

XII CONVENTION D'AUTUNNO DEI RICERCATORI IN FIBROSI CISTICA

Convention of Investigators in Cystic Fibrosis

Garda - Verona, 27-29 Novembre 2014



Fondazione Ricerca
Fibrosi Cistica - Onlus
italian cystic fibrosis research foundation

In copertina/*Front cover*

Neutrofili in escreato FC

(per gentile concessione di Alessandro Corti, Dipartimento di Ricerca Traslazionale e delle Nuove Tecnologie in Medicina e Chirurgia, Università di Pisa)

In un campione di escreato FC, opportunamente colorato su vetrino, una cellula epiteliale (al centro, più chiara) circondata da numerosi granulociti neutrofili (più piccoli, di colore arancio). L'intensa colorazione arancio dei neutrofili è dovuta alla presenza di enzima gamma-glutamiltransferasi, che essi possiedono in granuli e sono capaci di rilasciare all'esterno (zone a colorazione diffusa).

Neutrophils in CF sputum

(by courtesy of Alessandro Corti, Department of Translational Research and New Technologies in Medicine and Surgery - University of Pisa)

In a sample of CF sputum smeared and stained on a slide, an epithelial cell (center, larger) surrounded by several neutrophilic granulocytes (smaller cells, orange colour). The intense orange colour of neutrophils is given by gamma-glutamyltransferase enzyme activity, which they possess in the form of intracellular granules and can be released in the extracellular space (areas of diffuse stain).

XII Italian Convention of Investigators in Cystic Fibrosis

XII Convention d'Autunno dei Ricercatori in Fibrosi Cistica

Poiano Hotel Resort
Via Poiano, Garda-Verona

November 27-29, 2014

Work progress of projects funded by FFC (2012-2014)

Presentazione dello stato di avanzamento dei progetti
finanziati dalla Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica
(2012-2014)

Innovative anti-microbial therapy



New targets to control lung inflammation



Strategies to correct the chloride transport in CF



Disease models for CF research



**Fondazione Ricerca
Fibrosi Cistica - Onlus**

italian cystic fibrosis research foundation

Program at a glance

Thursday, November 27

- 10:00-13:00 **Registration and Poster set-up**
10:30-13:00 **Satellite meetings**
- Primary cell cultures
- Murine model service
13:00-14:00 *Lunch*
14:00-14:15 *Introduction & greetings*
14:15-16:00 Plenary Session 1: Innovative anti-microbial therapy
16:00-16:30 *Coffe break*
16:30-18:00 Plenary Session 2: New targets to control lung inflammation
18:00-19:00 **Extra session: New horizons for FFC funded projects**

Friday, November 28

- 08:40-10:40 **Plenary Session 3: Genetics and Clinical topics**
10:40-11:10 *Coffee break*
11:10-13:00 **Poster Session 1: Rescuing CFTR function. Proposals for clinical research**
11:10-13:00 **Poster Session 2: Journey across CF inflammation**
13:00-14:00 *Lunch*
14:00-15:50 **Plenary Session 4: Strategies to correct the chloride transport in CF**
15:50-16:20 *Coffee break*
16:30-17:40 **Plenary Session 5: Disease models for CF research**
17:40-19:00 **Poster Session 3: Infection and new antimicrobial perspectives**
20:00-23:00 *Dinner and entertainment (at Hotel Poiano)*

Saturday, November 29

- 09:00-10:40 **Plenary Session 6: Alternative methods of correcting the basic defect and monitoring the CFTR function**
10:40-11:00 *Coffee break*
11:00-12.40 **Plenary Session 7: Alternative methods of controlling inflammation in cystic fibrosis**
12.40 **Final remarks and closing-up of the Convention**

Index • Indice

Thursday November 27 - Afternoon

14:00-16:00

PLENARY SESSION 1: *Innovative anti-microbial therapy*

Chairman: **Rossolini GM** - Co-chairman: **Bragonzi A**

- | | |
|---|----|
| 1. Riccardi G, Fani R | 9 |
| A very promising drug against <i>Burkholderia cenocepacia</i> (FFC project#10/2012, Completed) | |
| 2. Briani F | 9 |
| Exploring pyrazinamide derivatives as novel <i>Pseudomonas aeruginosa</i> inhibitors: unexploited antibacterial molecules for a new antibiotics target (FFC Project#8/2013, Completed) | |
| 3. Cocuzza C, Cariani L, Giacomini D | 10 |
| Drug development of new beta-lactam and linezolid-like compounds active against <i>Staphylococcus aureus</i> isolated from cystic fibrosis patients: in vitro and in vivo biological evaluation (FFC Project#9/2013, Completed) | |
| 4. Notomista E, Ungaro F | 11 |
| Inhalable dry powders for chemically-modified human Cationic Antimicrobial Peptides (CAMPs): moving toward in vivo application (FFC Project#11/2013, Completed) | |
| Pini A | |
| Preclinical development of the antimicrobial peptide M33 and onset of regulatory procedures for clinical trials (FFC Project#12/2013, Ongoing, Poster 52) | |

16:30-18:00

PLENARY SESSION 2: *New targets to control lung inflammation*

Chairman: **Bertoni G** Co-chairman: **Romano M**

- | | |
|---|----|
| 5. Battistoni A | 12 |
| Role of high affinity zinc transporters in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ability to colonize the inflamed cystic fibrosis lung (FFC Project#13/2012, Completed) | |
| 6. Dehecchini MC, Becq F | 13 |
| Structure-activity relationships (SAR) of neoglycoconjugates derived from deoxynojirimycin as possible therapeutic agents for Cystic Fibrosis lung disease, by modulating the metabolism of sphingolipids CF (FFC Project#14/2012, Completed) | |
| Signorelli P, Borghi E, Iannitti RG, Sozzani S | |
| Sphingolipid targeting in inflammation and fungal infection (FFC Project#20/2013, Ongoing, Poster 39) | |
| 7. Raia V, Bruscia E, Maiuri L | 14 |
| The Heme-oxygenase 1 (HO-1) as modulator of Cystic Fibrosis lung disease (FFC Project#15/2012, Completed) | |
| 8. De Stefano D, Carnuccio R | 15 |
| Lipoic acid as a proteostasis regulator for the control of inflammation in cystic fibrosis (FFC Project#15/2013, Completed) | |

18:00-19:00

EXTRA SESSION: *New horizons for FFC funded projects*

- | | |
|--|----|
| Cecchi C (Zebra Ventures srl, Milano) | 16 |
| New horizons for FFC funded projects: collaborations between research centres and industries. The Industrial Liaison Office (ILO), a new service for FFC-funded scientists | |

Friday November 29 - Morning

08:40-10:00

PLENARY SESSION 3A: *Genetics*

Chairman: Castaldo G

- | | |
|---|----|
| 9. Castellani C, Picci L | 16 |
| A field study in an area of extensive carrier screening for cystic fibrosis (FFC Project#8/2011, Completed) | |
| Mosconi P, Castellani C | |
| Citizens' jury and decision making on cystic fibrosis carrier screening: to screen or not to screen? (FFCProject#22/2013, Ongoing, Poster 28) | |
| 10. Corvol H, Cabrini G | 17 |
| European Cystic Fibrosis Modifier Gene Study (FFC Project#5/2011, Completed) | |
| Castaldo G | |
| Nasal epithelial cells as a novel diagnostic approach for cystic fibrosis and CFTR related-disorders | |

PLENARY SESSION 3B: Clinical topics

Chairman: Buzzetti R

- 11. Taccetti G, Costantini D, Lucidi V, Collura M, Magazzù G, Raia V** 18
 Early antibiotic treatment for MRSA eradication in cystic fibrosis patients: a randomised multicentre study
 (FFC Project#20/2012, Completed)
- 12. Tiddens H, Assael BM** 18
 The impact of chest computed tomography on clinical management of CF lung disease (FFC Project#23/2013, Completed)

11:10-12:20

POSTER SESSION 1: Rescuing CFTR functionality

Chairman: Galietta L

- 13. Casavola.....** 20
 Mechanism of action of trimethylangelicin in rescuing F508del CFTR functional expression (FFC Project#1/2013, Ongoing)
- 14. Gambari R, Chilin A.....** 20
 Design and synthesis of improved analogs of trimethylangelicin (TMA) for personalized treatment of cystic fibrosis.
 (FFC Project#8/2014, New)
- 15. Mazzei M, Fossa P, Pascale M** 21
 ΔF508-CFTR correctors deriving from computational design and from safe natural compounds for a prompt clinical application (FFC Project#3/2013, Ongoing)
- 16. Luini A** 22
 A systems biology approach to the correction of Cystic Fibrosis: from building a network of proteostasis regulatory pathways to combinatorial targeting. (A rational approach to develop novel drugs for the treatment of Cystic Fibrosis)
 (FFC Project#2/2014, New)
- 17. Rusnati M, Fossa P** 23
 Development of novel methodologies for the identification of CFTR-targeted drugs: a multidisciplinary approach using Real Time Surface Plasmon Resonance interaction assay supported by bioinformatics strategies on HPC infrastructures.
 (FFC Project#6/2014, New)
- 18. Venerando A, Villella VR** 24
 A kinase-directed approach to rescue functionality of F508del CFTR. (FFC Project#7/2014, New)
- 19. Lentini L, Pibiri I** 25
 Identification and validation of novel molecules obtained by integrated computational and experimental approaches for the read-through of PTCs in CF cells. (FFC Project#1/2014, New)

The following posters will be discussed in plenary sessions (Ps 4: Moran & Galietta. Ps 6: Pagani & Melotti)

- 20. Moran O** 26
 The molecular structure and the folding of the whole Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR):
 Correctors sites. (FFC Project#4/2014, New)
- 21. Pagani F** 26
 An RNA based approach based on ExSpeU1 for correction of CFTR splicing defects: analysis of efficacy in primary bronchial cells. (FFC Project#5/2014, Extension)
- 22. Melotti P, De Jonge H** 27
 Testing CFTR in epithelial organoids for drug development and diagnosis of cystic fibrosis. (FFC Project#3/2014, Extension)
- 23. Galietta L, Bandiera T** 28
 Task force for CF 2014: drug discovery for correctors and potentiators of F508del-CFTR (Ongoing)

12:20-13:00

Proposal for clinical research and surrounding

Chairman: Buzzetti R

- 24. Battezzati A, Colombo C, Mari A** 28
 Clinical implications of the natural history of insulin secretory and sensitivity defects in cystic fibrosis (FFC Project#21/2013, Ongoing)
- 25. Zegarra OA, Vassalli M** 29
 Properties of airway mucus in cystic fibrosis: their modification by changes in the activity of CFTR and after application of bicarbonate. (FFC Project#29/2014, New)
- 26. Zaza G** 30
 In vitro study of potential pro-fibrotic effect of Everolimus in different human airway cell lines. Searching for new biomarkers to optimize MTOR-inhibitor immunosuppressive treatment of cystic fibrosis patients undergoing lung transplantation.
 (FFC Project#28/2014, New)

The following posters will be discussed in plenary session 3

27. Castaldo G	31
Nasal epithelial cells as a novel diagnostic approach for cystic fibrosis and CFTR related-disorders (FFCProject#7/2013, In progress)	
28. Mosconi P, Castellani C	32
Citizens' jury and decision making on cystic fibrosis carrier screening: to screen or not to screen? (FFCProject#22/2013, In progress)	

11:10-13:00

POSTER SESSION 2: *Journey across CF inflammation*

Chairman: Berton G

29. Evangelista V	33
Phosphodiesterases type-4 (PDE4) inhibitors and β 2-adrenergic agonists to reduce neutrophilic lung inflammation in cystic fibrosis. Preclinical studies and identification of biomarkers of efficacy (FFC Project#16/2013, Ongoing)	
30. Lleò MM	33
Development of a CF, IL-8/NF-KB transgenic mouse model for the in vivo long-term monitoring of the inflammatory response induced by bacteria treated or not with azithromycin (FFC Project#18/2013, Ongoing)	
31. Cabrini G, Nassini R	34
TRPA1 channels as novel molecular targets for anti-inflammatory therapies in CF lung (FFC Project#17/2014, New)	
32. Corti A	35
GSH inhalation therapies in CF: how useful, how safe? Set-up of a CF murine model for monitoring of inflammation in vivo and assessment of convenient alternatives. (FFC Project#18/2014, New)	
33. Pinton P	36
Mitochondrial Ca ²⁺ -dependent inflammasome activation exacerbates the <i>P. aeruginosa</i> -driven inflammatory response (FFC Project#19/2014, New)	
34. Pizzo E, Pedone EM	37
Identification and characterization of LPS-neutralizing human peptides: potential tools to control inflammation in cystic fibrosis lung disease (FFC Project#20/2014, New)	
35. Recchiuti A	38
Resolvin D1 for Targeting Chronic Lung Inflammation and Infection in Cystic Fibrosis (FFC Project#21/2014, New)	
36. Hirsch E, Laudanna C	38
Targeting PI3K γ scaffold function to activate airway CFTR, limit lung inflammation and promote bronchorelaxation in cystic fibrosis (FFC Project#25/2014, New)	
37. Sonnino S	39
The role of Glucocerebrosidase GBA2 in cystic fibrosis lung inflammation: from molecular mechanism to therapeutic strategies (FFC Project#24/2014, New)	
38. Pilette C, Derose V	40
Impaired secretory IgA and mucosal immunity in cystic fibrosis: contribution to lung pathology and impaired defence against bacterial infection, and role of CFTR-related epithelial changes in the regulation of the receptor-mediated IgA transcytosis. (FFC Project#26/2014, New)	
39. Signorelli P, Borghi E, Iannitti RG, Sozzani S	41
Sphingolipid targeting in inflammation and fungal infection (FFC Project#20/2013, Ongoing)	

The following posters will be discussed in plenary session 7

40. Romani L	42
Targeting pathogenic pathways leading to inflammatory Th17 responses in cystic fibrosis: from drug discovery to preclinical validation. (FFC Project#22/2014, New)	
41. Romano M, Totani L, Marchisio M	43
Mechanisms and clinical implications of endothelial dysfunction in cystic fibrosis. (FFC Project#23/2014, New)	
42. Berlutti F	44
Lactoferrin-loaded niosomes in reducing inflammation and infection of cystic fibrosis airways. (FFC Project#16/2014, New)	

Friday November 28 – Afternoon

14:00-15:50

PLENARY SESSION 4: Strategies to correct the chloride transport in CF**Chairman: Luzzato L Co-chairman: Casavola V***Short introduction*

43. Galietta L, Millo E	45
Development of novel strategies to correct the chloride transport defect in cystic fibrosis (FFC Project#2/2012, Completed)	
Galietta L	
Task Force for CF: drug discovery for correctors and potentiators of F508del-CFTR (Ongoing, Poster 23)	
44. Pedemonte N	45
Modulation of post-translational modification and quality control system as a novel therapeutic strategy for Cystic Fibrosis (FFC Project#5/2012, Completed)	
45. Moran O	46
The molecular structure and the folding of the whole Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) (FFC Project#4/2012, Completed – FFC Project#4/2014, Extension, Poster 20)	
46. Borgatti M, Altamura N	47
The read-through approach for the treatment of cystic fibrosis caused by premature termination codons (FFC Project#1/2012, Completed)	
47. Lucarelli M, Bombieri C, Conese M	48
Study of the pathogenetic and therapeutic role of the Epithelial Na ⁺ channel (ENaC) in CF and CF-like disease (FFC Project#3/2012, Completed)	

16:20-17:40

PLENARY SESSION 5: Disease models for CF research**Chairman: Luzzato L****De Jonge HR:** A critical overview of the current CF models (Lecture)*Short reports***Galietta L:** Highlights from the meeting on primary cell cultures**Bragonzi A:** Highlights from the meeting on murine model

17:40-19:00

POSTER SESSION 3: Infection and new antimicrobial perspectives**Chairman: Taccetti G**

48. Cigana C, Naggi A, Colombo C	50
Pathophysiological relevance of glycosaminoglycans in Pseudomonas aeruginosa chronic lung infections and validation of new therapeutic approaches to modulate inflammation and tissue remodeling (FFC Project#14/2013, Ongoing)	
49. Bragonzi A, Iraqi F	50
Cystic fibrosis modifier genes related to Pseudomonas aeruginosa lung disease. (FFC Project#9/2014, New)	
50. Leoni L, Ungaro F, Imperi F, Fiscarelli E	51
Anti-virulence therapy against Pseudomonas aeruginosa: identification of antibiofilm drugs and development of inhalable Niclosamide and Flucytosine formulations (FFC Project#10/2013, Ongoing)	
51. Bevvino A, Mengoni A, Taccetti G, Fiscarelli E, De Alessandri A	52
Investigating the airway microbiome in cystic fibrosis patients with a severe decline in lung function: an opportunity for a personalized microbiomebased therapy (FFC Project#10/2014, New)	
52. Pini A	53
Preclinical development of the antimicrobial peptide M33 and onset of regulatory procedures for clinical trials (FFC Project#12/2013, Ongoing)	
53. Mangoni ML	54
Development and preclinical testing of a novel antimicrobial peptide to treat Pseudomonas aeruginosa-induced lung infections (FFC Project#11/2014, New)	
54. Scocchi M	55
Development of BMAP18 as a peptide drug in the lung bacterial infections: a study to improve its effectiveness in the CF pulmonary environment. (FFC Project#14/2014, New)	
55. Notomista E, Ungaro F	55
Inhalable dry powders for chemically-modified human Cationic AntiMicrobial Peptides (CAMPs): moving toward in vivo application (FFC Project#12/2014, New)	
56. Pacello F	56
Targeting extracellular Protein Disulphide Isomerase to control Burkholderia cenocepacia lung infections (FFC Project#13/2014, New)	

57. Garlanda C	57
Infections in cystic fibrosis patients: effect of PTX3 genetic variants on endogenous PTX3 production and function (FFC Project#15/2014, New)		
58. Tortoli E, Cariani L, Di Serio C, Nieman S	58
Transmissibility and clinical significance of Mycobacterium abscessus in patients with cystic fibrosis (FFC Project#27/2014, New)		

Saturday November 29 Morning

09:00-10:40

PLENARY SESSION 6: *Alternative methods of correcting the basic defect and monitoring CFTR function*

Chairman: Galietta L Co-chairman: Luini A

Short introduction

59. Pagani F	59
CFTR splicing correction mediated by Exon-Specific U1 small nuclear RNAs (ExSpe U1) (FFC Project#6/2012, Completed. FFCProject#5/2014, Extension, Poster 21)		
60. Loi R	59
An induced pluripotent stem cell (iPS)-based approach for the repopulation and phenotypic correction of cystic fibrosis airway epithelium (FFC Project#2/2013, Completed)		
61. Messina G	60
Vessel associated progenitor cells as a promising cell-based approach to treat cystic fibrosis disease (FFC Project#5/2013, Completed)		
62. Melotti P, De Jonge H	61
CFTR in epithelial organoids: relevance for drug development and diagnosis of cystic fibrosis (FFC Project#4/2013, Completed. FFCProjec#3/2014, Extension, Poster 22)		
63. Sorio C, Averna M, Buffelli MR	62
Establishment of a semi-automated evaluation of CFTR function in blood cells for clinical applications (FFC Project#6/2013, Completed)		

11:00-12:40

PLENARY SESSION 7: *Alternative methods of controlling inflammation in cystic fibrosis*

Chairman: Bruni P

Short introduction

64. Romani L	63
Targeting pathogenic pathways leading to inflammatory Th17 responses in cystic fibrosis: a drug discovery approach (FFC Project#16/2012, Completed. FFCProject#22/2014, Extension, Poster 40)		
65. Romano M, Totani L	64
The role of vascular endothelium in cystic fibrosis inflammation (FFC Project #19/2013, Completed. FFCProject#23/2014, Extension, Poster#41)		
66. Strazzabosco M	64
Cystic Fibrosis liver disease: the role of CFTR as regulator of epithelial innate immunity (FFC Project#18/2012, Completed)		
67. Berluttì F	65
Lactoferrin-loaded niosomes in reducing inflammation and infection of cystic fibrosis airway epithelium (FFC Project#13/2013, Completed – FFCProject#16/2014, Extension, Poster#42)		
68. Fraziano M, Nisini R, Sanguinetti M	66
Preclinical study of a novel aerosol immunotherapeutic approach based on Janus-faced liposomes to enhance innate antimicrobial immunity (FFC Project#17/2013, Completed)		

APPENDICES

1. Publications & Congress Communicatons	68
2. Analysis of publications from FFC projects	98
3. FFC Network for CF Research	99
4. International Reviewers of FFC projects	102
5. Research Funding by FFC	104
6. FFC projects (2012-2014) adopted by supporters	105

ABSTRACTS

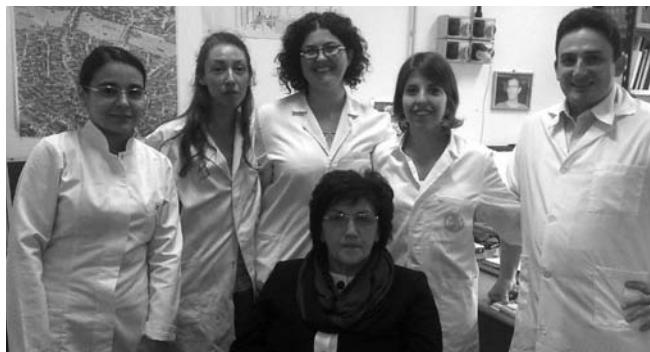
PLENARY SESSION 1

Innovative anti-microbial therapy

1. A very promising drug against *Burkholderia cenocepacia*

Riccardi G

Dept. Biology & Biotechnology, University of Pavia
(FFC project#10/2012, Completed)



Giovanna Riccardi, seduta al centro, con il team di ricerca

Background A huge emergence for cystic fibrosis patients is the establishment of chronic infections of the respiratory tract due to opportunistic pathogens. Among these pathogens, *Burkholderia cenocepacia* is largely involved in severe lung infections, so it is urgent to find new therapeutic agents and innovative targets to fight these bacteria.

Hypothesis and objectives In order to find new drugs effective against *B. cenocepacia*, we performed a screening of different chemical compounds. Among these, we have found a very active pyridine compound and we identified the resistance mechanism which relies on its extrusion by the efflux pump RND-4. Our objectives are: target identification of pyridine derivatives; to obtain structural information of RND-4 efflux system; the characterization of the role of RND transporters; the screening of other chemical libraries.

On the other side it is important to find new drug targets and we chose to characterize quorum sensing (QS) synthases, which are involved in the virulence.

Essential methods We took advantage of molecular cloning, minimal inhibitory concentration evaluation, gene inactivation, qRT-PCR, protein purification, enzymatic assay setup, crystal screening.

Results We identified two resistance mechanisms which relies on RND-4 and RND-9 efflux systems over-expression and elucidated the role of the other RND efflux transporters in protecting *B. cenocepacia* planktonic and sessile cells when exposed to different drugs. We screened a lot of molecules and we found another active compound effective against *B. cenocepacia*. We are also characterizing QS synthases and we found an inhibitor of CepI. We also obtained the crystal structure of BCAM0581.

Spin-off for research & clinical purposes Drug design studies based on the structural data. Search of new drugs suitable for clinical trials.

Un farmaco molto promettente contro *Burkholderia cenocepacia*

Ragioni dello studio Uno dei principali problemi che af-

fligono i pazienti affetti da Fibrosi Cistica sono le infezioni croniche del tratto respiratorio dovute a patogeni opportunisti. Tra questi patogeni *Burkholderia cenocepacia* è coinvolta nelle infezioni polmonari più gravi, quindi è particolarmente urgente trovare nuovi farmaci e nuovi bersagli terapeutici per combattere questi batteri.

Ipotesi e obiettivi Per trovare nuovi farmaci attivi contro *B. cenocepacia* abbiamo testato diversi composti chimici. Tra questi abbiamo trovato un derivato piridinico molto attivo e abbiamo identificato un meccanismo di resistenza basato sull'efflusso all'esterno della cellula batterica mediato dal trasportatore RND-4. I nostri obiettivi sono: l'identificazione del bersaglio del derivato piridinico; ottenere informazioni strutturali sul trasportatore RND-4; caratterizzare il ruolo dei trasportatori RND; testare altre librerie chimiche.

D'altra parte è importante trovare anche nuovi bersagli terapeutici e noi ci siamo focalizzati sulle sintesi del Quorum Sensing (QS), un processo di comunicazione intracellulare coinvolto nella virulenza.

Metodi Essenziali Ci siamo serviti di metodologie di biologia molecolare e non quali il clonaggio, la valutazione della minima concentrazione inibente, l'inattivazione genica, la PCR quantitativa, la purificazione delle proteine, i saggi enzimatici e la cristallizzazione delle proteine.

Risultati Abbiamo identificato due meccanismi di resistenza basati sull'iperespressione delle pompe di efflusso RND-4 e RND-9 e abbiamo chiarito il ruolo dei trasportatori RND nelle cellule planctoniche e nei biofilm. Abbiamo testato molte nuove molecole e abbiammo identificato un altro composto attivo contro *B. cenocepacia*. Stiamo anche caratterizzando le sintesi del QS e abbiammo identificato un inibitore di CepI. Abbiamo anche ottenuto la struttura cristallografica di un'altra sintesi tipica di *Burkholderia*, BCAM0581.

Possibili ricadute per ricerca e cliniche Studi di drug design basati sui dati strutturali ottenuti. Ricerca di nuovi farmaci adatti ai trials clinici.

2. Exploring pyrazinamide derivatives as novel *Pseudomonas aeruginosa* inhibitors: unexploited antibacterial molecules for a new antibiotics target

Briani F, Raneri M, Sciandrone B

Dept. Bioscience, University of Milano
(FFC project#8/2013, Completed)



Federica Briani, prima da sinistra, e il suo gruppo di ricerca

Background and rationale *P. aeruginosa* (*Pa*) is the most common pathogen in cystic fibrosis lung infection with a high negative impact on lung functionality and patients' mortality. The increasing diffusion of multi-resistant strains demands for the development of new anti-*Pa* agents. The ribosomal protein S1 (encoded by *rpsA*) is a promising target for new antibacterial drugs. In *Escherichia coli*, S1 has an essential role in translation. S1 is highly conserved among Gram negative bacteria and absent in mammalian cells. Recently, it has been found that pyrazinamide (PZA), a first-line tuberculosis drug, targets S1 protein. PZA derivatives were developed by Bracco SpA in the early '60s and roughly characterized for antibacterial activity; interestingly, in preliminary tests, the derivative B2320 seemed to be active against *Pseudomonas aeruginosa* (*Pa*). B2320 target in *Pa* is currently unknown.

Hypothesis and objectives

1. Characterizing the anti-*Pa* activity of B2320.
2. Exploring *Pa* S1 as a potential target for new antibacterials.
3. Setting-up an *E. coli* biosensor strain for the screening of S1 inhibitors.

Results and their significance

1. B2320 has been tested for anti-bacterial activity both against *Pseudomonas* lab strains and a collection of clinical isolates from CF patients in different growth conditions. We found that although only high concentrations of B2320 impaired aerobic growth of most *P. aeruginosa* strains, the sensitivity to B2320 was increased by stress conditions and in vivo, in the infection model *Galleria mellonella*. The genome of a clinical isolate particularly sensitive to B2320 and of a B2320-resistant derivative were sequenced.
2. *rpsA* essentiality in *P. aeruginosa* has been addressed by site-directed mutagenesis. Our data strongly support *rpsA* essentiality in *P. aeruginosa*.
3. We have set up a fluorescence-based assay to find inhibitors of S1-dependent translation initiation in *E. coli*. The screen allows to identify compounds interfering with an essential and bacteria specific step of gene expression, discriminating from molecules with nonspecific cell toxicity. Moreover, as we have adapted the assay to *P. aeruginosa*, cell penetration properties of the active compounds identified in the primary screening could be easily assessed. Since our screen is technically very simple and appears to be robust, it is potentially adaptable to High-Throughput Screening campaigns.

Rivalutare molecole antibatteriche neglette come nuovi antibiotici contro specifici bersagli molecolari: derivati della pirazinamide come nuovi inibitori di *Pseudomonas aeruginosa*

Ragioni dello studio *Pseudomonas aeruginosa* (*Pa*) è il patogeno più comune nelle infezioni polmonari in pazienti FC, con un elevato impatto negativo sulla funzionalità polmonare e la sopravvivenza. La crescente diffusione di ceppi multiresistenti richiede lo sviluppo di nuovi agenti anti-*Pa*. La proteina ribosomiale S1 è un bersaglio promettente per nuovi farmaci antibatterici. In *Escherichia coli*, S1 ha un ruolo essenziale nell'inizio della sintesi proteica. S1 è molto conservata tra i batteri Gram negativi mentre è assente in cellule di mammifero. Recentemente, si è scoperto che la pirazinamide (PZA), un farmaco anti-tubercolosi, ha S1 come bersaglio. Derivati della PZA sono stati sviluppati dalla Bracco SpA nei primi anni '60 e caratterizzati per l'attività antibatterica; in prove preliminari, il derivato B2320 sembrava essere attivo contro *Pa*. Il bersaglio di B2320 in *Pa* non è noto.

Ipotesi e obiettivi

1. Valutare l'elevata attività anti-*Pa* di B2320.
2. Esplorare S1 di *Pa* come un potenziale bersaglio per nuovi antibiotici.

3. Mettere a punto un biosensore per identificare inibitori dell'inizio della sintesi proteica.

Risultati e loro significato

1. L'attività antibatterica del B2320 è stata testata sia contro ceppi di laboratorio di *Pseudomonas* che contro una collezione di isolati da pazienti FC. Abbiamo scoperto che, sebbene il B2320 riduca la crescita di *Pa* solo ad alte concentrazioni, la sensibilità del batterio verso questa molecola è maggiore in vitro in condizioni di stress e in vivo, nel modello di infezione *Galleria mellonella*. Il genoma di un isolato clinico particolarmente sensibile al B2320 e di un ceppo derivato resistente al B2320 sono stati sequenziati.
2. L'essenzialità di *rpsA* di *P. aeruginosa* è stata sagggiata mediante mutagenesi sito-diretta. I nostri dati supportano fortemente l'idea che tale gene sia essenziale.
3. Abbiamo istituito un saggio basato sulla fluorescenza per trovare inibitori dell'inizio della traduzione batterica in *E. coli*. Il saggio consente di identificare composti che interferiscono con un processo essenziale e specifico per i batteri, eliminando molecole con generica tossicità cellulare. Inoltre, dal momento che abbiamo adattato il saggio anche a *P. aeruginosa*, le proprietà di penetrazione in questo batterio dei composti attivi identificati nello screening primario potrebbero essere facilmente valutate. Poiché il nostro saggio è tecnicamente molto semplice e robusto, è potenzialmente adattabile a campagne di "High-Throughput Screening".

3. Drug development of new beta-lactam and linezolid-like compounds active against *Staphylococcus aureus* isolated from cystic fibrosis patients: in vitro and in vivo biological evaluation

Musumeci R¹, Sancini G², Bulbarelli A², Oggioni D¹, Madeo M¹, Careddu AM¹, Lonati E², Dal Magro R², Cocuzza C¹, Colombo C³, Cariani L⁴, Teri A⁴, Galletti P⁵, Tolomelli A⁵, Gentilucci L⁵, Giacomini D⁵, Gasco P⁶, Pace A⁷, Palumbo Piccionello A⁷

¹Department of Surgery and Translational Medicine, University of Milano-Bicocca; ² Department of Health Sciences, University of Milano-Bicocca; ³ Department of Pediatrics, CF Center, Fondazione IRCCS Cà Granda Ospedale Maggiore Policlinico, University of Milano;

⁴ Central Laboratory CF Microbiology, Fondazione IRCCS Cà Granda Ospedale Maggiore Policlinico; ⁵ Department of Chemistry "G. Ciamician", University of Bologna;

⁶ Nanovector s.r.l., Torino; ⁷ Department of Biological, Chemical, Pharmaceutical Sciences and Technologies, University of Palermo
(FFC project#9/2013, Completed)



Clementina E. Cocuzza, seconda da destra, e il suo gruppo di ricerca

Background *Staphylococcus aureus* is one of the first pathogens to colonize and infect the lungs of cystic fibrosis (CF) patients, causing recurrent and relapsing infection. Emergence of multidrug-resistant bacteria, such as MRSA, pose a special challenge in the treatment of infections in CF and new therapeutic agents are required.

Hypothesis and objectives This one year project aimed to optimize the antibacterial activity of new promising anti-staphylococcal compounds and to evaluate their in vitro cytotoxicity and in vivo biodistribution and safety following pulmonary route administration of solid lipid nanoparticles (SLNs) formulation in healthy mice model.

Essential methods This project has involved the synthesis of selected lead antibacterial compounds, "in vitro" evaluation of their anti-staphylococcal activity by means of Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) determination and cytotoxicity effect on adenocarcinoma alveolar basal epithelial cell line (A549). "In vivo" evaluation of biodistribution and safety following pulmonary route administration in a healthy mice model of SLNs formulation of a new compound was carried out.

Results New lead antibacterial compounds with moderate activity versus both MRSA and MSSA accompanied by relatively low non-specific cytotoxicity were developed. No signs of acute toxicity were observed and biodistribution studies showed that 20% of the administered dose was present still within the lungs after 24 hours.

Conclusions Preliminary results of this study have shown some promising lead compounds as well as indicating that the solid lipid nanoparticles can be considered a suitable tool to increase drug bioavailability of antimicrobials and to improve treatment of bacterial infections, especially in life-threatening diseases such as staphylococcal infections.

Sviluppo di nuovi composti beta-lattamici e linezolid-simili con attività antibatterica nei confronti di ceppi di *Staphylococcus aureus* isolati da pazienti con fibrosi cistica: valutazione in vitro e in vivo

Ragioni dello studio Le infezioni batteriche polmonari rappresentano la principale causa di mortalità in pazienti con fibrosi cistica (FC). Lo *Staphylococcus aureus* è spesso causa di infezioni croniche e recidivanti. L'aumento nelle infezioni associate allo *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA), rappresenta un'importante sfida nel trattamento delle infezioni in questi pazienti e rende necessario lo sviluppo di nuovi farmaci antibatterici.

Obiettivi Lo sviluppo e ottimizzazione dell'attività antibatterica e biodisponibilità, dopo somministrazione per via polmonare in un modello animale, di nuovi composti attivi nei confronti di *Staphylococcus aureus* antibiotico-resistente (MRSA).

Metodi Sono stati sintetizzati ed ottimizzati nuovi composti, valutata l'attività antibatterica nei confronti di isolati clinici di MRSA da pazienti con FC. La tollerabilità e biodisponibilità di una nuova formulazione contenente uno dei composti più promettenti, veicolato da nanoparticelle e somministrata per via intrapolmonare, è stata valutata "in vivo" in un modello animale (topi sani).

Risultati Composti sono stati sviluppati e sintetizzati che hanno mostrato una moderata attività nei confronti sia di MRSA che di MSSA con una ridotta citotossicità. Gli studi di tollerabilità e biodisponibilità su un modello animale hanno mostrato mancanza di tossicità acuta e la presenza del 20% della dose somministrata al livello polmonare dopo 24 ore.

Conclusioni I risultati di questo studio hanno mostrato nuovi composti con potenziale attività antistafilococcica indicando che se associati a nuove formulazioni contenenti SLN possono risultare particolarmente utili nello sviluppo di

nuove strategie terapeutiche migliorando la biodisponibilità di nuove molecole antibatteriche.

4. Inhalable dry powders for chemically-modified human Cationic AntiMicrobial Peptides (CAMPs): moving toward in vivo application.

Notomista E¹, Ungaro F²

¹Dep. Biology, , ²Dept. Pharmacy, Napoli University "Federico II" (FFC project#11/2013, Completed)



Eugenio Notomista, responsabile del progetto

Background The diffusion of multidrug resistant (MDR) bacteria has highlighted the need of new antibiotics, but, so far, progress in developing them has been slow. Cationic Antimicrobial Peptides (CAMPs) are the first line of defense of multicellular eukaryotes against microbial invasions. Even if the protein nature of CAMPs makes difficult their use as systemic antimicrobials they are ideally suited for direct delivery to airways and lung.

Objectives The main aim of this project is to develop inhalable dry powders for lung-delivery of CAMPs and CAMP-releasing proteins (CAMP-RPs) carrying simple chemical modifications which improve their antimicrobial activity.

Methods Using methods developed in our laboratory we prepared two modified human CAMP-RP, lysozyme (mhLYS) and RNase 5 (mhRNase 5), two CAMPs derived from human thrombin and apolipoprotein E, and a synthetic artificial peptide active on several strains of *P. aeruginosa* and *S. aureus*.

By spray drying we prepared inhalable dry powders containing mhLYS and carriers already approved in inhaled medicines. As an alternative tool for CAMP administration we developed inhalable powders containing biodegradable nanoparticles (Nano-Embedded Microparticles or NEM).

Preliminary results Following intra-tracheal administration in mice mhLYS proved to be slightly toxic at doses higher than 10 mg/Kg whereas no toxicity was detected in the case of mhRNase 5 at doses as high as 50 mg/kg. At this dose mhRNase 5 reduced the bacterial load in the lung of *P. aeruginosa* infected mice, on the contrary mhLYS at 10 mg/kg failed to reduce bacterial CFU likely due to toxic effects. Administration to mice of rhodamine-labelled mhLYS showed that the distribution among lung lobes was asymmetric and heterogeneous suggesting that an effective distribution is essential for safety and efficacy of CAMP-RPs.

We have developed powders optimized for the release of mhLYS into the lung. Particular attention has been devoted to the evaluation of the effect of operating conditions on the activity of the encapsulated protein and the aerosolization properties. In particular, the recovery of the antimicrobial activity was complete only in the case of mannitol powders. Moreover, we have produced NEM whose properties are well suited for the direct administration to bronchi/bronchioles of colistin, a model CAMP.

Expected results and their significance In perspective, our inhalable powder formulations may be a valuable support tool for the treatment of CF. Our results are a further step toward the development of CAMP(-RP)-based pharmacological formulations.

Polveri inalabili per la somministrazione di peptidi antimicrobici umani (CAMP) chimicamente modificati: verso l'applicazione in vivo

Ragioni dello studio La diffusione di ceppi batterici resistenti agli antibiotici usati nel trattamento delle infezioni FC ha evidenziato la necessità di nuovi composti antibatterici. I peptidi antimicrobici (CAMP) sono la prima linea di difesa gli organismi pluricellulari contro le invasioni microbiche. La natura proteica ne rende difficile l'impiego farmacologico per via orale o parenterale ma allo stesso tempo li rende particolarmente adatti al trattamento delle infezioni di vie aeree e polmoni.

Ipotesi e obiettivi Lo scopo del presente progetto è lo sviluppo di polveri inalabili per la somministrazione mirata a livello polmonare di CAMP e proteine che rilasciano CAMP (CAMP-RP) recanti semplici modifiche chimiche che ne potenziano l'attività battericida.

Metodi Utilizzando strategie sviluppate nel nostro laboratorio, sono state preparate due CAMP-RP umane modificate, lisozima (mhLYS) e RNasi 5 (mhRNasi 5), due CAMP umani (derivanti dalla trombina e dall'apolipoproteina E) ed un peptide sintetico attivo, in vitro, su diversi ceppi di *P. aeruginosa* e *S. aureus*.

Polveri inalabili contenenti mhLYS a base di materiali già

approvati per l'uso inalatorio sono state prodotte mediante spray-drying. Quale alternativa per il rilascio di CAMP, abbiamo sviluppato polveri inalabili a base di nanoparticelle biodegradabili (Nano-Embedded Microparticles o NEM).

Risultati In seguito a somministrazione polmonare nel topo, mhLYS si è dimostrato tossico a dosi superiori a 10 mg/Kg mentre mhRNasi 5 non ha dato segni di tossicità fino alla dose di 50 mg/Kg. A questa dose, la mhRNasi 5 ha determinato una riduzione della carica batterica nei polmoni di topi infettati con *P. aeruginosa*. Al contrario, mhLYS a 10 mg/kg non ha indotto alcuna riduzione, probabilmente a causa della tossicità della molecola. Mediante somministrazione di mhLYS fluorescente abbiamo verificato che la distribuzione nei lobi polmonari era asimmetrica ed eterogenea suggerendo che una distribuzione efficace è cruciale nella determinazione di tossicità ed efficacia delle CAMP-RPs.

Sono state sviluppate polveri ottimizzate per il rilascio di mhLYS al polmone. Particolare attenzione è stata dedicata alla valutazione dell'effetto delle condizioni operative sull'attività della proteina incapsulata e sulle proprietà aerosolizzanti. In particolare, il recupero dell'attività antimicrobica era completo solo per polveri a base di mannitololo. D'altra parte, sono state prodotte NEM dalle proprietà adeguate alla veicolazione diretta di un CAMP modello, la colistina, a bronchi/bronchioli.

Possibili ricadute per ricerca e clinica In prospettiva, le polveri inalabili oggetto di studio possono rivelarsi un valido strumento di supporto alla terapia della FC. I risultati ottenuti costituiscono un ulteriore passo in avanti verso l'applicazione di CAMP(-RP) per inalazione in campo clinico.

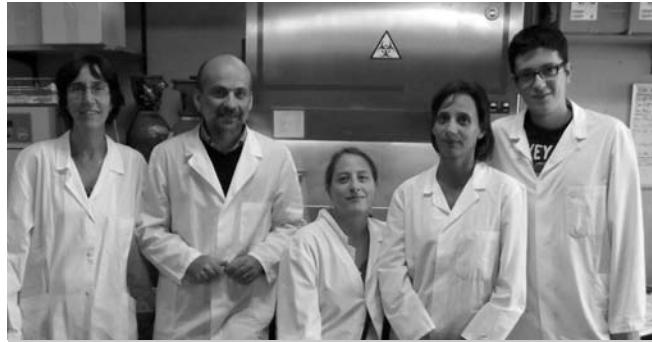
PLENARY SESSION 2

New target to control lung inflammation

5. Role of high affinity zinc transporters in *Pseudomonas aeruginosa* ability to colonize the inflamed cystic fibrosis lung

Battistoni A

Dept. Biology, University of Tor Vergata, Rome
(FFCProject#13/2012, Completed)



Andrea Battistoni, secondo da sinistra, e il suo gruppo di ricerca

tween the most abundant protein in the sputum from CF patients. The ability of pathogens to withstand the antimicrobial activity of CP relies on the production of metal transporters characterized by high affinity for the Zn ion.

Hypothesis and objectives We hypothesize that *P. aeruginosa* ability to colonize the inflamed CF lung must be supported by effective strategies to counteract CP-induced metal starvation. The goal of this project has been to characterize the Zn import apparatus of *P. aeruginosa* and its contribution to bacterial infectivity.

Methods *Pseudomonas* responses to Zn shortage have been investigated by a combination of approaches, including: the construction and characterization of strains lacking genes involved in Zn uptake; the analysis of transcriptomic, proteomic and ionomic responses to Zn deprivation; in vivo infections in mice.

Results We have demonstrated that *P. aeruginosa* displays a remarkable resistance to CP. In line with this finding, inactivation of the major Zn uptake system (ZnuABC) has moderate effects on *P. aeruginosa* growth in metal-poor environments and does not cause changes in the intracellular Zn content. Moreover, although znuABC mutant strains show defects in several virulence features (motility, alginate production, secretion of Zn-dependent proteases), they display only a limited loss of virulence. These observations suggest that *P. aeruginosa* is equipped with redundant mechanisms for the acquisition of Zn. A transcriptomic analysis of *P. aeruginosa* responses to Zn shortage lead to the identification of an uncharacterized Zn-dependent Outer Membrane Protein, that we have shown to contribute to Zn uptake. This

Background Transition metals play key roles in bacterial physiology and, therefore, vertebrates adopt a series of strategies to make metals unavailable to pathogens. For example, the inflammatory response aimed at the control of bacterial pathogens involves the release of antimicrobial metal-sequestering proteins. One of these proteins, the neutrophilic zinc and manganese-sequestering protein Calprotectin (CP), is be-

protein is overexpressed during lung infections, supporting the hypothesis that Zn acquisition is crucial for *P. aeruginosa* virulence.

Spin off for research & clinical purposes Zn homeostasis has been suggested as a promising target for novel antimicrobial strategies. The elucidation of the role of Zn in the host-*P. aeruginosa* interaction is crucial to evaluate the potential of this approach.

Ruolo dei trasportatori di zinco ad alta affinità nella capacità di *Pseudomonas aeruginosa* di colonizzare il polmone infiammato tipico della fibrosi cistica.

Ragioni dello studio I metalli di transizione svolgono ruoli chiave nella fisiologia batterica. 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 da parte dell'ospite. Una delle proteine rilasciata dai neutrofili nei siti di infezione è la calprotectina (CP), capace di sequestrare zinco e manganese. La resistenza di vari patogeni alla CP dipende dalla loro capacità di produrre il trasportatore di Zn ZnuABC.

Ipotesi e obiettivi Ipotizziamo che la capacità di *P. aeruginosa* di colonizzare il polmone dei pazienti FC debba essere supportata da efficienti strategie per contrastare la carenza di metalli causata dalla CP. L'obiettivo di questo progetto è stato quello di caratterizzare l'apparato di importo di Zn di *P. aeruginosa* e il suo contributo all'infettività batterica.

Metodi: Le risposte di *Pseudomonas* alla carenza di Zn sono state studiate attraverso di diversi approcci sperimentali, che hanno incluso: la costruzione e caratterizzazione di ceppi privi di geni coinvolti nell'acquisizione di Zn; l'analisi delle risposte trascrittomiche, proteomiche e ionomiche alla privazione di Zn; infezioni in vivo in modelli murini:

Risultati Abbiamo dimostrato che *P. aeruginosa* è estremamente resistente alla CP e che l'inattivazione di ZnuABC ha effetti modesti sulla crescita di *P. aeruginosa* in ambienti poveri di metalli e non causa alterazioni nel contenuto intracellulare di Zn. Inoltre, sebbene i mutanti znuABC mostriano difetti in alcuni caratteri di virulenza (motilità, produzione di alginato e proteasi extracellulari), la loro perdita di virulenza è limitata. Queste osservazioni suggeriscono che *P. aeruginosa* possiede sistemi ridondanti per l'acquisizione dello zinco. Un'analisi delle risposte trascrizionali alla carenza di Zn ha portato all'identificazione di una proteina canale di membrana regolata da Zn, che abbiamo dimostrato contribuire all'acquisizione del metallo. A sostegno dell'ipotesi che l'acquisizione di Zn sia critica per la virulenza di *P. aeruginosa*, questa proteina è iperespresa nel corso delle infezioni polmonari.

