FFC 2009-2011 adottati dai sostenitori**

### **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)



**Loifur**

### **FFC #2/2010**

#### **Nuovi modelli cellulari e nuove molecole terapeutiche rivolte alle mutazioni "stop" del gene CFTR**

**Responsabile:** Monica Borgatti (Dip. Biochimica e Biologia Molecolare – Univ. Ferrara)

**Costo:** € 40.000

**Adottato totalmente da:** Delegazione FFC di Ferrara con la collaborazione del Gruppo di Sostegno di Comacchio



### **FFC #3/2010**

#### **Un approccio basato sulle cellule staminali pluripotenti indotte (iPS) per rigenerare l'epitelia polmonare affetto da fibrosi cistica**

**Responsabile:** Roberto Loi (Dip. Tossicologia – Sez. Oncologia e Patologia Molecolare – Univ. di Cagliari)

**Costo:** € 50.000

**Adottato totalmente da:** Philip Watch – Morellato & Sector Group



### **FFC #4/2010**

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

**Responsabile:** Alberto Luini (TIGEM, Napoli)

**Costo:** € 45.000

**Adottato totalmente da:** Lega Italiana FC - Associazione Siciliana - Onlus



### **FFC #5/2010**

#### **Ricerca di 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 (Gruppo di Sostegno FFC) (in ricordo di Silvia Sommavilla) (€ 10.000), Consorzio Promotre s.c.r.l. (€ 15.000), Antonio Guadagnin e Figlio di Montebelluna (€ 10.000), Alessandra Bocanera (€ 12.000)

### **FFC #7/2010**

#### **Proprietà strutturali delle componenti intracellulari della proteina CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator)**

**Responsabile:** Oscar Moran (Istituto di Biofisica, CNR, Genova)

**Costo:** € 90.000

**Adottato totalmente da:** Delegazione FFC di Cosenza 2 (€ 8.000), Work in Progress Communication "Sapore di Sale 2010" (€ 12.000), Gruppo di Sostegno FFC di Monterotondo (€ 13.000), Delegazione FFC di Genova (€ 10.000), Delegazione FFC Il Sorriso di Jenny (€ 8.000), LIFC Associazione Toscana Onlus con il Comitato Provinciale di Livorno (€ 8.000), Donatori Cartasi (31.000)



### **FFC #8/2010**

#### **Interazione fra attività di CFTR e infezione da Pseudomonas nelle cellule epiteliali respiratorie e ruolo della proteina NHERF1**

**Responsabile:** Anna Tamanini (Lab. Patologia Molecolare, Lab. Analisi Cliniche ed Ematologiche, Az. Ospedaliera Universitaria Integr., Verona)

**Costo:** € 30.000

**Adottato totalmente da:** Delegazione FFC "Bottega delle Donne" Montebelluna TV

### **FFC #9/2010**

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

**Responsabile:** Daniela Maria Cirillo (Emerging Bacterial Pathogens Unit, Div. of Immunology, Transplantation and Infectious Disease, Scientific Institute H. S. Raffaele, Milano)

**Costo:** € 70.000

**Adottato totalmente da:** Delegazione FFC di Milano (€ 52.000), Associazione "Gli Amici di Claudia" Onlus di Cirignola (€ 8.000), Delegazione FFC di Bergamo Villa d'Almè (€ 10.000)



### **FFC #10/2010**

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

**Responsabile:** Giuseppe Manco (Ist. Biochimica delle Proteine, CNR Napoli)

**Costo:** € 65.000

**Adottato totalmente da:** Audemars Piguet Italia (€ 15.000), Delegazione FFC di Vibo Valentia (€ 8.000), Delegazione FFC di Novara (in ricordo di Andrea e Annalisa) (€ 10.000), "Una sera con noi" con Kiwanis Club e Famiglia Papini di Prato (€ 32.000)



### **FFC #11/2010**

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

**Responsabile:** Antonio Molinaro (Dip. Chimica Organica e Biochimica, Università Napoli)

**Costo:** € 80.000

**Adottato totalmente da:** Pastificio Rana SpA





### FFC #12/2010

**Segnali intracellulari dell'infezione da *Pseudomonas aeruginosa* come bersaglio di nuovi farmaci**

**Responsabile:** Paolo Pinton (Dip. Medicina Sperimentale e Diagnostica, Univ. Ferrara)

**Costo:** € 60.000

**Adottato totalmente da:** Delegazione FFC di Bologna



### FFC #13/2010

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

**Responsabile:** Alessandra Polissi (Dip. Biotecnologie e Bioscienze, Università Milano Bicocca)

**Costo:** € 70.000

**Adottato totalmente da:** Donatori SMS solidale 2010 con il supporto di Vodafone, Tim, Telecom Italia, Wind, Italia "3"