Possibili ricadute per ricerca e clinica È stato suggerito che l'omeostasi dello Zn sia un bersaglio promettente per lo sviluppo di strategie antimicrobiche innovative. La caratterizzazione del ruolo dello Zn nell'interazione ospite-*Pseudomonas* è cruciale per valutare le potenzialità di questo approccio.

6. 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 MC¹, Becq F²

¹Lab. Molecular Pathology, Clinical Analysis Lab. AOUI, Verona; ²Inst. Physiologie et Biologie Cellulaires, Université de Poitiers, France (FFC Project#14/2012, Completed)



Foto sinistra: Maria Cristina Dechechchi, a destra, responsabile del progetto. Foto destra: Frederic Becq, al centro, responsabile Unità partner

Background. Recent findings suggest that CF lung inflammation may be at least partly corrected by interfering with sphingolipid (SL) metabolism. Under a previous FFC grant we demonstrated that the iminosugar, N-butyl deoxynojirimycin (NB-DNJ, Miglustat) produces an anti-inflammatory effect, reduces the *P. aeruginosa*-induced immunoreactive ceramide and restores F508del CFTR function.

Hypothesis and objectives Miglustat inhibits different enzymes involved in SL metabolism that could lead to eventual off-target effects, rising concerns about the efficacy of the treatment. Therefore we need to address research toward the pathways that are impacted by miglustat, to facilitate the design of more potent derivatives for CF lung disease. Our preliminary results, suggest that non-lysosomal glucosylceramidase (GBA2), affecting the signal transduction pathways coupled to SLs, could be at least one of the molecular targets of the anti-inflammatory effect of miglustat. A library of neoglycoconjugates derived from the lead compound deoxynojirimycin with an adamantane (AMP-DNJ) moiety, has been synthesized and characterized for biological activity. This study aimed to probe the molecular basis for the anti-inflammatory activity of miglustat by examining specifically the role of GBA2 following the infection of CF bronchial epithelial cells by *P. aeruginosa* and to perform a Structure-Activity Relationships (SAR) on AMP-DNJ glycoconjugates as anti-inflammatory agents by modulating SLs.

Methods We focused mainly on: a) role of GBA2 on the inflammatory response to *P. aeruginosa* in CF bronchial cells, b) screening of AMP-DNJ conjugates.

Results In CF bronchial epithelial cells infected by *P. aeruginosa*, we have found a relevant inhibition of IL-8 expression associated with a down-regulation of GBA2 and provided evidence that the anti-inflammatory effects of miglustat are exerted through inhibition of GBA2, likely decreasing ceramide concentration through inhibition of GlcCer hydrolysis.

SAR indicates that all the AMP-DNJ conjugates, herein tested, reduce the IL-8 mRNA expression in CF bronchial cells infected by *P. aeruginosa*. They are more effective than miglustat, acting at lower concentrations. The length of the N-alkyl linker seems to affect the anti-inflammatory activity of these compounds, since the longer conjugates are more effective than the shorter ones.

Spin-off for research & clinical purposes In this study we have identified a relevant target to reduce the inflammatory response to *P. aeruginosa* in CF bronchial cells. The anticipated output of this study is to develop novel therapeutic options for CF lung inflammation, using iminosugars, DNJ derivatives, which can be effective at even low doses, thus limiting potential adverse effects.

Relazione struttura-attività (SAR) di nuovi glicoconiugati, derivati da deoxynojirimicina che agiscono sul metabolismo degli sfingolipidi, come

possibili farmaci per la malattia polmonare in fibrosi cistica

Ragioni dello studio Studi recenti suggeriscono che l'inflammazione polmonare in FC potrebbe essere normalizzata interferendo con il metabolismo degli sfingolipidi (SLs), lipidi critici in molte malattie polmonari. Grazie ad un precedente finanziamento della FFC, abbiamo dimostrato che l'imino zucchero Miglustat produce un effetto anti-infiammatorio in vitro e in vivo, riduce l'accumulo dello SL ceramide 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 la ricerca va indirizzata verso i bersagli molecolari del miglustat in modo da sviluppare composti più specifici e con effetti avversi limitati. I nostri risultati preliminari suggeriscono che la b-glucocerebrosidasi non-lisosomiale (GBA2), coinvolta nel segnale di membrana associato agli SLs, potrebbe essere un bersaglio dell'effetto anti-infiammatorio del Miglustat. Partendo dal composto DNJ (deoxynojirimicina) è stata prodotta una serie di nuovi imino zuccheri, coniugati ad adamantina (AMP-DNJ). Lo scopo di questo progetto è stato quello di caratterizzare le basi molecolari dell'effetto anti-infiammatorio del miglustat, esaminando il ruolo dell'enzima GBA2 in cellule epiteliali bronchiali, infettate da *P. aeruginosa* e di studiare la relazione tra struttura ed attività (SAR) di una serie di iminozuccheri, come possibili anti-infiammatori, modulando le ceramidi.

Metodi Ci siamo focalizzati su: a) ruolo di GBA2 sulla risposta infiammatoria a *P. aeruginosa* in cellule epiteliali bronchiali FC; b) screening di iminozuccheri, coniugati AMP-DNJ.

Risultati In cellule bronchiali FC, infettate da *P. aeruginosa* abbiamo dimostrato una inibizione rilevante della chemochina IL-8, associata ad una riduzione di espressione ed attività di GBA2. Quindi l'effetto anti-infiammatorio è dovuto alla riduzione di ceramide, conseguenza dell'inibizione dell'idrolisi di glucosilceramide da GBA2. L'analisi SAR indica che che tutti i composti da noi analizzati sono efficaci nel ridurre IL-8. Questi iminozuccheri sono più efficaci del miglustat poiché agiscono a dosi molto più basse. La presenza di adamantano e la maggiore lunghezza della catena alchilica aumentano l'attività anti-infiammatoria di queste molecole.

Possibili ricadute per ricerca e clinica In questo studio abbiamo identificato un bersaglio molecolare rilevante per ridurre la risposta infiammatoria a *P. aeruginosa* in cellule bronchiali FC ed abbiamo individuato le strutture chimiche che possono aumentare il potenziale terapeutico di questi inibitori del metabolismo degli SLs. È auspicabile che i risultati di questo studio in futuro possano rappresentare il punto di partenza per la scoperta di nuovi farmaci.



Foto sinistra: Valeria Raia, responsabile del progetto. Foto destra: Luigi Maiuri, responsabile unità Partner, con collaboratrici

Hypothesis and objectives We have discovered that an important protective cellular response (heme-oxygenase-1/carbon monoxide) that normally is increased in non-CF lungs exposed to bacteria, virus and other stressor, is inefficiently induced in the lungs of CF patients as a consequence of defective CFTR function. Thus, our aim is to investigate the correlation between this dysfunction and CF lung disease, and whether restoration of this protective response may ameliorate CF lung disease.

Methods We used in vitro and in vivo models of CF to test whether reduced induction of the HO-1/CO pathway contributes to CF-related oxidative stress and hyper-inflammation. We tested whether pharmacological or genetic reconstitution of this pathway can ameliorate CF-dysfunctions. We will also test FDA approved drugs that act stimulating endogenous HO-1 activity.

Results We have previously reported that TLR4 signaling is increased in LPS-stimulated CF macrophages (MFs), contributing to the robust production of proinflammatory cytokines. The HO-1/CO pathway modulates cellular redox status, inflammatory responses, and cell survival. The HO-1 enzyme, together with the scaffold protein caveolin 1 (CAV-1), also acts as a negative regulator of TLR4 signaling in MFs. In the first year of this project, we demonstrated that in LPS-challenged CF MFs, HO-1 does not compartmentalize normally to the cell surface and instead accumulates intracellularly, leading to decreased CAV-1 expression. Overexpression of HO-1 or stimulating the pathway with CO-releasing molecules enhances CAV-1 expression in CF MFs. Consistent with restoration of HO-1/CAV-1-negative regulation of TLR4 signaling by genetic or pharmacological inducers, the inflammatory response of CF MFs and CF mice treated with LPS decreased. Moreover, preliminary data show that by activating the HO-1/CO pathway, CF cells respond better to *P. aeruginosa* infection. In conclusion, our results demonstrate that the counterregulatory HO-1/CO pathway is defective in CF MFs through a CAV-1-dependent mechanism, exacerbating the CF MF response to LPS.

Spin-off for research and clinical purposes On the basis of our results, we hypothesize that the HO-1 pathway lung inflammation and the bacterial killing in FC and, thus, can be considered a potential therapeutic intervention for CF patients.

L'eme-ossigenasi 1 (HO-1) come modulatore della patologia polmonare associata alla Fibrosi Cistica

Ragioni dello studio Nei polmoni dei pazienti con Fibrosi Cistica (FC) il difetto primario è l'alterato trasporto di acqua e sale (squilibrio ionico) attraverso le cellule che rivestono le vie aeree, con alterazione della clearance muco-ciliare. Come effetto del difetto di funzione della proteina CFTR mutata, i pazienti FC presentano uno stress ossidativo, una complessa alterazione della fisiologia cellulare e un quadro infiammatorio cronico che predispone ad infezioni e coloniz-

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

Raia V¹, Bruscia E², Maiuri L³

¹Dept. Pediatrics, University "Federico II", Napoli;

² European Institute for Research in Cystic Fibrosis (IERFC), San Raffaele Scientific Institute, Milan;

³ Institute of Pediatrics, University of Foggia, Foggia (FFCProject#15/2012, Completed)

Background In Cystic Fibrosis (CF)-affected lungs the primary defect is the salt and water imbalance across the cells that line the airway, impairing mucus clearance. The imbalance leads to the perturbation of important cellular mechanisms (such oxidant generation and immune cells), contributing to lung environmental changes. It is believed that these changes may favor the deleterious chronic bacterial colonization in the lung of CF patients.

zazione batterica con progressivo danno polmonare.

Ipotesi e obiettivi Il nostro gruppo ha dimostrato che i polmoni FC esposti a batteri, virus o altri insulti non sono in grado di indurre in maniera efficiente una particolare risposta difensiva (HO-1/CO) in grado di rimuovere ossidanti e controllare la risposta infiammatoria. In questo studio abbiamo valutato se e come il difetto da noi individuato contribuisca allo sviluppo della patologia polmonare FC. Inoltre, dati preliminari ci hanno permesso di ipotizzare che il trattamento di cellule FC con molecole che hanno un impatto sulla via di trasduzione del segnale HO-1/CO è in grado di migliorare la risposta cellulare nei confronti di infezioni batteriche, favorendo il miglioramento della patologia polmonare FC.

Metodi Abbiamo utilizzato, quali modelli sperimentali, linee cellulari isolate da pazienti FC, biopsie da polipo nasale di pazienti con FC, cellule umane epiteliali bronchiali FC e modelli murini di FC.

Risultati Abbiamo dimostrato che nei macrofagi (MF) CF stimolati con LPS si innesca una risposta infiammatoria esagerata. L'enzima HO-1, attivando il processo del monossido di carbonio CO, modula lo stress ossidativo, la risposta infiammatoria e la sopravvivenza cellulare. Inoltre, HO-1 insieme alla caveolina 1 (CAV-1) blocca l'attivazione dei TLR4 nei MFs. Nel primo anno del progetto, abbiamo dimostrato che in MF CF stimolati con LPS, HO-1 si accumula all'interno delle cellule, riducendo l'espressione della CAV-1. Attraverso modifiche genetiche o farmacologiche, abbiamo quindi incrementato l'espressione di HO, riducendo in questo modo la risposta infiammatoria in MF e confermando che il meccanismo HO-1/CO è danneggiato in MF CF. Infine, dati preliminari dimostrano che incrementare l'attività di HO-1 induce un miglioramento della risposta allo *Pseudomonas aeruginosa*.

Possibili ricadute per ricerca clinica Sulla base dei nostri risultati, possiamo ipotizzare che la modulazione di questa risposta difensiva migliori diversi aspetti associati con FC come infiammazione, stress ossidativo, e resistenza ai batteri e pertanto questa strategia potrebbe rappresentare un potenziale approccio terapeutico che migliora il quadro clinico e la qualità di vita dei pazienti con FC.

8. Lipoic acid as a proteostasis regulator for the control of inflammation in Cystic Fibrosis

De Stefano D¹, Carnuccio R²

¹ European Institute for Research in Cystic Fibrosis (IERFC), San Raffaele Scientific Institute, Milan; ² Department of Pharmacy, University of Naples Federico II, (FFC Project#15/2013)

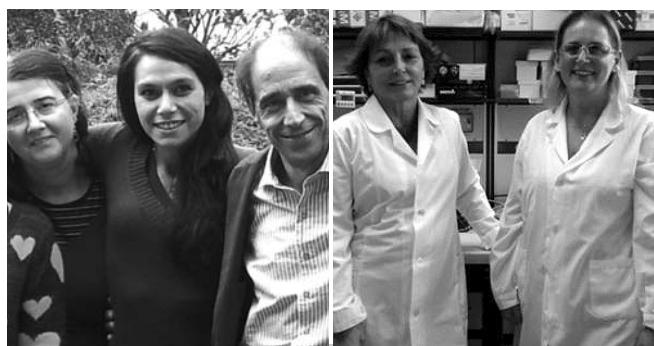


Foto sinistra: Daniela De Stefano, al centro. Foto destra, Rosa Carnuccio, a sinistra, responsabile dell'unità Partner

Background Cystic Fibrosis is the most common inherited autosomal recessive lethal disease in Caucasian population due to mutations in the CFTR gene and characterized by airway obstruction resulting from the thick mucus and reduced clearance of inhaled particles, including bacteria, pro-

moting persistent infection and chronic inflammation, major causes of death. Deletion of phenylalanine at position 508 (CFTR F508), results in a misfolded protein retained in the ER, increases intracellular ROS, TG2 SUMOylation, sustains TG2 activation, inhibiting autophagy. This, in turn, increases inflammation. Lipoic acid (LA) is a promising dietary bioactive molecule because of its recognized therapeutic potential on several diseases such as diabetes, vascular disease, hypertension and inflammation.

Hypothesis and objectives We hypothesized that LA is able to prevent CF-associated inflammation. Therefore, we tested whether LA can ameliorate the CFTR-related dysregulated proteostasis in CF cells and mice, restoring the inflammatory-related dysfunctions in CF.

Essential methods We used in vitro and in vivo models of CF to test whether treatment of cells as well as CF mice with LA prevented CF-related hyper-inflammation.

Preliminary results Our results demonstrated that lipoic acid (LA) prevents inflammation in two CF animal models, the Scnn1b-Tg and F508del-CFTR mice. In addition, LA prevents the activation of the NF- κ B pro-inflammatory pathway in human bronchial epithelial CF cells (IB3-1).

Spin-off for research and clinical purposes CF is a multi-organ disease mainly characterized by lung infection and inflammation, representing the major causes of morbidity and mortality among CF patients. LA is a naturally occurring molecule with well known anti-oxidant, anti-inflammatory effects and exhibiting even a positive impact on mitochondrial metabolism. The results of our study demonstrate that LA may contribute in preventing lung inflammation in CF.

L'acido lipoico come regolatore proteostasis per il controllo dell'infiammazione nella fibrosi cistica

Ragioni dello studio La Fibrosi Cistica (FC) è la patologia genetica autosomica recessiva più comune e letale nella popolazione caucasica, dovuta a mutazioni nel gene per il CFTR. È caratterizzata da ostruzione delle vie aeree, che dipende dalla formazione di muco denso e ridotta degradazione di particelle, tra cui batteri che, a loro volta, provocano infezione e infiammazione cronica, cause principali di morte. La delezione della fenilalanina in posizione 508 (CFTR F508) determina la biosintesi di una proteina danneggiata che viene trattenuta nel reticolo endoplasmatico, induce la sintesi di specie reattive dell'ossigeno, l'attivazione della transglutaminasi2, inibendo il processo di autofagia. Ciò provoca un circolo vizioso che determina ulteriore infiammazione. L'acido lipoico è una molecola molto promettente di origine naturale e presente nella dieta, nota per le sue proprietà terapeutiche in numerose patologie come diabete, disordini vascolari, ipertensione e infiammazione.

Ipotesi e obiettivo Abbiamo dimostrato che in FC il processo autofagico è deregolato e contribuisce all'instaurarsi del processo infiammatorio. Sulla base di dati preliminari e studi riportati in letteratura, abbiamo ipotizzato che l'acido lipoico possa prevenire i disordini di proteostasi associati alla Fibrosi Cistica e, pertanto, ridurre l'infiammazione.

Metodo Gli esperimenti sono stati condotti su modelli di FC (cellule e topi) per valutare se l'acido lipoico previene l'infiammazione.

Risultati preliminari I nostri risultati preliminari indicano che l'acido lipoico previene l'infiammazione costitutiva in topi Scnn1b-Tg e F508del-CFTR, modelli animali di FC. Dati preliminari in vitro dimostrano che l'acido lipoico inibisce alcune componenti del processo infiammatorio in cellule umane di FC.

Possibili ricadute per ricerca clinica I nostri risultati dimostrano che l'acido lipoico previene l'infiammazione in modelli FC e, pertanto, può rappresentare uno strumento terapeutico.

EXTRA SESSION

New horizons for FFC funded projects

Cecchi C (Zebra Ventures srl, Milano)

New horizons for FFC funded projects: collaborations between research centres and industries. The Industrial Liaison Office (ILO), a new service for FFC-funded scientists

Discussion

PLENARY SESSION 3

3A. Genetics

9. A field study in an area of extensive carrier screening

Castellani C¹, Picci L²

¹Centro Regionale FC, Azienda Ospedaliera Universitaria, Verona; ²Clinica Pediatrica, Azienda Ospedaliera, Padova (FFCProject#8/2011, Completed)



Carlo Castellani, responsabile del progetto

Background In a Northeastern Italy subarea it has been shown that a negative trend in CF incidence is connected with the extensive offer of mutation analysis to the general population.

Hypothesis and Objectives The project was designed to continue the monitoring of carrier screening with respect to CF incidence, to collect information on the mechanisms for accepting testing offer and to create a website providing information for the general population and education for health professionals.

Essential methods Two regions were compared: in one (ER) carrier screening was performed in the other (WR) it was not. Annual births of CF infants, carrier tests performed and carriers detected were monitored during the 1993-2013 period. To evaluate mechanisms for testing questionnaires were administered in Blood Sampling Points.

Results

- 259 newborns with CF out of 1,112,620 screened were detected. In ER 174,494 carrier tests were performed, 5,966 carriers and 150 carrier couples detected. Mean annual percentage incidence decrease was 9% per 10,000 and 15% in ER. Expected incidence in WR was 1/3589 in 1993 and 1/3870 in 2013, in ER 1/2730 in 1993 and 1/14200 in 2013. Incidence in ER correlated inversely with number of tests, carriers and carrier couples detected.
- 243 completed questionnaires were collected. The great majority of the interviewed (80.42%) was performing the CF carrier test following their gynecologist suggestion,

the remaining 15.42% were directed to the test by their general practitioner, and 4.17% on the recommendation of other health professionals or suggestion by relatives or friends. 65.89% of women/couples said that the visit to the specialist was specifically motivated by the fact that the couple was planning a pregnancy. Only 7.32% had genetic counseling before undergoing the test. In case of 1/4 risk, 25.93% say that this would affect reproductive choices while 8.10% would not alter the original plans. All others either do not know what they would do or have not yet considered it as a possible event.

- The website dedicated to the project has been completed and is on-line at: www.testfc.org.

Spin-off for research and clinical purposes Carrier screening was connected with a dramatic downturn in CF incidence. These results may be relevant for estimates of CF prevalence in future years and for planning of CF carrier screening policies.

Studio sul campo in una zona di vasto Screening dei Portatori sani FC

Ragioni dello studio Un trend negativo nell'incidenza FC connesso all'offerta estesa del test del portatore alla popolazione generale è stato dimostrato in un'area del Nordest italiano.

Ipotesi e obiettivi Il progetto è stato concepito per continuare a monitorare il rapporto tra screening del portatore e incidenza FC, per raccogliere informazioni sulle modalità che portano ad accettare il test, e per creare un sito web che fornisca informazioni alla popolazione generale e formi i professionisti sanitari.

Metodi essenziali Sono state confrontate due regioni: in una (ER) si esegue lo screening del portatore, nell'altra (WR) no. Per il periodo 1993-2013 sono stati monitorati le nascite di bambini con FC, i test del portatore eseguiti, i portatori e le coppie di portatori identificate. Le modalità che portano ad accettare il test sono state indagate tramite un questionario somministrato nei punti prelievi.

Risultati

- Sono stati identificati 259 neonati con FC su 1.112.620 screenati. In ER sono stati eseguiti 174.494 test del portatore, identificati 5.966 portatori e 150 coppie di portatori. Il calo medio percentuale di incidenza è stato del 9% su 10.000, del 15% in ER. L'incidenza attesa in WR era 1/3589 nel 1993 e 1/3870 nel 2013, in ER 1/2730 nel 1993 e 1/14200 nel 2013. In ER l'incidenza correlava negativamente con il numero di test, portatori e coppie di portatori.
- Sono stati completati 243 questionari. La maggioranza degli intervistati (80.42%) ha eseguito il test su suggerimento del ginecologo, il 15.42% del medico di base e il 4.17% su consiglio di altri professionisti, parenti o amici. Il 65.89% delle donne/coppie si era recata dal ginecologo

per un progetto di gravidanza. Solamente il 7.32% aveva fatto consulenza genetica prima del test. In caso di rischio $\frac{1}{4}$ il 25.93% avrebbe modificato le proprie scelte riproductive, l'8.10% no. Tutti gli altri dicevano di non sapere che cosa avrebbero deciso o non avevano ancora preso in considerazione l'eventualità.

- Il sito web è stato completato ed è consultabile allo: www.testfc.org

Possibili ricadute per ricerca clinica Lo screening del portatore porta a un rilevante calo dell'incidenza della FC. Questi risultati possono dimostrarsi importanti per stimare l'incidenza della malattia negli anni a venire e per pianificare politiche di screening del portatore.

10. European Cystic Fibrosis Modifier Gene Study

Corvol H¹, Cabrini G²

¹Pediatric CF center of Trousseau Hospital - Inserm U938 / UPMC, Paris, France, ²Dip. Patologia e Diagnostica, Azienda Ospedaliera Universitaria di Verona (FFC Project #5/2011)



Harriet Corvol, al centro in prima fila, e collaboratori

Background 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 4400 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.

Essential 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 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, France); 4) phenotype analyses allowing extreme disease phenotype determination; 5) genetic analyses 6) further genotype/phenotype association analyses, 7) replication in independent CF cohorts.

Results The progression of the project is now concentrating all the efforts on the collection of blood samples, DNA extraction, and collection of homogeneous clinical data. As far as the

Italian branch of the project is concerned, we completed all the procedures concerning the authorizations of the local Ethical Committees for all the 11 Italian CF centers participating in the project. After that, the collection of the biological samples and clinical data completed successfully in 11 centers that have recruited 800 Italian CF patients (DNA stored and longitudinal clinical data collected). The recent results of the meta-analysis of the latest North-American and French GWAS are very promising to identify new loci associated with phenotype disease variation (results presented during the 2014 NACFC). We have plan a deep sequencing of these regions on Italian samples, along with French samples that have not yet been genotyped. This deep sequencing will allow identifying the genes and/or the variants within the positive regions that are involved, and realizing further biological investigations.

Spin-off for research & clinical purposes The study wishes to 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 therapies.

Studio Europeo sui geni modificatori in fibrosi cistica

Ragioni dello studio È osservazione condivisa come vi sia una notevole diversità clinica tra pazienti pur 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 4200 pazienti affetti da fibrosi cistica. Purtroppo, le dimensioni delle popolazioni in ciascun studio separato hanno limitato significativamente l'impatto dei risultati ottenuti sinora.

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

Metodi essenziali Assieme, gli esperti delle nazioni partecipanti formano un Consorzio Europeo allo scopo di sequenziare il genoma dei pazienti fibrocistici partecipanti. Il programma consiste di diversi stadi successivi: 1) reclutamento dei pazienti fibrocistici; 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 fibrocistici.

Risultati Lo stato di avanzamento del progetto vede attualmente gli sforzi concentrati sul reclutamento dei pazienti eleggibili, sulla raccolta dei campioni di sangue e dei dati clinici su database confrontabili con gli altri centri europei. Sono state attualmente completate con successo tutte le procedure richieste dai Comitati Etici locali dei 11 Centri fibrosi cistica italiani partecipanti al progetto ed è iniziata la fase di raccolta campioni e dati clinici, che precede l'analisi genetica.

Possibili ricadute per ricerca e clinica Lo studio intende contribuire alla identificazione di varianti geniche implicate nella gravità della malattia. L'informazione derivata da questo studio potrà permettere di identificare non solo i pazienti a rischio di sviluppare una malattia polmonare più grave e di adottare quindi cure più incisive, ma anche di avanzare nella comprensione dei meccanismi fisiopatologici della fibrosi cistica utili a sviluppare o a trasferire da altre patologie terapie indirizzate a nuovi bersagli molecolari.

3B. Clinical topics

11. Early antibiotic treatment for eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in patients with cystic fibrosis: a randomized multicenter study.

Taccetti G¹, Cocchi P¹, Galici V¹, Lombardo M², Cristadoro S², Colombo C³, Costantini D³, Cariani L³, Raia V⁴, Terlizzi V⁴, Collura M⁵, Lucidi V⁶, Fiscarelli E⁶

¹CF Center of Florence, ²CF Center of Messina, ³CF Center of Milan, ⁴CF Center of Naples, ⁵CF Center of Palermo, ⁶CF Center of Rome (Bambino Gesù).

(FFCProject#20#2012, Completed)



Giovanni Taccetti con collaboratrici

Background Persistent MRSA infection significantly affects lung function decline and survival in CF patients. To date, there is no indication for treatment of initial MRSA infection in CF patients.

Hypothesis and objectives Early antibiotic treatment at the time of initial infection could increase the percentage of MRSA clearance, guaranteeing a clinically relevant period free from infection. The present study (randomized multicenter) has, as its primary objective, the evaluation of an eradication treatment schedule compared to "observation only" against MRSA initial infection.

Methods Patients with initial colonization were randomized into one of two study arms: antibiotic treatment versus observation only. Patients in the active arm received rifampicin and TMP/SMX orally for 21 days and nasal mupirocin for 5 days. Eradication was defined as the clearance of the germ in 3 following cultures. MRSA chemosensitivity profile and molecular studies were carried out.

Results Recruitment of patients is behind schedule due to onerous regulations and bureaucratic rules in each centre. The incidence of new MRSA infection in the centers participating in the study seems lower than originally hypothesized. To date, 26 patients (15M and 11F), mean age 21.6 ± 12.1 years have been randomized. Nine (34%) patients were allocated to the active arm while the remaining 17 (66%) patients were allocated to the observational arm. Drop-out occurred in 4 (15%) out of 26 patients. Two patients did not complete follow-up, while 2 more patients have yet to complete the 6-month follow-up period. The last analysis, conducted on the 18 subjects completing the study, showed no statistically significant differences in eradication between the active and the observational arm.

Isolates from 24 out of 26 patients were susceptible to TMP/SMX and rifampicin. The 2 remaining patients were treated with an alternative protocol including minocycline. Side effects have not been reported.

Spin-off for research & clinical purposes Due to the limited number of studies on this topic, the continuation of this

trial in clinical settings will shed further light on this critical area. MRSA eradication continues to be considered a simple way to avoid persistent infection. Moreover, microbiological characteristics of MRSA strains responsible for initial infection would be highlighted.

Trattamento antibiotico precoce per l'eradicazione di *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA) in pazienti affetti da fibrosi cistica: uno studio randomizzato multicentrico.

Background L'infezione persistente da MRSA incide in maniera significativa sul decremento della funzionalità polmonare e sulla sopravvivenza. Ad oggi non esistono indicazioni per il trattamento dell'infezione iniziale da MRSA nei soggetti affetti da FC.

Ipotesi e obiettivi Un trattamento antibiotico precoce, al momento dell'infezioni iniziale, potrebbe incrementare la percentuale di clearance di MRSA garantendo un periodo di libertà clinicamente rilevante. 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 con colonizzazione iniziale sono stati randomizzati in uno dei due bracci di studio: trattamento antibiotico versus sola osservazione. I pazienti nel braccio attivo hanno ricevuto rifampicina e TMP/SMX per os per 21 giorni e mupirocina nasale per 5 giorni. L'eradicazione è definita come assenza del germe in almeno 3 successivi esami culturali. Nei ceppi di MRSA isolati sono stati studiati profilo di chemiosensibilità e caratteristiche molecolari.

Risultati Ritardi burocratici e probabili variazioni nell'epidemiologia dell'infezione da MRSA hanno contribuito a limitare il reclutamento dei pazienti. A oggi 26 pazienti (15M e 11F) età media 21.6 ± 12.1 anni è stata randomizzata. 9 (34%) pazienti sono stati allocati a braccio attivo e 17 a braccio osservazionale. Drop-out è stato osservato in 4 (15%) pazienti. 2 pazienti hanno avuto un follow-up incompleto e 2 pazienti devono ancora completare il follow-up. L'analisi statistica condotta su 18 soggetti che hanno completato lo studio non ha evidenziato differenze statisticamente significative nell'eradicazione del germe. Gli isolati di 24 su 26 pazienti erano suscettibili a TMP/SMX e rifampicina. 2 pazienti sono stati trattati con un protocollo alternativo con associazione di minociclina.

Possibili ricadute per ricerca e clinica Considerato il limitato numero di studi sull'eradicazione da MRSA in FC, la prosecuzione dello studio nei centri partecipanti contribuirà a far luce in questa area critica. In prospettiva, il trattamento eradicante continua a essere ritenuto come un metodo semplice per evitare l'infezione persistente da MRSA. Verranno inoltre preciseate le caratteristiche microbiologiche dei ceppi di MRSA responsabili di prima infezione in FC.

12. The impact of chest computed tomography on clinical management of CF lung disease

Tiddens H¹, Assael BM²

¹Erasmus Medical Centre, Sophia Children's hospital, Department of Paediatric Pulmonology and Department of Radiology, Rotterdam; ²Centro fibrosi cistica, AOUI Verona (FFCProject#23/2013, Completed)



Harm Tiddens, primo in alto a sinistra, e i collaboratori del team di progetto

Background Bronchiectasis (BE) and Trapped air (TA) are the most well-validated markers of lung disease in cystic fibrosis (CF). Chest Computed Tomography (CT) is the gold standard to diagnose and monitor BE and TA. However, routine CT is not yet considered standard care. It remains unknown whether the results of CT scans influence clinical decisions more than chest radiography (CR) and whether CT lead to treatment changes. Although the risk of radiation exposure is low, CT should only be routinely performed if it influences clinical decision making, especially in children.

Hypothesis & objectives To investigate whether: 1) CT scan information influences clinical decision making in CF patients in current clinical practice, compared to non-radiological standard diagnostic tests only; 2) CR influences clinical decision making in the same setting; 3) The impact of chest CT on clinical decision making is larger than that of CR?

Essential methods 10 random clinical cases have been presented twice (3-month interval), to CF clinicians from European paediatric CF centres with high standard of care: 4 cases include CT or only clinical details; 4 cases include CR or only clinical details. 2 cases have been presented twice in the same format to test the consistency of clinicians clinical decision. The cases were presented through a customized web-presentation. At the end of each case, the CF clinician was asked to decide whether pulmonary diagnostics and treatments should be changed or not.

Results (preliminary) The project is currently still ongoing. We have by now recruited 39 clinicians from 19 different European CF centres. 17 clinicians completed the full first set of 10 cases and 6 clinicians received the second set of 10 cases. We cannot yet analyze our results yet. Analyses will start as soon as all cases have been completed twice by 40 clinicians.

Spin-off for research & clinical purposes 1) We will be able to make important recommendations with respect to

the radiologic monitoring of stable CF patients. Although CT scans are likely to give important clinical information, they are associated with an increased radiation exposure. 2) To our knowledge, this is the first study that uses this novel cross-over design with clinical cases to investigate a clinical decision query, at least in CF pediatric patients. If effective, this design and the created web-based platform could be used for future studies on different clinical decision making processes.

L'impatto della TAC torace nella gestione clinica della malattia polmonare in Fibrosi Cistica

Ragioni dello studio La TAC torace è la tecnica radiologica d'elezione nella diagnosi di bronchiectasie, noto marker di progressione di malattia polmonare in Fibrosi Cistica (FC). Tuttavia il suo utilizzo routinario nel monitoraggio della malattia respiratoria non è ancora stato incluso negli standard di cura. Attualmente non è noto se le informazioni fornite dalla TAC influenzino l'approccio clinico del medico più di quelle fornite dalla radiografia del torace standard, né se la TAC influenzi l'approccio terapeutico a confronto delle sole informazioni cliniche non radiologiche. Considerata l'esposizione a radiazioni superiore rispetto alla radiografia, soprattutto in età pediatrica, la TAC dovrebbe essere utilizzata solo se influenza l'approccio clinico e terapeutico.

Ipotesi e obiettivi 1) La TAC influenza l'approccio clinico in pazienti con FC, confrontato con informazioni cliniche di base? 2) La radiografia standard ha un impatto simile, nello stesso contesto? 3) L'impatto clinico delle informazioni fornite dalla TAC è maggiore di quello della radiografia?

Metodi essenziali 10 casi clinici vengono presentati, tramite un sito web, a pediatri esperti in FC, selezionati in Centri europei con alti standard di cura. I casi sono presentati due volte allo stesso medico (con modifiche in dettagli non rilevanti): con o senza TAC, con o senza radiografia, alcuni casi senza modifiche per testare la coerenza delle risposte. Al medico viene chiesto se ritiene opportuno modificare le terapie proposte e in che modo.

Risultati Il progetto è ancora in corso, finora sono stati reclutati 39 medici in 19 Centri Europei. 17 medici hanno completato il primo set di casi e 6 di questi hanno ricevuto il secondo set. La conclusione del progetto è prevista entro breve. Non è ancora possibile analizzare i risultati, questo sarà fatto non appena almeno 40 medici avranno completato entrambi i gruppi di casi proposti.

Possibili ricadute per ricerca e clinica Contiamo di poter suggerire importanti raccomandazioni sull'utilizzo della TAC nel monitoraggio di bambini con FC. È importante considerare che questo mezzo diagnostico comporta una aumentata esposizione a radiazioni ionizzanti. Questo studio è il primo ad analizzare l'approccio clinico-decisionale in FC, utilizzando un metodo innovativo informatizzato che, se si dimostrerà efficace, potrà essere applicato in molti altri ambiti. Scopo del nostro progetto rimane l'identificazione dei migliori standard di cura in FC.

POSTER SESSION 1

Rescuing CFTR functionality

13. Mechanisms of action of trimethylangelicin in rescuing F508del CFTR functional expression

Casavola V

Dip. di Bioscienze, Biotecnologie e Biofarmaceutica, Università di Bari (FFCProject#1/2013, Ongoing)



Valeria Casavola, prima a destra, e il suo gruppo di ricerca

Background It has been demonstrated that to reach the levels of F508del CFTR correction required to achieve substantial clinical benefit it is necessary to make a combined administration of either two correctors that display synergistic action or a corrector with a potentiator, that counteracts distinct conformational defects in trafficking and activates the corrected F508del CFTR. We have demonstrated that trimethylangelicin (TMA) behaves as a potentiator because a short-term treatment increases chloride secretion through CFTR already present in the membrane of airway cells, and, recently, we have found that long-term TMA treatment also has corrector properties in that at low concentrations (100 nM) it restores both the trafficking of the mutated F508del CFTR to cell surface and the chloride secretion.

Hypothesis and objectives The goal of this study is to clarify the molecular mechanisms by which TMA preincubation is able to rescue the functional expression of F508del CFTR in airway cells homozygous for F508del mutation.

Material and methods In this first year of the project, we have analyzed the entity of the TMA-dependent rescue of F508del CFTR-dependent chloride secretion in polarized cell monolayers of primary airway cell homozygous for F508del mutation by both spectrofluorimetric and electrophysiological analysis. At the same time, the TMA-dependent rescue of F508del CFTR expression on the apical membrane of primary cells was analyzed by confocal microscopy. Moreover, by measuring the kinetics of F508del CFTR internalization, we analyzed if TMA is able to stabilize F508del CFTR once it has been rescued on the apical membrane.

Results Our results show that in human primary airway cells homozygous for F508del mutation, nanomolar concentrations of TMA produced a significant increase in chloride secretion in response to cAMP stimulation. Further, confocal immunolocalization analysis performed in polarized monolayers confirmed that F508del CFTR rescued by TMA is significantly expressed on the apical membrane region. In addition, we observed that TMA enhances the cell surface stability of F508del CFTR protecting it, at least partially, from the peripheral degradation pathways.

Spin-off for research & clinical purposes Understanding the cellular mechanisms by which TMA treatment is able to rescue both chloride secretion and F508del CFTR stability on the plasma membrane of CF airway cells should provide the basis for optimizing its potential therapeutic development.

Analisi del meccanismo di azione mediante il quale la trimetil angelicina ripristina l'espressione funzionale della proteina F508del CFTR

Background La più frequente mutazione della proteina CFTR, F508del, dà luogo a una proteina che, incapace di raggiungere la membrana cellulare, non è in grado di trasportare cloruro. Si ritiene che la somministrazione combinata di "correttori", che determinano il ripristino della proteina mutata sulla membrana cellulare, e di "potenziatori", che incrementano il trasporto di cloruro una volta che la CFTR è in membrana, possa contribuire a riportare il trasporto di cloruro ad un livello sufficiente per conseguire sostanziale beneficio clinico. Abbiamo dimostrato che la trimetilangelicina (TMA), se somministrata per tempi brevi, si comporta come potenziatore del trasporto di cloruro attraverso proteine CFTR già presenti nella membrana di cellule delle vie aeree. Recentemente abbiamo dimostrato che il trattamento a lungo termine con TMA (100 nM) ripristina sia il traffico della proteina mutata F508del CFTR sulla superficie di membrana delle cellule sia la secrezione di cloruro suggerendo che la TMA svolge anche un'azione di correttore.

Ipotesi e obiettivi Il progetto di ricerca si propone di chiarire i meccanismi molecolari attraverso cui la TMA è in grado di ripristinare l'espressione funzionale di F508del CFTR nelle cellule delle vie aeree.

Materiali e metodi In questo primo anno del progetto, abbiamo analizzato l'effetto della TMA in epiteli polarizzati di cellule primarie delle vie aeree i) sulla secrezione di cloruro F508del CFTR-dipendente sia mediante analisi spettrofluorimetriche sia elettrofisiologiche; ii) sull'espressione della proteina F508del CFTR in membrana apicale mediante microscopia confocale; iii) sulla stabilità della proteina mutata ripristinata in membrana mediante misure di cinetica di internalizzazione.

Risultati I nostri risultati mostrano che nelle cellule primarie umane delle vie aeree FC, concentrazioni nanomolari di TMA danno luogo a 1) un aumento significativo della secrezione di cloruro; 2) un ripristino dell'espressione della proteina F508del CFTR sulla membrana apicale degli epitelii; 3) una maggiore stabilità di F508del CFTR sulla superficie cellulare proteggendola, almeno parzialmente, dalla via di degradazione periferica.

Spin-off per la ricerca e scopi clinici La comprensione dei meccanismi cellulari attraverso cui la membrana plasmatica delle cellule delle vie aeree FC rappresenta un passo per ottimizzare un suo potenziale sviluppo terapeutico.

14. Design and synthesis of improved analogs of trimethylangelicin (TMA) for personalized treatment of cystic fibrosis

Gambari R¹, Chilin A²

¹Dip. Scienze della Vita e Biotecnologie, Sez. di Biochimica e Biologia Molecolare, Università di Ferrara;

² Dip. Farmaceutica e Scienze Farmacologiche, Università di Padova (FFCProject#8/2014, New)

Background TMA (4,6,4'-trimethylangelicin) has been already identified as a very promising anti-inflammatory molecule for CF lung disease, with additional properties as potentiator and corrector of mutated F508del CFTR protein in *in vitro* experimental models. In order to proceed from pre-clinical to phase I clinical development, different topics should be further explored, to invest on the most effective and safe compound.



Roberto Gambari e le sue collaboratrici

Hypothesis & objective. The major objective of the project is to synthesize TMA (trimethylangelicin) analogues with the aim to find new ant inflammatory agents and/or CFTR function modulators, useful for CF lung disease, with equal or higher activity in the respect to the parent TMA. In addition, the new synthesized compounds will allow to gain structure activity relationship concerning all the biological effects, including inflammation, CFTR modulation and binding site of ligands on the involved molecular targets (NF kB and/or CFTR), helping in better understanding mechanism of action of the analyzed compounds.

Essential methods The project deals with the design, synthesis and biological evaluation of a library of TMA analogues to identify a lead compound with optimized properties in the respect of parent TMA. The goals of the project can be outlined in 5 sections: 1) design and synthesis of new TMA analogues, 2) test of the anti-inflammatory activity, 3) test of the effects as CFTR function modulators, 4) test of possible photoreactivity, 5) derivation of structure-activity relationships aimed at rationalizing the structural determinants required to obtain selective anti-inflammatory properties, selective CFTR modulatory properties and dual anti-inflammatory/CFTR modulatory activity.

Preliminary results We have synthetized 35 novel TMA analogues, demonstrated that analogues with anti inflammatory effects can be identified exhibiting low CFTR corrector efficiency. On the other hands, CFTR correctors might display low anti inflammatory effects.

Expected results & their significance Identification of novel candidates with improved anti-inflammatory and/or CFTR function modulating properties without side effects for the treatment of the chronic lung pathology of patients affected by CF.

Disegno e sintesi di analoghi della trimetilangelicina (TMA) per ottimizzare le applicazioni cliniche per la fibrosi cistica: attività anti-infiammatoria, potenziatore CFTR e correttore CFTR

Ragioni dello studio TMA (4,6,4'-trimetilangelicina) è già stata identificata come una molecola molto promettente con proprietà anti infiammatorie e di potenziatore e correttore della proteina CFTR mutata F508del. Per procedere dalla fase sperimentale preclinica a quella clinica, differenti aspetti devono essere ancora approfonditi su questa classe di molecole, in modo da investire sul composto chimico potenzialmente più efficace e più sicuro.

Ipotesi e obiettivi L'obiettivo principale di questo progetto è sintetizzare analoghi di TMA allo scopo di identificare nuovi agenti anti infiammatori e/o modulatori della funzione della CFTR mutata, che siano applicabili alla patologia polmonare della fibrosi cistica, con un'efficienza maggiore o almeno pari a TMA e che siano adatti ad approcci di terapia personalizzata. Attraverso i nuovi composti sarà possibile

ottenere informazioni sulle caratteristiche strutturali di TMA cruciali per l'azione anti infiammatoria e modulatoria della funzione di CFTR, nonché sui siti specifici d'azione dei bersagli implicati (NF-kB e/o CFTR) e, di conseguenza, sul meccanismo d'azione.

Metodi Il progetto si baserà sulla progettazione, sintesi e valutazione dell'attività biologica di una collezione di analoghi di TMA per identificare la molecola base con proprietà ottimizzate. In particolare, le fasi del seguente progetto sono cinque: 1) disegno e sintesi di nuovi analoghi della TMA, 2) analisi dell'azione anti infiammatoria e 3) di modulazione della funzione della proteina CFTR mutata, 4) analisi della potenziale fotoreattività e 5) definizione di relazioni struttura-attività per individuare i determinanti strutturali necessari ad ottenere selettivamente proprietà antinfiammatorie, proprietà modulatorie di CFTR o attività duale anti-infiammatoria/modulatrice di CFTR.

Risultati preliminari Abbiamo sintetizzato 35 nuovi analoghi di TMA e dimostrato che possono essere identificati analoghi con effetti anti-infiammatori e bassa efficienza nell'attività di correzione di CFTR. D'altro canto, abbiamo identificato analoghi di TMA in grado di correggere CFTR senza mostrare effetti anti infiammatori.

Risultati attesi e loro significato In conclusione, ci attendiamo di identificare nuove molecole candidate con maggiore attività anti infiammatoria e/o di correzione della proteina CFTR mutata, in assenza di effetti collaterali per la cura della patologia polmonare cronica dei pazienti affetti da fibrosi cistica

15. ΔF508-CFTR correctors deriving from computational design and from safe natural compounds for a prompt clinical application

Mazzei M¹, Fossa P², Pascale M³

¹Dipartimento di Farmacia, Università di Genova;

²Dip. di Farmacia, Università di Genova; ³ Dip. di Farmacia, Università di Salerno (FFCProject#3/2013, Ongoing)



Mauro Mazzei e il suo gruppo di ricerca

Background Since drugs useful for CF patients carrying the ΔF508-CFTR mutation are not present in the market, a great deal of research to rescue the ΔF508-CFTR is worldwide made. Our efforts are devoted to this aim through the study of small molecules named "correctors".

Objective 1) Finding, by a computational analysis, molecules able to interact with the mutant CFTR or with some proteins committed to its degradation to rescue the ΔF508-CFTR. 2) Discovering new potential correctors among the natural substances which, already present in foodstuffs or in medicinal herbs, could get the market more quickly with respect to the time requested for a new drug obtained by synthesis.

Essential methods 1) A set of substances has been identified by a virtual screening approach: the X-rays of potential binding sites located in proteins involved in CF (NBD1,

NBD2, HSC70, CHIP, BAG-1) have been downloaded from PDB. Ligands have been extracted from the Zinc Database, where more than 5 millions of drug-like molecules (all commercial products) are stored. This massive collection has been divided in smaller groups containing about 100.000 molecules each, thus obtaining 50 stocks. Until now, about ten stocks have been worked up. For each molecule, energy optimization, molecular dynamics and docking calculations have been performed. The computational time required for these studies has been obtained using the cloud computing resources available in Google. 2) We investigated the possible synergic activity of Matrine plus Ascorbic acid and Matrine plus Resveratrol. Also many organic acids were tested as correctors. All biological tests were performed on A549 cells carrying the ΔF508 mutation.

Results 1) About 1.000 molecules were already identified as potentially interesting and now an additional selection to reduce this number is under way by the use of flexible docking. To date, no experimental data are available on the biological activity of these compounds. 2) Data show that Ascorbic acid, at a conc. of 10 μM, induces an increase of mutant protein, particularly of the CFTR-C shape, but we do not notice any synergic effect with Matrine. Resveratrol alone (5, 10 and 50 μM) slightly increases CFTR-C shape and, at the same conc., seems to have a synergic effect with Matrine. Interestingly, two safe natural products, namely tartaric acid and citric acid, show an increased CFTR-C shape at conc. of 10 mM. Clearly, these acids deserve a deeper insight to appraise this activity.