### FFC #14/2010

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

**Responsabile:** Paolo Visca (Dipart. Biologia, Univ. Roma Tre, Roma)

**Costo:** € 50.000

**Adottato totalmente da:** Delegazione FFC di Vittoria Ragusa (€ 30.000), Delegazione FFC del Lago di Garda con i Gruppi di Sostegno di Chivasso, dell'Isola bergamasca e della Valpolicella VR (€ 20.000)



### FFC #15/2010

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

**Responsabile:** Andrea Battistoni (Dip. Biologia, Univ. di Roma Tor Vergata, Roma)

**Costo:** € 55.000

**Adottato totalmente da:** Delegazione FFC di Roma 2 con gli eventi Vorrei e Vinoforum 2010



Latteria Montello  
il piacere naturale



### FFC #16/2010

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

**Responsabile:** Maria Cristina Dechechchi (Lab. Patologia Molecolare, Lab. Chimica Clinica ed Ematologica, Az. Ospedaliera Universitaria Integr., Verona)

**Costo:** € 60.000

**Adottato totalmente da:** Assist Group Srl (€ 30.000), Latteria Montello SpA (€ 20.000), Delegazione FFC di Imola (€ 10.000)



### FFC #17/2010

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

**Responsabile:** Roberto Gambari (Dip. Biochimica e Biologia Molecolare, Univ. Ferrara)

**Costo:** € 60.000

**Adottato totalmente da:** Delegazione FFC di Torino



Tribute to Fashion

### FFC #18/2010

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

**Responsabile:** Cecilia Garlanda (Fondazione Humanitas per la Ricerca, Milano)

**Costo:** € 80.000

**Adottato totalmente da:** Coca Cola Light Tribute to Fashion



### FFC #19/2010

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

**Responsabile:** Paolo Montuschi (Dip. di Farmacologia, Facoltà Medicina, Univ. Sacro Cuore, Roma)

**Costo:** € 45.000

**Adottato totalmente da:** Comune di Cernobbio Festival Città di Cernobbio (€ 15.000), Delegazione FFC di Lecce (€ 15.000), LIFC Associazione Lucana Onlus (€ 15.000)

### FFC #20/2010

**Identificazione di nuovi potenziali agenti terapeutici per la fibrosi cistica ad attività multipla selettiva**

**Responsabile:** Annamaria Naggi (Ist. di Ricerche Chimiche e Biochimiche "G. Ronzoni", Milano)

**Costo:** € 45.000

**Adottato totalmente da:** Delegazione Lago di Garda con i GdS dell'Isola Bergamasca, di Chivasso e della Valpolicella

### FFC #21/2010

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

Coca Cola Light Tribute to Fashion

**Responsabile:** Luigina Romani (Dip. Medicina Sperimentale e Scienze Biomediche, Univ. Perugia)

**Costo:** € 80.000

**Adottato totalmente da:** Coca Cola Light Tribute to Fashion (€ 7.500), Francesca Guadagnin (€ 8.000), Delegazione FFC di Belluno (€ 64.500)

### FFC #22/2010

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

**Responsabile:** Mario Romano (Dip. Scienze Biomediche, Univ. Chieti-Pescara, Chieti)

**Costo:** € 60.000

**Adottato totalmente da:** LIFC Associazione Lucana Onlus



### FFC #23/2010

**Lo screening neonatale della fibrosi cistica in Italia. Indagine valutativa sugli aspetti tecnico-scientifici, organizzativi e psico-relazionali**

**Responsabile:** Teresa Repetto (A.O.U. "A. Meyer", Centro Regionale Toscano Fibrosi Cistica, Firenze)

**Costo:** € 35.000

**Adottato totalmente da:** I Familiari e Amici di Luisa Alghero (€ 12.000), Delegazione FFC di Latina (in ricordo di Alessandro Lombardi) (€ 23.000)