Correttori della ΔF508-CFTR derivanti da disegno computazionale e da composti naturali, classificati come sicuri, per una rapida applicazione clinica

Ragioni dello studio Poiché non sono ancora disponibili farmaci per curare pazienti FC con mutazione ΔF508-CFTR, un gran numero di ricerche è fatto a livello mondiale per aiutare i pazienti con questa grave mutazione. Anche i nostri sforzi sono tesi a questo fine per mezzo di ricerche fatte su piccole molecole organiche chiamate "correttori".

Ipotesi e obiettivi 1) Trovare, mediante analisi computazionale, molecole in grado di interagire con la CFTR mutata o con le proteine preposte alla sua degradazione in modo da salvare la ΔF508-CFTR. 2) Scoprire nuovi potenziali correttori tra sostanze naturali che, già presenti in alimenti o erbe medicinali, possano raggiungere il mercato in tempi inferiori rispetto ai farmaci ottenuti per sintesi.

Metodi essenziali 1) Mediante il Disegno Molecolare (DM) assistito dal computer, abbiamo selezionato un set di sostanze capaci di legarsi a specifici siti presenti in proteine coinvolte in FC (NBD1, NBD2, HSC70, CHIP, BAG-1) e di cui si conoscono i dati cristallografici. Il tempo macchina è stato acquistato da Google. Le molecole per il "virtual screening" sono state tratte dal Database Zinc in cui sono presenti più di 5 milioni di molecole cosiddette "drug-like". Questa massiva collezione è stata suddivisa in gruppi più piccoli contenenti ca. 100.000 molecole e sono stati così ottenuti 50 stocks. Finora sono stati processati una decina di stocks. Per ciascuna molecola sono stati eseguiti i calcoli di minimizzazione dell'energia, studi di dinamica molecolare ed il docking rigido. 2) Nell'ambito delle indagini su prodotti naturali abbiamo ricercato possibili sinergie tra Matrina, Acido ascorbico e Resveratolo. Anche taluni acidi organici sono stati testati quali correttori. Tutti i tests biologici sono stati fatti su cellule ΔF508 A549.

Risultati 1) Circa 1.000 molecole sono state selezionate per mezzo del DM. Ora è in corso un'ulteriore riduzione di tale quantità utilizzando il docking flessibile per ottenere dati ancora più significativi. Finora non sono disponibili dati spe-

rimentali su cellule. 2) I dati mostrano che alla conc. 10 mM l'Acido ascorbico induce un aumento della banda C ma non si notano effetti sinergici con la Matrina. Il Resveratolo alle conc. testate (5, 10, 50 mM) aumenta leggermente la banda C e sembra avere un effetto sinergico con la Matrina. Risultati promettenti giungono dall'analisi di acidi organici in quanto 2 prodotti naturali, l'acido tartarico e l'acido citrico, aumentano la banda C a 10 mM.

16. A systems biology approach to the correction of Cystic Fibrosis: from building a network of proteostasis regulatory pathways to combinatorial targeting. (A rational approach to develop novel drugs for the treatment of Cystic Fibrosis)

Luini A

Centro Nazionale Ricerche, Dip. di Scienze Biomediche, Istituto di Biochimica delle Proteine, Napoli (FFCProject#2/2014, New)



Alberto Luini, responsabile del progetto

Background/rationale Cystic fibrosis (CF) is a frequent and lethal genetic disease caused by mutations associated with the CF transmembrane regulator (CFTR), a chloride channel located in the apical membrane of epithelial cells lining the ducts. In nearly 70% of the CF patients, the mutation involved is a deletion of phenylalanine at position 508 of the protein (DF-CFTR). The mutant protein cannot fold properly leading to its intracellular retention and degradation. Pharmacological screening approaches have identified small molecule "correctors" (which promote a modest level of DF-CFTR arrival at the plasma membrane), some of which are in clinical trials. Unfortunately, their mode of action is not known.

Objectives We propose to develop a rational basis for the pharmacological correction of DF-CFTR defects, by characterizing the mechanism of action of correctors, to identify molecular components and pathways involved in the correction and then targeting them by efficient ways.

Preliminary results (personal) Our analysis of the gene expression changes induced by the corrector compounds have led to the identification of at least 10 regulatory pathways/networks that control DF-CFTR proteostasis. Small molecule based targeting of one of these pathways shows efficient functional rescue of DF-CFTR demonstrating the validity of the approach.

Project description (experimental plan, methods, timing) The regulatory pathways will be characterized for their mode of action, their targets and the feasibility of using small molecule modulators to target them. Since a rational combinatorial targeting of the pathways is more effective, we will first build an epistatic map of the regulatory pathways to characterize

their interaction. Small molecule modulators of these pathways, if available, will then be used in judicious combination based on previous results to obtain enhanced correction. The results will also be validated using primary human bronchial epithelial cells and CF mouse models.

Anticipated output A rational pharmacological basis of correction of DF-CFTR will be provided and potential novel, efficient and specific small molecule reagents that correct the basic defect of DF-CFTR will be identified.

Un approccio razionale per lo sviluppo di nuovi farmaci per il trattamento della Fibrosi Cistica

Ragioni del progetto La Fibrosi Cistica è la malattia genetica più frequente nelle popolazioni caucasiche, dovuta ad un gene mutante chiamato DF508-CFTR. La mutazione si manifesta come ripiegamento improprio della proteina la quale viene trattenuta nella cellula e degradata. Sono stati identificati vari composti in grado di correggere questo difetto di base della Fibrosi Cistica, molti di questi sono però poco efficaci e nessuno lo è stato in studi clinici. Molti di loro sono stati identificati da procedure di screening casuali ed il loro meccanismo d'azione non è noto, limitando così la nostra abilità di migliorarli. Al momento, non esiste alcun trattamento disponibile per il difetto di base della Fibrosi Cistica e tutti i trattamenti sono sintomatici.

Obiettivi Noi proponiamo di caratterizzare il meccanismo d'azione dei correttori usando nuovi approcci. I nostri risultati preliminari hanno già dimostrato una chiara ragione per l'inefficacia di questi farmaci. Essi non hanno come bersaglio solo le vie metaboliche che migliorano il difetto di base, ma anche quelle che lo peggiorano ed il risultato finale è un'azione debole. Avendo compreso la possibile ragione della loro inattività ed individuato le vie efficaci, proponiamo di sviluppare trattamenti specifici.

Risultati preliminary (personalni) Le analisi da noi effettuate, sui cambiamenti nell'espressione genica indotti dai correttori, hanno portato all'identificazione di almeno 10 pathways/networks regolatori che controllano la proteostasi della DF-CFTR. L'utilizzo di piccole molecole che hanno come bersaglio uno di questi pathways mostra un recupero efficiente nella funzionalità della DF-CFTR sottolineando la validità dell'appuccio.

Descrizione del progetto (piano sperimentale, metodi, tempi) I pathways regolatori saranno caratterizzati per la loro modalità di azione, i loro bersagli e la possibilità di essere essi stessi bersaglio di piccole molecole. Dal momento che una razionale azione combinata sui pathways è più efficace, come prima cosa costruiremo una mappa epistatica dei suddetti pathways per caratterizzare le loro interazioni. Piccole molecole regolatorie dei suddetti pathways, se disponibili, saranno poi usate in studiate combinazioni, sulla base dei precedenti risultati, per ottenere la correzione maggiore. I risultati saranno inoltre validati usando cellule primarie umane dell'epitelio bronchiale ed in modelli animali di Fibrosi Cistica.

Risultati attesi Ci aspettiamo di sviluppare nuovi, specifici ed efficienti farmaci che abbiano come bersaglio il difetto di base della Fibrosi Cistica per il quale, al momento, non ci sono trattamenti. Così questo studio vuole colmare una grave lacuna nella gamma delle terapie disponibili per la Fibrosi Cistica.

Rusnati M¹, Orro A², Fossa P³, D'Ursi P², Trombetti G²,

Milanesi L², Bugatti A¹, Cichero E³

¹Macromolecular Interaction Analysis Unit, Dept. of Molecular & Translational Medicine, University of Brescia;

²Istituto di Tecnologie Biomediche, CNR,

Milano, ³Department of Pharmacy, University of Genova

(FFCProject#6/2014)



Marco Rusnati, responsabile del progetto, e il suo team

Background Correcting defects of mutant CFTR with small molecules has been the goal of an increasing number of recent Cystic Fibrosis (CF) drug discovery programs. However, the mechanism of action by which these molecules restore mutant CFTR is still poorly understood, in particular for those preventing the entangling of the CFTR inside the endoplasmic reticulum (ER) and subsequent degradation.

Thus, not only a better insight of the mechanism of action of correctors is needed, but also the identification of new chemical scaffolds, which can be achieved by more accurate computational methods validated with advanced laboratory assays.

Surface Plasmon Resonance (SPR) is a label-free optical technique to study biomolecular interactions in real time. To date, SPR has become a fundamental technology for the identification of new drugs in almost all the fields of biomedical research.

Hypothesis & objectives Development of innovative methodologies for the screen of large libraries of molecules in order to ease the identification of CFTR-targeted molecules of therapeutic relevance. Validation with SPR assays.

Essential methods SPR technology will be employed to evaluate the capacity of small molecules to bind to NBD1 domain of wt or ΔF508-CFTR and to prevent its binding with chaperones that retain it in the ER. Computational analysis (docking, QSAR, molecular dynamics, HPC infrastructures) will assist in understanding the mechanisms of the defect and sieve molecular databases searching for correcting molecules which will be validated with SPR.

Preliminary results Our research groups already set up numerous SPR models for the identification of small molecules and have a strong background in virtual screening and molecular dynamics simulation techniques.

Expected results & their significance The project will deliver knowledge and experimental models that will be made available to the scientific community for the development of clinically relevant CF therapies. The multidisciplinary approach proposed will provide a stimulating environment for training of young investigators on CF.

The project will impact on basic and applied molecular medicine, providing new protocols and new promising small therapeutic molecules for the treatment of CF. The specific aspects of this proposal address the main priorities of the Italian CF Foundation with regards to the improvement of scientific knowledge and its dissemination in the scientific community.

17. Development of novel methodologies for the identification of CFTR-targeted drugs: a multidisciplinary approach using Real Time Surface Plasmon Resonance interaction assay supported by bioinformatics strategies on HPC infrastructures

Sviluppo di nuove metodologie per l'identificazione di farmaci per la cura della fibrosi cistica: un approccio multidisciplinare mediante strategie bioinformatiche affiancate alla tecnologia di risonanza plasmonica di superficie

Ragioni dello studio La possibilità di correggere i difetti del recettore CFTR mutato [causa della fibrosi cistica (FC)] mediante piccole molecole è l'obiettivo di un crescente numero di ricerche volte all'identificazione di nuovi farmaci per la cura della FC. Nonostante ciò, nella maggior parte dei casi, i meccanismi attraverso cui tali molecole correggono la funzionalità di CFTR rimangono ancora sconosciuti.

Ne consegue la necessità sia di scoprire nuove molecole sia di comprenderne meglio i meccanismi d'azione, obiettivi al cui raggiungimento possono contribuire approcci multidisciplinari nei quali strategie computazionali più accurate si affianchino alle più recenti tecnologie sperimentali. La risonanza plasmonica di superficie (SPR) è una tecnologia per lo studio in tempo reale dell'interazione farmaco-proteina bersaglio. Essa è ormai diventata una metodica di riferimento per l'identificazione di nuovi farmaci in praticamente tutti i campi della ricerca biomedica, mentre è stata poco impiegata nell'ambito della FC.

Ipotesi & obiettivi L'obiettivo della nostra ricerca è lo sviluppo di un innovativo approccio multidisciplinare per lo "screening" di ampie "librerie" di composti chimici alla ricerca di molecole in grado di legare (e correggere i difetti) di CFTR, con conseguenti effetti terapeutici sulla FC.

Metodi La tecnologia SPR verrà impiegata per valutare la capacità di piccole molecole di legare la forma mutata di CFTR e di prevenirne quindi il suo legame a quelle molecole patologiche che lo trattengono nel reticolo endoplasmico, causando la FC. Tecniche di modellistica strutturale computerizzata faciliteranno l'identificazione di tali molecole dalle banche dati e la comprensione del meccanismo attraverso cui il difetto di CFTR viene corretto.

Risultati preliminari Il nostro gruppo di ricerca ha già messo a punto numerosi modelli di analisi mediante SPR per l'identificazione di piccole molecole a significato terapeutico e ha una forte esperienza nello "screening" virtuale e nella simulazione di dinamiche molecolari.

Risultati attesi & loro significato Il progetto fornirà nuove conoscenze e modelli sperimentali che verranno rese disponibili alla comunità scientifica per lo sviluppo di nuove terapie per la cura della FC. L'approccio multidisciplinare proposto fornirà inoltre un ambiente stimolante per la formazione di giovani ricercatori nell'ambito della FC.

Il progetto avrà molteplici ricadute nell'ambito della medicina molecolare, sviluppando nuovi protocolli sperimentali ed identificando nuove promettenti piccole molecole terapeutiche per il trattamento della FC. Gli aspetti specifici di questo progetto rispettano le principali priorità delineate dalla Fondazione Italiana per la ricerca sulla FC sia per quanto riguarda il miglioramento delle conoscenze scientifiche di base sia per la loro disseminazione nella comunità scientifica.



Andrea Venerando e la sua collaboratrice Valeria Rachela Villella

kinase CK2 that, in turn, can favour CFTR fragmentation and reduce CFTR stability.

Hypothesis & objectives CK2 inhibition can provide a novel and valuable tool to rescue the CF phenotypes especially in combination with CFTR corrector molecules and/or other proteostasis regulators.

The primary objective will be to seed a rational design to develop mechanism-based therapies to correct the CF basic defect. The workflow is summarized in the following tasks: 1) Identification and functional characterization of endogenous CK2 targets whose phosphorylation is altered by F508del-CFTR; 2) In vivo confirmation of the CK2/CFTR functional link; 3) Analysis of known kinase modulators as a new class of molecules useful to rescue/stabilize F508del-CFTR; 4) In vivo validation of CK2/protein kinases modulators as reagents able to rescue CF phenotypes.

Essential methods In vitro and in vivo models of CF will be used to test whether treatment of CF cells as well as CF mice with potential CK2 modulators are able to play a role in the process leading to premature degradation of F508del-CFTR.

Preliminary results Fragments of CFTR from the F508 deleted (F508del) region are found in different cell models; the fragmentation pattern of F508del-CFTR differs from that of wild type (wt) CFTR. Phosphorylation of CK2 targets in cells expressing F508del-CFTR is altered (generally enhanced) with respect to wt-CFTR expressing cells. Phosphorylation level of lysates from human bronchial epithelial cells that express F508del-CFTR (CFBE) is higher than that obtained with lysates from 16-HBE cells. CFTR is itself a CK2 substrate displaying some canonical phosphorylation sequences.

Expected results & their significance Since CK2 could both mediate some of the consequence of the basic defect causative of CF and play a role in the process leading to premature degradation of F508del-CFTR, targeting the underlying structures could seed drug discovery against this lethal disease.

Un approccio chinasi-diretto per ristabilire la funzionalità di F508del-CFTR

Ragioni dello studio La proteina F508del-CFTR va incontro ad una prematura degradazione che sovverte la regolazione della proteostasi e genera frammenti che hanno la capacità di potenziare l'azione della protein chinasi CK2. Quest'ultima a sua volta può favorire l'ulteriore frammentazione di CFTR riducendone la stabilità.

Ipotesi e obiettivi L'inibizione di CK2, specialmente se in combinazione con correttori di CFTR e/o regolatori della proteostasi, può rappresentare una nuova e importante strategia per recuperare il fenotipo FC.

L'obiettivo principale di questo progetto è quello di promuovere lo sviluppo razionale di terapie basate sul meccanismo d'azione per correggere il difetto di base della FC e si può ricapitolare nei seguenti punti: 1) Identificazione e caratterizzazione funzionale di quei substrati di CK2 la cui fosforilazione è alterata dalla presenza di CFTR mutato; 2)

18. A kinase-directed approach to rescue functionality of F508del CFTR

Venerando A¹, Villella VR²

¹Dip. Scienze Biomediche, Università di Padova; ²IERFC, Divisione di Genetica e Biologia Cellulare, Istituto San Raffaele, Milano (FFCProject#7/2014, New)

Background F508del-CFTR undergoes premature degradation subverting proteostasis regulation and generating fragments which have the potential to up-regulate the protein

Conferma in vivo della relazione funzionale tra CK2 e CFTR; 3) Analisi di noti composti che modulano CK2 utilizzandoli come una nuova classe di molecole utili a recuperare/stabilizzare la proteina F508del-CFTR; 4) Validazione in vivo di questi modulatori dell'attività CK2 (o di altre chinasi) come farmaci capaci di recuperare fenotipi FC.

Metodi Saranno utilizzati modelli di FC in vitro e in vivo per studiare in che modo il trattamento di cellule o topi FC con potenziali modulatori di CK2 siano capaci di intervenire nel processo che porta alla degradazione prematura della proteina F508del-CFTR.

Risultati Preliminari Frammenti di CFTR della regione F508del sono stati trovati in diverse linee cellulari; il pattern di frammentazione di CFTR è diverso se è presente la mutazione F508del rispetto alla sua controparte sana. La fosforilazione di substrati CK2 in cellule che esprimono F508del-CFTR è alterata (aumentata) se paragonata a cellule che esprimono CFTR sano. Il livello di fosforilazione in cellule epiteliali bronchiali umane che esprimono F508del-CFTR (CFBE) è più alto rispetto a cellule sane (16-HBE). La proteina CFTR è essa stessa un substrato CK2 presentando nella sua sequenza alcuni siti fosforilabili da parte di CK2.

Risultati attesi e loro significato Dal momento che CK2 potrebbe essere coinvolta in alcune delle conseguenze del difetto di base che causa la FC e avere un ruolo nel processo che porta alla premature degradazione della proteina F508del-CFTR, lo studio di CK2 come bersaglio molecolare potrebbe rappresentare una nuova strategia contro questa malattia.

19. Identification and validation of novel molecules obtained by integrated computational and experimental approaches for the read-through of PTCs in CF cells

Lentini L, Pibiri I, Melfi R, Tutone M, Pace A, Barone G, Costantino C, Di Leonardo A

Department of Biological, Chemical and Pharmaceutical Sciences and Technologies (STEBICEF), University of Palermo (FFCProject#1/2014, New)



Prima fila: Laura Lentini (Principal Investigator), Ivana Pibiri (Partner), Raffaella Melfi, Cristina Costantino (Borsista FC). Seconda fila da sinistra: Aldo Di Leonardo, Andrea Pace, Giampaolo Barone, Marco Tutone

Background Cystic Fibrosis patients with nonsense-mutation in h-CFTR gene generally make virtually no CFTR protein and thus often have a more severe form of CF. Ataluren (PTC124) was suggested to induce read-through of premature but not normal termination codons. Despite the promising results there is not a general consensus on the mechanism of its action (protein stabilization or codon read-through), the identification of new PTC124 analogues and the study of the mechanism of action may lead to a new strategy for the development of a pharmacologic approach to the cure of CF.

Hypothesis and objectives This project aims to optimize the readthrough strategy by identifying molecules that act with read-through mechanism in experimental cell models containing stop mutations for cystic fibrosis. In particular, we aim to implement and to evaluate the efficacy of the activity of PTC124 derivatives identified in our precedent FFC study in primary human bronchial epithelial cells and in immortalized epithelial cells of cystic fibrosis (CF) patients.

Methods Design and synthesis of the new PTC's read-through promoters will be based on the results obtained in our precedent project FFC and by a initial virtual screening approach. Moreover we will use human bronchial epithelial G542X-CFTR and IB3 cell lines to test the new identified products. Computational studies will be aimed to model the interaction between the bioactive synthesized compounds and the possible cellular target in order to understand their mechanism of action.

Preliminary results We synthesized 24 derivatives of the PTC124 and tested them in three different biological models. Three of these new compounds showed high read-through capacity associated to the expression of the CFTR protein in IB3-1 cells.

Expected results and their significance Obtainment of molecules displaying high readthrough activity. Identification of the mechanism of action of PTC's read-through promoters.

Identificazione e validazione di nuove molecole ottenute da studi computazionali e saggi biologici per il superamento di codoni di stop prematuri in cellule FC

Ragioni dello studio Pazienti affetti fibrosi cistica che presentano mutazioni nonsenso nel gene CFTR non possiedono alcuna forma della proteina e in generale il loro quadro clinico risulta essere più grave. Recentemente è stato suggerito che l'Ataluren (PTC124), una piccola molecola aromatica, sia in grado di indurre il "readthrough" (superamento) dei codoni di stop prematuri e non di quelli normali. Ma nonostante i buoni risultati iniziali esistono molte controversie sull'effettiva efficacia di tale molecola e inoltre non se ne conosce il meccanismo d'azione.

Ipotesi e obiettivi In uno studio precedente finanziato dalla Fondazione Fibrosi Cistica, abbiamo sintetizzato e identificato alcune molecole che sembrano mostrare una migliore attività di readthrough rispetto a quella del PTC124. Scopo di questo progetto è quello di cercare di implementare i dati ad oggi ottenuti e cercare di estenderli a sistemi cellulari modello di fibrosi cistica. Un ulteriore obiettivo del progetto è il disegno e la sintesi di nuove molecole ad azione readthrough. Infine, saranno condotti studi computazionali volti a generare dei modelli d'interazione tra i composti bioattivi sintetizzati e il loro possibile bersaglio cellulare.

Metodi La progettazione e la sintesi di nuove molecole correlate al PTC124 sarà fatta sulla base dei risultati ottenuti dal precedente progetto e mediante uno screening virtuale dei composti. Per il saggio dei nuovi prodotti useremo linee cellulari umane bronchiali epiteliali G542X-CFTR e cellule IB3, affiancate da sistemi cellulari contenenti codoni di stop prematuri. Infine saranno condotti studi computazionali finalizzati a valutare l'interazione tra i composti bioattivi sintetizzati e il bersaglio cellulare al fine di capire il possibile meccanismo d'azione di tali molecole.

Risultati preliminari Abbiamo sintetizzato e saggiato 24 derivati del PTC124 in tre diversi modelli biologici. Tre di questi nuovi composti hanno mostrato elevata capacità di readthrough associata all'espressione della proteina CFTR in cellule IB3. Risultati attesi e loro significato Il risultato che ci prefiggiamo è quello di ottenere molecole che mostrano un'elevata attività readthrough e la possibile identificazione del meccanismo di azione di tali molecole per migliorarne l'efficacia.

20. The molecular structure and the folding of the whole Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR)

Moran O

Istituto di Biofisica, Consiglio Nazionale delle Ricerche-CNR, Genova (FFCProject#4/2014, Extension)



Oscar Moran e collaboratrici

Cystic fibrosis (CF) is a genetic disease of epithelia, in which the primary defect is a mutation of the CFTR protein. 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. Nowadays, the molecular mechanism of the correctors is unknown, limiting the rational design of effective substances. The description of the molecular structure of the CFTR is a premise to understand these mechanisms. We studied the structural properties of CFTR by small-angle X-ray scattering methods. The activities of the project FFC#4/2012 were concluded with several important results: 1- we demonstrated that CFTR-therapy drugs interact with lipid membranes; 2- we showed the differences between the structure of membranes extracted from cells over-expressing wild type (WT) and ΔF508 CFTR, as well as membranes with ΔF508 from cells treated to rescue the CFTR; 3- we investigated the structure of CFTR purified from yeast, showing the differences on the structure of WT and ΔF508 human CFTR. The extension of this project (FCC#4/2014) is aimed to study isolated CFTR. As results obtained from proteins purified from yeast showed an incomplete folding of the protein, now CFTR, normal or mutated, will be purified from mammalian cells, which will be also treated with correctors in order to study how these drugs modify the molecular conformation of the mutant. The goal is to study the structure of normal CFTR in different functional states, and compare it with the structure of the protein carrying the mutation ΔF508. The results obtained 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)

La fibrosi cistica (FC) è una malattia genetica in cui il difetto principale è una mutazione della proteina CFTR. La mutazione più frequente nei pazienti, ΔF508, causa difetti nella maturazione della proteina, che viene distrutta prima

di essere inserita nella membrana cellulare. L'uso di composti, noti come correttori, che impediscono la distruzione di ΔF508 permettendo di raggiungere la membrana, è stata indicato come terapia per pazienti con questa mutazione. Oggi, il meccanismo molecolare dei correttori è sconosciuta, limitando la progettazione razionale di sostanze efficaci. La descrizione della struttura molecolare della CFTR è una premessa per comprendere questi meccanismi. Abbiamo studiato le proprietà strutturali di CFTR con metodi di diffusione di raggi X a basso angolo. Le attività del progetto FFC # 4/2012 sono state concluse con diversi risultati importanti: 1- abbiamo dimostrato che i farmaci CFTR-terapia interagiscono con le membrane lipidiche; 2- abbiamo evidenziato le differenze tra la struttura delle membrane estratte da cellule sovra-esprimono la CFTR normale (WT) e ΔF508, così come le membrane con ΔF508 da cellule trattate per recuperare la CFTR; 3- abbiamo studiato la struttura della CFTR purificata da lievito, che mostra le differenze tra struttura di CFTR umano WT e ΔF508. L'estensione di questo progetto (FCC # 4/2014) ha lo scopo di studiare la CFTR purificata. Siccome i risultati ottenuti dalle proteine purificate da lievito ha mostrato un incompleto ripiegamento della proteina, questa volta la CFTR, normale o mutata, sarà purificata da cellule di mammifero, che saranno trattati anche con correttori per studiare come questi farmaci modifichino la conformazione molecolare del mutante. L'obiettivo è quello di studiare la struttura di CFTR normale in diversi stati funzionali e confrontarla con la struttura della proteina che con la mutazione ΔF508. I risultati ottenuti serviranno a comprendere i meccanismi funzionali della CFTR normale e le sue alterazioni patologiche causate dalla mutazione ΔF508 e per ottenere delle informazioni che potrebbero essere fondamentali per lo sviluppo di nuovi e migliori correttori per la terapia farmacologica del difetto di base in FC.

21. An RNA-approach based on ExSpeU1 for correction of CFTR splicing defects: analysis of efficacy in primary bronchial cells

Pagani F

Centro Internazionale di Ingegneria Genetica e Biotecnologie- ICGB, Trieste (FFCProject#5/2014, Extension)



Franco Pagani, primo da sinistra, e i suoi collaboratori

ExSpe U1s are modified U1 snRNAs whose specific binding in intronic sequences downstream the 5'ss rescue splicing of defective exons. We previously showed that ExSpeU1 efficiently correct multiple splicing defects in CFTR exon 13 (former name exon 12) minigene. Here we show that ExSpeU1s have a broader activity on CFTR gene as they correct splicing mutations also in exon 5. To investigate in detail the molecular mechanisms, we have characterized the composition of ExSpeU1s particles. Our result indicate that ExSpeU1RNA is assembled into RNA-protein complexes with similar characteristic to endogenous U1snRNPs. In addition,

through mutagenesis of RNA domains that form the particle, we identify associated proteins that are strictly required for their splicing rescue activity. Lastly, to explore the potential therapeutic effect of ExSpeU1 we evaluated their effect on CFTR protein. In a novel cellular model based on splicing competent minigenes we show that ExSpe U1 rescues splicing and protein function. ExSpe U1s represent an interesting RNA-based therapeutic strategy to correct CFTR splicing mutations distributed along the CFTR gene.

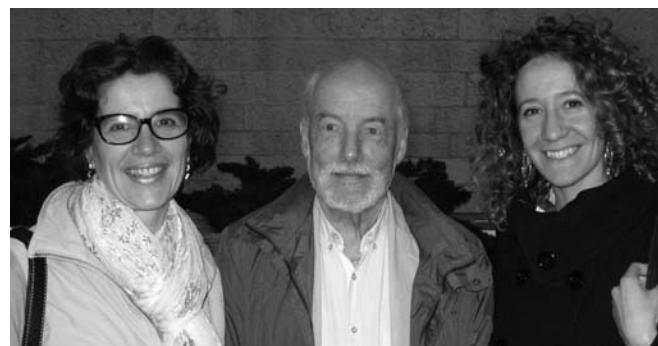
Un approccio basato su piccoli RNA per la correzione dei difetti di splicing del gene CFTR: analisi delle efficacia in cellule primarie bronchiali.

Gli ExSpe U1 sono dei piccoli RNA (U1 snRNAs modificati) che legando sequenze introniche a valle della giunzione di splicing al 5'ss sono in grado di correggerne il difetto di splicing. Precedentemente abbiamo dimostrato che gli ExSpeU1 possono correggere più difetti di splicing nel CFTR esone 13 (ex esone 12). In questo lavoro mostriamo che ExSpeU1s hanno un'attività più ampia in quanto correggono mutazioni di splicing anche nell'esone 5. Per studiare in dettaglio i meccanismi molecolari, abbiamo caratterizzato la composizione delle particelle ExSpeU1s. Il nostro risultato indica che ExSpeU1RNA è assemblato in complessi RNA-proteina con caratteristiche simili al U1snRNPs endogeno. Inoltre, mediante mutagenesi di domini RNA che formano la particella, abbiamo identificato proteine associate che sono strettamente necessarie per recuperare lo splicing aberrante. Infine per esplorare il potenziale effetto terapeutico di ExSpeU1 abbiamo valutato il loro effetto sulla proteina CFTR. In un nuovo modello cellulare basato su splicing -competent minigeni mostriamo che ExSpe U1 recupera la sintesi della proteina CFTR. Gli ExSpe U1 rappresentano un'interessante strategia terapeutica basata sull'RNA utile per la correzione di mutazioni di splicing distribuite lungo il gene CFTR.

22. Testing CFTR in epithelial organoids for drug development and diagnosis of cystic fibrosis.

Melotti P¹, de Jonge H²

¹Centro Fibrosi Cistica, Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata di Verona; ²Gastroenterology & Hepatology, Erasmus University Medical Center, Rotterdam (FFCProject#3/2014, Extension)



Paola Melotti, a sinistra, Hugo de Jonge e collaboratrice

CFTR function measurement is required for screening of potential CFTR correctors/potentiators and human models are needed, in particular for preclinical studies and personalized medicine.

Upon validation of European Cystic Fibrosis Society Intestinal Current Measurements (ICM) Standardized Operat-

ing Procedure (SOP) will be utilized in Verona for diagnosis of atypical cases in addition to nasal potential difference (NPD) already available. Rectal organoids and leukocytes of subjects tested by ICM and/or NPD will be tested for CFTR function. Setting up of this method in Verona has been completed since organoids from CF and non CF subjects have been developed whose CFTR function has been evaluated by swelling.

Hypothesis and objectives 1) To detect the effects on CFTR function of new molecules targeting F508del mutation. 2) To test CFTR function in organoids in the presence of mutations of uncertain clinical relevance. 3) To compare CFTR function in organoids with ICM, leukocytes assay and NPD in the same subjects.

Material, patients, methods Stem cells from intestinal biopsies from CF patients will form in vitro organoids whose CFTR activity will be detected by swelling using fluorescent dye. Molecules targeting F508del mutation provided by the Cystic Fibrosis Foundation Therapeutics will be tested.

Expected results and spin-offs Effects of new drugs on CFTR function could be detected in the same CF patient using four different methods (ICM, leukocytes assay, organoids swelling). CFTR function in the presence of mutations of uncertain clinical relevance will be tested in leukocytes and rectal organoids beside standardized ICM and NPD.

This study proposes a relatively simple and robust assay to facilitate diagnosis, functional studies, drug development as well as personalized medicine approaches in CF

CFTR in organoidi epiteliali: rilevanza per lo sviluppo di farmaci e la diagnosi della fibrosi cistica.

Ragioni dello studio La misurazione della funzione di CFTR risulta necessaria per lo screening di correttori CFTR correttori/potenziatori, in particolare per gli studi preclinici e della medicina personalizzata.

A seguito di convalida da parte della Società Europea di Fibrosi Cistica, misurazioni di corrente da cellule intestinali (ICM) secondo la Procedura Operativa Standardizzata (SOP), saranno disponibili a Verona per la diagnosi di casi atipici in aggiunta/alternativa a differenza con potenziale nasale (NPD) già disponibili. Organoidi rettali e leucociti di soggetti testati con ICM e / o NPD saranno testati per valutare la funzionalità di CFTR. La loro messa a punto del metodo è stata completata a Verona nel primo anno di studio sviluppando organoidi da soggetti affetti o meno da FC e monitorandone il rigonfiamento attribuito alla funzione di CFTR.

Ipotesi e obiettivi 1) Rilevare gli effetti sulla funzione di CFTR di nuove molecole aventi come bersaglio la mutazione F508del; 2) Testare la funzione CFTR in organoidi in presenza di mutazioni di incerta rilevanza clinica; 3) Confronto tra la funzione CFTR in organoidi con ICM, e tra NPD e saggio su leucociti negli stessi soggetti.

Materiali, i pazienti, i metodi Con le cellule staminali prelevate da biopsie rettali di pazienti con FC si svilupperanno organoidi in laboratorio e l'attività di CFTR sarà rilevata da rigonfiamento cellulare utilizzando un colorante fluorescente. Le molecole in grado di correggere la mutazione F508del fornite dalla Cystic Fibrosis Foundation Therapeutics saranno quindi testate su queste preparazioni cellulari.

Risultati attesi e spin-off Effetti dei nuovi farmaci sulla funzione di CFTR potrebbero essere rilevati nello stesso paziente CF utilizzando quattro diversi metodi (NPD, ICM, saggio sui leucociti, e mediante test di rigonfiamento degli organoidi). La funzionalità di CFTR in presenza di mutazioni di incerta rilevanza clinica sarà testata nei leucociti e negli organoidi contemporaneamente agli standard ICM e NPD. Questo studio propone tests relativamente semplici e robusti per facilitare la diagnosi, studi funzionali adatti per lo sviluppo di farmaci, così come una medicina personalizzata in CF.

23. Task force for CF 2014 : drug discovery for correctors and potentiators of F508del-CFTR

Galietta L¹, Bandiera T², Pedemonte N¹, Pesce E¹, Tomati V¹, Scudieri P¹, Ottonello G², Goldoni L², Venzano S²
¹U.O.C. Genetica Medica, Istituto Giannina Gaslini (IGG), Genova; ²Istituto Italiano di Tecnologia (IIT), Genova
(In progress)



Louis Galietta, responsabile del progetto, e Tiziano Bandiera, partner

Background F508del, the most frequent mutation among patients with cystic fibrosis (CF), causes a defective maturation of CFTR protein. The maturation defect can be treated with chemical compounds known as correctors. F508del and other mutations like G551D also show a gating defect that requires another type of compounds called potentiators. At the moment there are no F508del correctors with adequate efficacy. New potentiators are also required.

Hypothesis and objectives Our project aims at identifying new correctors and potentiators for the functional rescue of mutant CFTR protein.

Essential methods We screened a chemical library with 11,334 compounds using two different cell types (FRT and CFBE41o-) expressing CFTR with the F508del mutation. For the screening, we used two separate functional assays

designed to identify correctors and potentiators.

Results By high-throughput screening of the chemical library, we have found: i) 104 hits active as potentiators among which 5 compounds with activity comparable to that of VX-770; ii) 5 new correctors with activity on both FRT and CFBE41o- cells. All compounds have been confirmed and characterized with dose-response experiments and cytotoxicity tests.

Spin-off for research & clinical purposes The active compounds identified so far will be a starting point for the synthesis of novel potentiators and correctors having improved potency and efficacy.

Ragioni dello studio La mutazione più frequente nei pazienti con fibrosi cistica (FC) è F508del che provoca un difetto di maturazione della proteina CFTR. Il difetto di maturazione può essere trattato con opportuni composti chimici chiamati correttori. F508del ed altre mutazioni quali G551D presentano anche un difetto di attività che invece richiede un tipo diverso di composti chiamati potenziatori. Al momento non esistono correttori di F508del sufficientemente efficaci ed è opportuno trovare anche nuovi potenziatori.

Ipotesi e obiettivi Il nostro progetto si prefigge di trovare nuovi correttori e potenziatori per il recupero funzionale della proteina CFTR mutata.

Metodi essenziali Abbiamo effettuato lo screening su vasta scala di 11.334 composti utilizzando due diversi tipi di cellule (FRT e CFBE41o-) con espressione della proteina CFTR con la mutazione F508del. Per lo screening abbiamo utilizzato due saggi separati, per l'identificazione di correttori e potenziatori.

Risultati Gli screening effettuati hanno permesso di identificare: i) 104 composti attivi come potenziatori di cui 5 con attività paragonabile a quella del composto VX-770; ii) 5 nuovi correttori in grado di funzionare sia su cellule FRT sia su cellule CFBE41o-. Tutti i composti sono stati confermati e caratterizzati effettuando esperimenti di dose-risposta e test di tossicità.

Possibili ricadute per ricerca e clinica I composti attivi identificati serviranno da punto di partenza per la sintesi di nuovi composti potenziatori e correttori dotati di maggiore efficacia.

Proposal for clinical research and surrounding

24. Clinical implications of the natural history of insulin secretory and sensitivity defects in cystic fibrosis

Battezzati A¹, Colombo C², Mari A³

¹International Center for the Assessment of Nutritional Status (ICANS) - DeFENS Università di Milano; ²Dip. Scienze Materno Infantili, Università di Milano, Centro regionale FC; ³Istituto di Ingegneria Biomedica, ISIB-CNR, Padova (FFCProject#21/2013)

Background Cystic Fibrosis Related Diabetes (CFRD), the most prevalent comorbidity in patients who survive longer, is associated to pulmonary deterioration and nutritional decay even years prior to diagnosis. Insulin secretory defects and variable insulin resistance are prime suspects but their progression rates, determinants and implications for nutritional, respiratory and clinical outcomes remain undefined. Early nutritional failure has been related to future diabetes but the role of insulin secretory defects is putative. Under previous funding (FFC #16/2005) we reported the determinants of fasting glycemia and glucose tolerance at entry, and strong relation-



Alberto Battezzati, responsabile del progetto, e Carla Colombo

ships to respiratory and nutritional status. Prospective analysis is object of the present proposal. Key data (the lifelong time-course of respiratory and nutritional parameters) need to be "mined" from the Milan CF Center database, including body composition measurement by DXA, anthropometry and BIA.

Hypothesis and objectives

1) To provide CF population-specific estimates of the time

- course of secretory and insulin sensitivity defects quantified by a model previously developed*
- 2) *To identify genetic, clinical and nutritional risk factors associated to their individual progression rates*
 - 3) *To identify the associated risk of negative outcomes (progression to diabetes, nutritional decay, respiratory function deterioration, Pseudomonas and Cepacia colonization and mortality)*

Methods The project is organized in workpackages:

- WP1 All alive patients in follow-up will repeat OGTT (if non diabetic), respiratory function, bacterial colonization and nutritional status (DEXA, anthropometry and BIA)
- WP2 Data mining in CF Center electronic records to retrieve lifelong respiratory and nutritional parameters
- WP3 Validation studies in patient subsets of the relationship of anthropometric and bioimpedance screening measures to body composition reference methods.
- WP4 Modelling natural history of insulin secretion and sensitivity parameters. Relation to clinical parameters. Results dissemination

Expected results and spin-offs: Description of natural history of glucose tolerance defects, of the determinants of insulin secretory defects and of their consequences. Validation of anthropometry and BIA equations for nutritional screening. The project will improve current key-strategies to diagnose and to devise early interventions for CF metabolic and nutritional comorbidities

The preliminary results show that with advancing age the oral glucose tolerance test profile changes showing increased glucose concentrations at 60 min because of a progressive delay in the insulin secretory response to glucose. A reduced secretory response is associated to an increased risk of CFRD in the long-term.

Implicazioni cliniche della storia naturale dei deficit di secrezione e sensibilità insulinica in fibrosi cistica

Ragioni dello studio Il diabete in Fibrosi Cistica (CFRD), è la più frequente comorbilità nei pazienti che sopravvivono più a lungo ed è associato a compromissione respiratoria e decadimento nutrizionale anni prima della diagnosi. Deficit di secrezione e sensibilità insulinica sono coinvolti ma le loro implicazioni per gli outcomes nutrizionali respiratori e clinici restano poco definiti. Grazie ad un precedente finanziamento (FFC #16/2005), abbiamo studiato i determinanti della glicemia a digiuno e della tolleranza al glucosio all'ingresso nello studio e la relazione con la funzionalità respiratoria. A seguito del follow-up quasi decennale della popolazione in studio con ripetute misurazioni individuali della tolleranza al glucosio, si è aperta ora la possibilità di analizzare prospettivamente il decorso temporale individuale.

Obiettivi dello studio 1) completare la descrizione della storia naturale di CFRD e malnutrizione avviato negli ultimi 10 anni, con particolare riferimento alla relazione tra malnutrizione, alterazioni glicometaboliche e funzionalità respiratoria; 2) individuare i disturbi di metabolismo glucidico misurando secrezione e sensibilità insulinica mediante modellizzazione; 3) mettere a punto protocolli di screening nutrizionale e di diagnostica nutrizionale con metodologie gold-standard di misura della composizione corporea, del dispendio energetico e di biomarker nutrizionali;

Metodo Il progetto è organizzato in workpackages:

- WP1 I pazienti in follow-up ripeteranno un carico orale di glucosio, la funzionalità respiratoria e lo stato nutrizionale
- WP2 recupero di dati clinici, nutrizionali e respiratori dal database elettronico relativo ai pazienti in follow-up
- WP3 Messa a punto di metodologie di screening per la valutazione nutrizionale
- WP4 Modellizzazione della storia naturale dei difetti di se-

crezione e sensibilità insulinica e relazione con i parametri clinici. Si ritiene di descrivere la storia naturale del CFRD e valutare l'importanza del deficit di secrezione insulinica nel determinare decadimento nutrizionale e respiratorio. Il progetto potrebbe migliorare strategie diagnostiche e terapeutiche promuovendo interventi precoci per le comorbidità metaboliche e nutrizionali.

I risultati preliminari mostrano che con l'avanzare dell'età il profilo del carico orale di glucosio si modifica in particolare mostrando iperglicemia a 60 minuti a causa di una progressiva riduzione della capacità di rispondere tempestivamente con un'adeguata secrezione insulinica. La riduzione della capacità secretoria dimostra un valore prognostico a lungo termine per lo sviluppo di diabete.

25. Properties of airway mucus in cystic fibrosis: their modification by changes in the activity of CFTR and after application of bicarbonate.

Zegarra OL¹, Vassalli M²

¹U.O.C. Genetica Medica, Istituto "Giannina Gaslini", Genova; ²Istituto di Biofisica del Consiglio Nazionale delle Ricerche, Genova (FFCProject#29/2014)



Olga Zegarra, al centro, e le sue collaboratrici

Most of the health problems experienced by cystic fibrosis (CF) patients arise from a thick mucus. In particular, in the airways, the difficulty to get rid of mucus with the cough leads to frequent infections and bacterial colonization. Mucins are mucus glycoproteins that are kept compact inside the cells. However, when mucus is secreted towards the airways, mucins have to expand to function correctly. In CF, this does not happen and recent data suggest that mucus is so thick in CF not only due to reduced fluid secretion, but because the lack of bicarbonate secretion across mutated CFTR does not allow mucins to expand. We aim to study the viscoelastic properties of mucus released by CF and non-CF airway epithelia in vitro. Our preliminary data indicate that the diffusion of fluorescent beads inside mucus from F508del epithelia is slower than inside mucus from non-CF epithelia. We plan to evaluate whether compounds that recover the activity of mutated CFTR (Ivacaftor and CFTR correctors) and compounds that act on other epithelial membrane proteins, are able to restore the normal properties of mucus and thin it. Finally, we will study the viscoelastic properties of sputum from CF patients before and after the application of bicarbonate. The results of our investigation will permit to determine whether bicarbonate can improve the properties of mucus near normal levels and which is the best concentration to obtain it. This information will allow the design of clinical trials for CF patients, using inhaled bicarbonate, with better probability to succeed. For some CF mutations, a new drug (Ivacaftor) that seems to cause a sig-

nificant improvement in CF status has already reached the marked. Nevertheless, for most CF mutations there is still no cure. Bicarbonate might represent a mutation-independent and low-cost therapy to clear out the mucus that accumulates in the airways, and in this way reduce the risk of infections and improve lung function.

Proprietà del muco delle vie aeree in fibrosi cistica: modifiche dovute a cambiamenti nell'attività di CFTR e dopo applicazione di bicarbonato.

La maggior parte dei problemi dei pazienti colpiti da fibrosi cistica (FC) dipende dalla presenza di un muco molto denso, soprattutto nelle vie aeree, dove la difficoltà di eliminare questo muco mediante la tosse porta a infezioni e alla colonizzazione batterica. Le mucine, ossia delle glicoproteine del muco, sono molto compatte quando stanno dentro le cellule, ma quando vengono secrete nelle vie aeree dovrebbero espandersi per poter funzionare correttamente. In FC questo non accade e dati recenti suggeriscono che il muco sia così denso, non solo per la mancanza di fluido, ma principalmente perché la mancata secrezione di bicarbonato dovuta alle mutazioni di CFTR non permette una buona espansione delle mucine. Noi proponiamo qui di analizzare le proprietà del muco prodotto *in vitro* da epitelii delle vie aeree ottenuti da pazienti FC e da controlli non-FC. I nostri dati preliminari dicono che la capacità di piccole biglie fluorescenti di muoversi dentro il muco di epitelii F508del è ridotta rispetto al muco di epitelii non-CF. Vorremmo valutare se i composti chimici che aumentano l'attività della CFTR mutata (come il potenziatore Ivacaftor e alcuni correttori) e vari composti che agiscono su altre proteine della membrana dell'epitelio, migliorano le caratteristiche del muco rendendolo meno denso e, soprattutto, stabilire se il bicarbonato può farlo. Per ultimo, vogliamo studiare le proprietà viscoelastiche dello sputo di pazienti FC prima e dopo l'applicazione di bicarbonato. I risultati di queste analisi ci permetteranno di stabilire se l'applicazione di bicarbonato ha la capacità di riportare le proprietà del muco dei pazienti a livelli simili al normale, e a quale concentrazione sia possibile ottenerlo. Quest'informazione permetterebbe di progettare studi clinici per i pazienti FC, usando bicarbonato per via inalatoria, con migliori probabilità di successo. Esiste già un farmaco, Ivacaftor, che sembra produrre un importante miglioramento nei pazienti FC che presentano un tipo particolare di mutazioni. Purtroppo, per la maggior parte delle mutazioni non c'è ancora cura. Il bicarbonato potrebbe rappresentare una terapia, indipendente dal tipo di mutazione e a basso costo, per liberare le vie aeree del muco denso e in questo modo ridurre il rischio di infezioni e migliorare la funzionalità polmonare.



Gianluigi Zaza, responsabile del progetto

tients with cystic fibrosis (CF) undergoing lung transplantation. In this context epithelial to mesenchymal transition (EMT) in airway cells may play a pivotal role.

Objectives 1. To assess the capability of EVE to induce EMT in primary human bronchial epithelial cells (CF and not CF) and immortalized cell lines [bronchial epithelial cells wild-type (Nuli-1), homozygous for the delta F508 cystic fibrosis-causing mutation (Cufi-1) and human type II pneumocyte-derived A549 cell line]. 2. To identify by several biomolecular strategies (including microarray and miRNAs assay) early diagnostic EMT biomarkers and therapeutic targets to minimize onset/progression of pulmonary adverse effects in mTOR-I-treated CF patients receiving lung transplantation.

Preliminary results We have recently published that high doses of EVE (>100 nM) were able to induce EMT in renal proximal tubular epithelial cells. This biological effect was similar in human type II pneumocyte-derived A549 cell line and Nuli-1 cell lines. Our preliminary results showed a significant EVE-induced up-regulation of several EMT markers (e.g., a-SMA, Vimentin, Fibronectin, MMP-2) in these airway cells lines at both gene and protein level.

Project description To measure differences in gene expression and protein levels of EMT markers between untreated versus EVE-treated cells (primary human bronchial epithelial cells, A549, Nuli-1 and Cufi-1) by several lab strategies (RT-PCR, western blot, immunofluorescence, immunocytology). [Aim 1]

To identify new genes and miRNAs deregulated in EVE-treated cells undergoing EMT by specific new lab methods (e.g., Microarray). The obtained results will be validated by classical biomolecular strategies (e.g., western blot, RT-PCR). [Aim 2-3]

Anticipated output We expect to define a cut-off dose of EVE able to induce EMT in different airway cell lines. Moreover, by microarray analysis and miRNAs assay, we expect to identify new elements involved in the complex biological machinery associated with the mTOR-I-related pulmonary fibrosis.

Relevance to Italian cf foundation To identify new biomarkers useful to adjust mTOR-inhibitors dosage optimizing their therapeutic effects and minimizing fibrosis-related pulmonary complications with a consequent reduction of expensive therapies and hospitalization of cystic fibrosis patients undergoing pulmonary transplantation.

Studio *in vitro* degli effetti pro-fibrotici dell'everolimus in diverse linee cellulari polmonari e bronchiali. Ricerca di nuovi biomarker per ottimizzare il trattamento immunosoppressivo con inibitori di MTOR in pazienti con fibrosi cistica portatori di trapianto polmonare

Introduzione: Diversi studi hanno sottolineato che gli inibitori di mTOR, Sirolimus ed Everolimus (EVE), potenti farmaci immunosoppressori utilizzati in pazienti affetti da fibrosi cistica (FC) sottoposti a trapianto di polmone, sono in grado

26. *In vitro study of potential pro-fibrotic effect of Everolimus in different human airway cell lines. Searching for new biomarkers to optimize MTOR-inhibitor immunosuppressive treatment of cystic fibrosis patients undergoing lung transplantation*

Zaza G¹, Chilosi M²

¹Unità di Nefrologia, Dip. di Medicina, Azienda Universitaria Ospedaliera, Verona; ²Dip. di Patologia e Diagnostica, Università di Verona (FFCProject#28/2014, New)

Background/rationale Several studies have reported an high rate of pulmonary fibrosis-associated adverse effects in patients treated with mTOR inhibitors, sirolimus and everolimus (EVE), potent immunosuppressants used in pa-

di determinare l'insorgenza di importanti eventi avversi polmonari di natura fibrotica. Sembra, inoltre, che nella genesi di queste complicanze giochi un ruolo primario l'attivazione del processo di transizione epitelio-mesenchimale (EMT) delle cellule epiteliali polmonari e bronchiali.

Dati preliminari: Abbiamo recentemente dimostrato che alte dosi di EVE (> 100 nM) sono in grado di indurre EMT nelle cellule epiteliali del tubulo prossimale renale. Lo stesso effetto biologico si verificava su linee di pneumociti di II tipo (cellule A549) e cellule di epitelio bronchiale (Nuli-1). I risultati ottenuti in queste linee cellulari confermavano una iperespressione di diversi marker di EMT (ad esempio, a-SMA, vimentina, fibronectina, MMP-2) sia a livello genico sia proteico dopo trattamento con elevate concentrazioni di EVE (>100 nM).

Oggetto dello studio: Pertanto oggetto del nostro studio sarà: 1. Valutare la capacità dell'EVE di indurre EMT nelle cellule epiteliali bronchiali umane primarie (CF e non CF) e in linee cellulari immortalizzate [cellule epiteliali bronchiali wild-type (Nuli-1), omozigoti per la mutazione delta F508 (CUFI-1) e A549]. 2. Identificare, attraverso diverse strategie biomolecolari (incluso microarray e miRNA test), biomarcatori diagnostici precoci di EMT e target terapeutici per minimizzare l'insorgenza/progressione degli eventi avversi polmonari nei pazienti con FC portatori di trapianto polmonare trattati con mTOR-I.

Metodologia Per misurare le differenze nell'espressione genica e proteica dei marker di EMT tra cellule trattate con EVE versus non-trattate (cellule epiteliali bronchiali umane primarie, A549, Nuli-1 e CUFI-1) saranno utilizzate diverse tecniche biomolecolari incluso RT-PCR, western blot, immunofluorescenza e immunocitologia.

Nuove tecnologie high-throughput (microarray e miRNA) associate a tecniche classiche di biologia molecolare saranno, poi, utilizzate per identificare nuovi geni e miRNA deregolati nelle cellule trattate con EVE in cui ci sia avvenuta la transizione delle cellule epiteliali verso un fenotipo mesenchimale.

Risultati attesi Dal nostro studio, ci aspettiamo di identificare una dose "cut-off" di EVE in grado di indurre EMT nelle diverse linee cellulari oggetto di studio. Inoltre, dall'analisi microarray e dei miRNA, ci aspettiamo di riconoscere nuovi elementi chiave coinvolti nel complesso meccanismo biologico associato alla fibrosi polmonare mTOR-I-correlata.

Rilevanza per la fondazione italiana fibrosi cistica Il nostro progetto permetterà l'identificazione di nuovi biomarcatori che, in futuro, potrebbero rivelarsi utili nella pratica clinica nel suggerire la corretta posologia degli inibitori di mTOR da somministrare in pazienti con FC portatori di trapianto polmonare. Inoltre, la minimizzazione delle complicanze polmonari mTOR-I-correlate potrebbe ridurre significativamente i costi gestionali e le ospedalizzazioni di questi pazienti.

27. Nasal epithelial cells as a novel diagnostic approach for cystic fibrosis and CFTR related-disorders

Castaldo G

CEINGE-Biotecnologie Avanzate srl, Napoli
(FFCProject#7/2013, In progress)

Background CF patients have specific symptoms, increased sweat chloride and 2 mutations in the CFTR gene, even if first level molecular analysis lacks to identify mutations in about 15% of alleles. In addition to the classic CF, atypical forms (CFTR-RD) have been described that do not meet diagnostic criteria for CF, show normal or borderline sweat test and often a single mutation. Sequencing analysis can identify a second mutation but in several cases it may be of uncertain pathogenic significance requiring a complex in vitro analysis to determine its pathogenic effect.



Giuseppe Castaldo, secondo da sinistra, e il suo gruppo

Hypothesis & objectives The model of epithelial nasal cells from patients allows to study the effect of mutations of uncertain significance. The main objectives of the study are to develop this model and a series of advanced molecular technologies that may help to define the molecular effect of CFTR mutations. The model will be applied on a large population of patients, carriers and controls.

Essential methods A sample of nasal epithelial cells is obtained by nasal brushing from CF and CFTR-RD patients with different genotypes. The analysis is performed as follows: RT-PCR for quantitative assay of CFTR mRNA to study the effect of mutations that potentially impair gene expression; RT-PCR-electrophoresis to assess the splicing effect of mutations that lie in exon-intron boundaries; halide-sensitive fluorescent assay to quantitate the CFTR gating activity.

Results i) we set up the optimal sampling procedures and the conditions to store the cells before culturing (this permits to mail the cells sampled in other centers); ii) we set up the culture of cells (and the storage conditions of cells for longer period before re-culturing); iii) we verified (by the use of specific stains) that the culture does not impair the phenotype of nasal epithelial cells; iv) we studied the quantitative CFTR mRNA expression by 30 samples from CF patients and controls, also testing the effect of butyrate on CFTR expression; v) we studied the splicing effect of 8 novel mutations; vi) we analyzed by the halide-sensitive fluorescent system 20 samples from patients bearing different genotypes, several carriers and control subjects.

Spin-off for research & clinical purposes The model of nasal epithelial cells from patients may be useful to improve the efficiency of molecular diagnosis of the classic and atypical forms of CF. This approach, once validated on a large number of cases will be easily used in the routine setting.

Cellule epiteliali nasali: un nuovo approccio per la diagnosi di Fibrosi Cistica e delle forme atipiche

Ragioni dello studio I pazienti FC presentano sintomi specifici, aumento del cloro nel sudore e 2 mutazioni del gene CFTR, anche se l'analisi molecolare di I livello non identifica la mutazione causale in circa il 15% degli alleli. Oltre alla FC classica, esistono forme atipiche (CFTR-RD) che si manifestano con sintomi variabili, test del sudore normale o borderline e spesso una sola mutazione. L'analisi di sequenziamento può aumentare la detection rate dell'analisi molecolare ma spesso rivela mutazioni di incerto significato e risulta quindi necessaria un'analisi in vitro molto complessa per stabilire se si tratta di una mutazione responsabile di malattia.

Ipotesi ed obiettivi Il modello delle cellule epiteliali nasali da paziente consente di studiare l'effetto di mutazioni di incerto significato e di facilitare la diagnosi nei casi dubbi. I principali obiettivi dello studio sono quelli di sviluppare questo modello applicando una serie di tecnologie che possano aiutare la diagnosi precisa di FC e CFTR-RD.

Metodi essenziali Il campione di cellule è ottenuto at-

traverso brushing nasale da pazienti con diverso genotipo. L'effetto delle mutazioni è analizzato come segue: analisi quantitativa del trascritto di CFTR (per saggiare l'effetto di mutazioni che possono alterare l'espressione di CFTR); RT-PCR ed elettroforesi del trascritto per definire l'effetto di mutazioni che possono alterare lo splicing; saggio fluorescente di permeabilità al cloro per l'analisi quantitativa dell'attività canale della proteina CFTR.

Risultati Durante il I anno abbiamo: i) messo a punto le condizioni per il prelievo e le condizioni per conservare le cellule prima della coltura (per consentire l'invio di campioni prelevati in altri centri); ii) sviluppato le condizioni per la coltura (e le condizioni di conservazione a lungo termine delle cellule che possono essere ricoltivate successivamente); iii) verificato, attraverso colorazioni specifiche, che la coltura non modifica il fenotipo delle cellule epiteliali; iv) analizzato l'espressione di CFTR in 30 campioni da pazienti e controlli; v) studiato l'effetto sullo splicing di 8 nuove mutazioni; vi) analizzato, mediante sonde fluorescenti, l'attività di gating di CFTR in campioni ottenuti da 20 pazienti con diverse mutazioni, nonché da portatori e controlli.

Possibili ricadute per ricerca e clinica Una volta validato su un alto numero di casi il modello delle cellule nasali potrà migliorare l'efficienza della diagnosi molecolare.

28. Citizens' jury and decision making on cystic fibrosis carrier screening: to screen or not to screen?

Mosconi P¹, Castellani C²

¹Ist. di Ricerche Farmacologiche "Mario Negri" Laboratory for medical research and consumer involvement; ²Centro fibrosi cistica, AOUI Verona (FFCProject#22/2013, In progress)



Paola Mosconi, responsabile del progetto

Background CF carrier screening is a genetic test to identify carriers among reproductive adults, namely the so-called heterozygotes who have one copy of the mutated gene and therefore are not sick, but can transmit the disease to a child if the partner is carrying a similar mutation. Over the past 10-15 years in the western part of the Veneto and Trentino-Alto Adige, the test has been used with caution and offered to those who already had a case of cystic fibrosis in the family. For the past ten years the University of Padua took a different policy and launched a campaign of active offer of CF testing to the general population. As a consequence, in the eastern region thousands of tests have been performed, identifying CF carriers. In the eastern Veneto region, the number of newborns with cystic fibrosis has fallen year after year until almost to zero. While this decrease was lower in the western part of the Veneto and Trentino-Alto Adige.

Hypothesis and objectives The aims of this project - which follows a pilot project supported by the FFC http://www.partecipasalute.it/cms_2/node/1840 - are to organize "The

jury of citizens" in two other Italian cities to consolidate the results of the pilot project in order to facilitate the implementation on a national scale, and launch an internet survey to compare opinions and attitudes of all stakeholders involved.

Methods During the first year of the project, in Pistoia and Palermo had been organized two juries of citizens to effectively involve citizens in the decision-making process. The citizens were involved through associations. The jurors received a 30 pages informative booklet 2 weeks before the meeting and participated to two days fully dedicated to the topic with experts. At the end of this process they were able 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 cystic fibrosis?"

Results The jury of Pistoia (May 2014) has involved 15 jurors who unanimously have expressed in favor of Yes; the second jury in Palermo (September 2014) involved 16 jurors, 9 were in favor of Yes and 7 in favor of No.

Spin-off for research & clinical purposes All data collected by the juries will be made public and presented in a final conference where the implementation in the clinical practice of the results will be discussed.

Fare o non fare lo screening del portatore sano per la fibrosi cistica? La voce dei cittadini e della comunità scientifica

Ragioni dello studio Lo screening del portatore prevede un esame genetico per individuare tra gli adulti in età riproduttiva i portatori sani, cioè i cosiddetti eterozigoti coloro che hanno una sola copia del gene mutato e quindi non sono malati, ma possono trasmettere la malattia a un figlio se anche l'altro genitore è portatore di una mutazione simile. Negli ultimi 10-15 anni nella parte occidentale del Veneto ed in Trentino Alto-Adige il test del portatore è stato offerto a coloro che avevano già un caso di fibrosi cistica in famiglia. Da una decina d'anni l'Università di Padova ha avviato una campagna di offerta attiva del test alla popolazione generale. Nella parte orientale della regione si sono così eseguite decine di migliaia di test, individuando migliaia di portatori e decine di coppie in cui entrambi sono eterozigoti. A seguito di questa attività, nella parte orientale della regione Veneto il numero di nuovi nati con la fibrosi cistica è sceso sino quasi ad annularsi, mentre questa diminuzione è stata più bassa nella parte occidentale del Veneto e in Trentino-Alto Adige.

Ipotesi e obiettivi Obiettivo del progetto, che segue il progetto FFC http://www.partecipasalute.it/cms_2/node/1840, è quello di organizzare la Giuria dei Cittadini in altre due realtà italiane per consolidare il risultato e facilitarne l'implementazione su scala nazionale, nonché avviare una consultazione pubblica tramite questionario via internet.

Metodi Durante il primo anno si sono organizzate, a Pistoia e a Palermo, due "Giurie dei cittadini". I cittadini sono stati coinvolti attraverso le associazioni sanitarie e non. I giurati selezionati – a seguito di un processo informativo che comprendeva l'invio del materiale informativo 2 settimane prima delle due giornate interamente dedicate all'argomento con esperti – sono stati in grado di 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 fibrosi cistica?".

Risultati La Giuria di Pistoia (maggio 2014) ha visto il coinvolgimento di 15 giurati i quali all'unanimità si sono espressi a favore del Si; la Giuria di Palermo (settembre 2014) con 16 giurati: 9 si sono espressi a favore del Si e 7 a favore del No.

Possibili ricadute per ricerca e clinica Tutti i dati raccolti tramite le giurie saranno resi pubblici e discussi in un convegno finale dove verrà discussa l'implementazione pratica dei risultati ottenuti.

POSTER SESSION 2

Journey across CF inflammation

29. Phosphodiesterases type-4 (PDE4) inhibitors and β 2-adrenergic agonists to reduce neutrophilic lung inflammation in cystic fibrosis. Preclinical studies and identification of biomarkers of efficacy

Evangelista V

Dip. di Farmacologia Cellulare e Traslazionale, Consorzio Mario Negri Sud, Chieti (FFCProject#16/2013, In progress)



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

Background Lung disease, in cystic fibrosis (CF), develops with time because of neutrophilic inflammation. However, current therapies for CF lack of specific approaches to counteract exaggerated recruitment and tissue damaging activities of neutrophils migrated into the lungs.

Hypothesis and objectives Our previous studies (FFC#21/2011), indicated that PDE4 blockade, controls neutrophilic activities, relevant to the pathogenesis of pulmonary disease in CF. The aim of the present project is to define the effect of PDE4 inhibitors alone or combined with β2 adrenergic agonists on neutrophils from CF patients, *in vitro*, and to test the efficacy and potential side effects of this pharmacological treatment in mice subjected to chronic *Pseudomonas aeruginosa* (PA) infection.

Essential methods CF patients were recruited at the "Centro Regionale Fibrosi Cistica, Ospedale di Atri". Selective PDE-4 inhibitors tested in this study were: rolipram, roflumilast, an oral selective PDE4 inhibitor approved for treatment of COPD, its active metabolite roflumilast-N-Oxide (RNO), and formoterol a long acting β2 adrenergic agonist.

Results PDE4 inhibitors curbed neutrophil extracellular traps (NETs) formation, preserved cellular integrity, reduced microparticles formation and IL-8 secretion by healthy and CF neutrophils. The efficacy of PDE4 inhibitors was significantly increased by formoterol. Notably, pharmacological effects appeared significantly higher in normal neutrophils in which CFTR was blocked by CFTRinh-172 as well as in neutrophils isolated from CF patients, compared to untreated normal neutrophils, suggesting the existence of an unexpected interference between the activity of CFTR and cAMP metabolism and/or cAMP-modulated pathways. Experiments in a mouse model of PA chronic infection indicated that oral administration of roflumilast, reduced several markers of neutrophilic inflammation in the lungs but did not affect the anti-bacterial immune response. Finally we found increased leukocyte-derived derived microparticles in circulating blood of CF patients suggesting a role for measurement of these cellular fragments as surrogate marker in explorative clinical trials testing

the efficacy of PDE4 inhibitors on neutrophilic inflammation in CF patients.

Spin-off for research & clinical purposes Identification of PDE4 and β2 adrenergic receptors as novel targets to reduce neutrophilic inflammation and lung damage in CF. PDE4 inhibitors are currently under clinical use.

Inibitori di fosfodiesterasi tipo 4 (PDE4) e agonisti β2-adrenergici per ridurre l'infiammazione polmonare nella fibrosi cistica. Studi preclinici e identificazione di bio-marcatori di efficacia

Ragioni dello studio. Il danno polmonare, nella fibrosi cistica (FC), si sviluppa come conseguenza di una cronica infiammazione che coinvolge principalmente i leucociti neutrofili (PMN).

Ipotesi e obiettivi. Il progetto è basato su precedenti risultati (FFC#21/2011) che dimostrano che il blocco di PDE4 attiva segnali che controllano l'attività dei PMN e si propone 3 obiettivi: 1) Definire l'effetto di inibitori di PDE4, da soli e in combinazione con agonisti β2-adrenergici, *in vitro*, in PMN isolati da pazienti FC. 2) Testare l'efficacia e i potenziali effetti collaterali della terapia in un modello di infezione cronica da *Pseudomonas aeruginosa* nel topo. 3) Identificare marcatori di efficacia.

Metodi. I pazienti FC sono stati reclutati al "Centro Regionale Fibrosi Cistica, Ospedale di Atri". Inibitori selettivi di PDE-4 testati nello studio: rolipram, roflumilast, un inibitore orale approvato per uso clinico nella BPCO, il suo metabolita attivo, roflumilast-N-Oxide (RNO) e il formoterolo un agonista β2 adrenergico.

Risultati Gli inibitori di PDE4 bloccano la formazione di "neutrophil extracellular traps" (NETs), preservano l'integrità cellulare, riducono la formazione di microparticelle e la produzione di IL-8 da parte di PMN di soggetti normali e di pazienti FC. La loro efficacia è potenziata dal formoterolo.

Gli effetti farmacologici osservati appaiono consistentemente più rilevanti nei confronti dei PMN normali in cui il CFTR è stato bloccato con CFTRinh-172 o dei PMN di pazienti FC, in paragone con i PMN normali non trattati con CFTRinh-172, suggerendo l'esistenza di un meccanismo attraverso cui CFTR influenza le vie metaboliche che regolano e/o sono regolate dall'AMPc. Esperimenti in un modello di infezione cronica da *Pseudomonas aeruginosa* nel topo dimostrano che la somministrazione orale di roflumilast, riduce vari marcatori di infiammazione nei polmoni ma non influenza la risposta antibatterica. Infine abbiamo dimostrato un aumento di micro particelle di origine leucocitaria nel sangue di pazienti FC, suggerendo un ruolo per la misura di questo parametro come indicatore di efficacia in trial clinici che testino inibitori di PDE4 sull'infiammazione neutrofilica in pazienti CF.

Possibili ricadute per ricerca e clinica L'inibitore orale, selettivo per le PDE4 è attualmente in uso clinico per trattamento della BPCO. Eventuali risultati positivi nei nostri studi preclinici potrebbero essere rapidamente verificati in test clinici in pazienti con FC.

30. Development of a CF, IL-8/NF-KB transgenic mouse model for the *in vivo* long-term monitoring of the inflammatory response induced by bacteria treated or not with azithromycin

Lleò MM

Dip. di Patologia e Diagnostica, Sez. Microbiologia,
Università di Verona (FFCProject#18/2013, In progress)



Maria Lleò, responsabile
del progetto

Background and objectives To study the mechanisms of lung chronic inflammation in cystic fibrosis (CF) and to evaluate the anti-inflammatory role of some candidate molecules, a number of in vitro and in vivo protocols in animal models have been used. Frequently, in mouse models the inflammation is induced by injection of bacterial lipopolysaccharide (LPS) and monitored by analyzing the presence of inflammation markers in the bronchoalveolar lavage of the killed mouse.

Methods In this study we have used a mouse model, transiently expressing the luciferase reporter gene under the control of an IL-8 or of a TNF-alfa promoter, which is suitable to functionally study inflammation via a long term, in vivo monitoring of bioluminescence (BL) images of the damaged lung.

The IL-8 promoter construct was introduced both in WT and in CTRdel mice and the lung inflammation was stimulated using *Pseudomonas* LPS (0.625 and 3.125 ug): a clear BL signal both in WT and CF mice was observed also at 48 and 96 hours after the introduction of the bacterial product. A delay was detected in CF mice for the inflammation level to increase (4 versus 24 hours) but in this type of mice the signal is higher and more durable with respect to that in WT mice lasting at least 48 hours.

The transgenized mouse was also used to in vivo monitoring the IL-8 mediated lung inflammation induced by *Pseudomonas aeruginosa* secreted virulence factors, specifically metalloproteases and to test the possible anti-inflammatory activity of azithromycin mediated by its hypothetical effect on *Pseudomonas* metalloproteases.

Preliminary results A culture supernatant from a *P. aeruginosa* strain, isolated from the sputum of a CF patient and showing MP activity, was obtained after growth in the absence or presence of a sub-MIC dose of azithromycin. The pro-inflammatory activity of the VR1 supernatant was clearly visible in vivo from 4 to 48 hours after the instillation in a WT transgenized mice while a significant decrease of this response was observed with the supernatant from VR1 grown in the presence of antibiotic.

Spin-off for research The present animal model has revealed useful to the in vivo, long term monitoring of the effect of bacterial virulence factors in the lung tissue and the possible beneficial, anti-inflammatory effect of molecules for therapeutic use.

Sviluppo di un modello di topo con fibrosi cistica, transgenico per IL-8/NF-KB, per il monitoraggio in vivo e a lungo termine della risposta infiammatoria indotta da batteri trattati e non con azitromicina

Premesse e obiettivi Un modello animale di topino transgenico è stato utilizzato per monitorare in vivo l'infiamma-

zione polmonare indotta da fattori di virulenza rilasciati da *Pseudomonas aeruginosa* durante l'infezione delle basse vie respiratorie.

Disegno e Metodi Nell'animale viene introdotto un promotore dell'infiammazione (via interluchina 8) ed il gene della luciferasi per cui con questo sistema è possibile monitorare l'infiammazione polmonare perché il tessuto infiammato diventa bioluminescente. Questo modello è stato anche utilizzato per saggiare la possibile attività anti-infiammatoria dell'antibiotico azitromicina (AZI) mediata dal suo ipotetico effetto sulle metalloproteasi batteriche.

Risultati preliminari Il sistema di monitoraggio è stato introdotto sia in topi sani che in topi con fibrosi cistica e gli animali sono stati trattati con una tossina batterica, LPS, in grado di stimolare l'infiammazione nel polmone: tale infiammazione è stata rilevata mediante bioluminescenza nel topo sano e in quello FC anche dopo 96 ore dopo l'inoculo del prodotto batterico.

L'infiammazione polmonare è stata anche rilevata con lo stesso sistema nei topi sani dopo inoculo di un sopraventante culturale (un materiale contenente i prodotti sintetizzati e secreti dai batteri) ottenuto da un ceppo di *Pseudomonas aeruginosa* fatto crescere in presenza o assenza di una dose minima dell'antibiotico/anti-infiammatorio azitromicina.

L'attività pro-infiammatoria del sopraventante era ben visibile già dopo 4 ore, e fino a 48 ore, dopo l'inoculazione del materiale nel topino transgenico mediante immagini bioluminescenti del polmone. Al contrario, la risposta infiammatoria era fortemente ridotta se veniva inoculato il sopraventante ottenuto dopo crescita del batterio in presenza di azitromicina dimostrando così che l'antibiotico avrebbe un effetto anti-infiammatorio perché riduce la sintesi di metalloproteasi nel batterio.

Potenzialità dello studio Il modello animale qui descritto si è rivelato utile per il monitoraggio in vivo e a lungo termine dell'effetto dei fattori di virulenza batterici sul tessuto polmonare e per dimostrare l'effetto benefico e anti-infiammatorio di molecole per uso terapeutico come l'azitromicina.

31. TRPA1 channels as novel molecular targets for anti-inflammatory therapies in CF lung

Cabrini G¹, Nassini R²

¹Laboratorio di Patologia Molecolare, Dip. di Patologia e Diagnostica, Università di Verona; ²Dip. di Scienze Sanitarie, Unità di Farmacologia Clinica e Oncologica, Università di Firenze (FFCProject#17/2014, New)



Giulio Cabrini, primo da destra, e il suo team di ricerca

Background Hallmark of cystic fibrosis (Cf) lung disease is a massive infiltrate of neutrophils into the bronchial lumen. Neutrophils are continuously activated by bacterial products, releasing high amounts of DNA, proteases and radicals

of oxygen species (ROS) which worsen the tissue damage produced by bacterial infection. Moreover, *P.aeruginosa* infection causes increased release of ROS from airway epithelia. Among the human cellular channels which are able to recognize ROS, the Transient Receptor Potential Subfamily A (TRPA1) is of peculiar interest, due to the potential role in inflammatory processes.

Hypothesis and objectives The main objective of this project is to investigate the involvement of TRPA1 channels within the ROS-mediated pro-inflammatory signaling pathways in airway epithelial cells upon infection of *P.aeruginosa*.

Essential methods Several airway epithelial cell lines and primary culture of bronchial epithelial cells derived from patients affected by CF and from healthy subjects will be stimulated by *P.aeruginosa* infection and ROS sources in order to mimic the CF lung pathology condition.

Preliminary results We already found functional expression of TRPA1 channels in human bronchial epithelial cell lines by testing both specific agonists and inhibitors, and we found that inhibition of TRPA1 channels reduces *P.aeruginosa*-dependent expression of the chemokine IL-8.

Expected results and their significance We wish to define the role of TRPA1 channels in CF lung inflammation and the main mechanisms of TRPA1 function regulation. The results obtained will provide the rationale to test the pharmacological inhibitors of TRPA1 channels already available for other diseases, in the perspective of drug repositioning to cure CF lung disease.

Il canale TRPA1 come nuovo bersaglio molecolare per lo sviluppo di terapie anti-infiammatorie in FC

Ragioni dello studio Il lume bronchiale dei pazienti affetti da fibrosi cistica (FC) presenta una grande quantità di neutrofili polimorfonucleati, i quali vengono continuamente attivati da prodotti di degradazione batterica e rilasciano grandi quantità di DNA, proteasi e radicali dell'ossigeno (ROS), contribuendo essi stessi al danneggiamento del tessuto polmonare. Inoltre, l'infezione da parte di *P.aeruginosa* comporta un aumento di rilascio di ROS da parte dell'epitelio respiratorio. I canali cellulari non selettivi per gli ioni calcio, definiti *Transient Receptor Potential Subfamily A* (TRPA1), attivati dai ROS, stanno suscitando grande interesse presso la comunità scientifica per il loro potenziale ruolo nella infiammazione.

Ipotesi e obiettivi. L'obiettivo principale di questo progetto è studiare il possibile coinvolgimento dei canali TRPA1 nella risposta infiammatoria polmonare FC a seguito dell'infezione da parte di *P.aeruginosa*.

Metodi In questo studio verranno usate diverse linee cellulari e colture primarie epiteliali respiratorie, derivate da pazienti affetti da fibrosi cistica e da soggetti sani di controllo, le quali verranno stimolate con *P.aeruginosa* e sorgenti di radicali dell'ossigeno, al fine di mimare la condizione infiammatoria polmonare della fibrosi cistica.

Risultati preliminari L'espressione funzionale del canale TRPA1 è stata verificata preliminary in linee cellulari respiratorie umane, utilizzando sia agonisti che inibitori specifici i quali, alle concentrazioni utilizzate, non hanno dimostrato significativa tossicità. Inoltre, abbiamo verificato come inibitori del canale TRPA1 riducono significativamente l'espressione di un mediatore chimico critico nella infiammazione polmonare.

Risultati attesi e loro significato Visti i limiti delle terapie anti-infiammatorie attualmente in uso in FC, diventa necessario individuare nuove strategie anti-infiammatorie in grado di ridurre, senza abolire completamente, l'eccessiva risposta infiammatoria osservata nei polmoni dei pazienti affetti da FC. La definizione del ruolo dei canali TRPA1 nella infiam-

mazione respiratoria costituirà la base razionale della applicazione futura di farmaci inibitori di TRPA1, attualmente in trial clinici per altre patologie quali il trattamento del dolore, prospettando un riposizionamento di questi farmaci a vantaggio della cura della FC.

32. GSH inhalation therapies in CF: how useful, how safe? Set-up of a CF murine model for monitoring of inflammation in vivo and assessment of convenient alternatives

Corti A

Dip. di Ricerca Traslazionale NTMS - Lab. Patologia Generale, Università di Pisa (FFCProject#18/2014, New)



Alessandro Corti, responsabile del progetto

Background Among antiinflammatory therapies, inhalation (aerosol) treatments with glutathione (GSH) have gained interest among CF patients. GSH is a primary antioxidant whose levels are significantly decreased in lungs during inflammatory processes. However the results attained so far remain disappointing, and it is not clear why. One of the possible reasons of such inefficiency may lie in the fact that CF lungs often present with increased levels of gamma-glutamyltransferase (GGT), an enzyme secreted by inflammatory cells, capable of degrading GSH.

Preliminary results It has been shown (in cultured cells) that GSH degradation – besides consuming GSH – also originates metabolites having (paradoxically) a pro-inflammatory and harmful action! Moreover we have demonstrated that GGT levels in sputum of CF patients are inversely correlated with respiratory function (FEV1). On the other hand, the same enzyme also catalyzes the metabolism of S-nitrosoglutathione (GSNO), a compound provided with antiinflammatory properties.

Hypothesis & objectives It is of importance to clarify whether GSH inhalation therapies are truly beneficial, useless or even – in selected conditions – potentially dangerous. For the first time this study will try to clarify whether the presence of GGT activity in lung fluids of patients may represent a contraindication to GSH-based therapies. It will also be verified whether the inhibition of GGT may suppress the proinflammatory effects and restore the antioxidant/beneficial action of GSH.

Essential methods A pioneering CF animal model will be employed (mice with a mutation causing a disease equivalent to human CF and transiently transgenized with a reporter gene system allowing to "visualize" the activation of inflammation in the living animal). In addition, suitable laboratory analyses will be carried out on samples obtained from CF patients during GSH inhalation treatment. All biochemical processes (beneficial or potentially harmful) involved will be evaluated in the animal model.

Expected results It will be elucidated if and in which se-

lected CF patients the GSH inhalation is really safe and potentially beneficial. On the other hand elements will be collected in order to identify patients liable to suffer from undesired effects of the treatment. It will also be verified whether a valuable alternative to GSH for inhalation therapies may be represented by GSNO, a GGT substrate possibly exerting a more efficient antiinflammatory action.

Terapie inalanti con glutazione in fibrosi cistica: quanto sono utili, quanto sicure? Messa a punto di un modello murino di fibrosi cistica per il monitoraggio dell'infiammazione in vivo e la valutazione di trattamenti alternativi

Ragioni dello studio Tra le terapie antiinfiammatorie, quelle inalanti (aerosol) miranti a ricostituire nei fluidi bronchiali le riserve di glutazione (GSH) si sono diffuse da tempo tra i pazienti FC. Il GSH è infatti un antiossidante che viene consumato durante i processi infiammatori. I risultati ottenuti finora rimangono però deludenti e non è chiaro perché. Uno dei motivi può essere il fatto che i polmoni FC spesso presentano elevati livelli di gammaglutamiltransferasi (GGT), un enzima secreto dalle cellule infiammatorie capace di degradare il GSH.

Risultati preliminari È stato dimostrato (in cellule coltivate) che tale degradazione – oltre a consumare il GSH – può dare origine a metaboliti ad azione (paradossalmente) proinfiammatoria e dunque nociva! Abbiamo inoltre dimostrato che i livelli di GGT in campioni di escreto FC correlano inversamente con il parametro di funzionalità respiratoria FEV1. D'altro canto, la GGT catalizza anche il metabolismo del S-nitrosoglutazione (GSNO), un composto che invece è dotato di azione antiinfiammatoria.

Obiettivi principali È importante chiarire se la terapia inalatoria con GSH sia realmente benefica, del tutto inutile o se – in determinate condizioni – possa risultare pericolosa. Per la prima volta verrà verificato se la presenza nei fluidi polmonari di GGT può costituire controindicazione all'impiego di terapia inalatoria con GSH. Verrà inoltre verificato se l'inibizione dell'enzima GGT possa ovviare agli effetti proinfiammatori e ripristinare gli effetti antiossidanti/benefici del GSH.

Metodi Verrà utilizzato un modello animale d'avanguardia (topini con malattia equivalente alla FC umana, "preparati" con una procedura biologico-molecolare che permette di "visualizzare" l'attivazione del processo infiammatorio nell'animale vivente) e saranno inoltre condotte adeguate indagini di laboratorio su campioni ottenuti da pazienti FC in corso di terapia inalatoria con GSH. Saranno verificati tutti i processi biochimici in gioco, benefici (antiinfiammatori) o potenzialmente nocivi.

Risultati attesi Verrà chiarito se e in quali pazienti specifici il trattamento con GSH è veramente sicuro e potenzialmente utile. Viceversa saranno poste le basi per identificare i pazienti in cui lo stesso trattamento può invece suscitare reazioni avverse. Sarà verificato se una valida alternativa al GSH possa essere rappresentata dal GSNO, anch'esso substrato della GGT ma probabilmente dotato di azione antiinfiammatoria più efficace.

33. Mitochondrial Ca²⁺-dependent inflammasome activation exacerbates the *P. aeruginosa*-driven inflammatory response.

Pinton P

Dip. Di Morfologia, Chirurgia e Medicina Sperimentale, Lab. Trasduzione del Segnale, Università di Ferrara (FFCProject#19/2014, New)



Paolo Pinton al centro, con vasto gruppo di ricercatori del suo dipartimento

Background The NOD-like receptors (NLRs) are intracellular pattern-recognition receptor that recognize pathogen-associated molecular patterns activating pro-inflammatory response through the assembly of large caspase-1-activating complex, called inflammasome. Recent data suggest that the mitochondria integrate distinct pro-inflammatory signals and relay this information to a key molecular complex related to inflammation, the NLRP3 inflammasome. It has been demonstrated that mitochondria are the main source of inflammasome-activating ROS and as such may constitute the signal-integrating organelle for NLRP3 recruitment and activation in *Pseudomonas aeruginosa* (PAO-1)-driven inflammation in cystic fibrosis (CF).

Aims The overall goal of this project is to broaden our knowledge on role of mitochondria to decode and integrate the pro-inflammatory signals generated during PAO-1 infection in CF. This 2 years grant will focus to obtaining a deeper insight into the complex relationship between mitochondrial homeostasis and the inflammatory response induced by PAO-1 in CF. The aims are: i) Mitochondrial dysfunction in CF epithelial airways cells is direct link between PAO-1 infection and inflammasome.

Expected results The project should obtain the following results: i) Characterization of roles of mitochondria and mitochondrial Ca²⁺ signaling in controlling inflammasome-activation of innate immune responses triggered by PAO-1 ii) Identification of mitochondrial targets to design and test alternative pharmacological strategies to contrast the PAO-dependent innate immune response.

Il Ca²⁺ mitocondriale media l'attivazione dell'inflammasoma esasperando la risposta infiammatoria nell'infezione da *Pseudomonas aeruginosa*

Premesse I NOD-like recettori (NLRs) sono proteine atte a riconoscere costituenti associati al patogeno promuovendo la risposta pro-infiammatoria attraverso l'assemblaggio di complessi molecolari caspasi-1 dipendenti chiamati inflammasomi. Dati recenti suggeriscono che i mitocondri integrano distinti segnali pro-infiammatori e forniscono queste informazioni a una struttura molecolare che controlla l'infiammazione chiamata inflammasoma NLRP3. I mitocondri sono la principale fonte di ROS (attivatori dell'inflammasoma) e quindi possono giocare un ruolo chiave per il reclutamento e l'attivazione di NLRP3 nell'infezione promossa da *Pseudomonas aeruginosa* (PAO-1) in fibrosi cistica (CF).

Obiettivi dello studio L'obiettivo generale di questo progetto è quello di ampliare le nostre conoscenze sul ruolo dei mitocondri nel decodificare e integrare i segnali pro-infiammatori generati durante l'infezione da PAO-1 in CF. In questi due anni di finanziamento svilupperemo obiettivi complementari finalizzati ad ottenere una più profonda comprensione del complesso rapporto tra l'omeostasi mi-

tocondriale e la risposta infiammatoria indotta da PAO-1 in CF, in considerazione che la disfunzione mitocondriale è il link diretto tra l'infezione da PAO-1 e il reclutamento dell'inflammasoma nelle cellule epiteliali patologiche di CF delle vie aeree.

Risultati attesi Il progetto dovrebbe ottenere i seguenti risultati: i) caratterizzazione del ruolo del Ca^{2+} mitocondriale nel controllare l'attivazione dell'inflammasoma durante le risposte immunitarie innate promosse da PAO-1 ii) Identificazione di target mitocondriali nell'intento di progettare e testare alternative strategie farmacologiche per contrastare la risposta immunitaria innata scatenata da PAO-1.

34. Identification and characterization of LPS-neutralizing human peptides: potential tools to control inflammation in cystic fibrosis lung disease

Pizzo E¹, Pedone EM²

Lab. di Struttura e Funzione delle Proteine-SFP, Lab. Group presso Dip. di Biologia, Università di Napoli "Federico II"; Istituto di Biostrutture e Bioimmagini, C.N.R,Napoli (FFCProject#20/2014, New)



Eliodoro Pizzo, responsabile del progetto. A destra Emilia Maria Pedone

Background Lipopolysaccharides (LPS), the main components of the outer membrane of Gram (-) bacteria, are recognized by the immune system as a marker of bacterial invasion. LPS binding to specific receptors stimulate the production of inflammatory cytokines thus activating the immune response. In the lung of CF patients the chronic infection by *P. aeruginosa* induces a chronic, excessive inflammation which not only damages the lung but contributes to inability to eradicate infection. Drugs able to block LPS pro-inflammatory activity could attenuate inflammation limiting damage to host tissues. In this context cationic antimicrobial peptides (CAMPs) are excellent candidates. Several CAMPs show immunomodulatory activities like direct binding and scavenging of LPS and regulation of the expression of hundreds of genes, including inflammatory cytokines.

Objectives The aim of the present project is the identification and characterization of human cationic peptides able to neutralize the pro-inflammatory activity of the LPS of 4 *P. aeruginosa* CF clinical strains. We expect to identify two types of peptides: (a) peptides able to bind LPS with very high affinity which could be used as LPS-scavengers and (b) cytokine-like peptides which could be used as anti-inflammatory drugs. The use of human peptides will limit the risk of inducing immune response.

Methods We developed two useful tools for the identification and production of CAMPs:

- 1) A *in silico* method which allows the quantitative prediction of antibacterial activity and the localization of CAMPs within the sequences of their precursors. Using our meth-

od we have prepared a list of very promising hypothetical CAMPs.

- 2) An effective procedure for the production of recombinant CAMPs in *E. coli* with yields of about 10mg/L of culture.

The general aim of the project will be pursued through the 3 phases: 1) Identification of peptides with LPS-neutralizing activity by preliminary characterization of a panel of 5-7 known CAMPs and 20-25 hypothetical CAMPs. 2) Thorough characterization of few peptides with high LPS-neutralizing activity 3) *In vivo* analysis of the most promising LPS-neutralizing peptides

Spin-off for research & clinical purposes The objective is to obtain a panel of human peptides able to neutralize LPS pro-inflammatory effect, which could be used as drugs with anti-inflammatory and immunostimulating activity. Innovative anti-inflammatory drugs are crucially required for the treatment of CF lung disease and a systematic approach voted to the identification of natural immunomodulating peptides well suits to this demanding task.

Identificazione e caratterizzazione di peptidi umani neutralizzanti gli LPS: potenziale strumento per controllare l'infiammazione nei polmoni FC

Ragioni dello studio I Lipopolisaccaridi (LPS), principali componenti della membrana esterna dei batteri Gram (-) stimolano la risposta immunitaria legandosi a specifici recettori.

Nel polmone dei pazienti FC, l'infezione cronica di *P. aeruginosa* induce una infiammazione grave che non solo danneggia il polmone, ma contribuisce all'incapacità di debellare l'infezione. Farmaci in grado di bloccare l'attività pro-infiammatoria degli LPS potrebbero attenuare l'infiammazione, limitando i danni dei tessuti. In questo contesto particolarmente interessanti risultano essere i peptidi cationici antimicrobici (CAMP), molti dei quali mostrano oltre all'attività batterica anche attività immunomodulanti.

Obiettivi Lo scopo del presente progetto è l'identificazione e la caratterizzazione di peptidi cationici di origine umana in grado di neutralizzare l'attività pro-infiammatoria degli LPS di ceppi clinici CF di *P. aeruginosa*. Il nostro obiettivo è identificare due tipi di peptidi: (a) peptidi in grado di legare LPS con elevata affinità, in grado quindi di contribuire alla loro demolizione; (b) peptidi in grado di neutralizzare LPS in maniera indiretta agendo come citochine.

Metodi Abbiamo sviluppato due strumenti utili per l'identificazione e la produzione di CAMPs:

- 1) Un metodo bioinformatico che permette la previsione quantitativa dell'attività antibatterica e la loro localizzazione all'interno di precursori proteici dalle differenti proprietà biologiche;
- 2) Una procedura efficace per la loro produzione eterologa in cellule *E. coli*.

L'obiettivo generale del progetto sarà perseguito attraverso 3 fasi:

- 1) Identificazione di peptidi con attività LPS-neutralizzante partendo da una selezione preliminare di 5-7 CAMPs noti in letteratura e 20-25 nuovi CAMPs ad oggi mai descritti.
- 2) Caratterizzazione approfondita dei peptidi ad attività LPS-neutralizzante.
- 3) Analisi *in vivo* dei più promettenti peptidi LPS-neutralizzanti

Risultati attesi L'obiettivo è quindi quello di andare a riconoscere e caratterizzare un pannello di peptidi umani capaci di neutralizzare l'effetto pro-infiammatorio degli LPS, così da poter essere utilizzati come nuovi farmaci con attività anti-infiammatoria e immunostimolante. Tali nuovi potenziali farmaci potrebbero giocare un ruolo fondamentale per il trattamento di malattie polmonari FC.

35. Resolvin D1 for Targeting Chronic Lung Inflammation and Infection in Cystic Fibrosis

Recchiuti A

Dip. di Scienza Clinica e Sperimentale e Centro di Eccellenza sull'Invecchiamento-CeSI, Università "G. d'Annunzio", Chieti-Pescara (FFCProject#21/2014, New)



Antonio Recchiuti e il suo gruppo di ricerca

Background Natural mechanisms promoting the return from acute inflammation to homeostasis are defective in cystic fibrosis (CF), leaving inflammation “unchecked” and determining progressive fatal lung disease.

Evidence has emerged that resolvin (Rv) D1, an endogenous resolution-favouring molecule that has entered clinical trials for treating inflammation-related diseases, potently limits neutrophil infiltration, stimulates resolution of inflammation, and boosts host immune defense mechanisms against bacteria.

To meet the paramount FFC mission of identifying “**Original approaches to treat inflammation in Cystic Fibrosis**”, this multipronged project will test whether RvD1 carries beneficial actions against persistent airway inflammation and infection in preclinical models of CF.

Hypothesis & objectives Overarching hypotheses tested here are that RvD1 represents a potent immunoresolvent that blocks excessive lung inflammation and infection in preclinical models of CF.

Broad objectives of this research are 2-fold to determine if RvD1:

- 1) limits lung inflammation and damage elicited by PA infection (Aim 1);
- 2) enhances containment and clearance of PA in long term infection (Aim 2).

Essential methods To test our hypotheses and achieve our research objective, CFTR-deficient mice [Cftrtm1UNCTgN(FABPCFTR)] will be infected with the RP73 clinical strain of PA and treated with RvD (1-100 ng/mouse/day, os). Lung inflammation, damage, and infection will be assessed after short (3-7 days) and medium-long (14-28 days) term treatment with RvD1 with flow cytometry and histology. Also, combined treatment of RvD1 with sub-optimal doses of azithromycin and ciprofloxacin, leading anti-PA antibiotics, will be explored to determine whether RvD1 boosts immune defences against chronic infection and increases the effects of antimicrobials.