### FFC#1/2011

**Proprietà di Trimetilangelicina nel recupero di**

**DF508-CFTR**

**Responsabile:** Valeria Casavola (Dip. Fisiologia generale ed ambientale, Università di Bari)

**Costo:** € 90.000

**Adottato totalmente da:** Delegazione FFC di Vicenza

### FFC#2/2011

**Sintesi di derivati del PTC124 con capacità di correggere i codoni di stop prematuri presenti nel gene CFTR e di aumentarne la biodisponibilità**

**Responsabile:** Aldo Di Leonardo (Dip. Scienze e Bioteconomie Molecolari e Biomolecolari, Università di Palermo)

**Costo:** € 40.000

**Adottato totalmente da:** Delegazione FFC di Lecce (€ 20.000), Deleg. FFC di Vittoria Ragusa (€ 20.000)

### FFC#3/2011

**Alterazione di segnali generati dalla Protein Chinasi CK2 in cellule che esprimono ΔF508-CFTR. Aspetti funzionali e prospettive terapeutiche**



*Responsabile:* Lorenzo Pinna (Dip. Chimica Biologica, Università di Padova)

*Costo:* € 40.000

*Adottato totalmente da: Delegazione FFC della Valladige (€ 20.000), Associazione Trentina FC Onlus con la Fiaba "Il Villaggio di Natale" (in ricordo di Massimiliano e Sebastiano) (€ 20.000)*



### FFC#4/2011

**Ruolo della compartmentazione e dell'attività del sistema AMPc/PKA nella regolazione dell'espressione funzionale di CFTR**



*Responsabile:* Stephan Reshkin (Dip. Fisiologia generale ed ambientale, Università di Bari)

*Costo:* € 65.000

*Adottato totalmente da: Delegazione FFC di Avellino (€ 15.000), ParkingGo Oasi Srl (€ 10.000), Amici per la Ricerca 2011 Bassano e Loifur Srl (€ 30.000)*



*Adottabile per € 10.000*

### FFC#5/2011

**Studio Europeo sui geni modificatori in fibrosi cistica**

*Responsabile:* Harriet Corvol (Pediatric CF Center of Troussseau Hospital - Inserm U938 / UPMC, Paris, France)

*Costo:* € 100.000



*Adottato totalmente da: Fondazione Cassa di Risparmio di Verona*

### FFC#6/2011

**Studio del ruolo di mutazioni nel gene CFTR nel modulare l'espressione fenotipica della fibrosi cistica mediante analisi dell'mRNA**

*Responsabile:* Stefano Duga (Dip. Biologia e Genetica per le Scienze Mediche, Università di Milano)

*Costo:* € 50.000



*Adottato totalmente da: Fondazione Bruno Maria Zaini*

ATTIVITÀ SOCIALI



### FFC#7/2011

**Nuove strategie per applicazioni cliniche alla diagnosi prenatale non invasiva di fibrosi cistica: analisi di alleli fetal mutati nel plasma materno**

*Responsabile:* Maurizio Ferrari (Lab. Biologia Clinica Molecolare e Citogenetica, Università Vita-Salute HSR, Milano)

*Costo:* € 60.000

*Adottato totalmente da: Delegazione FFC di Milano*

### FFC#8/2011

**Analisi dello screening del portatore di fibrosi cistica su un ampio territorio**

*Responsabile:* Carlo Castellani (Centro Regionale FC, Azienda Ospedaliera Universitaria, Verona)

*Costo:* € 65.000

*Adottato totalmente da: Fondazione Veneto Banca onlus*



### FFC#9/2011

**Lo screening del portatore sano per la fibrosi cistica: la voce dei cittadini**

*Responsabile:* Paola Mosconi (Ist. Ricerche Farmacologiche Mario Negri, Lab. for Medical Research and Consumer Involvement)

*Costo:* € 35.000

*Adottato totalmente da: Delegazione FFC La Bottega delle Donne di Montebelluna*

### FFC#10/2011

**Sviluppo pre-clinico di Peptidomimetici attraverso la via inalatoria per il controllo delle infezioni da Pseudomonas aeruginosa in modelli murini**



*Responsabile:* Alessandra Bragonzi (Infection and Cystic Fibrosis Unit, Division of Immunology, Transplantation and Infectious Disease, San Raffaele Scientific Institut, Milano)