Preliminary results In this project, we have learned that RvD1: a) is rapidly absorbed after oral administration, potently dampens acute inflammation, and enhances resolution of inflammation; b) lowers bacteria burden and leukocyte infiltration during PA lung infection in wild type mice.

Expected results & their significance Completion of specific aims will establish new actions of RvD1, providing proof of concepts for clinical studies on CF and opening new opportunities for fighting excessive inflammation and persistent infection in patients.

Resolvina D1 per il trattamento dell' infiammazione ed infezione cronica in fibrosi cistica

Ragioni dello studio Infiammazione persistente ed infezioni croniche alle vie aeree sono le principali cause di progressivo danno polmonare nei pazienti con fibrosi cistica (FC) nei quali esiste un difetto dei meccanismi che, normalmente, tengono sotto controllo la risposta infiammatoria. Nonostante i numerosi progressi, la FC resta ancora una malattia orfana di terapie mirate che, al contempo, riducano l'infiammazione e stimolino l'eliminazione dei batteri dalle vie aeree.

Recenti studi dimostrano che la resolvina (Rv) D1, una molecola endogena entrata in trial clinici per il trattamento di patologie infiammatorie croniche, riduce l'infiammazione, ne favorisce la risoluzione e stimola il sistema immunitario nei confronti di infezioni microbiche.

Per rispondere alla missione della FFC di identificare “Approcci originali per il trattamento dell'infiammazione nella Fibrosi Cistica” questo progetto analizzerà le azioni di RvD1 in modelli preclinici di FC per valutarne il potenziale quale farmaco per curare l'infiammazione le infezioni polmonari nei pazienti con FC.

Ipotesi e obiettivi Le ipotesi che testeremo sono che RvD1 sia una molecola in grado di controllare l'infiammazione e le infezioni da *Pseudomonas aeruginosa* (PA).

Gli obiettivi del progetto sono quelli di determinare se RvD1 riduca l'infiammazione alle vie aeree e la severità dell'infezione indotti da PA in modelli preclinici di FC

Metodi Per testare tali ipotesi e raggiungere gli obiettivi descritti utilizzeremo un modello preclinico di FC con topi nei quali è stato riprodotto il difetto di base (cioè la mancanza della proteina CFTR). I topi saranno infettati con PA e trattati con RvD1 per brevi (3-7 giorni) o lunghi (14-28 giorni) periodi, al termine dei quali valuteremo il grado di infiammazione, danno ai tessuti e crescita batterica. Effettueremo, inoltre, esperimenti di co-somministrazione di RvD1 con dosi sub-ottimali di antibiotici azitromicina e ciprofloxacina per valutare se RvD1 sia in grado di potenziare l'effetto degli antimicrobici comunemente utilizzati in clinica per combattere l'infezione da PA.

Risultati preliminari Risultati preliminari dimostrano che RvD1 è efficace, dopo somministrazione orale, nel ridurre l'infiammazione acuta, favorirne la risoluzione e contrastare l'infezione da PA in topi normali.

Risultati attesi e loro significato I risultati di questo studio stabiliranno nuove azioni biologiche di RvD1 fornendo le basi per ulteriori studi clinici nel campo della FC ed offrendo nuove opportunità per il trattamento dell'infiammazione e delle infezioni croniche alle vie aeree nei pazienti con FC.

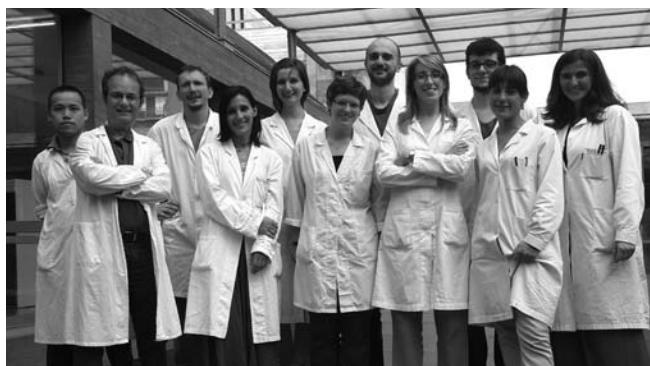
36. Targeting PI3Kγ scaffold function to activate airway CFTR, limit lung inflammation and promote bronchorelaxation in cystic fibrosis

Hirsch E¹, Laudanna C²

¹Dip. di Biotecnologie Molecolari e Scienze per la Salute, Università di Torino, Centro di Biotecnologia Molecolare;

²Dip. di Patologia e Diagnostica, Università di Verona, Laboratorio di Traffico Cellulare e Trasduzione del segnale (FFCProject#25/2014, New)

Background The underlying cause of cystic fibrosis (CF) is a mutation in the gene encoding the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR), a cyclic AMP (cAMP)-stimulated chloride channel. The ensuing CFTR hypofunction primarily affects the respiratory system, in which the reduced activity of the channel results in obstruction of small airways that, together with airway inflammation and infections, even-



Emilio Hirsch (secondo da sinistra) con il suo team di ricerca

tually lead to respiratory failure and death in 80% of CF patients. A number of CFTR correctors and potentiators, restoring membrane expression and cAMP-mediated gating of the channel, have been developed, but their efficacy appears to be unsatisfactory and to strictly rely on elevated concentrations of intracellular cAMP. cAMP-elevating drugs may thus constitute suitable tools to either increase the efficacy of currently available treatments or directly target CFTR functional defects in CF.

Objectives Given the well-established role of phosphoinositide 3-kinase γ (PI3K γ) as negative regulator of cAMP in different cell types, including smooth muscle cells, we intend to explore the therapeutic potential of PI3K γ inhibition in cell-based and pre-clinical models of CF.

Preliminary results and study design Our preliminary data demonstrate that PI3K γ is a master regulator of cAMP homeostasis in airway epithelial cells. We thus intend to investigate whether inhibition of PI3K γ is a suitable approach to simultaneously enhance cAMP signaling in the multitude of cell types that critically contributes to CF development. In particular, we plan to evaluate the effects of PI3K γ inhibition (i) on CFTR conductance in rectal biopsies of CF mice; (ii) on smooth muscle cell relaxation in tracheal explants of CF mice and (iii) on activation of human primary leukocytes. Finally, we intend to explore the ability of the inhibitor to function as (i) a CFTR potentiator, (ii) a bronchodilator and (iii) an anti-inflammatory agent in a pre-clinical model of CF.

Expected results and their significance We anticipate that PI3K γ inhibition stimulates cAMP-dependent events in airway epithelial, smooth muscle and immune cells and thus provides three independent therapeutic benefits in CF models by: (i) restoring CFTR conductance, (ii) limiting airway obstruction and (iii) reducing lung neutrophilic inflammation.

PI3K γ : un nuovo bersaglio terapeutico per riattivare il CFTR e ridurre l'infiammazione e l'ostruzione delle vie aeree nella fibrosi cistica

Premesse La causa della fibrosi cistica (FC) è una mutazione nel gene CFTR, che codifica per un canale espresso prevalentemente in cellule epiteliali secretorie, chiamato regolatore di conduttanza transmembrana della fibrosi cistica (CFTR). I pazienti con FC hanno gravi complicazioni cliniche che colpiscono diversi organi, tra cui l'intestino, il pancreas e il fegato. Il bersaglio più colpito è tuttavia il sistema respiratorio, in cui la riduzione dell'attività del canale causa l'ostruzione delle piccole vie aeree che, insieme con l'infiammazione delle stesse ed infezioni, può condurre a insufficienza respiratoria e morte nel 80% dei pazienti CF.

Ipotesi e obiettivi L'ipotesi fondante di questo progetto è che l'enzima fosfoinositide 3-chinasi (PI3K γ) costituisca un regolatore chiave dei diversi tipi cellulari che contribuiscono all'insorgenza ed alla progressione della patologia. Pertanto, intendiamo valutare se l'inibizione di questo enzima rappresenti un valido approccio terapeutico nel trattamento della FC, efficace

nel correggere il difetto primario della malattia, la disfunzione del canale CFTR, e nel limitare le manifestazioni cliniche associate, quali l'infiammazione e l'ostruzione delle vie aeree.

Metodi A tal scopo, analizzeremo i potenziali effetti terapeutici di un inibitore di PI3K γ in modelli cellulari ed animali di FC. In particolare, esamineremo la capacità di tale molecola di potenziare l'attività del canale mutato negli epitelii. Inoltre, ci proponiamo di esplorare se lo stesso inibitore riduce efficacemente l'attivazione leucocitaria, limitando quindi l'infiammazione polmonare incontrollata che caratterizza i pazienti con FC. Infine, si intende valutare la capacità della molecola di funzionare come broncodilatatore e alleviare pertanto l'iperattività bronchiale associata alla FC.

Risultati e loro significato Prevediamo che l'inibizione di PI3K γ stimoli eventi cAMP-dipendenti nelle vie aeree a livello di cellule epiteliali, cellule immunitarie e cellule muscolari lisce, offrendo così tre vantaggi terapeutici indipendenti in modelli FC. a) Ripristino della conduttanza CFTR. b) Limitazione dell'ostruzione delle vie aeree. c) Riduzione dell'infiammazione polmonare.

37. The role of Glucocerebrosidase GBA2 in cystic fibrosis lung inflammation: from molecular mechanism to therapeutic strategies.

Sonnino S¹, Aureli M¹, Loberto N¹, Bassi R¹, Schiumarini D¹, Cantù L¹, Brocca P¹, Motta S¹, Munari S², Dechechchi MC²

¹Dep. Medical Biotechnology and Translational Medicine, University of Milano; ²Lab. Molecular Pathology, Lab. Analysis AOUI, Verona (FFC Project#24/2014, New)



Sandro Sonnino, primo da sinistra, e il suo gruppo di ricerca

Background Several studies indicate that sphingolipids play a regulatory role in CF airways inflammation and suggest a relationship between altered ceramide (Cer) content and inflammation. Moreover, the accumulation of Cer has been correlated to the intrinsic pro-inflammatory state typical of CF pathology.

New interest has emerged about Cer derived from glycosphingolipids (GSL), since the treatment of CF human epithelial bronchial (CFhEB) cells with inhibitors of GSL metabolizing enzymes results in a reduced inflammatory response to *P.aeruginosa*.

Hypothesis & objectives The glucocerebrosidase GBA2, which hydrolyzes glucosylceramide to Cer, is emerging as a promising target for the Cer reducing strategies, but no data are available on the molecular mechanism linking GBA2 and CF inflammation. This proposal is aimed to study the correlation among CFTR defect, IL-8 expression and GBA2 and also to develop a nanoparticles (NP)-based system for the delivering of siRNA targeting GBA2.

Essential methods Normal and CFhEB cells will be analyzed for: 1) GBA2 expression, activity and cellular topology; 2) the effects of *P.aeruginosa* infection on protein and lipid composi-

tion of the GBA2 plasma membrane microenvironment; 3)the effect of GBA2 up- or down-regulation on the nuclear translocation of transcription factors (TFs) promoting IL-8 expression and their up-stream signaling pathways as well as on total and PM-associated Cer levels. NPs will be developed for *in vivo* delivering of GBA2-siRNA sequenze and tested for their: 1)anti-inflammatory effect on CFhEB cells; 2)biocompatibility and efficacy in the downregulation of GBA2 in lungs of normal mice; 3)efficacy in reducing both the intrinsic pro-inflammatory state and the inflammation response to *P.aeruginosa* in CF mice.

Preliminary results We observed in CFhEB cells infected with *P.aeruginosa* that both the inhibition of GBA2 activity and its down-regulation by siRNA, are associated with a significant decrease of IL-8 levels. Moreover, GBA2 knocking-down causes a reduction of the intrinsic pro-inflammatory state.

Expected results & their significance We expect to clarify the molecular mechanism linking GBA2 and IL-8 expression in CF and to develop a NP-based siRNA-GBA2 delivering system that could represent an innovative approach to reduce the airways pro-inflammatory state and the inflammatory response to *P.aeruginosa* in CF, thus contributing to define therapeutic strategies ameliorating the CF lung pathology.

Ruolo della glucocerebrosidasi GBA2 nell'infiammazione polmonare in fibrosi cistica: dal meccanismo molecolare a nuove strategie terapeutiche

Ragioni dello studio Numerosi studi indicano che gli sfingolipidi hanno un ruolo cruciale nell'infiammazione che caratterizza la patologia polmonare della Fibrosi Cistica (FC). In particolare, alterati livelli di ceramide (Cer) sono correlati sia allo stato pro-infiammatorio che all'elevata risposta infiammatoria causata da infezioni, aspetti tipici della patologia. Recenti evidenze dimostrano inoltre che, in cellule epiteliali bronchiali umane FC (CFhEB) esposte a *P.aeruginosa*, si osserva una drastica riduzione della risposta infiammatoria in seguito all'inibizione di enzimi coinvolti nel metabolismo dei glicosfingolipidi.

Ipotesi e obiettivi La glucocerebrosidasi GBA2, enzima responsabile della produzione di Cer da glucosilceramide, intermedio comune del metabolismo di tutti i glicosfingolipidi, può essere direttamente coinvolta nei processi molecolari alla base dell'infiammazione in FC. Questo progetto sarà dunque volto allo studio dei meccanismi molecolari che legano GBA2, la proteina difettiva CFTR e l'espressione della interleuchina 8 (IL-8); inoltre, intendiamo sviluppare una terapia anti-infiammatoria basata sull'utilizzo di nanoparticelle in grado di veicolare siRNA per il silenziamento di GBA2.

Metodi Ci proponiamo di analizzare: 1)i livelli di espressione e la localizzazione subcellulare di GBA2 in cellule CF; 2)il microambiente di GBA2 sulla membrana plasmatica prima e dopo infezione con *P.aeruginosa*; 3)gli effetti della up-/down-regolazione di GBA2 sulle vie del segnale che regolano l'espressione di IL-8 e sui livelli di Cer totali e di membrana. Inoltre, dopo aver sviluppato nanoparticelle per il trasporto di siRNA contro GBA2, verrà prima validato il loro effetto anti-infiammatorio in cellule CFhEB e poi sarà testata in topi FC la loro efficacia in termini di riduzione dello stato pro-infiammatorio e della risposta infiammatoria a *P.aeruginosa*.

Risultati preliminari I nostri risultati preliminari hanno dimostrato che in cellule CFhEB, l'inibizione di GBA2, sia in termini d'attività che di espressione, oltre a determinare una riduzione dello stato infiammatorio basale, è associata, dopo infezione con *P.aeruginosa*, ad una significativa diminuzione dei livelli di IL-8.

Risultati attesi e loro significato L'identificazione dei meccanismi molecolari che legano GBA2 alla risposta infiammatoria alle infezioni ed allo stato pro-infiammatorio tipico della patologia FC, e lo sviluppo di un approccio innovativo per ridurre l'infiammazione polmonare attraverso la down-regolazione di GBA2, potrebbero rappresentare un importante avanzamento nelle strategie terapeutiche della FC.

38. Impaired secretory IgA and mucosal immunity in cystic fibrosis: contribution to lung pathology and impaired defence against bacterial infection, and role of CFTR-related epithelial changes in the regulation of the receptor-mediated IgA transcytosis

Pilette C¹, De Rose V²

¹Université Catholique de Louvain, Brussels; ²Dip. di Scienze Biologiche e Cliniche, Università di Torino (FFCProject#26/2014, New)



Charles Pilette, primo da sinistra, e il suo team di ricerca

Background. Secretory IgA (S-IgA) represents a first line defence mechanism of the lungs and depends on the epithelial polymeric immunoglobulin receptor (plgR) to be transported into secretions where it acts through so-called immune exclusion of pathogens. Cystic fibrosis (CF) is a chronic lung disease due to mutations in the cystic fibrosis transmembrane

conductance regulator (CFTR) gene, where the susceptibility to chronic bacterial infection of the airways is a prominent feature. However, no clear biological defect in the immune system has been identified, and the S-IgA system has been poorly studied in this disease.

Hypothesis & objectives As plgR is the rate-limiting factor to generate S-IgA at mucosal surfaces, we hypothesize that the epithelial abnormalities could lead to decreased S-IgA in CF airways and contribute to impaired protection against infection by bacteria such as *Staph. aureus* and *Ps. aeruginosa*.

Essential methods We will analyze plgR/S-IgA expression in lung specimens from CF patients, as well as S-IgA antibodies in airway secretions, to confirm whether their production is impaired in CF. The contribution of S-IgA deficiency to CF lung disease will be studied in CFTR KO mice exposed to bacterial endotoxin in a chronic model inducing plgR down-regulation. Double CFTR/plgR KO mice could be generated to directly address the role of plgR/S-IgA in lung pathogenesis in the absence of CFTR. A model of chronic lung *Pseudomonas* infection will also be used to address the response to *Pseudomonas* in these mice. The mechanisms of plgR/S-IgA downregulation in CF will also be studied in primary cultures of airway epithelium.

Preliminary results In a pilot study of lung explants from end-stage CF, we observed that the expression of the plgR was reduced in the bronchial epithelium and that its soluble secretory component was almost undetectable in sputum from CF patients.

Expected results & their significance This project should clarify whether S-IgA is altered in the airways of CF patients and contributes to lung pathology, particularly through impaired neutralization of bacteria such as *P. aeruginosa*. The identification of the molecular mechanisms underlying the epithelial defect in plgR expression, the key receptor to generate S-IgA, could have major clinical implications. It could pave the avenue toward a new therapeutic approach based on S-

IgA and aiming at improving lung mucosal defense against bacteria in patients with cystic fibrosis.

Compromissione del sistema delle IgA secretorie ed immunità mucosa nella fibrosi cistica: ruolo nella patologia polmonare e nella suscettibilità all'infezione batterica, e ruolo delle alterazioni epiteliali correlate al difetto di CFTR nella regolazione della transitosi recettore-mediata delle IgA

Ragioni dello studio Le S-IgA rappresentano uno dei principali meccanismi di difesa a livello polmonare; attraverso il legame con il recettore epiteliale poli-Ig (pIgR), esse vengono trasportate nelle secrezioni dove svolgono la loro funzione attraverso il processo cosiddetto di "esclusione immune" dei microrganismi patogeni. La malattia polmonare è la principale causa di morbilità e mortalità nella Fibrosi cistica (FC) ed è caratterizzata da infusione bronchiale cronica che condiziona strettamente la prognosi. A tutt'oggi, non sono stati evidenziati specifici difetti immunitari nei pazienti con FC; in particolare, il sistema delle IgA non è stato studiato in maniera approfondita nella malattia.

Ipotesi ed obiettivi L'ipotesi alla base di questo studio è che le alterazioni epiteliali nella FC potrebbero portare ad una ridotta espressione del pIgR e conseguentemente ad una ridotta concentrazione di S-IgA nelle vie aeree dei pazienti con FC, che contribuirebbe alla aumentata suscettibilità all'infezione batterica.

Metodi Verranno determinati i livelli di S-IgA nelle secrezioni bronchiali e l'espressione di pIgR/S-IgA in campioni di tessuto polmonare di pazienti con FC. Il ruolo del difetto di S-IgA nella malattia polmonare verrà anche studiato in topi CFTR/pIgR KO e verrà studiata la risposta all'infezione da Pseudomonas in questo modello murino. I meccanismi dell'eventuale compromissione del sistema pIgR/S-IgA nella FC verranno infine studiati in culture primarie di cellule epiteliali difettive di CFTR.

Risultati preliminari In uno studio pilota, abbiamo osservato una riduzione dell'espressione di pIgR a livello dell'epitelio bronchiale di pazienti con FC ed abbiamo anche osservato che i livelli della componente secretoria delle IgA erano molto ridotti nelle secrezioni bronchiali dei pazienti affetti dalla malattia.

Risultati attesi e loro significato I risultati di questo studio consentiranno di chiarire se il sistema delle S-IgA è alterato nelle vie aeree dei pazienti con FC e se tale difetto contribuisce alla aumentata suscettibilità all'infezione bronchiale cronica ed in ultima analisi alla patogenesi della malattia polmonare nella FC. L'identificazione dei meccanismi responsabili del difetto del sistema pIgR/S-IgA nelle vie aeree dei pazienti con FC potrebbe portare allo sviluppo di approcci terapeutici innovativi, volti ad aumentare le difese immuni locali ed a ridurre la suscettibilità alle infezioni in tali pazienti.

39. Sphingolipid targeting in inflammation and fungal infection

Signorelli P¹, Caretti A¹, Borghi E¹, Perdoni F¹, Sozzani S², Del Prete A²

¹ Dip. Scienze della Salute, Facoltà di Medicina, Università di Milano; ²Dip. Medicina Molecolare e Traslazionale, Università degli Studi di Brescia
(FFCProject#20/2013, In progress)

Background Sphingolipids are structural and signaling molecules found across eukaryotes, regulating key cellular processes including inflammation. Ceramide, a known sphingolipid therapeutic target, is increased in CF patients nasal



Paola Signorelli, seconda da destra, e le collaboratrici di progetto

epithelia and pharmacologically targeted by an ongoing phase II trial. We demonstrated that inhibition of ceramide synthesis by myriocin reduces ceramide levels, inflammation and *P. aeruginosa* infection in CF mice lungs (Caretti et al. BBA 2012, FFC project 22/2011).

Another major treat for chronically inflamed CF patients is the infection by opportunistic fungi, forming drug-resistant biofilms. Fungi share with mammals key steps of sphingolipid metabolism, including the one that is impaired by myriocin, as well as the need for structural sphingolipids, essential in hyphal growth and branching.

Objective To assess the hypothesis that sphingolipid metabolism is a suitable pharmacological target to counteract *A. fumigatus* biofilm formation and inflammation in CF, this project will investigate the effect of ceramide synthesis inhibitor myriocin in CF human respiratory epithelial cells and in lungs of CF mice challenged with experimental *A. fumigatus* infection.

Preliminary results Delivery and long lasting release of myriocin within *A. fumigatus* biofilms, both *in vitro* and *in infected lungs in vivo*, was obtained by means of innovative solid lipid nanocarriers. Myriocin was effective on preformed *A. fumigatus* biofilms ($sMIC_{50}$ of 4 μ g/mL). Significant reduction in biofilm biomass as well as a dramatic reduction in fungal metabolic activity were obtained. TEM studies showed cell wall detachment from cell membrane, and reduced density of cytosolic matrix. Myriocin treatment reduced the release of inflammatory mediators from CF respiratory epithelial cells following infection with *A. fumigatus*, and altered fungal hyphae growth. Myriocin also reduced the presence of vital *A. fumigatus* conidia in infected CF epithelial cells.

Future directions Fungal infection as well as myriocin delivery *in vivo* will be obtained by non invasive intratrachea injection employing a micro-nebulizer (Penn-Century) under mild anesthesia. Sphingolipids profile will be evaluated by LC-MS; infection and inflammation will be evaluated as well.

Impact Final aim is to obtain an aerosol-like formulation for a spin-off initiative and translation to clinical research.

Potenziale anti-infiammatorio e anti-fungino di inibitori del metabolismo degli sfingolipidi in Fibrosi Cistica

Stato dell'arte Gli sfingolipidi sono molecole strutturali delle cellule eucariotiche, con ruoli di segnalazione in processi fondamentali, inclusa l'infiammazione. Un incremento dello sfingolipide ceramide, è stato riscontrato nell'epitelio nasale di pazienti CF e un farmaco che blocca il rilascio di ceramide dalle membrane è attualmente in sperimentazione in uno studio clinico di fase II. Abbiamo dimostrato che l'inibizione della sintesi di ceramide, mediante somministrazione di myriocin, riduce i livelli di infiammazione e la colonizzazione batterica polmonare in topi CF (Caretti et al. BBA 2012, FFC project 22/2011). I pazienti CF con infiammazione cro-

nica sono anche soggetti ad infezione da funghi opportunisti, che formano biofilm resistenti. I funghi sono sensibili all'inibizione da myriocin della sintesi degli sfingolipidi, molecole essenziali per crescita e ramificazione delle ife.

Obiettivo Al fine di verificare l'ipotesi che il metabolismo sfingolipidico rappresenti un nuovo bersaglio farmacologico per la cura dell'infiammazione cronica e delle infezioni fungine resistenti nei pazienti CF, questo progetto si propone di valutare l'effetto terapeutico dell'inibitore della sintesi di ceramide myriocin in epitelio respiratorio CF e in polmoni di topi CF, soggetti ad infezione con *A. fumigatus*.

Risultati preliminari La somministrazione ed il rilascio prolungato di myriocina in biofilm di *A. fumigatus* *in vitro* e nei polmoni murini dopo infezione fungina, sono garantiti dall'utilizzo di nanocarrier lipidici innovativi. La myriocin ha mostrato una marcata efficacia nel ridurre sia la biomassa sia l'attività metabolica del biofilm preformato ($sMIC_{50}$ di 4 μ g/mL). Studi di microscopia confocale hanno rilevato distacco della membrana dalla parete e ridotta densità citosolica nelle cellule di *A. fumigatus* trattate *in vitro*. Il trattamento con myriocin ha mostrato di ridurre il rilascio di mediatori dell'infiammazione da parte delle cellule CF in seguito ad infezione e di causare una crescita alterata delle ife e la riduzione del numero di conidi vivi nel fungo infettante.

Sviluppi futuri Infezione e trattamenti *in vivo* si otterranno tramite inoculo intratracheale con micronebulizzatore (Penn-Century) in topi CF sottoposti ad anestesia lieve. Il profilo degli sfingolipidi verrà determinato tramite LC-MS, e infezione ed infiammazione verranno valutate.

Impatto Scopo finale è arrivare ad una formulazione come aerosol del farmaco, che si presti ad un'iniziativa spin-off ed alla sperimentazione clinica.

40. Targeting pathogenic pathways leading to inflammatory Th17 responses in cystic fibrosis: from drug discovery to preclinical validation

Romani L

Dip. Medicina Sperimentale, Università di Perugia
(FFCProject#22/2014, New)



Luigina Romani, prima da destra, e i suoi collaboratori

Background An exaggerated and ineffective airway inflammation that fails to eradicate pulmonary pathogens is present in cystic fibrosis (CF). Building upon the results from our past projects –indicating how the application of a system biology approach and new findings from the laboratory may translate into the development of new therapeutics and rationales for their use–we are proposing preclinical evaluation study of Anakinra, a recombinant, non-glycosylated version of human IL-1 receptor antagonist (IL-1RA) in CF. Since 2001, Anakinra has proved to be efficacious in a broad spectrum of auto-inflammatory diseases with a remarkable record of safety.

Hypothesis and objectives

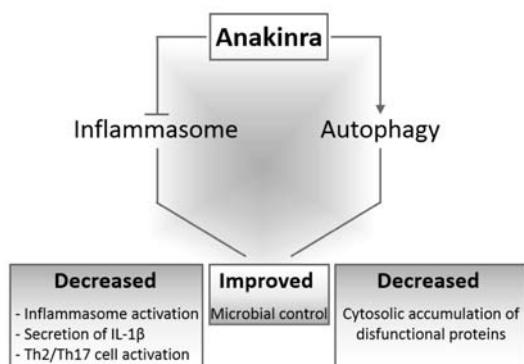
1. The evaluation of the efficacy of Anakinra in experimental and preclinical models of CF.
2. The definition of the molecular mechanisms underlying Anakinra activity, with emphasis on the reciprocally regulated processes, inflammasome and autophagy.
3. The screening of CF patients for IL-1RA deficiency and the definition of Anakinra-responsive signatures through microarray gene expression profiling.

Methods The project will include experimental and human studies consisting of:

1. fungal or bacterial infections in selected, genetically-modified mice treated with Anakinra
2. *in vitro* studies on ex-vivo purified immune and non-immune cells from mice and human with CF and controls
3. the screening of CF patients for IL-1RA deficiency and microarray gene expression profiling

Preliminary results

Our preliminary results indicate that Anakinra inhibited inflammasome-dependent inflammation through autophagy in lung immunodeficiency thus expanding the therapeutic potential of IL-1 antagonists to inflammatory diseases in which autophagy and inflammasomes are linked. Our global model is that limiting inflammasome activation and restoring autophagy by Anakinra may contribute to restrain microbial virulence, calibrate the inflammatory response to minimize injury and pathology and likely prevent accumulation of dysfunctional proteins in CF.



Expected results & their significance This study will provide the foundation for repurposing a drug approved for other indications for the treatment of CF.

Antagonisti della risposta infiammatoria mediata da linfociti Th17 nella Fibrosi Cistica: valutazione preclinica dell'efficacia di Anakinra

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. Una eccessiva attivazione di linfociti T produttori IL-17A (sottopopolazione Th17) può essere responsabile dello stato di infiammazione cronica in modelli sperimentali di CF e probabilmente nella CF umana, tanto che meccanismi a monte dell'attivazione della risposta Th17 possono rappresentare utili bersagli terapeutici. In questi meccanismi è coinvolto il processo infiammatorio chiamato "inflammasoma". Questo progetto prevede lo studio preclinico di Anakinra, un farmaco anti-infiammatorio già usato nel trattamento di varie patologie umane su base auto-infiammatoria, di ottima tollerabilità e scarsa tossicità; esso blocca l'attivazione dell'inflammasoma, inoltre ripristina il processo dell'autofagia, un altro processo cellulare alterato in FC.

Ipotesi e obiettivi

1. Valutare l'efficacia di anakinra *in vivo* come nuovo agente anti-infiammatori
2. Valutare l'impatto di anakinra su l'autofagia in FC

3. Valutare attraverso lo screening dei polimorfismi (SNPs) potenzialmente associati con il pathway “inflammasoma” e la suscettibilità alle malattie infiammatorie/infettive nei pazienti.

Metodi Utilizzeremo modelli in vivo ed in vitro per studiare l’impatto di anakinra, in particolare il suo impatto sull’infiammazione polmonare, la resistenza antimicrobica e il ripristino di autofagia.

Risultati Preliminari Anakinra blocca l’attivazione di un processo infiammatorio, l’inflammasoma, che è esageratamente attivato in FC. Precedenti nostri studi ci indicano che anakinra è anche efficace nel ripristino di autofagia, un processo connesso all’inflammasoma e da questo inibito. Per cui la ridotta autofagia in CF può essere a sua volta causa di infiammazione e pertanto generare un patologico circolo vizioso; pertanto anakinra potrebbe attraverso il blocco dell’inflammasoma ripristinare l’autofagia in FC.

Risultati attesi e loro significato Anakinra ha tutte le premesse di un farmaco potenzialmente efficace anche in FC e questo studio intende fornire tutte le informazioni necessarie per uno studio pilota con Anakinra in pazienti FC.

41. Mechanisms and clinical implications of endothelial dysfunction in cystic fibrosis.

Romano M¹, Totani L², Marchisio M³

¹Dip. di Scienze Sperimentali e Cliniche, Lab. di Medicina Molecolare, Università “G.D’Annunzio”, Chieti-Pescara;

²Dip. di Farmacologia Traslazionale, Consorzio Mario Negri Sud/Unità di Biomarkers Vascolari, Chieti; ³Dip. di Medicina e Scienze dell’Invecchiamento, Lab. sul Signalling Cellulare, Università “G.D’Annunzio”, Chieti-Pescara (FFCProject#23/2014, Extension)



Mario Romano, al centro, e il suo gruppo di ricerca

Background The present proposal is based on a large body of data, obtained with FFC projects #17/2012 and #19/2013, showing for the first time that CFTR controls the integrity of the endothelial monolayer as well as endothelial cell functions relevant in inflammation and pulmonary arterial hypertension. This indicates that primary endothelial dysfunction may be pathogenetically relevant in CF lung inflammation and that the elucidation of CFTR signaling in endothelial cells may provide clues for innovative pharmacological approaches to CF lung disease.

Hypothesis and objectives Results from our FFC#17/2012 and FFC#17/2013 projects fully support our hypothesis that the vascular endothelium is dysfunctional in CF. Main objectives of this study are to:

1. Uncover mechanisms of CF endothelial dysfunction as molecular targets for novel anti-inflammatory therapeutics in CF.
2. Elucidate the clinical relevance of circulating endothelial cells (CEC) and endothelial microparticles (EMP) in CF.

Essential methods Flow cytometry, confocal microscopy, western blotting, real-time PCR, electrophysiology techniques.

Preliminary results

1. CFTR blockade drastically reduced VE-Cadherin and p120-catenin localization at junctional level and increased intercellular gaps. This translates in increased endothelial permeability, under static conditions, and dramatic alterations of the endothelial monolayer integrity under shear stress.

2. Agents that increase cAMP levels:

a) Protected endothelial cells from CFTR-dependent alterations under shear stress.

b) Reduced VE-cadherin phosphorylation and stimulated phosphorylation of the PKA-consensus sequence of several proteins, including the COOH-terminal Src kinase (Csk).

3. CF patients displayed increased CEC, which negatively correlated with respiratory parameters as it did EMP.

Expected results and their significante We expect to identify:

- a) Molecular targets for anti-inflammatory therapy.
- b) Biomarkers, mechanisms and clinical relevance of endothelial dysfunction in CF.

Meccanismi e Rilevanza Clinica della Disfunzione Endoteliale nella Fibrosi Cistica

Ragioni dello studio Questo progetto è basato su un largo numero di evidenze ottenute con i progetti FFC #17/2012 and #19/2013, i quali hanno mostrato per la prima volta come il CFTR controlli l’integrità delle cellule endoteliali oltre che alcune funzioni di queste cellule rilevanti per l’infiammazione e l’ipertensione polmonare. Questi dati indicano che la disfunzione endoteliale può essere rilevante per lo sviluppo e il mantenimento dell’infiammazione polmonare e che la conoscenza delle vie di segnalazione del CFTR nelle cellule endoteliali può fornire informazioni preziose per la messa a punto di strategie terapeutiche innovative per la malattia polmonare nella FC.

Ipotesi e obiettivi Risultati dei nostri progetti FFC#17/2012 e FFC#17/2013 sostengono in pieno la nostra ipotesi che l’endotelio vascolare è disfunzionale nella FC. Principali obiettivi di questo studio sono:

1. Chiarire i meccanismi della disfunzione endoteliale nella FC al fine di individuare bersagli molecolari per terapie anti-infiammatorie innovative.
2. Stabilire la rilevanza clinica delle componenti endoteliali presenti nel torrente circolatorio al fine di individuare nuovi biomarcatori di severità della compromissione respiratoria dei pazienti FC.

Metodi Citofluorimetria a flusso, microscopia confocale, real-time PCR, tecniche di elettrofisiologia.

Risultati preliminari

1. Il blocco del CFTR ha ridotto drasticamente la localizzazione di VE-Cadherin e di p120-catenina nelle giunzioni interendoteliali. Questo ha portato a un aumento della permeabilità endoteliale e ad alterazioni del monostato endoteliale in condizioni che mimano il flusso ematico fisiologico.

2. Farmaci che aumentano l’AMP ciclico hanno:

- a) Protetto le cellule endoteliali dalle alterazioni indotte dal blocco del CFTR.
- b) Ridotto la fosforilazione di VE-cadherin e hanno stimolato la fosforilazione di particolari regioni di alcune proteine coinvolte in specifiche vie di segnalazione intracellulari.

3. Pazienti FC hanno mostrato un aumento di cellule e di particelle endoteliali circolanti che correlavano negativamente con indici di funzionalità respiratoria.

Risultati attesi e loro significato Ci aspettiamo di identificare:

- a) Nuovi bersagli molecolari per terapie anti-infiammatorie.
- b) Biomarcatori, meccanismi e rilevanza clinica della disfunzione endoteliale nella FC.

42. Lactoferrin-loaded niosomes in reducing inflammation and infection of cystic fibrosis airways

Berlotti F

Dip. Sanità Pubblica e Malattie infettive, Università "La Sapienza", Roma (FFCProject#16/2014, Extension)



Francesca Berlotti,
responsabile del progetto

Background In CF airway secretions a dangerous vicious circle between inflammation/iron overload/biofilm infections is established. To interrupt this vicious circle, lactoferrin (Lf), an iron-chelating glycoprotein of the innate immunity of human secretions, could be a key molecule exerting anti-inflammatory and anti-microbial activities. In CF airways Lf may be hydrolyzed by human and bacterial proteases thus resulting in digested fragments unable to exert the beneficial effects of the undigested molecule. The Lf delivery using nano-particles as niosomes could be useful to protect Lf against proteases. In the past year (FFC#13/2013), niosomes loaded with milk-derived bovine Lf (bLf-NIOs) have been prepared and characterized. bLf was used as it shows similar structure and functions of human Lf, it is generally recognized as a safe substance by FDA (USA), and it has been successfully employed in clinical trials.

Hypothesis and objectives We hypothesize that bLf-NIOs could reduce the infection and inflammation in animal models. We aim to verify the anti-inflammatory and antibacterial activity of bLf-NIOs in WT and CF mouse models in which both experimental acute and chronic *P. aeruginosa* infections will be established.

Essential methods The preparation of bLf-NIO will be optimized to be aerosolized. Acute and chronic *P. aeruginosa* infections will be established in the airways of wt and CF mice. The efficacy of aerosolized bLf-NIOs in comparison with empty niosomes or bLf on total and differential cell counts, bacterial load in bronchoalveolar lavage and lung homogenate, cytokine levels in lung homogenates and histopathological examination of lung tissues will be assayed.

Preliminary results bLf is efficiently entrapped in niosomes and protected against the activity of both human and bacterial

proteases. bLf is quickly released from bLf-NIOs to CF bronchial cells and no cytotoxicity is observed. bLf-NIOs show antibacterial activity similar to bLf solution. Moreover, bLf-NIOs affect bacterial adhesion both to abiotic and cellular surfaces.

Expected results & their significance We expect to demonstrate the effect of bLf-NIOs on inflammation and infection in pre-clinical animal models. This study should represent the basis for the development of the bLf delivery system to be administered as aerosol formulation in the treatment of CF airway infection.

Effetto della lattoferrina veicolata da niosomi sulla riduzione dell'infiammazione e dell'infezione in studi pre-clinici in animali

Ragioni dello studio Nelle secrezioni delle vie aeree di soggetti con Fibrosi Cistica (FC) si stabilisce un pericoloso circolo vizioso tra infiammazione, sovraccarico di ferro e infezione. La lattoferrina (Lf), una glicoproteina chelante il ferro dell'immunità innata delle mucose con proprietà antinfiammatorie e antibatteriche, potrebbe interrompere tale circolo vizioso, rappresentando una promettente strategia terapeutica. Tuttavia, la sua attività è ridotta nelle vie aeree dei soggetti con FC dall'azione delle proteasi batteriche ed umane. Per questo, nello scorso anno (FFC#13/2013) abbiamo studiato un sistema di nano veicolazione della Lf basato sull'uso dei niosomi già utilizzati per la somministrazione per aerosol di farmaci per uso umano. È stata impiegata la Lf purificata dal latte bovino (bLf) in quanto è simile per struttura ed attività a quella umana, è considerata una sostanza sicura (Generally Recognized As Safe Substance-GRAS, FDA, USA) ed è già impiegata in studi clinici.

Ipotesi e obiettivi Ipotizziamo che la bLf intrappolata in niosomi (bLf-NIO) eserciti le stesse attività antinfiammatorie e antibatteriche della Lf. Si intende quindi valutare l'attività antinfiammatoria e antibatterica dei niosomi carichi di bLf in topi normali ed affetti da FC in cui verrà indotta una infezione acuta o cronica con *P. aeruginosa*.

Metodi Sarà ottimizzato il protocollo di preparazione dei NIO-bLf per la somministrazione per aerosol. I NIO-bLf saranno somministrati per aerosol ai topi infettati per verificarne l'attività sul processo infiammatorio ed infettivo valutando diversi parametri istologici e batterici e la produzione di citochine.

Risultati preliminary I risultati preliminari (vedi il progetto FFC#13/2013) dimostrano che la bLf intrappolata nei NIO-bLf è protetta dall'azione delle proteasi umane e batteriche, è rilasciata alle cellule CF dai niosomi e mostra le stesse proprietà antibatteriche della bLf.

Risultati attesi e loro significato Ci aspettiamo di verificare l'efficacia antinfiammatoria e antibatterica della bLf veicolata da niosomi nei topi infettati sperimentalmente. Questo studio potrà rappresentare la base su cui sviluppare in futuro un sistema di somministrazione della bLf per aerosol da utilizzare in trial clinici.

Strategies to correct the chloride transport in CF

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

Galietta L¹, Millo E²

¹Lab. Genetica Molecolare, Ist. "G. Gaslini", Genova; ²Centre of Excellence for Biomedical Research, Università di Genova (FFCProject#2/2012, Completed)



Luis Galietta, in basso a destra, e alcuni collaboratori

Background Cystic fibrosis (CF) is caused by mutations affecting CFTR protein, which works in epithelial cells to transport chloride ions. In the lungs, CFTR loss of function causes the impairment of antibacterial defenses. TMEM16A is instead a calcium-activated chloride channel expressed in airway epithelial cells and not affected by CF mutations. Pharmacological stimulation of TMEM16A could represent an alternative strategy to correct the basic defect in CF.

Hypothesis and objectives In our project, we have considered two different targets to develop possible drugs: CFTR and the TMEM16A protein.

Essential methods To target CFTR, we have studied a group of chemical compounds belonging to the aminoarylthiazole (AAT) family. Nearly 100 AATs were synthesized and tested on cells expressing the CFTR protein with the deltaF508 mutation. Regarding TMEM16A, we have studied its expression in the human bronchial epithelium and its response to a panel of kinase inhibitors (kinases are intracellular proteins with a variety of regulatory functions).

Results The tests with AATs on mutant CFTR have revealed various active compounds. The compound labeled as FC G is able to correct the deltaF508 defect particularly when combined with the investigational drug VX-809. Other AATs have instead the ability to act as potentiators for the C551D mutation which has a severe gating defect. The screening of kinase inhibitors has identified compounds able to stimulate TMEM16A-dependent chloride transport. In particular, the compound act-121 is effective in excised membrane patches in ATP-free conditions, which may indicate an effect independent of kinase inhibition and possibly mediated by direct interaction with TMEM16A protein.

Spin-off for research & clinical purposes The results obtained in our studies will be useful to develop novel drugs able to correct mutant CFTR or to stimulate the alternative TMEM16A channel.

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

Ragioni dello studio La fibrosi cistica (FC) è causata da mutazioni a carico della proteina CFTR, la cui funzione nelle cellule epiteliali è di trasportare ioni cloruro. Nei polmoni, la perdita di funzione della proteina CFTR compromette le difese antibatteriche. TMEM16A è una proteina diversa da CFTR ma anch'essa espressa nelle cellule epiteliali ed in grado di trasportare cloruro. La sua stimolazione farmacologica potrebbe rappresentare quindi una strategia alternativa per correggere il difetto di base nella FC.

Ipotesi e obiettivi Nel nostro progetto abbiamo considerato due bersagli diversi per lo sviluppo di possibili farmaci: la proteina CFTR stessa e la proteina TMEM16A.

Metodi essenziali Per la proteina CFTR sono stati sintetizzati circa 100 nuovi composti chimici appartenenti alla famiglia degli aminoarilthiazoli (AAT). I nuovi AAT sono stati provati su cellule con espressione della proteina mutata deltaF508 alla ricerca di molecole in grado di correggerne il difetto di maturazione e di recuperarne la funzione. Per quanto riguarda TMEM16A, abbiamo studiato la sua espressione nell'epitelio bronchiale umano e la risposta ad un pannello di inibitori di chinasi (le chinasi sono proteine intracellulari dotate di funzioni regolatrici).

Risultati I test con gli AAT sulla proteina CFTR mutata hanno identificato diverse molecole attive, tra le quali il composto FC G. Questo composto è in grado di correggere la CFTR mutata soprattutto in combinazione con il farmaco sperimentale VX-809. Tra gli AAT abbiamo anche trovato molecole con attività potenziatrice. Lo studio su TMEM16A ha invece rivelato che l'espressione di questa proteina è particolarmente associata alla produzione di muco. Lo screening degli inibitori di chinasi ha permesso l'identificazione di composti che hanno un effetto positivo sull'attività della proteina TMEM16A.

Possibili ricadute per ricerca e clinica Le informazioni ottenute serviranno per lo sviluppo di nuovi farmaci in grado di correggere la proteina CFTR mutata o di stimolare il canale alternativo TMEM16A.

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

Pedemonte N

Lab. Genetica Molecolare, Ist. "G. Gaslini", Genova (FFCProject#5/2012, Completed)

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. The most frequent mutation in CF patients is the deletion of phenylalanine 508 (F508del), causing the mistrafficking of CFTR that remains trapped in the endoplasmic reticulum and is subsequently degraded.

Hypothesis and objectives The trafficking defect can be rescued by molecules called correctors, however, the efficacy



Nicoletta Pedemonte, al centro, con le sue collaboratrici

of known compounds is reduced. The development of new drugs requires a better understanding of the cellular processes responsible for the fate of the mutant protein.

Methods In order to identify the proteins involved in F508del-CFTR processing/degradation, we adopted a functional genomics approach, screening a genome-wide siRNA library. The siRNA library was screened using the assay based on the halide-sensitive yellow fluorescent protein (YFP) that measures the function of CFTR in the plasma membrane. For the screening, we used the CFBE41o- cell line, with stable expression of F508del-CFTR and the halide-sensitive YFP. In parallel, we also performed in vivo evaluation of the effect of the suppression of E3 ubiquitin ligase RNF5 in a CF mouse model, by interbreeding mice carrying the F508del mutation with RNF5 KO mice.

Results In vivo studies demonstrated that RNF5 suppression significantly ameliorates the intestinal malabsorption that is peculiar of CF, supporting the hypothesis that RNF5 could be the target of a novel drug therapy for CF. In addition, the genome-wide screening highlighted a list of proteins whose silencing caused a significant rescue of F508del-CFTR activity in CFBE41o- cells. Among the most interesting targets, we found MLLT6, UBXD1 and FAU proteins. In particular, MLLT6, also known as Af17, is a transcription factor that upregulates the transcription of the epithelial sodium channel (ENaC) genes. Further studies are needed to characterize interaction and function of these proteins in CFTR maturation/degradation.

Spin-off for research & clinical purposes The identification of new proteins and the unraveling of the cellular processes, whose modulation leads to an increased F508del rescue, is of primary importance as it will help in identifying novel targets for treatments with improved efficacy and selectivity.