*Costo:* € 35.000

*Adottato totalmente da: Delegazione FFC di Milano*

### FFC#11/2011

**Infezioni da *Staphylococcus aureus* in pazienti con fibrosi cistica: disegno, sintesi e determinazione dell'attività antibatterica in vitro di nuovi beta-lattamici e molecole lineazolid-simili come nuovi potenziali agenti antibatterici**



*Responsabile:* Clementina Elvezia Cocuzza (Dip. Medicina Clinica e Prevenzione, Univ. Milano-Bicocca)

*Costo:* € 50.000



*Adottato totalmente da: Delegazione FFC della Catania (€ 25.000), Delegazione FFC Il Sorriso di Jenny (€ 8.000), Associazione Trentina FC Onlus (in ricordo di Sara Zini) (€ 17.000)*

### FFC#12/2011



**Nuovi antibiotici versus *Burkholderia cepacia* a partire da batteri antartici**



*Responsabile:* Renato Fani (Dip. Biologia dell'Evoluzione, Università di Firenze)



*Costo:* € 65.000



*Adottato totalmente da: Donatori SMS Solidale 2011*



**Poste mobile tiscali TELECOM ITALIA INFOSTRADA**



**coop.voce FASTWEB teletu**



### FFC#13/2011

**Identificazione e caratterizzazione di nuovi farmaci contro l'infezione cronica da *Pseudomonas aeruginosa***

*Responsabile:* Livia Leoni (Dip. Biologia, Università di Roma Tre, Lab. Microbiol. Molecolare e Biotec. Microrganismi)

*Costo:* € 40.000



*Adottato totalmente da: Delegazione FFC della Verbania V.C.O. (€ 10.000), Delegazione FFC della Valpolicella (€ 20.000), Antonio Guadagnin & Figlio (€ 10.000)*



### FFC#14/2011

**Sviluppo di nuovi peptidi e lipopeptidi attivi nel trattamento di patogeni polmonari: studi *in vitro* ed *in vivo***

*Responsabile:* Maria Luisa Mangoni (Dip. Scienze Biochimiche, Univ. "La Sapienza", Roma)

*Costo:* € 70.000



*Adottato totalmente da: Carla Silva Ubertalli (in ricordo di Marcella Ubertalli Ferrero) Ventimiglia (€ 50.000), Gruppo di Sostegno FFC di Seregno (€ 12.000), Delegazione FFC di Foggia (€ 8.000)*



### FFC#15/2011

**Sviluppo, produzione e caratterizzazione di peptidi antimicrobici (CAMPs) attivi sulla forma sessile dei patogeni opportunisti *Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia cenocepacia***

*Responsabile:* Eliodoro Pizzo (Dip. Biologia Strutturale e Funzionale, Università "Federico II", Napoli)

*Costo:* € 35.000



*Adottato totalmente da: Delegazione FFC di Imola*

### FFC#16/2011

*Achromobacter xylosoxidans*, patogeno emergente in pazienti affetti da Fibrosi Cistica: dalla caratterizzazione molecolare allo sviluppo di strategie terapeutiche basate sull' attività del batterio predatore *Bdellovibrio*

*Responsabile:* Serena Quattrucci (Dip. Pediatria e Neuropsichiatria Inf., Univ. "La Sapienza", Policlinico Umberto I, Centro fibrosi cistica, Roma)

*Costo:* € 40.000

Adottato totalmente da: *Delegazione FFC di Monte-rotundo Roma* (€ 10.000), *Delegazione FFC di Latina* (€ 20.000), *Gruppo di Sostegno FFC di Palermo* (€10.000)



### FFC#24/2011

**Sviluppo preclinico del peptide antimicrobico M33. Efficacia contro le infezioni polmonari da *Pseudomonas aeruginosa***

*Responsabile:* Alessandro Pini (Dipartimento di Biotecnologie, Università di Siena)

*Costo:* € 38.000

Adottato totalmente da: *Delegazione FFC di Legnago* (€ 15.000), *Delegazione FFC di Varese* (€ 10.000)

*Delegazione FFC di Reggio Emilia e Assist Group* (€ 13.000)



### FFC#17/2011

**Mediatori anti-infiammatori derivati dall'acido docosaezenoico nell'esalato condensato e nello sputo di adulti affetti da fibrosi cistica**

*Responsabile:* Marina Aiello (Dip. Scienze cliniche, Università di Parma)

*Costo:* € 45.000

Adottato totalmente da: *Delegazione FFC di Bologna*



### FFC#18/2011

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

*Responsabile:* Maria Lina Bernardini (Dip. Biologia e Biotecnologie, Università "La Sapienza", Roma)

*Costo:* € 90.000

Adottato totalmente da: *Delegazione FFC di Roma* 2



### FFC#19/2011

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

*Responsabile:* Giulio Cabrini (Dip. Patologia e Diagnostica, Università di Verona)

*Costo:* € 90.000

Adottato totalmente da: *Delegazione FFC di Belluno*



### FFC#20/2011

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

*Responsabile:* Cristina Cigana (Infection and Cystic Fibrosis Unit, Division of Immunology, Transplantation and Infectious Diseases, San Raffaele Scientific Institute, Milano)

*Costo:* € 75.000

Adottato totalmente da: *Delegazione FFC di Bergamo Villa d'Almè* (€ 12.000), *Amici della Ricerca di Milano* (€ 24.000), *Latteria Montello 70° compleanno nonno Armando* (€ 12.000), *Delegazione FFC di Sondrio Valchiavenna* (€ 10.000), *Delegazione FFC di Fermo* (€ 8.600), *Delegazione FFC di Cosenza* 2 (€ 8.000)



### FFC#21/2011

**Fosfodiesterasi tipo-4 (PDE4) come potenziale bersaglio farmacologico per ridurre l'infiltrazione neutrofilitica e il danno polmonare nella fibrosi cistica**

*Responsabile:* Virgilio Evangelista (Lab. di Biologia e Farmacologia Vascolare, Cons. Mario Negri Sud, Chieti)

*Costo:* € 90.000

Adottato totalmente da: *Philip Watch-Morellato & Sector Group*

### FFC#22/2011

**Modulazione del metabolismo di ceramide nella terapia della fibrosi cistica**

*Responsabile:* Riccardo Ghidoni (Lab. Biochimica e Biologia Molecolare, Dip. Medicina, Osp. S. Paolo, Università di Milano)

*Costo:* € 90.000

Adottato totalmente da: *Philip Watch-Morellato & Sector Group*

### FFC#23/2011

**Particelle respirabili modificate con poli(etilenimina) per la veicolazione di un oligonucleotide decoy contro il fattore di trascrizione nucleotide NF- $\kappa$ B: una nuova strategia per la terapia combinata della fibrosi cistica?**

*Responsabile:* Fabiana Quaglia (Dip. Chimica Farmacologica e Tossicologica, Università "Federico II", Napoli)

*Costo:* € 40.000

Adottato totalmente da: *Delegazione FFC del Lago di Garda con i GdS dell'Isola Bergamasca e di Chiavasso*



### FFC#25/2011

**DWI un nuovo strumento per valutare l'infiammazione nei pazienti con fibrosi cistica con esacerbazione respiratoria**

*Responsabile:* Giovanni Morana (Servizio Fibrosi Cistica, Ospedale Ca' Foncello, Treviso)

*Costo:* € 70.000

Adottato parzialmente da: *Paolo Isoni con Marta Marzotto* (€ 15.040), *Dedikato 2011* (€ 11.000), *Delegazione FFC di Lucca* (€ 10.000), *Maria Pia Papini* (€ 33.960)



### FFC#26/2011

**Valutazione funzionale dei monociti umani come nuovo strumento per la ricerca clinica e preclinica in fibrosi cistica**

*Responsabile:* Claudio Sorio (Dip. di Patologia e Diagnostica, Università di Verona)

*Costo:* € 70.000

Adottato totalmente da: *Donatori SMS Solidale 2011* (€50.000), *Delegazione FFC di Varese* (€ 10.000), *Associazione Trentina FC onlus* in collaborazione con *U.S. Villazzano Calcio* in ricordo di Bepo Foches (€ 10.000)



### FFC#1/2012

**L'approccio "read-through" (lettura completa del codice DNA) per il trattamento della fibrosi cistica causata da mutazioni stop**

*Responsabile:* Monica Borgatti (Dipartimento Biochimica e Biologia Molecolare Università di Ferrara)

*Costo:* € 80.000

*Riservato totalmente (adottante in attesa)*



**LOIFUR**



**Bazak**



#### FFC#2/2012

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

**Responsabile:** Luis Galletta (Lab. Genetica Molecolare, Ist. "G. Gaslini", Genova)

**Costo:** € 160.000

Adottato parzialmente da: **Campagna Donatori SMS 2012** (€ 40.000), **LIFC Associazione Lucana Onlus** (€ 30.000), **Bazak Cartasi** (€ 8.000), **Delegazione FFC di Cecina** (€ 10.000), **Loifur srl** (€ 10.000), **Amici per la Ricerca Bassano del Grappa 2012** (€ 20.000), **Delegazione FFC di Varese** (€ 17.000).