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

Ragioni dello studio La fibrosi cistica (FC) è una malattia ereditaria causata da mutazioni che provocano la perdita di funzione di una proteina di membrana (chiamata CFTR) che serve per il trasporto di ioni cloruro. La mutazione più frequente nei pazienti FC è la delezione della fenilalanina 508 (F508del), che provoca una perdita di stabilità della proteina appena sintetizzata. Di conseguenza la proteina CFTR con la mutazione F508del viene in gran parte degradata prima ancora che raggiunga la membrana cellulare.

Ipotesi e obiettivi Il difetto di stabilità può essere trattato con molecole chiamate correttori, tuttavia, l'efficacia dei correttori a oggi identificati è ridotta. Per sviluppare nuovi farmaci occorre una migliore comprensione dei processi cellulari che determinano il destino della proteina mutata.

Metodi Al fine di identificare le proteine coinvolte nella maturazione/degradazione di CFTR, abbiamo adottato un approccio di genomica funzionale basato sulla interferenza genica mediata da RNA, in modo da spegnere selettivamente

un gene (e la relativa proteina) per volta, valutandone gli effetti sulla maturazione della proteina CFTR mutata. È stato valutato così il ruolo di 6650 geni umani. Inoltre, abbiamo valutato in vivo l'effetto della soppressione di una di queste proteine, chiamata RNF5, utilizzando modelli animali di FC incrociati con animali in cui la proteina RNF5 era stata spenta.

Risultati Gli studi su modelli animali ci hanno permesso di dimostrare che l'inibizione della proteina RNF5 migliora significativamente il malassorbimento intestinale tipico della FC, supportando l'ipotesi che RNF5 possa costituire il bersaglio per una nuova terapia farmacologica per la FC. Inoltre, questo studio ci ha permesso di identificare nuove proteine la cui modulazione permette un maggior recupero della F508del, ad esempio le proteine MLLT6, UBXD1 e FAU. In particolare, MLLT6 è una proteina che regola l'espressione di altri geni, e gioca un ruolo nella regolazione dell'assorbimento di sodio negli epitelii. Altri studi sono necessari per caratterizzare il ruolo di queste proteine nella maturazione/degradazione di CFTR.

Possibili ricadute per ricerca e clinica L'identificazione di nuove proteine e il chiarimento dei processi cellulari implicati nella maturazione/degradazione di CFTR è di primaria importanza, perché consentirà di definire nuovi bersagli per terapie farmacologiche più efficaci.

45. The molecular structure and the folding of the whole Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR)

Moran O

Istituto di Biofisica, Consiglio Nazionale delle Ricerche-CNR, Genova (FFCProject#4/2012, Extension: see abstract 20)



Oscar Moran

Background Cystic fibrosis (CF) is a genetic disease of epithelia, in which the primary defect is a mutation of the CFTR protein. 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. Nowadays, the molecular mechanism of the correctors is unknown, limiting the rational design of effective substances. The description of the molecular structure of the CFTR is a premise to understand these mechanisms.

Preliminary results We studied the structural properties of CFTR by small-angle X-ray scattering methods. The activities of the project FFC#4/2012 were concluded with several important results: 1- we demonstrated that CFTR-therapy drugs interact with lipid membranes; 2- we showed the differences between the structure of membranes extracted from cells over-expressing wild type (WT) and ΔF508 CFTR, as well as membranes with ΔF508 from cells treated to rescue the CFTR; 3- we investigated the structure of CFTR purified from

yeast, showing the differences on the structure of WT and ΔF508 human CFTR.

Objectives The extension of this project (FCC#4/2014) is aimed to study isolated CFTR. As results obtained from proteins purified from yeast showed an incomplete folding of the protein, now CFTR, normal or mutated, will be purified from mammalian cells, which will be also treated with correctors in order to study how these drugs modify the molecular conformation of the mutant. The goal is to study the structure of normal CFTR in different functional states, and compare it with the structure of the protein carrying the mutation ΔF508.

Spin-off for research & clinical purposes The results obtained 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)

Premesse La fibrosi Cistica è una malattia genetica in cui il difetto principale è una mutazione della proteina CFTR. La mutazione più frequente nei pazienti, ΔF508, causa difetti nella maturazione della proteina, che viene distrutta prima di essere inserita nella membrana cellulare. L'uso di composti, noti come correttori, che impediscono la distruzione di ΔF508 permettendo di raggiungere la membrana, è stata indicato come terapia per pazienti con questa mutazione. Oggi-giorno, il meccanismo molecolare dei correttori è sconosciuta, limitando la progettazione razionale di sostanze efficaci. La descrizione della struttura molecolare della CFTR è una premessa per comprendere questi meccanismi.

Risultati preliminari Abbiamo studiato le proprietà strutturali di CFTR con metodi di diffusione di raggi X a basso angolo. Le attività del progetto FFC # 4/2012 sono state concluse con diversi risultati importanti: 1- abbiamo dimostrato che i farmaci CFTR-terapia interagiscono con le membrane lipidiche; 2- abbiamo evidenziato le differenze tra la struttura delle membrane estratte da cellule sovra-esprimono la CFTR normale (WT) e ΔF508, così come le membrane con ΔF508 da cellule trattate per recuperare la CFTR; 3- abbiamo studiato la struttura della CFTR purificata da lievito, che mostra le differenze tra struttura di CFTR umano WT e ΔF508.

Obiettivi L'estensione di questo progetto (FFC# 4/2014) ha lo scopo di studiare la CFTR purificata. Siccome i risultati ottenuti dalle proteine purificate da lievito ha mostrato un incompleto ripiegamento della proteina, questa volta la CFTR, normale o mutata, sarà purificata da cellule di mammifero, che saranno trattati anche con correttori per studiare come questi farmaci modifichino la conformazione molecolare del mutante. L'obiettivo è quello di studiare la struttura di CFTR normale in diversi stati funzionali e confrontarla con la struttura della proteina che con la mutazione ΔF508.

Possibili ricadute per ricerca e clinica I risultati ottenuti serviranno a comprendere i meccanismi funzionali della CFTR normale e le sue alterazioni patologiche causate dalla mutazione ΔF508 e per ottenere delle informazioni che potrebbero essere fondamentali per lo sviluppo di nuovi e migliori correttori per la terapia farmacologica del difetto di base in FC.

Italy; ²Institute of Biomembrane and Bioenergetics, CNR, Bari, Italy; ³IRBM Science Park, Pomezia, Italy (FFC Project#1/2012, Completed).

Internal Collaborators: Giulia Breveglieri, Lucia Carmela Cosenza, Ilaria Lampronti, Francesca Salvatori, Cristina Zuccato. Jesus Ontoria.

External Collaborator: Giulio Cabrini, Lab. Molecular Pathology; Laboratory of Clinical Chemistry and Haematology; University-Hospital, Verona, Italy



Monica Borgatti, responsabile del progetto, Nicola Altamura e Alberto Bresciani

Background Nonsense mutations are the leading cause for approximately 30% of inherited diseases, including cystic fibrosis (CF). They generate premature termination codons (PTCs) that cause a premature arrest of translation precluding the synthesis of a full-length CFTR protein. Functional consequences of these mutations are often exacerbated by the nonsense-mediated RNA decay pathway (NMD), a translation-linked mechanism able to detect and degrade mRNA carrying PTCs thus preventing, eventually, the synthesis of a truncated partially functional CFTR protein. In the last few years, it has been demonstrated that drugs (like aminoglycoside antibiotics) can be designed and produced to promote ribosomal read-through at PTC such as to restore the synthesis of 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 molecules with read-through-inducing capability.

Hypothesis and objectives This project studied the development of: (a) Cellular 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.

Essential methods The read-through activity screening of the IRBM chemical collection was carried out in human epithelial cells carrying GFP gene as reporter sequence with stop codon mutations using FACS analysis in 24-well plate and Acumen explorer instrument. The NMD mechanism has been modulated using two different strategies: (a) shRNA UPF1 in lentivirus vectors; (b) knock-out strategy using plasmids carrying zincfinger domains.

Results (a) Development of yeast systems for the read-through screening: we have constructed a novel system that consists of two sequences encoding the fluorescent proteins, *yEGFP* and *Cherry* cloned in tandem in phase or interrupted by a stop codon and optimised for the expression in yeast. We have evaluated the dual fluorescence system in a read-through assay in the presence of aminoglycosides G418 and several other molecules leading to read-through correction of stop codon mutations, including tBramycin. (b) Development of cellular clones transfected with lentivirus vectors with GFP-carrying nonsense mutations. (c) Identification of a bioactive compound from IRBM library using GFPmut cellular clones. (d) Creation of UPF1 knock-out cellular clones for the modulation of NMD mechanism. (e) Biological assays to analyze CFTR function: we have developed experimental steps for the generation of a new model system consisting of lentivirus vector combining EYFP gene reporter (for the CFTR analysis) with

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

Borgatti M¹, Altamura N², Bresciani A³

¹Life Sciences and Biotechnology Department, Biochemistry and Molecular Biology Section-Ferrara University, Ferrara,

CFTR gene with or not stop codons and transfected in human cell line in order to analize the restoration of CFTR protein and channel function. **Spin-off for research & clinical purposes.** Pharmacological approach based on molecules able to induce the read-through activity and modulate NMD mechanism 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 di 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 decaimento 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 readthrough in grado di mascherare il segnale di stop prematuro e far riavviare la sintesi di proteina CFTR. Recentemente abbiamo sviluppato modelli basati sul lievito *S. cerevisiae* da utilizzare per lo screening di potenziali farmaci con attività read-through.

Ipotesi e obiettivi Questo progetto prevede l'identificazione di 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 o la proteina CFTR recanti mutazioni di stop. Inoltre prevede lo sviluppo di strategie per modulare il meccanismo NMD e individuare la migliore combinazione di molecole read-through e modulatori NMD.

Metodi essenziali La libreria IRBM costituita da composti commerciali e non è stata analizzata per l'attività read-through in cellule umane recanti il gene reporter GFP conmutazioni di stop usando analisi al FACS in piastra da 24 pozzi e la tecnologia Acumenexplorer. La modulazione del meccanismo NMD è stato realizzato con due diverse strategie: (a) short hairpin RNA per UPF1 in vettori lentivirali; (b) Knock-out di UPF1 usando plasmidi recanti domini per zinc-fingers.

Risultati (a) Sviluppo di sistemi basati sul lievito per lo screening di molecole readthrough: abbiamo costruito un nuovo sistema basato su due sequenze che codificano perle proteine fluorescenti yEGFP e Cherry intervallate da un codone di stop e ottimizzate per l'espressione in lievito. Questo potente sistema a doppia fluorescenza è stato validato esaminando la capacità di indurre read-through da parte di amminoglicosidi, G418 e di parecchie altre molecole aventi un'attività di correzione delle mutazioni di stop, incluso la Tobramicina. (b) Sviluppo di cellulari trasfettati con vettori lenti virali con GFP e recanti codoni di stop. (c) Identificazione di un composto bioattivo della libreria IRBM usando questo clone. (d) Creazione di cloni cellulari con assenza di espressione di UPF1 per la modulazione del meccanismo NMD. (e) Saggi biologici per analizzare l'attività CFTR: abbiamo sviluppato diversi step sperimentali per la produzione di un nuovo modello costituito da un vettore lenti virale che combina il gene reporter EYFP (per l'analisi dell'attività CFTR) con il gene CFTR con o senza mutazioni di stop e trasfettato in cellule umane per analizzare il ripristino della sintesi di proteina CFTR e della sua funzionalità come canale ionico.

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

47. Study of the pathogenetic and therapeutic role of the Epithelial Na⁺ channel (ENaC) in CF and CF-like disease

Lucarelli M¹, Bombieri C², Conese M³

¹Dip. Biotecnologie cellulari ed Ematologia, Università

"La Sapienza", Roma; ²Dip. Scienze della Vita e della Riproduzione, Università di Verona; ³Dip. Scienze Biomediche, Università di Foggia

(FFCProject#3/2012, Completed)



Marco Lucarelli, a sinistra, con i partner di progetto Massimo Conese e Cristina Bombieri

Background ENaC (Epithelial Na⁺ channel) is involved in CF and CF-like diseases. Mutations of ENaC genes may contribute to the final clinical manifestations of CF. The wild-type, although deregulated, ENaC appears as a better therapeutic target than the mutated CFTR. Proteolytic activation and epigenetics play a regulatory role and may also act as therapeutic targets.

Hypothesis and objectives 1) To establish whether, in CF or CF-like diseases, mutations in ENaC genes contribute to the pathogenesis and to the phenotype severity. 2) To characterize mutations selected in ENaC genes in CF or CF-like diseases. 3) To evaluate therapeutic approaches of ENaC epigenetic downregulation and activity attenuation.

Methods We used the human stable cell lines CFBE41o- as representative of CF epithelial cells and 16HBE14o- as the wild-type counterpart. We also used human CF bronchial primary epithelial cells, provided by the FFC facility. We evaluated epigenetic-based approaches of ENaC expression downregulation inducing DNA hypermethylation by the use of the S-adenosyl methionine (SAM) and/or chromatin condensation by using curcumin, a histone acetyltransferases (HATs) inhibitor. To induce the channel activity attenuation, we also used the camostat mesylate, a low-molecular weight inhibitor of extracellular peptidases and, consequently, of proteolytic activation of ENaC. The effect on both ENaC gene expression and apical fluid absorption were evaluated. For mutational and functional analysis, the sequencing of the 3 ENaC genes were performed in CF patients and Fischer Rat Thyroid (FRT) cell clones expressing human ENaC were produced.

Results ENaC-dependent fluid absorption was reduced in CFBE41o-, 16HBE14o- and CF primary cells by epigenetic modulation, with approaches acting on both DNA methylation and chromatin, as well as by activity attenuation by inhibiting extracellular peptidase. The last treatment reduced the rate of fluid absorption also in FRT cells, transfected with the three wild type ENaC subunits. In the CFBE41o- and 16HBE14o- cell line, the treatment with SAM and/or curcumin appeared to reduce the expression of ENaC genes. On the contrary, in CF primary cells neither SAM nor curcumin resulted to modulate ENaC gene expression. In conclusion, all treatments resulted to be able to reduce channel activity. In case of epigenetic treatments in stable cell lines, the molecular basis for this reduction seems to be the transcription inhibition, whereas in primary cells a different mechanism, to be clarified, seems effective.

For mutational analysis of ENaC genes, 84 patients with CF

of CF-like diseases, with at least one unidentified *CFTR* mutation, were analyzed. If, accordingly to a previous study, the only sequence variations taken into account are those missense or very close to exon / intron junctions and, in addition, with a MAF<0.025, our cumulative frequency of potentially mutated alleles is 0.25. This frequency is in agreement with a previously published frequency of 0.30. After frequency and *in silico* analysis, 4 probably damaging ENaC mutations (7 alleles) were selected: *p.Pro37Leu* (*SCNN1A*), *p.Glu438Gly* (*SCNN1B*), *p.Ser82Cys* (*SCNN1B*) and *p.Glu197Lys* (*SCNN1G*). We have been using FRT cells expressing tagged human ENaC genes as cellular models for the study of functional effects of these 4 variations. As a lot of CF or CF-like patients resulted negative for ENaC gene mutations, to obtain more information about a possible involvement of other genes, a whole exome sequencing by a NGS technology is ongoing.

Spin-off for research & clinical purposes The possibility of activity attenuation of ENaC channel by inhibiting extracellular peptidases and of decrement of ENaC gene expression by epigenetic approaches arises. Our results also add new insight into CF molecular mechanisms, partially extending the pathogenetic mechanism to ENaC molecular lesions.

Studio del ruolo patogenetico e terapeutico del canale epiteliale del Na⁺ (ENaC) nella Fibrosi Cistica tipica e atipica

Ragioni dello studio. Il canale epiteliale del sodio (ENaC) è coinvolto nella FC tipica e atipica. Le mutazioni dei geni ENaC possono contribuire alle manifestazioni cliniche della FC. L'ENaC (wild-type nella FC sebbene non correttamente regolato) sembra essere un target terapeutico migliore del CFTR mutato. L'attivazione proteolitica e l'epigenetica hanno un ruolo come meccanismi regolatori e potrebbero essere utilizzati anche come target terapeutici.

Ipotesi e obiettivi 1) Stabilire se, nella FC tipica e/o atipica, le mutazioni dei geni ENaC contribuiscono alla sua patogenesi e alla modulazione della gravità clinica. 2) Characterizzare le mutazioni dei geni ENaC coinvolte nella FC. 3) Valutare gli approcci terapeutici di repressione epigenetica e attenuazione dell'attività dell'ENaC.

Metodi Abbiamo usato le linee cellulari umane stabilizzate CFBE41o- come modello di epitelio FC e le 16HBE14o- come controparte wild-type. Abbiamo inoltre usato colture primarie di cellule bronchiali umane FC, fornite dalla facility della FFC. Abbiamo valutato approcci epigenetici volti alla diminuzione dell'espressione dei geni ENaC, inducendo ipermetilazione mediante l'uso della S-adenosil metionina (SAM) e/o condensazione cromatinica usando la curcumina, un inibitore delle istone acetiltransferasi (HAT). Per ridurre l'attività del canale, abbiamo anche utilizzato il camostat

mesilato, un inibitore a basso peso molecolare delle peptidasi extracellulari e, conseguentemente, dell'attivazione proteolitica dell'ENaC. È stato valutato l'effetto sia sull'espressione dei geni ENaC che sul riassorbimento apicale del fluido extracellulare. Per l'analisi mutazionale e funzionale, è stato effettuato il sequenziamento dei 3 geni ENaC in pazienti FC e sono stati prodotti cloni cellulari di FRT transfettati con ENaC umano.

Risultati Il riassorbimento apicale di fluido dipendente dall'ENaC è risultato ridotto nelle CFBE41o-, 16HBE14o- e nelle colture primarie di cellule bronchiali FC, sia dai trattamenti epigenetici, basati sulla modulazione della metilazione del DNA o della struttura cromatinica, che dalla riduzione dell'attività del canale originata dall'inibizione delle peptidasi extracellulari. Quest'ultimo trattamento è risultato anche efficace nel ridurre il riassorbimento di fluido apicale nelle FRT transfettate con le 3 subunità wild-type dell'ENaC. Nelle CFBE41o- e 16HBE14o-, il trattamento con SAM e/o curcumina ha ridotto anche l'espressione dei geni ENaC. Invece, nelle colture primarie, né la SAM né la curcumina sembrano modulare l'espressione dei geni ENaC. In conclusione, tutti i trattamenti effettuati sono in grado di ridurre l'attività del canale. Nel caso dei trattamenti epigenetici, la base molecolare per la riduzione di attività nelle linee cellulari sembra essere l'inibizione trascrizionale mentre, nelle cellule primarie, sembra operare un diverso meccanismo ancora da chiarire.

Per l'analisi mutazionale dei geni ENaC sono stati studiati 84 pazienti con FC tipica o atipica, con almeno 1 mutazione del CFTR non identificata. Seguendo l'impostazione di uno studio precedente, sono state inizialmente considerate solo le variazioni di sequenza missenso o poste nelle immediate adiacenze delle giunzioni introne / esone, con MAF<0.025. La frequenza cumulativa delle variazioni trovate è risultata essere 0.25, molto simile al precedente studio (0.30). Dopo l'analisi di frequenza e gli studi *in silico*, sono state selezionate 4 mutazioni (7 alleli) probabilmente patogenetiche: *p.Pro37Leu* (*SCNN1A*), *p.Glu438Gly* (*SCNN1B*), *p.Ser82Cys* (*SCNN1B*) and *p.Glu197Lys* (*SCNN1G*). Queste variazioni sono al momento in caratterizzazione mediante l'uso delle cellule FRT esprimenti i geni ENaC umani. Poiché molti pazienti sono risultati negativi all'analisi mutazionale dei geni ENaC, per valutare il possibile contributo di altri geni al fenotipo FC è in corso il sequenziamento dell'esoma mediante tecnologia NGS.

Possibili ricadute per ricerca e clinica Emerge la possibilità di ridurre l'attività del canale ENaC mediante un inibitore delle peptidasi extracellulari e anche di ridurre l'espressione dei geni ENaC mediante un approccio epigenetico. I nostri risultati consentono anche di individuare le lesioni molecolari dell'ENaC come uno dei possibili meccanismi patogenetici di FC.

PLENARY SESSION 5

Disease models for CF research

De Jonge HR: A critical overview of the current CF models
Galietta L: Highlights from the meeting on primary cell cultures

Bragonzi A: Highlights from the meeting on murine models

POSTER SESSION 3

Infection and new antimicrobial perspectives

48. Pathophysiological relevance of glycosaminoglycans in *Pseudomonas aeruginosa* chronic lung infections and validation of new therapeutic approaches to modulate inflammation and tissue remodeling

Cigana C¹, Naggi A², Colombo C³

¹Infections and Cystic Fibrosis Unit, Division of Immunology, Transplantation and Infectious Diseases, HSR, Milano; ²Ist. Ricerche Chimiche e Biochimiche G. Ronzoni; ³Centro Regionale FC, Fond. IRCCS "Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena", Milano
(FFCProject#14/2013, In progress)



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

Background CF airways select *P. aeruginosa* patho-adaptive variants that, during chronic colonization, acquired the ability to avoid the innate immunity and are associated with damage and airways remodelling. Structural changes in the airways are characterized by mucus hypersecretion, degradation of its structural components, and high level of sulphated glycosaminoglycans (sGAG).

Hypothesis and objectives The hypothesis is that during *P. aeruginosa* chronic lung infection there is an increasing concentration and sulphation of different sGAG, contributing to inflammation and tissue damage. Thus the aim of this project is to establish the role of sGAG during *P. aeruginosa* chronic infection and to modulate the vicious cycle inflammation-damage using specific molecules.

Methods *P. aeruginosa* clinical strains were used to infect Wt and CF mice in agar-beads mouse model. sGAG were quantified by dye-binding assay in murine lung and in human respiratory samples. HPLC-MS was used to distinguish different sGAG species in lung supernatants of mice. Modified polysaccharides (PS) were prepared and tested subcutaneously in mice during *P. aeruginosa* acute and chronic lung infection.

Results During chronic infection mice infected with late *P. aeruginosa* strain showed higher levels of sGAG and, in particular, a greater deposition of heparin/heparan sulfate compared to control mice. A library of PS, with attenuated anti-coagulant properties, were tested in our *P. aeruginosa* acute and chronic lung infection model. One of these PS (C23) inhibited significantly leukocytes recruitment in the bronchia, as well as TGF- β , suggesting an effect on inflammation and tissue damage induced by *P. aeruginosa* infection. Analysis in human respiratory samples showed that sGAG are present in lung of CF patients infected with *P. aeruginosa* and they are associated to markers of airways remodelling.

Spin-off for research & clinical purposes Understanding

the impact of sGAG on pulmonary condition during *P. aeruginosa* chronic infection could provide new insights on CF lung disease pathogenesis and suggest new biomarkers to follow the disease progression. Experiments performed with chemically modified PS suggest that these molecules could compete with natural sGAG in lung tissue and could represent a new therapeutic perspective for CF.

Rilevanza fisiopatologica dei glicosaminoglicani nelle infezioni croniche da *Pseudomonas aeruginosa* e validazione di nuovi approcci terapeutici per modularne l'attività infiammatoria e di danneggiamento del tessuto polmonare

Ragioni dello studio L'infezione cronica da *P. aeruginosa* è associata a danno e rimodellamento delle vie aeree. I cambiamenti strutturali delle vie respiratorie sono caratterizzati da ipersecrezione di muco, degradazione della matrice strutturale, e da alti livelli di glicosaminoglicani (GAG), tra i principali costituenti del tessuto polmonare.

Ipotesi e obiettivi La nostra ipotesi è che durante le infezioni croniche da *P. aeruginosa* ci sia un aumento della concentrazione e della solfatazione di differenti GAG che contribuiscono all'infiammazione e al danno tissutale. Lo scopo di questo progetto è, quindi, di stabilire il ruolo dei GAG durante le infezioni croniche da *P. aeruginosa* e di modularne l'attività usando molecole specifiche.

Metodi Ceppi clinici di *P. aeruginosa* sono stati utilizzati per infettare topi Wt e FC in un modello di infezione cronica per valutare la quantità dei GAG e le specifiche specie più espresse nei polmoni murini. Polisaccaridi modificati (PS), che competono con i GAG presenti nel polmone, sono stati preparati e somministrati ai topi durante l'infezione acuta e cronica.

Risultati Durante il corso dell'infezione cronica *P. aeruginosa* induce un aumento dei GAG sulfati e, in particolare, di eparina/eparansolfato nei polmoni murini rispetto ai topi di controllo. Una libreria di PS è stata testata in modelli di infezione acuta e cronica con *P. aeruginosa*. Uno di questi PS (C23) ha mostrato risultati promettenti inibendo in modo significativo il reclutamento dei leucociti e la quantità di TGF- β , un marcitore di fibrosi, dimostrando un effetto sull'infiammazione e sul danno tissutale indotto da *P. aeruginosa*. Le analisi nei campioni umani mostrano che i GAG sono presenti nei polmoni di pazienti FC infetti da *P. aeruginosa* e correlano con marcatori di rimodellamento delle vie respiratorie.

Risultati attesi e loro significato Determinare la rilevanza dei GAG nell'aggravamento della patologia polmonare in FC durante le infezioni croniche causate da *P. aeruginosa* potrebbe dimostrare la loro potenzialità come nuovi biomarcatori clinici per valutare la progressione della malattia. I risultati ottenuti con i PS modificati suggeriscono che queste molecole competono con i GAG nel tessuto polmonare inibendo sia l'infiammazione sia il rimodellamento tissutale e quindi potrebbero rappresentare una nuova prospettiva terapeutica per la FC.

49. Cystic fibrosis modifier genes related to *Pseudomonas aeruginosa* lung disease

Bragonzi A¹, Iraqi F²

¹Unità di infezioni e fibrosi cistica, divisione di immunologia, trapianti e malattie infettive, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano; ²Clinical Microbiology and Immunology, Tel Aviv University (FFCProject#9/2014, New)



Alessandra Bragonzi, terza da sinistra, e il suo gruppo di ricerca

Background Cystic fibrosis (CF) is a recessive monogenic disorder caused by mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene, encoding a chloride channel at the surface of most epithelial cells. Bronchiectasis, mucous plugging and parenchymal destruction caused mainly by *P. aeruginosa* infections progressively lead to severe lung disease and mortality in most of the CF patients. Despite the progress that has been made in understanding the pathophysiology of CF at the cellular and molecular level, the causal link between the primary defect, i.e. lack of functional CFTR, and the onset of CF lung disease is still not fully delineated.

Hypothesis & Objectives The remarkable heterogeneity among CF patients in the time of onset as well as in the severity of *P. aeruginosa* lung disease raised the question whether other genetic loci outside the CFTR can modify the variations and the outcome of the *P. aeruginosa* airways disease. Poor phenotype/genotype correlation in human studies and the lack of a fully faithful CF mouse model limit scientific advancements in the field. Thus, a major objective of this project is to define genetic factors that influence the severity of CF lung disease by using the high genetically diverse mouse resource population named the Collaborative Cross (CC) mice as novel tool.

Essential methods CC mice are a new resource to the development of modern quantitative genetics and model human genetic diversity. CC strains of mice will be evaluated for susceptibility to *P. aeruginosa* infection to identify mouse strains presenting deviant disease phenotypes amenable for genetic analyses. Strong candidate genes associated with *P. aeruginosa* susceptibility within the mapped genomic region/s will be identified and validated in CF mice.

Preliminary results We showed that severity of *P. aeruginosa* infection is influenced by host genetic background observing different response among nine inbred classical mouse strains. In addition, results obtained in a small cohort of 17 CC mice indicated that the widely marked differential response to *P. aeruginosa* infection is mainly affected by host genetic factors, as multiple genetic loci or polymorphic variations (unpublished data).

Expected results & their significance Overall, the project will explore more powerful mouse models as novel tools to address critical issues regarding the risk of *P. aeruginosa* lung colonization among CF and it will open the window for the investigation of new opportunities to revert the pathological changes elicited in the lungs by airway infection.

Geni modificatori legati alla malattia polmonare da *Pseudomonas aeruginosa* in fibrosi cistica

Ragioni dello studio La fibrosi cistica (FC) è una malattia monogenica recessiva causata da mutazioni nel gene codificante per un canale del cloro transmembrana, il CFTR. La malattia polmonare, caratterizzata da bronchiectasie, presenza di muco nelle vie aeree e distruzione parenchimale dovuta

ad infezioni da *P. aeruginosa*, è responsabile della mortalità dei pazienti FC. Nonostante i notevoli progressi compiuti nella comprensione della fisiopatologia della FC a livello cellulare e molecolare, il nesso di causalità tra il difetto primario, la mancanza cioè di CFTR funzionale, e l'insorgenza della malattia polmonare FC non è ancora delineato.

Ipotesi e obiettivi Esiste una notevole eterogeneità nell'insorgenza dell'infezione batterica e nella gravità della malattia polmonare in pazienti FC. In aggiunta, l'assenza di una spontanea malattia polmonare nei topi CFTR-KO solleva la questione se altri loci genetici al di fuori del CFTR possono indurre variazioni nella risposta immunitaria a *P. aeruginosa* e nella gravità della malattia. L'obiettivo principale del progetto è definire i fattori genetici che influenzano la gravità della mutazione CFTR, utilizzando una nuova popolazione di topi caratterizzati da un'alta variabilità genetica, i Collaborative Cross (CC).

Metodi Questi animali rappresentano un importante strumento per rappresentare la popolazione umana. I topi CC saranno caratterizzati per la suscettibilità all'infezione da *P. aeruginosa* ed utilizzati per mappare i determinanti genetici associati alla gravità della malattia FC. Geni candidati responsabili della suscettibilità a *P. aeruginosa* saranno identificati e validati in modelli murini FC.

Risultati preliminari Abbiamo dimostrato che la gravità dell'infezione *P. aeruginosa* è influenzata da background genetico dell'ospite infetto, osservando una risposta diversa tra nove topi inbred commerciali. Inoltre, i nostri dati ottenuti sui topi CC hanno dimostrato che la gravità dell'infezione da *P. aeruginosa* è influenzata principalmente da fattori genetici dell'animale infetto, come multipli loci genetici o varianti genetiche polimorfiche.

Risultati attesi e loro significato Questo studio apre la possibilità di traslare i risultati nei pazienti FC in uno studio di associazione per geni modificatori in relazione alla presenza di infezione da *P. aeruginosa* e gravità della malattia polmonare. Nel complesso, il progetto fornirà importanti risultati sulla patogenesi della malattia polmonare e ci permetterà di aprire nuovi orizzonti sulle alterazioni patologiche determinate da infezioni nelle vie aeree, importanti indizi per nuovi interventi terapeutici.

50. Anti-virulence therapy against *Pseudomonas aeruginosa*: identification of anti-biofilm drugs and development of inhalable Niclosamide and Flucytosine formulations

Leoni L¹, Ungaro F², Fiscarelli EV³

¹University Roma Tre, Rome; ²University of Naples

"Federico II"; ³Children's Hospital "Bambino Gesù", Roma (FFCProject#10/2013, In progress)



Livia Leoni, quarta da sinistra, con il suo team di ricerca

Background. Early aggressive and maintenance antibiotic therapies prolong cystic fibrosis (CF) patient life, but are not able to eradicate *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. Anti-virulence drugs represent a promising therapeutic option in CF. These drugs could alleviate the severity of the infection, reduce lung inflammation, and help antibiotics in eradicating the *P. aeruginosa* infection.

The long times and high costs required for the development of "brand new" anti-virulence drugs can be saved by repurposing "old" drugs already used in humans for different diseases. We have recently shown that the antimycotic drug flucytosine and the antihelmintic drug niclosamide can be repurposed to suppress *P. aeruginosa* virulence in vitro and in animal models of infection. However, the old drugs need to be re-formulated for the new application in CF therapy.

Hypothesis and objectives

- 1) To develop and validate inhalable formulations of flucytosine and niclosamide for CF therapy.
- 2) To discover additional drugs with anti-virulence activity against *P. aeruginosa*.

Essential methods Inhalable formulations of flucytosine and niclosamide have been developed through the adequate combination of available technologies and excipients for inhaled drugs and preliminarily characterized in vitro for their activity and toxicity. A biosensor targeting the GacS-GacA system of *P. aeruginosa*, crucial for biofilm development, has been used for the screening of 1600 "old" drugs.

Preliminary results Flucytosine and niclosamide inhalable formulations have been successfully developed. The formulations are easily delivered through advanced nebulizers and breath-actuated dry powder inhalers (DPI) available to CF patients for drug inhalation and display high activity against *P. aeruginosa* infection and low toxicity in vitro. Further characterization of these formulations employing animal models and *P. aeruginosa* CF isolates is in progress.

The screening with the biosensor described above gave no interesting results. This line has been abandoned. A second screening using a biosensor targeting the c-di-GMP system of *P. aeruginosa*, crucial for biofilm development, is in progress.

Expected results and their significance

- 1) Finalization of pre-clinical studies necessary to start phase I clinical trials for flucytosine and niclosamide.
- 2) Maintenance of the drug discovery pipeline through the identification of new drugs active against *P. aeruginosa* biofilm.

Terapie anti-virulenza contro *Pseudomonas aeruginosa*: identificazione di farmaci anti-biofilm e sviluppo di formulazioni inalatorie di Niclosamide e Flucitosina

Ragioni dello studio L'infezione polmonare cronica causata dal biofilm formato da *Pseudomonas aeruginosa* nelle persone con fibrosi cistica (FC) può essere tenuta sotto controllo grazie agli antibiotici, ma non eliminata.

Una promettente strategia anti-pseudomonas prevede l'utilizzo di farmaci che inibiscono la capacità del batterio di causare infezione e formare il biofilm. Questi farmaci "anti-virulenza", potrebbero ridurre la necessità di trattamenti antibiotici aggressivi e favorire l'eradicazione dell'infezione cronica. Lo sviluppo ex novo di un farmaco anti-virulenza richiede tempo e costi, che possono essere in parte risparmiati identificando una nuova attività collaterale anti-virulenza in medicinali già usati per la cura di altre malattie.

Ipotesi ed obiettivi I farmaci flucitosina e niclosamide, rispettivamente usati contro le micosi ed i vermi intestinali, inibiscono la virulenza di *P. aeruginosa*, ma non sono mai stati formulati per le esigenze delle persone affette da FC. Questo progetto ha come principale obiettivo la messa a punto di formulazioni inalabili di flucitosina e niclosamide adatte alla terapia FC.

Inoltre, saranno identificati nuovi farmaci attivi contro il biofilm di *P. aeruginosa*.

Metodi Sono state preparate e analizzate numerose formulazioni inalabili di flucitosina e niclosamide, in forma liquida o in polvere, usando tecnologie ed eccipienti che ne consentano la rapida trasferibilità alla pratica clinica.

Risultati preliminari Sono state ottenute formulazioni di flucitosina e niclosamide rispondenti agli standard di qualità imposti dall'attuale normativa europea. Esperimenti in protetta hanno dimostrato che queste formulazioni possono essere sommistrate facilmente attraverso i dispositivi per inalazione comunemente impiegati dai pazienti FC, hanno bassa tossicità ed elevata attività anti-*pseudomonas*.

E' stata iniziata l'analisi di una collezione di 1600 farmaci, già usati nell'uomo, per identificare composti con attività anti-biofilm in *P. aeruginosa*.

Risultati attesi e loro significato Gli studi sulle formulazioni inalatorie di flucitosina e niclosamide saranno approfonditi per confermarne efficacia e assenza di tossicità, anche in modelli sperimentali animali e utilizzando ceppi di *P. aeruginosa* isolati da pazienti affetti da FC. L'identificazione di specifiche attività anti-biofilm in medicinali già usati nell'uomo fornirà altre soluzioni terapeutiche potenzialmente trasferibili rapidamente ai pazienti affetti da FC.

51. Investigating the airway microbiome in cystic fibrosis patients with a severe decline in lung function: an opportunity for a personalized microbiome-based therapy.

Bevvino A¹, Mengoni A², Taccetti C³, Fiscarelli EV⁴, De Alessandri A⁵

¹Unità Tecnica per il Sistema di Sviluppo Sostenibile e Innovazione AgroIndustriale, ENEA Agenzia Nazionale Italiana, Centro Ricerche Casaccia, Roma; ²Dip. Biologia, Università di Firenze; ³Dip. di pediatria Centro FC, Ospedale "A. Meyer", Firenze; ⁴Laboratorio Microbiologia, Ospedale "Bambin Gesù", Roma; ⁵Dip. di Scienze Pediatriche, Centro FC, Università di Genova, Istituto "G. Gaslini" (FFCProject#10/2014, New)



Annamaria Bevvino, terza da destra, e il suo gruppo di ricerca

Background Cystic fibrosis (cf) is characterized by a progressive decline in lung function. despite antibiotic treatment, patients with cf may show a rapid and severe decline in lung function, measured as the percentage of predicted forced expiratory volume in 1 second (% fev1). interpreting the significance of changes in % fev1 over time requires a more in-depth comprehension of the airway microbiome (the totality of microbes and their genomes in a defined environment).

Hypothesis and objectives The main objectives of the study, which follows a pilot project supported by the ffc (FFC#8/2012) are: i) to characterize the airway microbiome of substantial decliners (sd) and stable (s) patients with cf, by bioinformatics analysis of airway metabarcoding and metage-

nomes sequenced in the previous project; ii) to identify additional biomarkers (in terms of both opportunistic non-cultivable pathogens and gene functions) of the serious decline in lung function; iii) to characterize the changes over time in the composition of the airway microbiome of s and sd patients (longitudinal study). the starting hypothesis is that a number of hidden pathogens/biomarkers from non-cultivable bacteria may be present in patient's airways of cystic fibrosis and could be used as predictive markers of severe decline in lung function, allowing earlier intervention and improving health care treatment of cf patients.

Methods This is a two steps project:

- bioinformatic analysis of next generation sequencing (ngs) data of previous project.
- beginning of a longitudinal metagenomic study where specific individual patients will be followed at regularly scheduled cf clinic visits at 2-months intervals.

Preliminary results In the previous project (FFC#8/2012), potential biomarkers related to FEV1 decline have been already identified. here, preliminary bioinformatic analysis of metabarcoding data revealed a sharp difference in the structure and composition of airway microbiomes of s and sd patients, especially in the severe disease group (FEV1<39%) where *pseudomonas* represents the most abundant genus in sd patients. our results also indicated that microbial communities in s patients were highly interconnected and more diverse than those of sd patients, suggesting a steady and core community of the airways in stable patients.

Expected results and their significance The results of the present proposal will permit to individuate the microbiome associate with a severe decline in lung function and biomarkers as good candidates predictors of substantial decline in lung function. a more in-depth metagenomic analysis of cf airway microbiome will permit to identify signatures for s and sd patients to unlock the potential of microbiome-based personalized medicine in major disease areas including cf.

Indagine del microbioma delle vie aeree nei pazienti con fibrosi cistica che presentano un severo declino della funzione polmonare: un'opportunità per una terapia personalizzata basata sul microbioma

Premessa Per "microbioma" delle vie aeree dei pazienti affetti da fibrosi cistica (FC) si intende l'insieme dei microrganismi, dotati di specifico patrimonio genetico, che coesistono nelle vie respiratorie dei pazienti FC.

Ragioni dello studio La fibrosi cistica è caratterizzata da un progressivo declino della funzione polmonare. Alcuni pazienti FC possono presentare, nonostante il trattamento terapeutico convenzionale, un declino più rapido e una diminuzione più severa della funzione respiratoria (espressa come FEV1 o *Volume di espirazione forzata nel primo secondo*). La comprensione del declino del FEV1 richiede una conoscenza più approfondita del microbioma delle vie aeree dei pazienti FC.

Ipotesi e obiettivi I principali obiettivi dello studio, che fa seguito al progetto pilota (FFC#8/2012) sono: i) caratterizzare il microbioma delle vie respiratorie in pazienti FC con un severo declino della funzione polmonare (SD) e in pazienti FC stabili (S), mediante analisi bioinformatica delle sequenze di metabarcoding e metagenomiche ottenute nel corso del progetto FFC #8/2012; ii) identificare nuovi biomarcatori (microrganismi e geni che li caratterizzano) associati al severo declino della funzione polmonare; iii) caratterizzare le variazioni nel tempo nella composizione delle comunità microbiche del tratto respiratorio di pazienti S e SD (studio longitudinale). L'ipotesi di partenza è che un certo numero di agenti patogeni nascosti /biomarcatori possano essere presenti nelle vie aeree dei pazienti FC e si possano utilizzare come marcatori predittivi del severo declino della funzione

polmonare, permettendo un intervento precoce e migliorando il trattamento terapeutico dei pazienti FC.

Metodi Il progetto si sviluppa in due fasi:

-Analisi bioinformatica dei dati di sequenziamento ultra-massivo di ultima generazione (NGS) ottenuti nel corso del precedente progetto.

-Inizio di uno studio longitudinale che prevede l'analisi metagenomica di campioni seriali di sputo da pazienti SD e S seguiti a intervalli regolari di due mesi.

Risultati preliminari Nel precedente progetto (FFC#8/2012) sono stati identificati alcuni potenziali marcatori microbici associati ad un severo declino della funzione polmonare. Nel presente progetto, la preliminare analisi bioinformatica delle sequenze di metabarcoding 454 ha rilevato una netta differenza nella struttura e composizione dei microbiomi dei pazienti S e SD, con le maggiori differenze tra i pazienti con una malattia polmonare severa, nei quali *Pseudomonas* rappresenta il genere più abbondante. I nostri risultati, inoltre, sembrano indicare che nei pazienti S il microbioma risulta più interconnesso e biodiverso rispetto ai pazienti SD, suggerendo che nei pazienti stabile è presente un nucleo o core stabile di comunità microbica.

Risultati attesi e loro significato Un risultato atteso è l'individuazione del profilo del microbioma associato al severo declino del FEV1 e di nuovi marcatori come predittori del severo declino della funzione polmonare. L'analisi dell'intero microbioma e l'identificazione di biomarcatori può fornire un set di strumenti per approcci futuri di medicina personalizzata basata sul microbioma in importanti malattie quali la FC.

52. Preclinical development of the antimicrobial peptide M33 and onset of regulatory procedures for clinical trials

Pini A

Dip. di Biotecnologie Mediche, Università di Siena
(FFCProject#12/2013, In progress)



Alessandro Pini, al centro, e il suo gruppo di ricerca

Background The antimicrobial peptide M33 was identified some years ago at the University of Siena. Its characterization *in vitro* and *in vivo* showed that the molecule was active against bacterial species of clinical interest in Cystic Fibrosis, including many multi drug resistant strains. This molecule is presently considered a strong candidate to the development of a new antibacterial agent to be experimented in humans.

Objectives This project is aimed at the conclusion of pre-clinical experimentation with the goal to start with regulatory procedures for clinical trials as soon as possible.

Preliminary results The first year of operation included preliminary experiments for PK and biodistribution and the synthesis of peptide M33 in forms suitable to a better execution of *in vivo* experiments as suggested by guidelines of the European Medicine Agency for the set up of new drugs. This

operations is currently performed in collaboration with private companies interested to the development of new drugs for Cystic Fibrosis.

Sviluppo preclinico del peptide antimicrobico M33 e inizio delle procedure regolatorie per la sperimentazione nell'uomo

Il peptide antimicrobico M33 è stato isolato all'Università di Siena alcuni anni fa. La sperimentazione in vitro ed in vivo ha dimostrato la sua efficacia contro specie batteriche di forte interesse clinico per la Fibrosi Cistica, inclusi ceppi multi resistenti agli antibiotici tradizionali. Questa molecola è quindi considerata un ottimo candidato allo sviluppo di un nuovo farmaco antibatterico da sperimentare nell'uomo. Questo progetto è finalizzato alla conclusione della fase sperimentale preclinica, al fine di iniziare le procedure di richiesta di sperimentazione clinica al più presto.

Durante il primo anno di lavoro, in collaborazione con aziende del settore antibatterico con interesse nella nicchia della Fibrosi Cistica, si è definito il protocollo generale delle operazioni da effettuare e sono state iniziate le prime fasi di test e valutazioni per le analisi farmacocinetiche e di biodistribuzione. Questi esperimenti hanno richiesto la sintesi di varie forme della molecola in oggetto in modo da rendere le procedure riproducibili ed affidabili per gli esperimenti in grande scala secondo le linee guida regolatorie richieste dalla agenzie europee del farmaco.

53. Development and preclinical testing of a novel antimicrobial peptide to treat *Pseudomonas aeruginosa*-induced lung infections.

Mangoni ML

Dip. Scienze Biochimiche, Università "La Sapienza", Roma (FFCProject#11/2014, New)



Maria Luisa Mangoni, al centro e il suo gruppo di collaboratori

Background *Pseudomonas aeruginosa* is the predominant microbial pathogen in the lungs of patients with cystic fibrosis (CF). It is quite difficult to eradicate because of its acquired resistance to most available antibiotics and because of its ability to form sessile communities, or biofilms, characterized by a protective and adhesive extracellular matrix of polymeric substances.

Hypothesis and objectives The project aims at developing new effective and economically feasible antimicrobial agents, based on the short-sized antimicrobial peptide (AMP) from frog skin (21 amino acids), named Esc(1-21), for treatment of *P. aeruginosa* lung infections after their delivery in the airways. Beside and in-depth in-vitro analysis of the antibacterial, anti-inflammatory and wound healing properties of Esc(1-21) and its derivatives, as well as their effect on the expression of

virulence factors by *P. aeruginosa* together with the possible induction of bacterial resistance, we will perform a preclinical testing in murine models of acute and chronic *P. aeruginosa* lung infection to establish both the peptides' safety profiles and therapeutic dosages. Furthermore, we will screen for the best strategies to improve the pulmonary stability/bioavailability of the selected AMPs and to optimize their delivery in the lung tissue.

Essential methods For that purpose, we will use a multidisciplinary approach combining biochemical, cell biology, microbiological techniques, as well as murine models of *P. aeruginosa* acute and chronic lung infections

Preliminary results We recently discovered that Esc(1-21) rapidly kills planktonic *P. aeruginosa* cells and eradicates its biofilm communities with a membrane-perturbing activity as a plausible mode of action. Esc(1-21) has also the capability to neutralize the toxic effect of *P. aeruginosa* lipopolysaccharide (a component of the bacterial cell wall that can lead to the emergence of septic shock syndrome) and to prolong survival of murine models of *P. aeruginosa* lung infection, upon intratracheal instillation.

Expected results and their significance Overall this project has high potential to yield a non-expensive AMP to use for future medical preparations against *P. aeruginosa* lung infections in CF, by local administration. The results of our studies will also assist to the future development of a peptide-based nebulizer solution that allows a direct release of the peptide to the site of infection at effective concentrations with minimal side-effects.