Adottabile per € 25.000



#### FFC#3/2012

**Studio del ruolo patogenetico e terapeutico del canale epiteliale del Na<sup>+</sup> (ENaC) nella Fibrosi Cistica tipica e atipica**

**Responsabile:** Marco Lucarelli (Dip. Biotecnologie cellulari ed Ematologia, Università "La Sapienza", Roma)

**Costo:** € 85.000

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Bologna** (€ 70.000), **Delegazione FFC di Ferrara** (€ 15.000)



#### FFC#4/2012

**Studio della struttura molecolare e conformazione della proteina CFTR**

**Responsabile:** Oscar Moran (Istituto di Biofisica CNR, Genova)

**Costo:** € 70.000

Riservato totalmente (adottante in attesa)

#### FFC#5/2012

**Modulazione delle modificazioni post-translazionali e dei sistemi di controllo di qualità come nuova strategia terapeutica per la fibrosi cistica**

**Responsabile:** Nicoletta Pedemonte (Lab. Genetica Molecolare, Ist. "G. Gaslini", Genova)

**Costo:** € 100.000

Riservato totalmente (adottante in attesa)



#### FFC#6/2012

**Correzione dei difetti di splicing del gene CFTR attraverso l'utilizzo di piccoli RNA nucleari**

**Responsabile:** Franco Pagani (ICGEB, Trieste)

**Costo:** € 70.000

Adottato parzialmente da: **Delegazione FFC di Legnago** (€ 8.000), **Gruppo di Sostegno Rita Verona** (€ 8.000), **Gruppo di Sostegno FFC di Riola Sardo** in ricordo di Marco (€ 10.000)

Adottabile per € 44.000



#### FFC#7/2012

**Metalloproteasi rilasciate da ceppi clinici di Pseudomonas aeruginosa quali fattori di virulenza in FC: correlazioni cliniche e modulatori chimici**

**Responsabile:** Gabriella Bergamini (Dip. Patologia e Diagnostica, Sez. Patologia Generale, Università di Verona)

**Costo:** € 18.000

Adottato totalmente da: **Associazione culturale "A Filo d'Arte"** Bovolone Verona

#### FFC#8/2012

**Indagine sul microbioma delle vie aeree nei pazienti con fibrosi cistica che presentano un severo declino della funzione polmonare e non rispondono alla terapia convenzionale antimicrobica**

**Responsabile:** Annamaria Bevvino (Unità per lo Sviluppo Sostenibile e Innovazione Sistema Agro-Industriale, ENEA, Roma)

**Costo:** € 60.000

Adottabile

#### FFC#9/2012

**Sviluppo, produzione e caratterizzazione di peptidi antimicrobici (CAMPs) attivi sulla forma sessile dei patogeni opportunisti Pseudomonas aeruginosa e Burkholderia cenocepacia**

**Responsabile:** Eliodoro Pizzo (Dip. Biologia Strutturale e Funzionale, Lab. Struttura e Funzione delle Proteine, Università "Federico II", Napoli)

**Costo:** € 30.000

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC La Bottega delle Donne** di Montebelluna



#### FFC#10/2012

**Studio di un farmaco molto promettente contro Burkholderia cenocepacia**

**Responsabile:** Giovanna Riccardi (Dip. di Biologia e Biotecnologie, Università di Pavia)

**Costo:** € 50.000

Adottato totalmente da: **Associazione Trentina FC Onlus** in ricordo di Zaira Tutino (€ 10.000), **Gruppo di Sostegno FFC di Palermo** in ricordo di Elisa Pepe (€ 30.000), **Delegazione FFC di Imola** (€ 10.000)



#### FFC#11/2012

**Sviluppo di peptidi anti-infettivi ottimizzati e sperimentazione di un nuovo sistema di somministrazione di farmaci per la terapia delle infezioni respiratorie**

**Responsabile:** Marco Scocchi (Dip. Scienze della Vita, Università degli studi di Trieste)

**Costo:** € 50.000

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC del Lago di Garda**



#### FFC#12/2012

**Antimicrobici di origine naturale per combattere le infezioni polmonari in pazienti affetti da fibrosi cistica: peptide ibridi Cecropina A-Melittina and polimixine**

**Responsabile:** Alba Silipo (Dip. Scienze Chimiche, Università "Federico II", Napoli)

**Costo:** € 60.000

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Novara** (€ 15.000), **Delegazione FFC di Latina** (€ 15.000), **Delegazione FFC di Imola** (€ 10.000), **Delegazione FFC di Pesaro** (€ 10.000), **Associazione Trentina FC Onlus** in ricordo di Renato Vallorzi (€ 10.000)



#### FFC#13/2012

**Ruolo dei trasportatori di zinco ad alta affinità nella capacità di Pseudomonas aeruginosa di colonizzare il polmone infiammato tipico della fibrosi cistica**

**Responsabile:** Andrea Battistoni (Dip. Biologia, Università Tor Vergata, Roma)

**Costo:** € 75.000

Adottato parzialmente da: **Delegazione FFC di Legnago** (€ 8.000), **Delegazione FFC di Monterotondo Roma** (€ 13.000), **Delegazione FFC di Sondrio Valchiavenna** (€ 10.000), **Delegazione FFC di Verona** (€ 20.000), **Delegazione FFC di Alba Cuneo** (€ 10.000).



Adottabile per € 14.000

#### FFC#14/2012

**Relazione struttura-attività(SAR) di nuovi glicocoo-**  
**nugati, derivati da deoxynojirimicina che agiscono**  
**sul metabolismo degli sfingolipidi, come possibili**  
**farmaci per la malattia polmonare in fibrosi cistica**

**Responsabile:** Maria Cristina Dechechchi (Lab. Patologica Molecolare, Laboratorio Analisi AOUI, Verona)  
**Costo:** € 120.000

**Riservato totalmente a: *Donatori visitatori della mostra "Picasso, capolavori dal Museo Nazionale Picasso di Parigi"***

#### FFC#15/2012

**L'eme-ossigenasi 1(HO-1) come modulatore della patologia polmonare associata alla fibrosi cistica**

**Responsabile:** Valeria Raia (Dipartimento di Pediatria, Università "Federico II", Napoli)  
**Costo:** € 110.000

**Adottato parzialmente da: *Delegazione FFC di Sovrato* in ricordo di Elena (€ 8.000), *Delegazione FFC di Torino* (€ 50.000).**

**Adottabile per € 52.000**



#### FFC#18/2012

**Malattia epatica associata alla fibrosi cistica: ruolo di CFTR come regolatore dell'immunità innata nell'epitelio**

**Responsabile:** Mario Strazzabosco (Dip. Medicina Clinica e Prevenzione, Università Milano-Bicocca, Milano)

**Costo:** € 70.000

**Adottabile**

#### FFC#19/2012

**Fattori di rischio per esiti sfavorevoli nei neonati FC diagnosticati tramite lo screening neonatale in Italia (anni 2009 -2011)**

**Responsabile:** Teresa Repetto (Centro Regionale Fibrosi Cistica, AOU "A. Meyer", Firenze)  
**Costo:** € 50.000

**Adottato parzialmente da: *Gruppo di Sostegno FFC di Seregno* (€ 15.000), *Antonio Guadagnin e Figlio Srl* (€ 8.000).**

**Adottabile per € 27.000**



#### FFC#16/2012

**Il ruolo patogenetico dell'ipossia/RAGE nell'infiammazione, suscettibilità a infezioni e risposta alla chemioterapia antibiotica nella fibrosi cistica e studio preclinico di efficacia di farmaci antagonisti specifici dell'asse ipossia/RAGE**

**Responsabile:** Luigina Romani (Dip. Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche, Università di Perugia)  
**Costo:** € 70.000

**Adottabile**

#### FFC#17/2012

**Il ruolo dell'endotelio vascolare nell'infiammazione della fibrosi cistica**

**Responsabile:** Mario Romano (Dip. Scienze Biomediche, Università Chieti-Pescara, Lab. Med. Molecolare)  
**Costo:** € 70.000