Sviluppo e test preclinico di un nuovo peptide antimicrobico per il trattamento di infezioni polmonari indotte da *Pseudomonas aeruginosa*

Ragioni dello studio *Pseudomonas aeruginosa* è il microorganismo patogeno predominante nei polmoni di pazienti con fibrosi cistica (FC). E' molto difficile da debellare a causa della sua acquisita resistenza agli antibiotici correnti e perché in grado di formare comunità sessili, o biofilm, contraddistinte da una matrice extracellulare protettiva di sostanze polimeriche.

Ipotesi e obiettivi Il progetto si propone di sviluppare nuovi agenti antimicrobici a basso costo ed efficaci nel trattamento delle infezioni polmonari da *P. aeruginosa* in seguito a somministrazione nelle vie aeree. Tali composti saranno derivati del peptide antimicrobico (AMP) da pelle di anfibio di piccole dimensioni (21 aminoacidi), chiamato Esc(1-21). Oltre ad approfondire la nostra conoscenza sulle proprietà antibatteriche, anti-infiammatorie e cicatrizzanti degli AMP selezionati nonché il loro effetto sull'espressione di fattori di virulenza di *P. aeruginosa* e la possibile induzione di resistenza batterica, verranno eseguiti test preclinici in modelli murini di infezione polmonare acuta e cronica da *P. aeruginosa*. Questi ultimi serviranno a stabilire sia il profilo di tollerabilità e sicurezza dei peptidi che la loro dose terapeutica. Inoltre, saranno studiate le migliori strategie per migliorare la stabilità/biodisponibilità polmonare degli AMP e per ottimizzarne la veicolazione nel tessuto polmonare.

Metodi Impiego di un approccio multidisciplinare coinvolgente tecniche biochimiche, microbiologiche e modelli animali di infezione polmonare acuta e cronica da *P. aeruginosa*

Risultati preliminari Il peptide Esc(1-21) è dotato di una rapida velocità di uccisione della forma libera e sessile di *Pseudomonas* contemporaneamente ad una rapida azione membranolitica. È anche in grado di neutralizzare l'effetto tossico del lipopolisaccaride (un componente della parete della cellula batterica che può condurre all'insorgenza di shock settico) e di prolungare la sopravvivenza di modelli murini di infezione polmonare da *P. aeruginosa*, dopo instillazione intra-tracheale.

Risultati attesi e possibili ricadute Nel complesso questo progetto ha elevate potenzialità di produrre un AMP a basso costo per la preparazione di nuovi farmaci da somministrare localmente contro le infezioni polmonari da *P. aeruginosa* in FC. I risultati ottenuti permetteranno anche di guidare il futuro sviluppo di una soluzione a base peptidica da inalare via aerosol dopo nebulizzazione e che consenta un rilascio diretto del peptide al sito di infezione a concentrazioni efficaci e con minimi effetti indesiderati.

54. Development of BMAP18 as a peptide drug in the lung bacterial infections: a study to improve its effectiveness in the FC pulmonary environment

Scocchi M

Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Trieste
(FFCProject#14/2014, New)



Marco Scocchi, in seconda fila, secondo da destra, e il suo gruppo di ricerca

Background Antibiotic therapy is an essential component in the management of CF patients. Unfortunately, pharmacological treatments is impaired by increasingly common multi-drug-resistant pathogens and by the lack of new antibiotics. Antimicrobial peptides (AMPs) are natural antibacterials representing potential novel drugs with low incidence of resistant strains. Some synthetic AMPs derived from the natural AMPs showed an excellent wide-spectrum of in vitro antibacterial activity against several CF isolates of *P. aeruginosa* and *S. maltophilia*. At the same time they showed unsatisfactory protective effect in a mouse model of acute pulmonary infection.

Hypothesis & Objectives Our aim is to investigate the reasons of acute toxicity at pulmonary level and scarce activity of the model peptide BMAP18 in this anatomical district and consequently to rationally improve its in vivo activity, also by assaying the protective effect of BMAP18 in combination with antibiotics commonly applied in CF therapy.

Essential methods We will measure the activity of BMAP18 in a medium mimicking the environment of the CF-lung, we will evaluate its possible degradation in pulmonary fluids and its biodistribution in the lungs of mice. Toxicity of BMAP18 against normal and FC bronchial epithelium will be also assessed. On this basis, we will re-design some BMAP18 analogues to decrease cell toxicity and/or to increase protease-resistance. Then, we will evaluate the in vivo toxicity and anti-infective activity of the best BMAP18 analogue through a pulmonary route of administration also in combination with a second drug.

Preliminary results BMAP18 showed MIC₉₀ value of 8-16 µg/ml against a number of CF clinical isolates of *P. aeruginosa* and *S. maltophilia*. However, when intratracheally administrated in mice, the peptide damaged the lungs and increased mortality at 8 mg/kg. Differently, when BMAP18 was intraperitoneally injected, no toxicity was observed up to 32 mg/kg

Expected results & their significance The results will provide new information on the efficacy of BMAP18 in the pulmonary environment and help identify those factor/s which interfere with its activity. Knowledge of these aspects is needed to optimize BMAP18 for use in the CF lung. Apart from leading to a new antimicrobial compounds useful for treating CF-related pulmonary infections, this study also chart possible routes for translating other AMPs from research to clinic.

Sviluppo di BMAP18 come farmaco peptidico per le infezioni polmonari batteriche: uno studio per migliorarne l'efficacia nell'ambiente polmonare della FC

Ragioni dello studio Spesso i pazienti di fibrosi cistica presentano complicazioni dovute a batteri resistenti agli antibiotici. Un'arma che potrebbe essere impiegata contro le infezioni polmonari è rappresentata dai Peptidi Antimicrobici (AMPs), molecole naturalmente prodotte dagli animali e dotate di azione antibatterica. L'AMP BMAP18 è molto attivo in laboratorio contro batteri resistenti agli antibiotici tuttavia quando utilizzato per curare topi con infezioni polmonari ha presentato una tossicità non trascurabile e non ha dimostrato l'attività antimicrobica attesa.

Ipotesi e obiettivi Per queste problematiche, che BMAP18 condivide con molti altri AMPs, tale molecola non può ancora essere utilizzata a fini terapeutici. L'obiettivo di questo progetto è analizzare i motivi che provocano la tossicità e la scarsa efficacia di BMAP18 quando applicato agli animali, al fine di poterlo correggere e poi specificatamente adattare all'ambiente particolare del polmone FC.

Metodi Utilizzeremo condizioni che mimino il polmone del malato di FC per valutare l'attività antibatterica del BMAP18, la sua stabilità e la sua tossicità in quell'ambiente specifico, poi, alla luce di questi dati, modificheremo la nostra molecola per correggerne gli effetti indesiderati. Il BMAP18 modificato verrà quindi somministrato a topi sani per valutarne la tollerabilità e a topi con infezioni polmonari, per valutarne il potenziale terapeutico, anche in combinazione con farmaci classici.

Risultati preliminari BMAP18 ha mostrato una buona capacità antibatterica in laboratorio contro patogeni tipici della FC. Sebbene quando somministrato ai topi per via polmonare si sia rivelato tossico, la sua somministrazione per via endovenosa sembra essere ben tollerata.

Risultati attesi e loro significato Ci aspettiamo di capire quali siano alcune delle caratteristiche che fino ad ora hanno impedito l'utilizzo terapeutico di BMAP18 e di riuscire a correggerle, per utilizzarlo poi in futuro come antibiotico. Confidiamo che il lavoro svolto per capire come modificare BMAP18 ed adattarlo all'ambiente polmonare FC non sia importante solo per lo sviluppo stesso della nostra molecola, ma che possa fornire indicazioni utili ad altri gruppi di ricerca per portare finalmente i peptidi antimicrobici verso applicazioni terapeutiche.

55. Inhalable dry powders for chemically-modified human Cationic AntiMicrobial Peptides (CAMPs): moving toward in vivo application

Notomista E¹, Ungaro F²

¹Dip. di Biologia, Università di Napoli "Federico II";

²Dip. di Farmacia, Università di Napoli "Federico II"
(FFCProject#12/2014, Extension)

Background The diffusion of pan-drug resistant bacteria has highlighted the need of new antibiotics, but, so far, prog-



Eugenio Notomista, primo da destra, e il suo team di ricerca

ress in developing them has been slow. At this regard, Cationic Antimicrobial Peptides (CAMPs) are a valuable alternative to conventional antibiotics because they have broad spectrum antimicrobial activity and low ability to induce the onset of resistant strains. CAMPs are secreted from all multicellular eukaryotic organisms and represent an essential component of innate immunity, the first line of defense against microbial invasions. Even if the protein nature of CAMPs makes difficult their use as systemic agents they are ideally suited for direct delivery to airways and lung.

Objectives The main aim of this project is to develop inhalable dry powders for lung-delivery of human or synthetic CAMPs and human CAMP-releasing proteins (CAMP-RPs) carrying simple chemical modifications which improve their antimicrobial activity.

Methods Two modified human CAMP-RPs and 2-3 modified CAMPs (human or synthetic) will be prepared by means of methods already developed and optimized by the proponents during annual project FFC#11/2013.

The powders, containing one or more CAMP/CAMP-RPs, will be prepared at two levels of complexity according to methods optimized by Partner 1:

- 1) mannitol/CAMP(-RP)s microparticles;
- 2) nano-embedded microparticles i.e. CAMP-containing biodegradable polymer embedded in an inert carrier (lactose).

During the preparation of particles we will consider parameters crucial for in vivo administration such as aerodynamic properties, resistance to proteases, release profile of the drug in simulated lung fluids, ability to overcome extracellular pulmonary barriers (mucus, biofilm, etc..).

Moreover, we will verify the possibility to add excipients already used for the inhalation in humans (e.g amino acids, salts, thiol compounds), that could improve release, diffusion and/or antimicrobial activity of CAMPs after powder dissolution.

Lung distribution of dry powder formulations will be studied using rhodamine-labelled CAMP(-RP)s or materials and the most promising formulations will be tested in vivo in a murine model of *P. aeruginosa* lung infection.

Expected results and their significance A systematic approach devoted to the development of suitable formulations to administer CAMPs and able to fight infection by *P. aeruginosa*, particularly critical for patients with cystic fibrosis, perfectly meets the mission of the FFC.

Polveri inalabili per la somministrazione di peptidi antimicrobici umani (CAMP) chimicamente modificati: verso l'applicazione in vivo.

Ragioni dello studio La diffusione dei batteri resistenti agli antibiotici, ha evidenziato la necessità di cercare nuovi composti antibatterici, sebbene i progressi in tale settore finora siano stati scarsi. I peptidi antimicrobici (CAMP) rappresentano una valida alternativa essendo dotati di attività antimicrobica a largo spettro e scarsa capacità di indurre la comparsa di ceppi resistenti. I CAMP sono secreti da tutti gli organismi

pluricellulari e sono la prima linea di difesa contro le invasioni microbiche. La natura proteica ne rende difficile l'impiego sistemico ma allo stesso tempo li rende particolarmente adatti per il trattamento delle infezioni di vie aeree e polmoni.

Ipotesi e obiettivo Lo scopo principale del presente progetto è lo sviluppo di polveri inalabili per la somministrazione mirata a livello polmonare di CAMP umani o sintetici e proteine che rilasciano CAMP (CAMP-RP), recanti semplici modifiche chimiche che ne potenziano l'attività battericida.

Metodo Mediante strategie ottimizzate dai proponenti durante il progetto FFC#11/2013 verranno preparate 2 CAMP-RP umane e 2-3 CAMP (umani o sintetici) modificati.

Due tipologie di polveri inalabili contenenti uno o più CAMP(-RP) saranno preparate mediante metodi precedentemente ottimizzati dai proponenti:

- 1) microparticelle mannitol/CAMP(-RP);
- 2) nano-embedded microparticles cioè nanoparticelle biodegradabili contenenti CAMP a loro volta incorporate in microparticelle di un supporto inerte (lattosio).

Durante la preparazione delle particelle saranno valutati parametri fondamentali per la somministrazione *in vivo* quali proprietà aerodinamiche, resistenza alla proteasi, profilo di rilascio dei CAMP in fluidi polmonari simulati e capacità di superare le barriere extracellulari (muco, biofilm, ecc.).

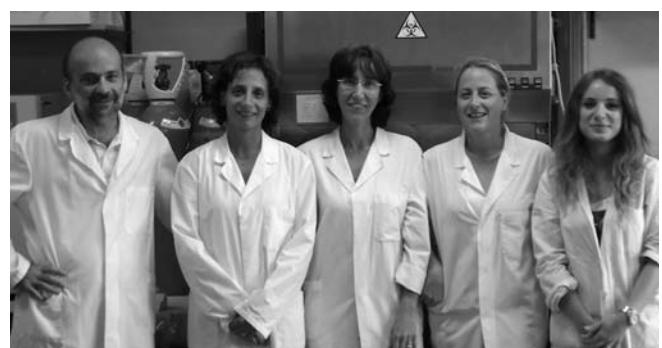
Inoltre, verificheremo la possibilità di aggiungere eccipienti già approvati per l'uso inalatorio nell'uomo quali aminoacidi, sali, composti tiolici, che potrebbero migliorare rilascio, diffusione e l'attività antimicrobica dei CAMP dopo la dissoluzione delle polveri. La distribuzione polmonare delle polveri sarà studiata usando CAMP(-RP) o materiali fluorescenti e le formulazioni più promettenti saranno testate *in vivo* in un modello murino di infezione polmonare da *P. aeruginosa*.

Risultati attesi e loro significato Un approccio sistematico volato allo sviluppo di formulazioni adatte alla somministrazione dei CAMP ed in grado di combattere le infezioni da *P. aeruginosa*, particolarmente critiche per i pazienti FC, ben si adatta alla missione della FFC.

56. Targeting extracellular Protein Disulphide Isomerase to control *Burkholderia cenocepacia* lung infections

Pacello F

Dip. di Biologia, Università di Roma "Tor Vergata"
(FFCProject#13/2014, New)



Francesca Pacello, al centro, e collaboratori

Background. We have recently demonstrated that extracellular GSH can drastically reduce *B. cenocepacia* ability to infect respiratory epithelial cells as well as the host inflammatory response triggered by bacterial infection. These observations suggest that GSH-sensitive membrane proteins mediate the interaction of *B. cenocepacia* with host cells. We have identified ERp57, a protein belonging to the Protein Disulfide Isomerase (PDI) family, as a major redox-sensitive host protein

favouring *B. cenocepacia* invasion under oxidizing conditions.

Hypothesis & objectives High levels of extracellular GSH may contrast *B. cenocepacia* infections, but recent clinical trials considerations suggest that therapies based on the administration of nebulized GSH could be of modest usefulness for CF patients. We hypothesize that inhibitors of PDIs could functionally compensate for the absence of GSH and favour the control of lung infections. In this context our goals are: 1) to verify if the ERp57 inhibitor EGCG (epigallocatechin-3-gallate, the most abundant green tea catechin) modulates *Burkholderia* infection also in primary cell monolayers; 2) to evaluate if the ability of EGCG to modulate intracellular oxidative stress and autophagy influences bacterial intracellular replication; 3) to carry out a preclinical investigation in wild type and cftr mice to evaluate the usefulness of EGCG in the treatment of *B. cenocepacia* infections.

Essential methods The effects EGCG on *B. cenocepacia* infections will be tested either in cell cultures and in acute and chronic *B. cenocepacia* mice infections.

Preliminary results Enzymes of the PDI family have been identified as mediators of *B. cenocepacia* infections by showing that, besides GSH, other thiol modifying agents and PDI inhibitors interfere with *B. cenocepacia* entry into tracheobronchial epithelial cells and reduce the expression of proinflammatory cytokines. Selective inhibitors and gene silencing allowed us to identify ERp57 as the most important PDI promoting *B. cenocepacia* infections. Among the various PDI inhibitors so far tested, EGCG exhibits very promising anti-inflammatory and anti-infective properties.

Expected results & their significance This research is expected to evaluate the possibility to use EGCG in therapies aimed at the control of *B. cenocepacia* in CF patients. This study will also provide useful information to understand the consequences of GSH dyshomeostasis in CF lung disease.

Utilizzo di inibitori della proteina Disolfuro Isomerasi extracellulare per controllare le infezioni polmonari da *Burkholderia cenocepacia*

Ragioni dello studio I liquidi che rivestono le vie aeree dei pazienti FC sono caratterizzati da un minor contenuto in glutathione ridotto (GSH). Recentemente abbiamo dimostrato che la presenza del GSH durante l'infezione riduce l'infettività di *Burkholderia cenocepacia* in cellule epiteliali respiratorie in coltura e la conseguente risposta infiammatoria. Queste osservazioni hanno suggerito l'esistenza di proteine di membrana modificate dal GSH che intervengono nell'interazione con *B. cenocepacia*. Abbiamo identificato ERp57, membro della famiglia delle disolfuro isomerasi (PDI), come una proteina sensibile allo stato redox dei tioli e coinvolta nell'infezione.

Ipotesi e obiettivi Elevati livelli di GSH extracellulare inibiscono l'infezione da *B. cenocepacia*, ma ad oggi l'utilizzo di GSH per via aerosolica ha evidenziato modeste proprietà benefiche sui pazienti FC. Noi ipotizziamo che inibitori delle PDI possano compensare la carenza di GSH e controllare le infezioni polmonari. I nostri obiettivi sono: 1) verificare se uno degli inibitori di ERp57, l'epigallocatechina gallato (EGCG, la catechina più abbondante del verde), è in grado di modulare anche l'infezione in cellule primarie; 2) valutare se la capacità di EGCG di modulare lo stress ossidativo e l'autofagia influenza la capacità replicativa dei batteri nelle cellule infettate; 3) sviluppare una sperimentazione preclinica sui topi FC e sani per valutare l'utilità di EGCG nel trattamento delle infezioni da *B. cenocepacia*.

Metodi Gli effetti di EGCG saranno valutati sia in cellule in coltura, che in infezioni acute e croniche di topi.

Risultati preliminari Enzimi della famiglia delle PDI mediane le infezioni da *B. cenocepacia*: infatti, oltre al GSH, altri agenti capaci di modificare i tioli e inibitori delle PDI

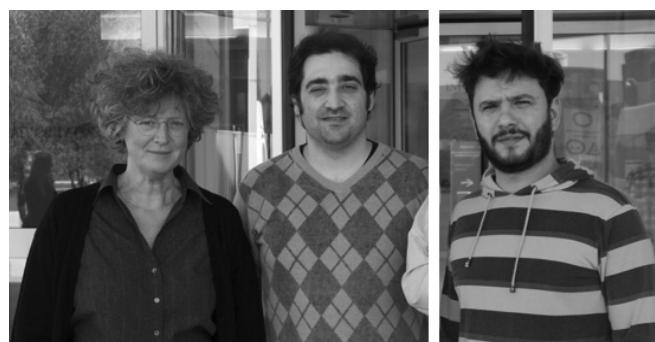
interferiscono con l'ingresso dei batteri all'interno delle cellule tracheobronchiali e riducono l'espressione delle citochine proinfiammatorie. Inibitori selettivi e il silenziamento genico hanno permesso di identificare ERp57 come la principale PDI in grado di modulare le infezioni da *B. cenocepacia*. Tra i vari inibitori testati, EGCG sembra avere le caratteristiche anti-infettive e anti-infiammatorie più promettenti.

Risultati attesi e loro significato Questa ricerca si propone di valutare possibili terapie, basate su EGCG, volte a controllare le infezioni da *B. cenocepacia* in pazienti FC e a comprendere gli effetti dell'alterata concentrazione del GSH nella malattia polmonare in FC.

57. Infections in cystic fibrosis patients: effect of PTX3 genetic variants on endogenous PTX3 production and function.

Garlanda C

Fondazione Humanitas per la Ricerca, Rozzano, Milano
(FFCProject#15/2014, new)



Cecilia Garlanda, prima a sinistra, e i suoi collaboratori

Background A major trust of this application is to explore, in a therapeutic perspective, how genetic variants of the prototypic long pentraxin PTX3 influence the susceptibility of cystic fibrosis patients to *Pseudomonas aeruginosa* and *Aspergillus fumigatus* infections. PTX3 is a non-redundant component of innate immunity against selected pathogens, including *P. aeruginosa* and *A. fumigatus*, microorganisms that play a key role in lung pathology of patients with cystic fibrosis.

Hypothesis & objectives In the past years, the applicant defined the role of this molecule in immunological mechanisms and generated unique tools to investigate its function. Studies conducted in previous research projects funded by Fondazione Fibrosi Cistica demonstrated the therapeutic potential of PTX3 in the context of experimental chronic lung infections by *P. aeruginosa*. Finally, the transfer to the clinic of PTX3 as therapeutic and prophylactic tool in opportunistic infections is under development.

Essential methods Now our aim is to better define the role of genetic variants of PTX3 in influencing the susceptibility of cystic fibrosis patients to specific infections. We also aim to evaluate whether cystic fibrosis is associated with a defect in the production of PTX3. This double approach possibly paves the way for identifying patients at higher risk of infection, and eventually candidate them for treatment with PTX3. In addition, the identification of two isoforms of PTX3, depending on a genetic variant of the PTX3 gene, is an important aspect for the future transfer to the clinic of this molecule. Thus, a further aim concerns the identification of the variant with a highest therapeutic potential against the infections of cystic fibrosis patients through preclinical studies.

Preliminary results These objectives will be pursued by means of genetic and functional studies with blood cells of

healthy donors, preclinical studies in vitro and in vivo with the recombinant molecules and studies on blood samples of cystic fibrosis patients. Since the discovery of PTX3, the applicant generated original reagents and tools, which will be employed in established techniques used with success in previous studies.

Expected results & their significance We hypothesize that the information obtained through this study will be useful to identify high-risk patients candidate for treatment with PTX3, and for the transfer to the clinic of this therapeutic molecule for the treatment of infections in cystic fibrosis patients.

Infezioni nei pazienti con fibrosi cistica: effetto delle variazioni genetiche di PTX3 sulla produzione e sulle funzioni della PTX3 endogena

Ragioni dello studio L'impegno principale di questo progetto è di esplorare, in una prospettiva terapeutica, come le varianti genetiche della pentrassina lunga PTX3 siano in grado di influenzare la suscettibilità dei pazienti affetti da fibrosi cistica a infezioni da *Pseudomonas aeruginosa* e *Aspergillus fumigatus*. PTX3 è una componente essenziale dei meccanismi di difesa innati nei confronti di specifici patogeni, tra cui *P. aeruginosa* e *A. fumigatus*, microorganismi che giocano un ruolo chiave nella patologia polmonare dei pazienti affetti da fibrosi cistica. 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. I lavori svolti in precedenti progetti di ricerca finanziati dalla Fondazione Fibrosi Cistica hanno dimostrato il potenziale terapeutico di PTX3 nell'ambito delle infezioni polmonari croniche sperimentali da *P. aeruginosa*. Infine, il trasferimento clinico di PTX3 come molecola terapeutica e profilattica per infezioni opportuniste è in corso.

Ipotesi e obiettivi Il nostro obiettivo ora è definire il ruolo delle varianti genetiche di PTX3 nell'influenzare la suscettibilità dei pazienti affetti da fibrosi cistica a specifiche infezioni. Intendiamo inoltre valutare se la fibrosi cistica si associa a un difetto di produzione di PTX3. Questo duplice approccio pone le basi per individuare pazienti a elevato rischio di infezioni ed eventualmente candidarli alla terapia con PTX3 ricombinante ad uso clinico. Infine, l'identificazione di due isoforme di PTX3, determinate da una variante genetica del gene PTX3, è un punto importante per il trasferimento clinico di PTX3. Un obiettivo è quindi identificare la variante a più elevato potenziale terapeutico contro le tipiche infezioni a cui vanno incontro i pazienti affetti da fibrosi cistica, mediante studi preclinici.

Metodi Questi obiettivi saranno perseguiti mediante studi genetici e funzionali su donatori sani, studi preclinici in vitro e in vivo con le molecole ricombinanti e studi su campioni di sangue dei pazienti. Reagenti e strumenti originali sviluppati dal gruppo verranno utilizzati in tecniche utilizzate con successo in studi precedenti.

Risultati attesi e loro significato Ipotizziamo che le informazioni ottenute con questo progetto siano utili per identificare pazienti ad alto rischio di sviluppare infezioni e candidati alla terapia con PTX3 e per il trasferimento alla clinica di questo strumento terapeutico per il trattamento delle infezioni nella fibrosi cistica.

58. Transmissibility and clinical significance of *Mycobacterium abscessus* in patients with cystic fibrosis

Tortoli E¹, Cariani ML², Di Serio C³

¹Unità Patogeni Batterici Emergenti, Divisione di Immunologia, Trapianto e Malattie Infettive, Istituto Scientifico San Raffaele; ²Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano;

³CUSSB-Centro Universitario di Statistica per le Scienze Biomediche, Università Vita-Salute San Raffaele Milano (FFCProject#27/2014, New)



Enrico Tortoli e i suoi collaboratori (nelle ife del mycobacterium)

Background *M. abscessus* is frequently isolated from patients with cystic fibrosis (CF). The role of different subspecies of *M. abscessus* in the deterioration of lung function is still unclear. Recent publications suggest possible nosocomial transmission of *M. abscessus* between patients.

Hypothesis and objectives Phenotypic and genotypic features of *M. abscessus* strains isolated from patients with chronic and transient infection will be compared. The presence of clusters of patients infected by genetically related *M. abscessus* strains will be investigated and the possibility of nosocomial transmission will be evaluated. The characteristics of different *M. abscessus* subspecies, and of possible clones, will be correlated with the clinical picture and existing risk factors. The drug resistance profiles of *M. abscessus* will be determined and correlated with mutations responsible of resistance.

Materials and methods *M. abscessus* strains isolated in three Italian CF centres (Milano, Firenze e Bari) will be investigated. More than 400 strains isolated in the last decade are available: most of them have been serially grown from about 40 CF patients; the others have originated from about 100 CF patients with transient infection. Clinical information about such patients is available. We have experience with different techniques suitable to identify and genotype mycobacterial strains (genetic sequencing, VNTR, WGS). Identification of *M. abscessus* subspecies and genotyping will make possible the detection of strain responsible of nosocomial transmission. WGS will allow the comparison of single strains and the characterization of the ones responsible of persistent infection.

Expected results and spin-offs The demonstration of the involvement of particular *M. abscessus* subspecies, or clones, in the deterioration of lung function will have important clinical and prognostic implications.

The possible demonstration of nosocomial transmission of *M. abscessus* will involve the implementation of proper prevention measures.

Trasmissibilità e significato clinico delle diverse sottospecie di *Mycobacterium abscessus* in pazienti con fibrosi cistica

Premessa *M. abscessus* è isolato frequentemente in soggetti con fibrosi cistica (FC). Non è ancora chiaro se *M. abscessus* abbia un ruolo nel deterioramento della funzione respiratoria. Studi recenti suggeriscono la possibilità di trasmissione da paziente a paziente.

Obiettivi principali Appurare se vi sia trasmissibilità di *M.*

abscessus fra pazienti con FC. Confrontare le caratteristiche dei ceppi di *M. abscessus* isolati da pazienti con infezioni croniche ed occasionali. Indagare se, all'interno dello stesso Centro, vi siano gruppi di pazienti infettati da ceppi geneticamente simili o addirittura identici. Verificare l'esistenza di una correlazione fra le singole sottospecie di *M. abscessus* con i diversi quadri clinici e con eventuali fattori di rischio. Saggiare la sensibilità di *M. abscessus* ai principali antibiotici e ricercare eventuali marcatori genetici di resistenza.

Materiali e metodi Saranno studiati i ceppi di *M. abscessus* isolati da pazienti afferenti a tre centri FC (Milano, Firenze e Bari). Sono disponibili circa 400 ceppi isolati nell'ultimo decennio provenienti da una quarantina di pazienti con infezione cronica e da un centinaio di pazienti con infezione occasionale. Dei pazienti suddetti saranno disponibili le informazioni cliniche. I ceppi saranno identificati a livello di sottospecie mediante sequenziamento, per la genotipizzazione si ricorrerà all'analisi delle sequenze ripetute (VNTR) mentre di ceppi selezionati sarà sequenziato l'intero genoma (WGS). La sensibilità agli antibiotici sarà investigata deter-

minando le concentrazioni minime inibenti (MIC).

Disegno dello studio Tutti gli isolati verranno identificati a livello di sottospecie. La genotipizzazione permetterà di individuare eventuali ceppi a larga diffusione che saranno ulteriormente studiati mediante WGS. Le informazioni ricavate permetteranno di confrontare i ceppi coinvolti in infezioni occasionali da quelli responsabili di infezione cronica e di identificare eventuali gruppi di pazienti infettati dallo stesso ceppo di *M. abscessus*. La possibilità di trasmissione fra tali pazienti sarà verificata con indagini epidemiologiche. Le caratteristiche dei ceppi di *M. abscessus* associati ad infezione cronica verranno correlate al deterioramento delle condizioni cliniche ed ai fattori di rischio.

Risultati attesi L'individuazione di singole sottospecie, o di ceppi, responsabili del deterioramento della funzione respiratoria. La dimostrazione, o l'esclusione, della trasmissione fra pazienti dell'infezione da *M. abscessus*. L'eventuale reperto di ceppi ad alta patogenicità avrà ricadute terapeutiche e prognostiche; la trasmissione dell'infezione fra pazienti potrà essere scongiurata adottando idonee misure di prevenzione.

PLENARY SESSION 6

Alternative methods of correcting the basic defect and monitoring the CFTR function

59. CFTR splicing correction mediated by Exon-Specific U1 small nuclear RNAs (ExSpeU1)

Pagani F

ICGEB, Trieste (FFCProject#6/2012, Completed.
(FFCProject#5/2014, Extension)



Franco Pagani, primo da sinistra, e collaboratori

ExSpe U1s are modified U1 snRNAs whose specific binding in intronic sequences downstream the 5'ss rescue splicing of defective exons. We previously showed that ExSpeU1 efficiently correct multiple splicing defects in CFTR exon 13 (former name exon 12) minigene. Here we show that ExSpeU1s have a broader activity on CFTR gene as they correct splicing mutations also in exon 5. To investigate in detail the molecular mechanisms, we have characterized the composition of ExSpeU1s particles. Our result indicate that ExSpeU1RNA is assembled into RNA-protein complexes with similar characteristic to endogenous U1snRNPs. In addition, through mutagenesis of RNA domains that form the particle, we identify associated proteins that are strictly required for their splicing rescue activity. Lastly, to explore the potential therapeutic effect of ExSpeU1 we evaluated their effect on

CFTR protein. In a novel cellular model based on splicing competent minigenes we show that ExSpe U1 rescues splicing and protein function. ExSpe U1s represent an interesting RNA-based therapeutic strategy to correct CFTR splicing mutations distributed along the CFTR gene.

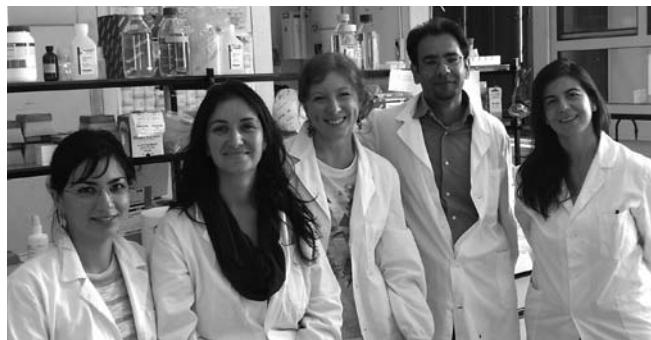
Correzione dei difetti di splicing del gene CFTR attraverso l'utilizzo di piccoli RNA nucleari

Gli ExSpe U1 sono dei piccoli RNA (U1 snRNAs modificati) che legando sequenze introniche a valle della giunzione di splicing al 5'ss sono in grado di correggerne il difetto di splicing. Precedentemente abbiamo dimostrato che gli ExSpeU1 possono correggere più difetti di splicing nel CFTR esone 13 (ex esone 12). In questo lavoro mostriamo che ExSpeU1s hanno un'attività più ampia in quanto correggono mutazioni di splicing anche nell'esone 5. Per studiare in dettaglio i meccanismi molecolari, abbiamo caratterizzato la composizione delle particelle ExSpeU1s. Il nostro risultato indica che ExSpeU1RNA è assemblato in complessi RNA-proteina con caratteristiche simili ai U1snRNPs endogeno. Inoltre, mediante mutagenesi di domini RNA che formano la particella, abbiamo identificato proteine associate che sono strettamente necessarie per recuperare lo splicing aberrante. Infine per esplorare il potenziale effetto terapeutico di ExSpeU1 abbiamo valutato il loro effetto sulla proteina CFTR. In un nuovo modello cellulare basato su *splicing-competent* minigeni mostriamo che ExSpe U1 recupera la sintesi della proteina CFTR. Gli ExSpe U1 rappresentano un'interessante strategia terapeutica basata sull'RNA, utile per la correzione di mutazioni di splicing distribuite lungo il gene CFTR.

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

Loi R

Dip. Scienze Biomediche, Unità di Oncologia e Patologia Molecolare, Università di Cagliari
(FFCProject#2/2013, Completed)



Roberto Loi e il suo team di ricerca

Background The repopulation of diseased airway epithelium with cells expressing functional CFTR may represent a future option to reduce morbidity and mortality of cystic fibrosis.

Induced pluripotent stem cells (iPSC) allowed the generation of patient-specific stem cells that may be useful for cell therapy approaches and for the development of *in vitro* systems for disease modeling.

However, many issues need to be solved before iPSC cells may be applied to cystic fibrosis and human pathology in general.

Notably, one of the main obstacles that limit the applicability of iPSC cells to lung diseases has been so far the inability to convert with high efficiency iPSC cells into mature, differentiated lung epithelial cell lineages.

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

Hypothesis and objectives To determine the differentiation potential of iPSC cells derived from bronchial epithelium, normal or CF, into mature bronchial epithelial cells, *in vitro*, and their capability to engraft in the bronchial epithelium in mouse lungs following transplantation into immunotolerant NOD-SCID mice.

Methods We subjected iPSC cells derived from human bronchial epithelium to an experimental protocol to drive their differentiation into bronchial epithelial cells, *in vitro*. These cells have been subsequently transplanted into immunotolerant NOD-SCID mice, to evaluate their engraftment in the bronchial epithelium.

Results Starting from iPSC cells we derived, *in vitro*, bronchial epithelial cells expressing the CFTR protein. These cells, transplanted in NOD-SCID mice, engrafted, although at a very low frequency, in the bronchial epithelium of recipient mice.

Spin-off for research and clinical purposes iPSC cells, induced to differentiate into bronchial epithelial cells, may represent an option for future approaches of cell therapy for the pulmonary manifestations of cystic fibrosis.

Furthermore, iPSC cells isolated from cystic fibrosis patients may be useful as an experimental model to study the clinical variability of the disease and to facilitate the screening of novel drugs directed towards defective CFTR protein.

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

Ragioni dello studio Il ripopolamento dell'epitelio bronchiale con cellule esprimenti la proteina CFTR funzionale po-

trebbe rappresentare una futura opzione per ridurre la morbilità e la mortalità determinate dalla fibrosi cistica.

Lo sviluppo delle cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC) ha consentito la generazione di cellule staminali specifiche per il paziente, potenzialmente utili sia per futuri approcci di terapia cellulare che per lo sviluppo di modelli sperimentali *in vitro* utili allo studio della malattia.

Sono tuttavia 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.

A questo proposito, 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 Determinare il potenziale differenziativo di cellule iPS derivate da epitelio bronchiale, normali e FC, in cellule epiteliali bronchiali mature, *in vitro*, e la loro capacità di integrazione nell'epitelio bronchiale di polmone murino in seguito a trapianto in topi immunotolleranti NOD-SCID.

Metodi Abbiamo sottoposto cellule iPS derivate da epitelio bronchiale umano, normali o FC, ad un protocollo sperimentale che ne determina il differenziamento in cellule epiteliali bronchiali, *in vitro*. Queste cellule sono state poi trapiantate in topi immunotolleranti NOD-SCID, che non rigettano il trapianto di cellule umane, per valutarne l'integrazione nell'epitelio bronchiale.

Risultati A partire da cellule iPS abbiamo generato, *in vitro*, cellule epiteliali bronchiali mature esprimendo la proteina CFTR. Queste cellule, trapiantate nei topi NOD-SCID, si sono integrate, sebbene con una frequenza limitata, nell'epitelio bronchiale dei topi riceventi.

Possibili ricadute per ricerca e clinica Le cellule iPS, in seguito al loro differenziamento in cellule epiteliali bronchiali, possono rappresentare una opzione per futuri approcci di terapia cellulare per le manifestazioni polmonari della fibrosi cistica. Inoltre, cellule iPS generate da pazienti FC possono costituire un modello sperimentale per lo studio della variabilità clinica di questa malattia, e per facilitare lo screening di farmaci mirati alla proteina CFTR difettosa.

61. Vessel associated progenitor cells as a promising cell-based approach to treat Cystic Fibrosis disease

Messina G¹, Vezzali C¹, Antonini S¹, Bonfanti C¹, Bacchetta R¹, Maiuri L², De Stefano D², Villella V²

¹Dept. of BioSciences, University of Milan; ²Istituto Europeo di Ricerca per la Fibrosa Cistica, Divisione di Biologia cellulare, Fondazione Centro San Raffaele
(FFC project #5/2013, Completed)



Graziella Messina, quinta da sinistra, e il suo gruppo di ricerca

Background Cystic Fibrosis (CF) is the most common autosomal recessive genetic disorder in Caucasian population,

caused by mutations in the CFTR gene. Lung disease, characterized by airway obstruction, inflammation and chronic bacterial infection, is the leading cause of death. Advances in the treatments have improved the life expectancy of CF patients, even if lung transplantation still remains the only resolute option. Cell-based therapies have also emerged as potential novel approach, even if still not efficacious to date. In our lab we isolated an adult vessels-associated progenitor population, named Mesoangioblasts (MABs), that showed an impressive potential in rescuing dystrophic phenotype in different animal models of Duchenne Muscular Dystrophies.

Hypothesis and objectives The major aim of this study was the evaluation overtime of the engraftment of adult mouse-MABs transplanted in CF mice, in terms of percentage of cell engrafted and persistence of donor cells in time. As a parallel purpose, mMABs have been studied in terms of their ability to differentiate in epithelial cells and to express functional CFTR in transplanted CF mice, thus resulting in a general amelioration of the pathology. The whole study aims to develop a cell therapy approach for patients affected by CF.

Essential methods mMABs have been transplanted in F508del CFTR mice and their engraftment in the airway epithelium followed overtime by histological, immunofluorescences and TEM analysis. Rescue of CFTR function have been evaluated by western blot and by *in vivo* and *ex vivo* transepithelial potential difference measurements.

Results We observed that mMABs engraft lung, tracheal and intestinal epithelium for up to 6 months in F508del CFTR mice after a single systemic injection. We also verified that mMABs express, *in vitro*, the CFTR channel which is in part expressed in the membrane and functional. Additionally, *in vivo*, mMAB transplanted F508del CFTR mice express a functional CFTR. Notably, when transplanted and engrafted in the epithelium, mMAB express typical epithelial markers, such as E-Cadherin and cytokeratins, thus demonstrating mMAB ability to differentiate in epithelial cells and/or to contribute to epithelial stem cell niche.

Spin-off for research & clinical purposes This pilot project verified the promising use of MABs for the development of an efficacious *in vivo* cell therapy for the cure of CF.

Progenitori cellulari associati ai vasi come promettente terapia cellulare per la cura della Fibrosi Cistica

Ragioni dello studio La Fibrosi Cistica (FC) è la malattia genetica autosomica recessiva più comune nella popolazione Caucasiche, causata da mutazioni nel gene CFTR. Numerosi progressi terapeutici hanno migliorato l'aspettativa di vita dei pazienti affetti da FC, nonostante il trapianto polmonare rimanga ad oggi l'unica opzione risolutiva. Le terapie cellulari stanno emergendo come nuovo potenziale approccio curativo, anche se la loro efficacia nella FC non è ancora stata dimostrata. Il nostro laboratorio ha isolato e caratterizzato dei progenitori cellulari adulti associati ai vasi, i mesoangioblasti (MAB), i quali negli ultimi anni hanno dimostrato un impressionante potenziale nel recupero del fenotipo patologico in diversi modelli animali di distrofia muscolare di Duchenne.

Ipotesi e obiettivi Il principale obiettivo di questo studio è stato il valutare la capacità di MAB adulti murini (mMAB) di colonizzare nel tempo, dopo trapianto, l'epitelio delle vie aeree del modello murino F508del CFTR. I trapianti sono stati analizzati in termini di percentuale e permanenza nel tempo dei mMAB. Parallelamente, è stata studiata la capacità dei mMAB a differenziare in cellule epiteliali e a esprimere la forma funzionale del CFTR sia *in vitro* che *in vivo*. Lo studio ha quindi avuto come scopo principale quello di valutare il potenziale terapeutico di queste cellule dopo trapianto fornendo quindi i dati necessari per un successivo sviluppo di una terapia cellulare per pazienti affetti da FC.

Metodi I mMAB sono stati trapiantati in topi F508del CFTR ed è stata monitorata nel tempo la loro localizzazione nell'epitelio delle vie aeree e dell'intestino, mediante analisi istologiche e di microscopia ad alta risoluzione. Inoltre è stato valutato il recupero della corretta funzionalità e localizzazione del canale CFTR.

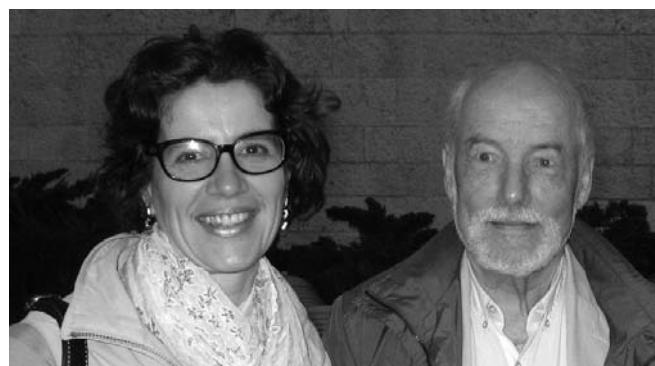
Risultati Abbiamo osservato che, in seguito a trapianto, i mMAB si localizzano nell'epitelio di polmoni, trachea e intestino di topi F508del CFTR fino a 6 mesi, dopo una singola iniezione. Abbiamo anche osservato che i mMABs esprimono, *in vitro*, il canale CFTR e, dato più interessante, *in vivo*, i topi F508del CFTR trapiantati presentano il canale correttamente localizzato in membrana. Inoltre, quando trapiantati, i mMAB esprimono i tipici marcatori epiteliali come la E-Caderina e le citokeratine. Questo risultato dimostrerebbe come i mMAB siano in grado di differenziare in cellule epiteliali e/o di contribuire alla nicchia di cellule staminali residenti, una caratteristica che li renderebbe una popolazione cellulare promettente per lo sviluppo di un'efficace terapia per la cura della FC.

Possibili ricadute per la ricerca e clinica Questo progetto pilota ha verificato come i mesoangioblasti possono rappresentare un utile strumento per definire una efficace terapia cellulare per la cura della FC.

62. CFTR in epithelial organoids: relevance for drug development and diagnosis of cystic fibrosis

Melotti P¹, de Jonge H²

¹Centro fibrosi cistica, AOUI Verona; ²Gastroenterology & Hepatology, Erasmus University Medical Center, Rotterdam (FFCProject#4/2013, Completed)



Paola Melotti e Hugo de Jonge

Background CFTR function measurement is required for screening of potential CFTR correctors/potentiators and human models are needed, in particular for preclinical studies and personalized medicine.

Upon validation of European Cystic Fibrosis Society Intestinal Current Measurements (ICM) Standardized Operating Procedure (SOP) will be utilized in Verona for diagnosis of atypical cases in addition to nasal potential difference (NPD) already available. Rectal organoids and leukocytes of subjects tested by ICM and/or NPD will be tested for CFTR function. Setting up of this method in Verona has been completed since organoids from CF and non CF subjects have been developed whose CFTR function has been evaluated by swelling.

Hypothesis and objectives

- 1) to detect the effects on CFTR function of new molecules targeting F508del mutation;
- 2) to test CFTR function in organoids in the presence of mutations of uncertain clinical relevance

3) to compare CFTR function in organoids with ICM, leukocytes assay and NPD in the same subjects.

Material, patients, methods stem cells from intestinal biopsies from CF patients will form in vitro organoids whose CFTR activity will be detected by swelling using fluorescent dye. Molecules targeting F508del mutation provided by the Cystic Fibrosis Foundation Therapeutics will be tested.

Expected results and spin-offs Effects of new drugs on CFTR function could be detected in the same CF patient using four different methods (ICM, leukocytes assay, organoids swelling). CFTR function in the presence of mutations of uncertain clinical relevance will be tested in leukocytes and rectal organoids beside standardized ICM and NPD. This study proposes a relatively simple and robust assay to facilitate diagnosis, functional studies, drug development as well as personalized medicine approaches in CF.

CFTR in organoidi epiteliali: rilevanza per lo sviluppo di farmaci e la diagnosi della fibrosi cistica

Ragioni dello studio La misurazione della funzione di CFTR risulta necessaria per lo screening di correttori CFTR correttori/potenziatori, in particolare per gli studi preclinici e della medicina personalizzata. A seguito convalida da parte della Società Europea di Fibrosi Cistica, misurazioni di corrente da cellule intestinali (ICM) secondo la Procedura Operativa Standardizzata (SOP), saranno disponibili a Verona per la diagnosi di casi atipici in aggiunta/alternativa a differenza con potenziale nasale (NPD) già disponibili. Organoidi rettali e leucociti di soggetti testati con ICM e / o NPD saranno testati per valutare la funzionalità di CFTR. La loro messa a punto del metodo è stata completata a Verona nel primo anno di studio sviluppando organoidi da soggetti affetti o meno da FC e monitorandone il rigonfiamento attribuito alla funzione di CFTR.

Ipotesi e obiettivi 1) Rilevare gli effetti sulla funzione di CFTR di nuove molecole aventi come bersaglio la mutazione F508del; 2) Testare la funzione CFTR in organoidi in presenza di mutazioni di incerta rilevanza clinica; 3) Confronto tra la funzione CFTR in organoidi con ICM, e tra NPD e saggio su leucociti negli stessi soggetti.