**Adottabile**

#### FFC#20/2012

**Eradicazione dell'infezione precoce da *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA) in fibrosi cistica: uno studio randomizzato multicentrico**

**Responsabile:** Giovanni Taccetti (Centro Regionale Fibrosi Cistica, AOU "A. Meyer", Firenze)  
**Costo:** € 70.000

**Adottato totalmente da: *Delegazione FFC di Vittoria Ragusa Catania 2* (€ 35.000), *Delegazione FFC di Messina* (€ 10.000), *Delegazione FFC di Cecina* (€ 10.000), *Delegazione FFC di Lecce* (€ 15.000)**



## Progetti per servizi alla Ricerca (Facilities) 2012-2014

### Servizio "CFaCore" (Cystic Fibrosis Animal Core Facility)

**Responsabile:** Alessandra Bragonzi (Istituto di Ricerca San Raffaele, Milano)  
**Costo:** € 512.000  
**Adottato parzialmente da: *Patrizio Pignato lascito testamentario* (€ 50.000).**  
**Adottabile per € 462.000**



### Servizio "QuantiGENE" (Quantificazione dell'espressione genica)

**Responsabile:** Giulio Cabrini (Laboratorio Patologia Molecolare, Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata, Verona)  
**Costo:** € 30.000  
**Adottato totalmente da: *Delegazione FFC della Valpolicella Verona***

### CFDB Cystic Fibrosis Data Base

**Responsabile:** Roberto Buzzetti (Fondazione Ricerca FC)  
**Costo:** € 50.000

### Servizio "Colture Primarie"

**Responsabile:** Luis Galletta (Laboratorio Genetica Molecolare, Istituto "G. Gaslini", Genova)  
**Costo:** € 210.000  
**Adottato totalmente da: *Omnia Media Srl con Formula Run Cup 2011* (€ 15.000), *Sapore di Sale 2011* (€ 13.000), *Cinzia Scambi* (€ 8.000), *Donatori iniziativa di Natale* (€ 9.605), *Philip Watch-Morellato & Sector Group* (€ 40.000), *LIFC Associazione Abruzzo Onlus e Associazione "Sport per la Vita"* Roseto degli Abruzzi (€ 13.000), *LIFC Associazione Siciliana Onlus* (€ 30.000), *Sorgente in Lavoro SpA* (€ 10.000), *Sant Luis Calzature Srl* (€ 20.000), *Delegazione FFC di Lucca* (€ 14.465), *Gruppo di Sostegno FFC di Palermo* (€ 10.000), *Delegazione FFC di Genova* (€ 26.930).**





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*

Direttore Scientifico: Gianni Mastella  
Tel. 045 8123567  
e-mail: gianni.mastella@ospedaleuniverona.it

*Comitato di Consulenza Scientifica*

Presidente: Lucio Luzzatto  
Consulenti: Giorgio Berton  
Paola Bruni  
Roberto Buzzetti  
Gerd Döring

*Per donazioni:*

- SWIFT-BIC code (per pagamenti dall'estero)  
UNCRITM1N58
- Bonifico Unicredit Banca:  
IBAN IT 47 A 02008 11718 000102065518
- Bonifico Banco Popolare di Verona:  
IBAN IT 92 H 05034 11708 000000048829
- On-line sul sito: [www.fibrosicisticaricerca.it](http://www.fibrosicisticaricerca.it)
- 5 x mille dell'IRPEF

*Redazione:*

Gianni Mastella, Graziella Borgo,  
Tecla Zarantonello, Federica Lavarini

*Grafica ed impaginazione:*

Ada Frapporti

*Stampa:*

Tipolitografia Artigiana snc  
San Giovanni Lupatoto (VR)  
Stampato il 20 novembre 2012

Le donazioni sono deducibili fino al 10% del reddito complessivo  
e comunque non oltre 70.000 euro/anno (art. 14 legge n. 80/2005)

[www.fibrosicisticaricerca.it](http://www.fibrosicisticaricerca.it)



Certificazione IID 2008/10  
Aderiamo agli standard  
della Carta della Donazione



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

*In collaborazione con*



Azienda Ospedaliera  
Universitaria Integrata  
Verona



## CFTR PROTEIN