Materiali, pazienti, metodi Con le cellule staminali prelevate da biopsie rettali di pazienti con FC si svilupperanno organoidi in laboratorio e l'attività di CFTR sarà rilevata da rigonfiamento cellulare utilizzando un colorante fluorescente. Le molecole in grado di correggere la mutazione F508del fornite dalla Cystic Fibrosis Foundation Therapeutics saranno quindi testate su queste preparazioni cellulari.

Risultati attesi e spin-off Effetti dei nuovi farmaci sulla funzione di CFTR potrebbero essere rilevati nello stesso paziente CF utilizzando quattro diversi metodi (NPD, ICM, saggio sui leucociti, e mediante test di rigonfiamento degli organoidi). La funzionalità di CFTR in presenza di mutazioni di incerta rilevanza clinica sarà testata nei leucociti e negli organoidi contemporaneamente agli standard ICM e NPD. Questo studio propone tests relativamente semplici e robusti per facilitare la diagnosi, studi funzionali adatti per lo sviluppo di farmaci, così come una medicina personalizzata in CF.

63. Establishment of a semi-automated evaluation of CFTR function in blood cells for clinical applications

Sorio C¹, Averna M², Buffelli MR³

Dip. di Patologia, Sez. Patologia generale, Università di Verona; Dip. di Medicina Sperimentale, Università di Genova; Dip. Scienze Neurologiche e del Movimento, Università di Verona (FFCProject#6/2013, Completed)



Claudio Sorio, primo a destra, responsabile del progetto e i colleghi di ricerca

Background Leukocytes are increasingly recognized in the scientific literature as key component of the pathogenetic events associated to cystic fibrosis. Recent studies performed by our group [Sorio C, et al PLoS One 2011; 6:e22212] demonstrated that the Cystic Fibrosis Transporter protein (CFTR) is expressed and functional in peripheral blood monocytes.

Hypotheses and objectives We hypothesize that peripheral blood leukocytes represent a suitable and easily accessible source of primary cells expressing CFTR that can be exploited to monitor CFTR expression and activity. Our goal is to devise new procedures and methods to monitor CFTR expression and function in leukocytes.

Essential methods We have evaluated CFTR expression by flow cytometry and CFTR function in monocytes by whole cell patch clamp technology. We have tested a new functional test based on the use of a iodine-sensitive YFP protein capable to detect differential iodine efflux in Wild Type (WT) vs Cystic Fibrosis (CF) peripheral blood mononuclear cells (PBMC).

Results We further defined the properties of CFTR in leukocytes demonstrating that it can be detected and monitored both at the protein and functional levels (Johansson J, et al. Cytometry A. 2014 Mar 12. doi: 10.1002/cyto.a.22456; Ettorre, M." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 2014, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.07.010>).

Our preliminary data confirm that YFP assay can detect differences in iodine exchange among healthy and CF individuals.

Spin-off for research and clinical purposes These results lay the basis for the measure of the effect of CFTR correctors/potentiators on CFTR function measured in blood cells of patients in a personalized manner with a relatively simple multiwell platform assay that can be analyzed in a commonly available automated plate reader.

Messa a punto di una procedura semi automatizzata per la misura dell'attività di CFTR nei leucociti umani per applicazioni cliniche

Ragioni dello studio I leucociti sono sempre più riconosciuti nella letteratura scientifica come componente chiave degli eventi patogenetici associati alla fibrosi cistica. Recenti studi eseguiti dal nostro gruppo [Sorio C, et al PLoS One 2011] hanno dimostrato che la proteina di trasporto della fibrosi cistica (CFTR) è espressa e funzionale nei monociti del sangue periferico.

Ipotesi e obiettivi Noi ipotizziamo che i leucociti del sangue periferico rappresentino una fonte conveniente e facilmente accessibile di cellule primarie che esprimono CFTR che può essere sfruttata per monitorare l'espressione e l'attività CFTR. Il nostro scopo è di progettare nuove procedure e metodi per monitorare l'espressione e la funzione CFTR nei leucociti.

Metodi essenziali Abbiamo valutato l'espressione CFTR con citometria di flusso e la funzione CFTR nei monociti per mezzo della tecnologia che ne misura la funzione. Abbiamo messo a punto un nuovo test funzionale basato sull'uso di

una proteina (YFP) sensibile allo iodio in grado di individuare un diverso efflusso di iodio nel controllo (WT) rispetto alle cellule mononucleate del sangue periferico di pazienti con fibrosi cistica (FC).

Risultati Noi abbiamo ulteriormente definito le proprietà di CFTR nei leucociti dimostrando che può essere individuato e monitorato sia a livello di proteine che a livello funzionale [Johansson J, et al. Cytometry A. 2014 Mar 12. doi: 10.1002/cyto.a.22456; Ettorre, M." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Soggetto generale, 2014, http://dx.doi.org/10.1016/j.

bbagen.2014.07.010)]. I nostri dati preliminari confermano che il saggio YFP può individuare differenze nello scambio iodio tra individui sani e CF.

Possibili ricadute per ricerca e clinica Questi risultati pongono le basi per la misura dell'effetto dei correttori/potenziatori CFTR sulla funzione CFTR di misurare le cellule nel sangue dei pazienti in maniera personalizzata con un test su piattaforma multi pozzetto relativamente semplice che può essere analizzato in un lettore di piastre automatizzato comuneamente disponibile.

PLENARY SESSION 7

Alternative methods of controlling inflammation in cystic fibrosis

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

Romani L

Dip. Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche,
Università di Perugia (FFCProject#16/2012, Completed)



Luigina Romani

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 bronchopulmonary 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 (sRAGE). Deficiencies in sRAGE are linked to heightened inflammation in various chronic conditions, including invasive aspergillosis.

Hypothesis and objectives An exaggerated and ineffective airway inflammation that fails to eradicate pulmonary pathogens is present in cystic fibrosis. In this study we characterized the impact of the hypoxia/RAGE pathway on pathogenic airway inflammation preventing effective pathogen clearance in CF and elucidate the potential role of this danger signal in pathogenesis and therapy of lung inflammation.

Methods Based on the these premises, we employed *in vivo*

and *in vitro* models to study the impact of hypoxia on RAGE expression and activity in human and murine CF, the nature of the RAGE ligand and the impact of RAGE on lung inflammation and antimicrobial resistance in fungal pneumonia.

Results Sustained expression of RAGE and its ligand S100B exerted a proximal role in promoting inflammation in murine and human CF, as revealed by functional studies and analysis of the genetic variability of AGER in patients with CF. Both hypoxia and infections contributed to the sustained activation of the S100B/RAGE pathway, being RAGE up-regulated by hypoxia and S100B by infection via Toll-like receptors. Inhibiting the RAGE pathway *in vivo* with soluble (s)RAGE restored lung immune homeostasis in experimental CF while sRAGE production was defective in CF patients.

Spin-off for research & clinical Collectively, we have identified a novel molecular pathway that contributes to the heightened inflammation in CF and provided evidence that this pathway could be a useful therapeutic target and biomarker of lung inflammation in this disease.

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 produttori IL 17A (subset Th17) è causalmente associata allo stato di infiammazione cronica in modelli sperimentali di CF. In questo progetto abbiamo perseguito tale studio andando ad indagare su meccanismi a monte dell’attivazione della risposta patogenetica Th17 e, tra questi, l’ipossia. L’ipossia contribuisce all’infiammazione dei tessuti, aumentando l’espressione del recettore per advanced glycation end products (RAGE), un recettore multiligando che è molto espresso nei polmoni anche sotto forma solubile (sRAGE). Carenze di sRAGE sono legati ad una accentuata infiammazione in diverse forme croniche, tra cui aspergillosi invasiva.

Ipotesi e obiettivi In questo studio abbiamo caratterizzato l’impatto dell’asse ipossia / RAGE nell’infiammazione ed abbiamo voluto chiarire il suo ruolo potenziale nella patogenesi e nella terapia di infiammazione polmonare nella FC.

Metodi Sulla base dei queste premesse, abbiamo impiegato modelli *in vivo* ed *in vitro* per studiare l’impatto dell’ipossia sull’espressione e l’attività RAGE, in particolare il suo impatto sull’infiammazione polmonare e la resistenza antimicrobica.

Risultati L’espressione di RAGE e del suo ligando S100B

esercita un ruolo prossimale nel promuovere sia l'infiammazione nella FC sperimentale che umana, come rivelato da studi e analisi della variabilità genetica di AGER in pazienti affetti da FC. Sia l'ipossia che l'infezione contribuiscono allo stato infiammatorio tramite l'asse S100B/RAGE, RAGE viene up-regolato dall' ipossia mentre S100B dall' infezione attraverso i recettori Toll-like. L'inibizione di RAGE in vivo con la forma solubile (s) RAGE restaura umeostasi polmonare e dona resistenza immunologica. Inoltre, abbiamo visto che in pazienti FC la misurazione di sRAGE è notevolmente inferiore rispetto ai controlli , supponendo un difetto nei pazienti con FC.

Possibili ricadute per ricerca e clinica Il presente studio ha permesso di definire dei possibili bersagli terapeutici e marcatori biologici in CF.

65. The role of vascular endothelium in cystic fibrosis inflammation

Romano M₁, Totani L₂, Marchisio M₃

Dip. Scienze Sperimentali e Cliniche, Lab. Medicina Molecolare, Università "G. D'Annunzio", Chieti-Pescara; Dip. di Farmacologia Traslazionale, Consorzio Mario Negri Sud; Dip. Medicina e Scienze dell'Invecchiamento, Università "G. d'Annunzio" Chieti-Pescara (FFCProject#19/2013, Completed)



Mario Romano

Background Neutrophilic inflammation is a key pathogenic mechanism of cystic fibrosis (CF) lung disease. The vascular endothelium represents the first barrier for neutrophils in their path to the airways. If dysfunctional, endothelium may allow unchecked leukocyte extravasation and tissue accumulation. It may also promote pulmonary arterial hypertension (PAH) and angiogenesis, which aggravate CF lung disease.

Hypothesis and objectives Results from our FFC#17/2012 project fully support our hypothesis that the vascular endothelium is dysfunctional in CF. Main objectives of this study are to:

1. Elucidate the impact of CFTR dysfunction on endothelial cell barrier function and activities related to inflammation, PAH and angiogenesis.
2. Assess the pathophysiological and clinical significance of endothelial microparticles in CF.
3. Search for correctors of endothelial dysfunction in CF.

Methods Flow cytometry, confocal microscopy, siRNA, western blotting, real-time PCR, electrophysiology measurements.

Results We successfully isolated pulmonary artery endothelial cells (PAEC) from one CF patient carrying the G542X/1717-1G->A genotype (CF-PAEC). These cells express low membrane CFTR levels and very little CFTR activity compared to normal PAEC. Remarkably, experiments with these cells confirmed data obtained with normal PAEC

exposed to CFTRinh-172. In particular, compared to normal PAEC, CF-PAEC displayed lower transendothelial resistance (TER); released a higher number of endothelial microparticles (MP) and higher amounts of vascular endothelial growth factor. The clinical relevance of the vascular endothelium in CF lung disease was confirmed by the observation that CF patients displayed increased number of circulating endothelial cells (CEC) and microparticles (EMP) and that CEC inversely correlated with indices of respiratory function, whereas EMP positively correlated with CEC number and negatively with FVC. Finally, cAMP-increasing agents, in particular the combination of phosphodiesterase inhibitors and β_2 -adrenergic agonists normalized TER and monolayer integrity of CF-PAEC.

Spin-off for research & clinical purposes These results uncover novel mechanisms of CF inflammation as well as potential biomarkers and innovative therapeutic approaches to CF lung disease.

Il ruolo dell'endotelio vascolare nell'infiammazione della fibrosi cistica

Ragioni dello studio L'infiammazione è un meccanismo chiave nella malattia respiratoria della fibrosi cistica (FC). Le cellule endoteliali rappresentano la prima barriera che i globuli bianchi neutrofili incontrano nel loro tragitto verso le vie respiratorie. Un endotelio malfunzionante potrebbe permettere quindi un passaggio incontrollato di neutrofili nelle vie aeree, oltre che promuovere l'ipertensione polmonare (PAH) e l'angiogenesi che aggravano la malattia polmonare nella FC.

Ipotesi e obiettivi I risultati del nostro progetto FFC# 17/2012 confermano la nostra ipotesi che l'endotelio vascolare sia malfunzionante nella FC. Ci proponiamo di determinare:

1. L'impatto di CFTR disfunzionale su attività dell'endotelio legate a infiammazione, PAH e angiogenesi.
2. Il significato clinico delle microparticelle endoteliali nella FC.
3. Correttori della disfunzione endoteliale nella FC.

Metodi Citofluorimetria, microscopia confocale, siRNA, western blotting, PCR real-time, misurazioni elettrofisiologiche.

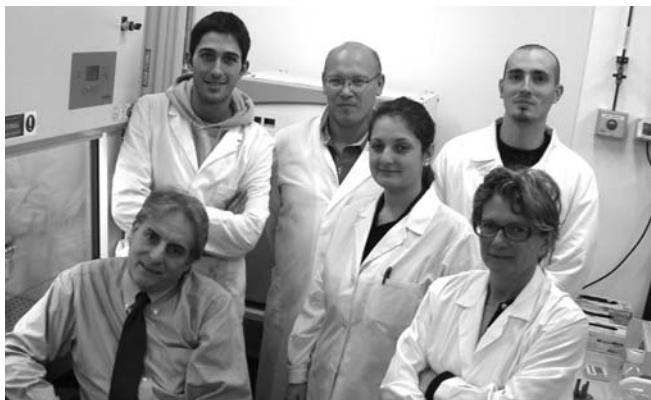
Risultati Abbiamo isolato cellule endoteliali dalle arterie polmonari (PAEC) da un paziente FC con il genotipo G542X/1717-1G->A (PAEC-FC). Queste cellule esprimono bassi livelli di CFTR sulle membrane e hanno scarsa attività CFTR. Esperimenti con queste cellule ci hanno permesso di confermare i dati ottenuti con cellule normali trattate con un inibitore del CFTR. In particolare, se paragonate alle cellule normali le PAEC-FC hanno mostrato più bassa resistenza transendoteliale (TER) e rilasciato più alte quantità di Fattore Vascolare di Crescita Endoteliale e un maggior numero di micropaticelle (MP). La rilevanza clinica dell'endotelio vascolare nella malattia polmonare della FC è stata confermata dall'osservazione che pazienti CF hanno mostrato un incremento nel numero di cellule endoteliali circolanti (CEC) e MP endoteliali (EMP) e che correlazioni inverse sono state osservate tra CEC e EMP con indici di funzionalità respiratoria. Infine, abbiamo osservato che alcuni farmaci sono in grado di correggere le alterazioni della TER e dell'integrità delle PAEC-FC.

Possibili ricadute per ricerca e clinica Crediamo che i nostri risultati ci possano aiutare a comprendere meglio le cause della infiammazione polmonare nella FC, oltre che a individuare nuovi marcatori di malattia e terapie anti-infiammatorie.

66. Cystic fibrosis liver disease: the role of CFTR as regulator of epithelial innate immunity

Strazzabosco M

Dip. Medicina Clinica e Prevenzione, Università Milano-Bicocca, Milano (FFCProject#18/2012, Completed)



Mario Strazzabosco, primo a sinistra, e il suo team di ricerca

Background Cystic Fibrosis-related liver disease (CFLD) negatively impacts on survival and quality of life of CF patients. The pathophysiology of this condition remains unclear, and treatment is limited to the administration of choleric bile acids. Instead, we have recently described that CFLD results from a dysregulated TLR4 response of CFTR-defective biliary cells associated with its increased phosphorylation mediated by c-Src tyrosine kinase.

Hypothesis and objectives Our hypothesis is that CFTR participates to the regulation of TLRs signaling and that a correct therapeutic approach should aim at controlling inflammation in biliary epithelial cells. We aimed to investigate if other TLRs signaling are affected by CFTR deficiency, to study the pathogenetic role of c-Src and to validate the potential therapeutic value of PPAR- γ agonists to treat inflammation.

Results We have found that TLR2 and TLR5 signaling is also affected by CFTR deficiency. We have unveiled the role of CFTR in the regulation of c-Src activity in the biliary epithelium. Expression of CFTR is essential for the assembly of an apical protein complex able to negatively regulate c-Src activity. Lack of CFTR perturbs this complex impairing the negative regulation of c-Src that is free to phosphorylate TLR4 and enhances the response to LPS. The protective effects of *in vivo* c-Src inhibition confirm the pathogenetic relevance of this mechanism and suggest that c-Src is a potential therapeutic target in CFLD. In addition, we have demonstrated that the chronic inflammatory state of CFTR-defective cholangiocytes may depend in part on decreased availability of PPAR- γ endogenous ligands and that stimulation of PPAR- γ signaling by synthetic agonists (*i.e.* pioglitazone and rosiglitazone) is able to limit the activation of NF- κ B and the secretion of pro-inflammatory cytokines, through the up-regulation of I κ B α . The therapeutic value of using PPAR- γ agonists was confirmed *in vivo*.

Spin-off for research & clinical purposes These studies unveil novel mechanisms of epithelial physiology and innate immunity. Our findings suggest that altered innate immune mechanisms of the biliary epithelium are responsible for chronic inflammation, typical feature of CFLD, and that a correct therapeutic approach should be to target the TLR-driven inflammatory response. We expect that it will be possible to extend the results of these studies to other organs affected in CF.

Malattia epatica associata a fibrosis cistica: ruolo del CFTR nella regolazione dell'immunità innata epiteliale

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 orga-

ni. Una grave complicanza è la malattia epatica, le cui cause patogenetiche non sono ancora note e una cura non è ancora disponibile. Abbiamo in precedenza dimostrato che la mancanza di CFTR nell'epitelio biliare ha un profondo impatto sui meccanismi che dell'immunità innata (recettori Toll-like, TLR) che in condizioni normali, proteggono il sistema biliare dalle infezioni. In particolare abbiamo visto che vi è una iperattivazione del TLR4 dovuta ad una alterata attività della proteina tirosina chinasi c-Src.

Ipotesi e obiettivi L'ipotesi del nostro studio è che il CFTR regola il sistema dei TLRs e che il controllo di tali meccanismi potrebbe avere un utilizzo terapeutico. Abbiamo quindi studiato l'effetto patologico di un difetto del CFTR sull'attivazione di diversi TLRs, il ruolo patogenetico della proteina c-Src e testato il potenziale effetto terapeutico del recettore nucleare PPAR- γ .

Risultati I nostri risultati mostrano che in assenza del CFTR vi è un'alterazione dei TLR2, e TLR5 oltre al TLR4. Il CFTR forma un complesso a membrane con proteine coinvolte nella regolazione dell'attività di c-Src. In assenza di CFTR tale complesso non si forma e c-Src è costitutivamente attiva e va ad aumentare il signaling del TLR4 in presenza di LPS. L'inibizione di Src *in vivo* ha un effetto protettivo sull'infiammazione, a conferma del suo coinvolgimento nella malattia e di un potenziale utilizzo terapeutico. Infine, abbiamo dimostrato che l'infiammazione cronica, che caratterizza la malattia epatica può dipendere, in parte, da una carenza di attivazione endogena del recettore nucleare PPAR- γ . Infatti, la stimolazione di PPAR- γ con ligandi sintetici (*es.* pioglitazone e rosiglitazone) riduce *in vitro* e *in vivo* l'iperattivazione di TLR4 e l'infiammazione, suggerendone un potenziale utilizzo terapeutico.

Possibili ricadute per ricerca e clinica I nostri studi descrivono nuovi meccanismi fisiologici e immunitari delle cellule biliari, che se alterati, determinano uno stato infiammatorio cronico, tipico della malattia epatica in FC. I dati *in vivo*, suggeriscono che un corretto approccio terapeutico dovrebbe mirare a ridurre la risposta infiammatoria indotta dall'attivazione dei TLRs. Riteniamo che i nostri risultati possano essere estesi anche ad altri organi affetti da FC.

67. Lactoferrin-loaded niosomes in reducing inflammation and infection of cystic fibrosis airway epithelium

Berlotti F

Department of Public health and Infectious Diseases,
"Sapienza" University of Rome, Rome, Italy
(FFCProject#13/2013, Completed)



Francesca Berlotti,
responsabile del progetto

Background In cystic fibrosis (CF) subjects, the dysfunction of transmembrane conductance regulator as well as the inflammation leads to abnormalities in iron homeostasis. As consequence, CF airway secretions contain micromolar concentrations of iron making this micronutrient more readily available for inhaled pathogens and favouring bacterial infections. The

iron overload in CF airway secretions strongly favours bacterial multiplication and biofilm lifestyle. Bacterial infection induces inflammation thus establishing a dangerous vicious circle involving iron overload, infection, and inflammation.

Lactoferrin (Lf), an iron-chelating glycoprotein of the innate immunity present in secretions and secreted by neutrophils in inflammation/infection sites, shows antimicrobial and anti-inflammatory properties. Even if the Lf concentration is higher in CF than healthy airways, Lf may be hydrolysed by human and bacterial proteases thus decreasing its activities.

Hypothesis and objectives We hypothesized that Lf could be regarded as a useful molecule to counteract iron overload/infection/inflammation. Our aim was to set up a system for delivery of intact Lf at levels sufficient to exert its activities. Therefore, we developed a nano-system for Lf delivery based on niosomal vesicles already employed for aerosol administrations of drugs.

Essential methods Bovine Lf was used as it shows similar structure and functions of human Lf, it is generally recognized as a safe substance by FDA (USA) and it has been successfully employed in clinical trials. The study concerned the preparation and characterization of Lf-loaded niosomes (bLf-NIOs) as well as the evaluation of cytotoxicity, cell diffusion and antibacterial effects.

Results BLf was efficiently entrapped in niosomes. The bLf entrapment caused an increase in rigidity of the bilayer (anisotropy values) and in microviscosity, while no change in bilayer polarity occurs indicating the stability of bLf-NIOs. BLf in bLf-NIOs was protected against the activity of both human and bacterial proteases. BLf was released from bLf-NIOs to CF bronchial cells already after 2 hours and it was found associated both to cytoplasm and nucleus. BLf-NIOs were not cytotoxic and showed antibacterial activity similar to bLf solution. Moreover, bLf-NIOs affected bacterial adhesion both to abiotic and cellular surfaces.

Spin-off for research & clinical purposes This *in vitro* study represented the basis to develop an Lf nano-delivery system to be administered as an aerosol formulation in animal pre-clinical study.

Veicolazione con niosomi della lattoferrina: effetto sulla riduzione dell'infiammazione e dell'infezione in epители respiratori affetti da fibrosi cistica

Ragioni dello studio Nelle secrezioni polmonari di soggetti con Fibrosi Cistica (FC) si stabilisce un pericoloso circolo vizioso tra il sovraccarico di ferro, l'infiammazione e l'infezione sostenuta da batteri in biofilm. Una strategia per interrompere tale circolo vizioso potrebbe rappresentare un promettente approccio terapeutico. La lattoferrina (Lf), una glicoproteina dell'immunità innata è presente nelle secrezioni e secreta dai neutrofili nei siti d'infezione e infiammazione. Essa svolge molteplici funzioni quali quella di chelare il ferro rendendolo così non più disponibile, quella antibatterica e anti-infiammatoria. Tuttavia, anche se la Lf è stata ritrovata ad alte concentrazioni nelle secrezioni delle vie aeree dei soggetti con FC, le proteasi batteriche ed umane presenti nelle secrezioni potrebbero alterare la struttura e ridurne l'attività. La ragione del progetto è mettere a punto un sistema di veicolazione della Lf in modo che possa, in futuro, essere somministrata per aerosol. Il sistema, quindi, dovrebbe consentire alla Lf di raggiungere le vie aeree inferiori integra ed in quantità sufficiente a svolgere le sue attività protettive.

Ipotesi e obiettivi Si intende sviluppare un sistema di nano-veicolazione basato sull'uso di niosomi, vescicole costituite da surfattanti non ionici, già impiegati per la somministrazione per via aerea (inalazione) di farmaci per uso umano.

Metodi essenziali È stata utilizzata la Lf purificata da latte bovino (bLf) in quanto la bLf presenta struttura e funzioni simili a quella umana, è considerata come sostanza sicura (GRAS) dall'FDA ed è già stata impiegata in molti trial clinici.

I niosomi carichi di Lf sono stati valutati per efficienza di caricamento e di rilascio, integrità, citotossicità ed attività.

Risultati I risultati dello studio mostrano che la bLf viene intrappolata efficacemente nei niosomi e che l'intrappolamento modifica leggermente la struttura dei niosomi aumentandone la stabilità. La bLf intrappolata nei niosomi è protetta dall'azione delle proteasi batteriche ed umane e viene rilasciata in poco tempo alle cellule bronchiali. I niosomi carichi di bLf non sono citotossici e mostrano la stessa attività antibatterica della bLf. In particolare sono in grado di inibire l'adesione batterica sia a superfici abiotiche che alle cellule.

Possibili ricadute per ricerca e clinica Il presente studio *in vitro* rappresenta la base per uno studio pre-clinico su topi normali ed affetti da FC.

68. Preclinical study of a novel aerosol immunotherapeutic approach based on Janus-faced liposomes to enhance innate antimicrobial immunity

Fraziano M ,Poerio N, Taus F, Santucci MB,

*Department of Biology, University of Rome "Tor Vergata"
(FFCProject#17/2013, Completed)*



Maurizio Fraziano, primo da sinistra, e i collaboratori di ricerca

Background We have recently generated asymmetric apoptotic body like liposomes (ABL) characterized by the presence of phosphatidylserine (PS), at the outer leaflet, and carrying phosphatidic acid (PA), at the inner leaflet of liposome membrane, as a strategy to enhance bactericidal innate immune response while limiting inflammatory response.

Hypothesis and objectives As second lipid messengers are key molecules for the activation of antimicrobial innate immune response and can impact the response against different bacterial pathogens, we aimed to optimize asymmetric ABL, by modifying the inner phospholipid content, in order to implement their immunotherapeutic value against a range of Gram -ve as well as Gram +ve bacterial infections in patients with normal genetic background and with Cystic Fibrosis (CF).

Essential methods Different liposome formulations were preliminarily tested on differentiated THP-1 cells (used as a model of human macrophages) infected or not with Bacille Calmette-Guerin (BCG) or *P. aeruginosa* (Pa) and were evaluated in terms of bacterial viability (by CFU assay), phagosomal acidification and ROS generation (by fluorometry). The effect of the different liposome formulations on antibacterial response was also studied ex vivo on Bronchoalveolar lavage (BAL) cells, from patients with different pulmonary infections, and on monocyte derived macrophages and neutrophils, from CF patients, in vitro infected with Pa. The effect of ABL on inflammatory response was also evaluated on dendritic cells by flow cytometry.

Results The main results show that i) ABL carrying PA induce a tolerogenic phenotype in dendritic cells, ii) ABL carrying PA or PI(5)P significantly increase bacteriocidal response in CF macrophages and in bronchoalveolar lavage (BAL) cells from patients with pulmonary infections by a wide range of bacterial pathogens, and iii) ABL carrying PA exert a synergistic direct bacteriocidal effect against *P. aeruginosa* when used in association with gentamicin plus ampicillin.

Spin-off for research & clinical purposes. This project simultaneously addresses two of the major priority areas in CF research: the development of innovative anti-microbial strategies and of new approaches to treat inflammation in CF lung infections. Accordingly, our purpose is the generation of a novel immunotherapeutic tool to be used as possible aerosol treatment against recurrent bacterial pulmonary infections and able to limit immunopathogenetic inflammatory immune response in CF.

Studio preclinico per un nuovo approccio immunoterapeutico aerosolico basato su liposomi atti a potenziare la risposta microbicida innata

Ragioni dello studio Nel nostro laboratorio abbiamo sviluppato dei liposomi asimmetrici in grado di attivare *in vitro*, *ex vivo* ed *in vivo* una forte risposta innata antimicrobica mantenendo bassa la risposta infiammatoria.

Ipotesi e obiettivi Poiché i secondi messaggeri lipidici sono molecole chiave nell'attivazione della risposta antimicrobica innata e possono influenzare la risposta contro diversi batteri patogeni, il nostro principale obiettivo è stato di ottimizzare questi liposomi, modificandone il contenuto lipidico, allo scopo di potenziare il loro valore immunoterapeu-

ticista contro infezioni batteriche rilevanti nell'ambito della Fibrosi Cistica (FC).

Metodi essenziali A questo scopo sono state prodotte formulazioni liposomal contenenenti differenti secondi messaggeri lipidici, noti per essere coinvolti nell'attivazione di meccanismi microbicidi. Tali formulazioni sono state preliminarmente valutate in macrofagi umani, infettati o no *in vitro* con Bacille Calmette-Guerin (BCG) o *P. aeruginosa* (Pa), in termini di vitalità batterica (mediante saggio delle CFU), acidificazione fagosomale e generazione di ROS (tramite fluorimetria). L'efficacia di queste formulazioni è stata successivamente analizzata su cellule di lavaggio broncoalveolare (BAL) provenienti da pazienti con diverse infezioni batteriche polmonari e su macrofagi e neutrofili provenienti da pazienti con FC ed infettati *in vitro* con Pa. La risposta infiammatoria è stata valuta, infine, su cellule dendritiche tramite citofluorimetria.

Risultati I principali risultati mostrano che i) ABL che veicolano PA inducono un fenotipo tollerogenico nelle cellule dendritiche, ii) ABL che veicolano PA o PI(5)P aumentano in modo significativo la risposta microbicida in macrofagi di pazienti FC e in cellule di BAL di pazienti con diverse infezioni polmonari batteriche e iii) ABL che veicolano PA, in associazione con gentamicina e ampicillina, esercitano un effetto battericida diretto contro Pa che risulta sinergico rispetto ai trattamenti singoli.

Possibili ricadute per ricerca e clinica Il nostro obiettivo è la generazione di un nuovo strumento immunoterapeutico, potenzialmente utilizzabile per via aerosolica, in grado contemporaneamente di incrementare la risposta microbicida polmonare limitando la risposta infiammatoria immunopatogenetica.

APPENDICES

Appendix 1

Publications and congress communications from the studies funded by Italian CF Research Foundation 2002-2014

Pubblicazioni e comunicazioni congressuali dagli studi finanziati dalla Fondazione Ricerca FC dal 2002 al 2014

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 minichromosome" EMBO Reports 2002; vol. 3, no. 9, pp. 862-868

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

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

Publications

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

Abstracts

- Copreni E. et al. "Pseudomonas aeruginosa infection of airway epithelium in a human fetal respiratory xenograft model in view of lentiviral gene therapy of CF lung disease" Journal of Cystic Fibrosis 2 (2003) S19-S23 - 26th Congress European Cystic Fibrosis Society, Belfast 4-7 June 2003.
- Copreni E. et al. "Biosafety of a third generation lentiviral vector for gene transfer to the airway epithelium" NACFC, 2005
- Copreni E. et al. "Gene transfer to the airway epithelium mediated by a third generation HIV-1 based vector: efficiency and role of heparin sulphate" American Society of Gene Therapy, 8th Annual Meeting June 1-5 2005.
- Copreni E. et al. "Study of clearance and internalization of pseudomonas Aeruginosa in a human fetal respiratory xenograft model" Pediatric Pulmonology Suppl. 25, 2003. 17th Annual North American Cystic Fibrosis Conference - Anaheim, 16 - 19 October 2003
- Copreni E. et al. "Lentivirus-mediated gene transfer to the respiratory epithelium in vitro and in vivo in the absence of preconditioning of the airways" 2nd European Conference & Practical Course, February 1-14th, 2004 - Bellaterra, Spain
- Copreni E. et al. "Gene transfer to the airway epithelium by HIV-based vectors" ECFS Conference, Tomar, Portugal 30 April - 3 May 2004;
- Copreni E. et al. "Optimisation of gene transfer to the respiratory epithelium in vitro and in vivo by a last generation lentiviral vector" 3rd European Conference & Practical Course 14 - 26 June 2004, Genopole-Evry, France;
- Copreni E. et al. "Gene transfer to the airway epithelium mediated by last generation lentiviral vectors does not require preconditioning of the epithelial tight junctions" Pediatric Pulmonology Suppl. 27 - The 18th Annual North American CF Conference; America's Center, St. Louis, Missouri, Oct. 14-17 2004
- Copreni E. et al. "Trasferimento genico in modelli in vitro e pre-clinici di epitelio respiratorio mediante vettori virali e non virali" I incontro dei ricercatori di base della fibrosi cistica, Roma 1-2 luglio 2004

- Copreni E. et al. "Trasferimento genico mediato da un vettore lentivirale in modelli di epitelio respiratorio in vitro e in vivo: efficienza e ruolo dell'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 tranfer in model systems of airway epithelia with cystic fibrosis" II Convention d'Autunno dei Ricercatori Italiani per la fibrosi cistica - 19-20 novembre 2004, Verona

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

Valeria Casavola (Dipart. Fisiologia Gen. ed Amb. - Univ. Bari), Manuela Zaccolo (Ist. Veneto Med. Molecolare, Padova)

Publications

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

Abstracts

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

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

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

Publications

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

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

Abstracts

- Moran O. et al. "Molecular model of the nucleotide binding domains of the CFTR: cystic fibrosis correlated mutations" Paediatric Pulmonology, The 17th Annual North American CF Conference, Anaheim, California 16-19 October 2003;
- Moran O. et al. "Searching for the CFTR- Openers binding site" 2004 - ECFS Conference New Frontiers in Basic Science of Cystic Fibrosis 30 April - 3 May 2004 Tomar Portugal;
- Moran O. et al. "Identification of the CFTR - openers binding site" S.I.B.P.A. 2004 XVII Congresso Nazionale della Società di Biofisica Pura ed Applicata Pisa 23 - 25 settembre 2004;
- Zegarra O. et al. "Identification of New Drugs for the 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. 22nd Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Orlando, Florida, 22-25 October 2008, p. 311

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

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

Publications

- Spirli C. et al. "Glibenclamide Stimulates Fluid Secretion in Rodent Cholangiocytes through a CFTR-Independent Mechanism" Gastroenterology 2005; 129: 220-33
- Strazzabosco M. et al. "Pathophysiology of Cholangiopathies" J. Clin Gastroenterology. Vol. 39, suppl. 2, April, 2005;
- Fiorotto R. et al. "Ursodeoxycholic Acid Stimulates Cholangiocyte Fluid Secretion in Mice via CFTR-Dependent ATP Secretion" Gastroenterology (2007); 133: 1603-1613
- 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 PKC /PKC -dependent mechanism" Hepatology Vol. 40, No. 4, Suppl. 1, 2004

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

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

Publications

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

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

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

Publications

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

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

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

Abstracts

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

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

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

Publications

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

Abstracts

- Tamanini A. et al. "Adenovirus Vector Receptor Interactions and Early Pro-Inflammatory Signalling" 2005 - European Cystic Fibrosis Conference - New Frontiers in Basic Science of Cystic Fibrosis - Evora, Portugal 14 - 17 April 2005;

- Tamanini A. et al. "Biosafety studies in CF gene transfer: role of vector-receptor interactions in pro-inflammatory signalling" Journal of Cystic Fibrosis 4 (2005) S26-S33; 28th European C.F. Conference, Hersonissos, Crete, Greece; 22-25 June 2005.

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

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

Publications

- Guerra L. et al. "Na⁺/H⁺ Exchanger regulatory factor isoform 1 over expression modulates cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) expression and activity in human airway 16HBE14o - cells and rescues ΔF508 CFTR functional expression in Cystic Fibrosis cells" The Journal of Biological Chemistry vol. 280, No. 49, pp. 40925-40933, December 9, 2005.

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

- Pantano S. et al. "Molecular basis of the allosteric mechanism of cAMP in the regulatory PKA subunit" FEBS Letters 579 (2005) 2679-2685;

- Fanelli T. et al. "Beta-estradiol rescues Delta-F508 CFTR functional expression in human cystic fibrosis airway CFBE 41 o-cells through the up-regulation of NHRF1". Biol Cell 2008 Jan 9

Abstracts

- Fanelli T. et al. " -estradiol rescues ΔF508-CFTR functional expression in CFBE41o-cells via NHERF1 up-regulation" Workshop Transporters 2006, Parma 6-9 September 2006.

- Guerra L. et al. "Rescue of deltaF508 CFTR in CFBE41O-cells is dependent on actin cytoskeleton interaction with ezrin and NHERF1" European CF Conference, Belek, Turkey, 13-16 June 2007; J. of Cystic Fibrosis June 2007, vol. 6, suppl. 1:S7

- Riccardi S.M. et al. "Rescue of deltaF508 CFTR in CFBE41O-cells is dependent on actin cytoskeleton interaction with ezrin and NHERF1" 58th National Congress of the Italian Physiological Society, Lecce 19-21 Sept. 2007; Acta Physiologica, vol. 191, suppl. 657

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

Abstracts

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

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

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

Abstracts

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

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

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

Publications

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

Abstracts

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

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

Marco Colombatti (Dipart. Patologia - Sez. Immunologia - Università di Verona), Giulio Cabrini (Lab. Patologia Molecol. - Centro FC - OCM Verona), Franco Dosio (Dipart. Scienza e Tecnologia del Farmaco - Univ. Torino)

Publications

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

Abstracts

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

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

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

Abstracts

- Conese M. et al. "Homing to the lung, mitochondrial content and CFTR expression in hematopoietic stem cells" 13th Italian Cystic Fi-

brosis Conference, Milan, 30 Nov. - 2 Dec. 2007, J. Cyst Fibrosis 2008; 7, suppl. 3: S16

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

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

Publications

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

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

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

Publications

- Zegarra Moran O. et al. "Functional analysis of mutations in the putative binding site for CFTR potentiators: interaction between activation and inhibition" The Journal of Biological Chemistry Vol. 282, No. 12 pp. 9098-9104, 2007
- Ferrera L. et al. "Characterization of a 7,8-Benzoflavone Doublet Effect on CFTR Cl⁻ Channel Activity" J. Membrane Biol. (2007) DOI 10.1007/s00232-007-9066-4
- Moran O. et al. "On the measurement of the functional properties of the CFTR" Journal of Cystic Fibrosis, 7 (2008) 483-494
- Moran O. "Model of the cAMP activation of chloride transport by CFTR channel and the mechanism of potentiators" J. Theor. Biol. (2010) 262:73-79.
- Bisignano P. et al. "Molecular dynamics analysis of the wild type and dF508 mutant structures of the human CFTR-nucleotide binding domain 1" Biochimie (2010) 92:51-57.
- Melani R. et al. "Analysis of ion transport in the airway epithelium using RNA interference" Current Opinion in Molecular Therapeutics, 11 (3): 282-291, 2009
- Melani R et al. "Modulation of Cystic Fibrosis transmembrane conductance regulator activity and genistein binding by cytosolic pH" 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.
- Galfrè E. et al. "Biophysical characterisation of the interaction of recombinant nucleotide binding domains of the CFTR and potentiators" XIX Congresso Nazionale SIBPA, Roma, 17-20 settembre 2008
- Ferrera L. et al. "Modulation of CFTR activity by interactions between the UCCF-029 potentiator and ATP analogues" The 22nd Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Orlando, Florida, October 23-25, 2008
- Melani R. et al. "Interaction between CFTR and Genistein at different values of intracellular pH" 2009 ECFS Basic Science Conference, New Frontiers in Basic Science of Cystic Fibrosis, April 15-19, Tavira, Portugal
- Martorana V. et al. "A molecular dynamics study of the CFTR nucleotide binding domains interaction" European Biophysics Journal, 7th EBSA European Biophysics Congress, Genova, July 11-15, 2009
- Moran O., moderators "Pharmacology - how do correctors and potentiators work?" Special group discussion - IV, European CF Society, Tavira, Portugal, April 15-19, 2009
- Moran O. et al., Identification of the binding site of CFTR potentia-

tors. Presented at the 51st Annual Meeting of the Biophysical Society (Baltimore, U.S.A.). 3-7 March, 2007.

- Galfrè 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 potentiators 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 potentiators 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 potentiators: 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 Potentiators 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. "β-estradiol rescues ΔF508CFTR functional expression in human cystic fibrosis airway CFBE41o-cells through the up-regulation of NHERF1" Biol Cell. -2008 Jul;100(7):399-412
- Favia M. et al. "NHERF1 overexpression-dependent increase of cytoskeleton organization is fundamental in the rescue of F508del-CFTR in human airway CFBE41o- cells" under revision for publication in Mol. Biol. Cell
- 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 potentiators of the CFTR chloride channel" Bioorganic & Medici. Chem. 17 (2009) 7894-7903
- **FFC Project#4/2007 "Assessing the implication of protein kinase CK2 in cystic fibrosis pathogenesis"** Lorenzo A. Pinna (Dipart. Chimica Biologica - Università di Padova)

Publications

- Pagano M. et al. "Modulation of protein kinase CK2 activity by fragments of CFTR encompassing F508 may reflect functional links with cystic fibrosis pathogenesis" Biochemistry 2008, 47, 7925-7936
- Pagano M. et al. "CFTR fragments with the F508 deletion exert a dual allosteric control over the master kinase CK2" Biochem. J. In press.
- Pagano M. et al. "La sorprendente diffusione del gene della fibrosi cistica: indizi per una nuova ipotesi" Atti dell'Istituto Veneto di Scienze, Lettere ed Arti, Tomo CLXVII (2008-2009) - Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali, Padova
- Pagano M. et al. "Cystic fibrosis trans membrane regulator fragments with the Phe508 deletion exert a dual 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⁺/H⁺ Exchanger Regulatory Factor 1 Overexpressiondependent 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
- Castellani S. et al. "NHERF1 and CFTR restore tight junction organization and function in cystic fibrosis airway epithelial cells: role of ezrin and the RhoA/ROCK pathway" Lab Invest. 2012 Nov;92(11):1527-40

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" 8th 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 rna-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 weblogo analysis" *Bio-Mol 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)

Publications

- Marasini C. et al. "Visualization of single proteins from stripped native cell membranes: a protocol for high-resolution atomic force microscopi" *Microsc Res Tech.* 2013 Jul;76(7):723-32

Abstracts

- Marasini C. et al. "Direct visualization of CFTR conformation by atomic force microscopi imaging" 8th EBSA European Biophysics Congress (August 23-27 2011, Budapest, Hungary) in *Eur Biophys J* 2011, 40 (Suppl 1):S3-S11

- 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 (Dipartimento di Patologia Generale - Sezione Patologia generale - Università degli Studi di Verona), Paola Melotti (Centro regionale fibrosi cistica - Azienda Ospedaliera di Verona). Rosario Buffelli (Dipartimento di Scienze Neurologiche e della Visione- Sezione Fisiologia - Università degli Studi di Verona)

Publications

- Sorio C, Buffelli M, Angiari C, Ettorre M, Johansson J, Vezzalini M, Viviani L, Ricciardi M, Verzè G, Assael BM, Melotti P. "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. doi: 10.1371/journal.pone.0022212. Epub 2011 Jul 21.

- FFC Project#7/2009 **"Strategies for the suppression of Na⁺ 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.
- Gianotti A. et al., "ENsC silencing as a strategy to correct the airway

- surface fluid deficit in cystic fibrosis" *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2013 Apr 19

- Gianotti A. et al., "ENsC silencing as a strategy to correct the airway surface fluid deficit in cystic fibrosis"- *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2013 Apr 19 [Current Medical Literature review, 2013, vol. 3, nr. 3]

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 potentiatotors 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 Potentiatotors 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

- Bezzzerri 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
- Bezzzerri 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)
- Bezzzerri 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
- Bezzzerri V. et al., "Role of PLCB3 in pro-inflammatory signaling in bronchial epithelial cells", 25th North American Cystic Fibrosis Conference, Anaheim, CA, USA, 2011\

- 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

- Cicchero 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
- Nieddu E. et al. "F508del-CFTR rescue: a matter of cell stress response" *Curr Pharm Des.* 2013;19(19):3476-96

- 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
- Tridello G. et al. "Search for appropriate outcomes of nasal potential difference measurement for diagnosis" NACFC 2013, Salt Lake City, Utah, 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 atomic 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

PhD Thesis

- Marasini C. "Structural study of CFTR intrinsically disorder domain

by computational and experimental approaches" Università degli Studi di Genova, Tesi di Dottorato di Ricerca in Bioingegneria, 25° ciclo, aprile 2013

- 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 Reskin (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
- Rubino R, Bezzerrini V, Favia M et all "Pseudomonas aeruginosa reduces the expression of CFTR in airways via post translational modification of NERFH1", New frontiers in basic science of cystic fibrosis, Malta ECFS Conference, 26-29 March 2014

- FFC Project#2/2011 **"PTC124 derivatives as a novel approach to improve the readthrough of premature stop codons in the CFTR gene"**

Aldo Di Leonardo (Dip. Scienze e Biotecnologie Molecolari e Biomolecolari, Università di Palermo)

Publications

- Lentini L. et al. "Towards a rationale for the PTC124 (Ataluren) promoted readthrough of premature stop codons: a computational approach and GFP-reporter cell-based assay" Mol Pharm. 2014 Mar 3;11(3):653-64.doi: 10.1021/mp400230s. Epub 2014 Feb 7.

Abstracts

- Lentini L. et al. "Ptc124 derivatives as a novel approach to improve the readthrough of premature amber and ochre stop codons" 86° CONGRESSO SIBS. Palermo 24 - 25 Ottobre
- Lentini L. et al. "Azione readthrough di derivati del ptc124 su sistemi modello cellulari e in cellule di epitelio bronchiale-fc ib3.1 (cftr Df508/w1282x)" XIX Congresso Italiano della Fibrosi Cistica, IX Congresso Nazionale della Società Italiana per lo Studio della Fibrosi Cistica, 13-16 Novembre 2013, Hotel Città del Mare, Terrasini (PA)

- 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]
- Venerando A. et al. "Detection of Phospho-Sites Generated by Protein Kinase CK2 in CFTR: Mechanistic Aspects of Thr1471 Phosphorylation" PLoS One. 2013 Sep 18;8(9):e74232.
- Cesaro L. et al. "Phosphorylation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) serine-511 by the combined action of tyrosine kinases and CK2. The implication of tyrosine-512 and phenylalanine-508" AminoAcids, in press

- FFC Project#4/2011 **"Role of spatial cAMP/PKA compartmentalization and activity in regulating CFTR function"**

Stephan Reskin (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

Abstracts

- Abbattisciani AC et al. "Spatial cAMP/PKA compartmentalization and activity in primary airway cells" ECFS Basic Science Conference, 20-24 March 2013, Malaga, Spain

- FFC Project#1/2012 **"The read-through approach for the treatment of cystic fibrosis caused by premature termination codons"**

Monica Borgatti (Dipartimento Biochimica e Biologia Molecolare Università di Ferrara), Nicola Altamura (Istituto Biomembrane e Bioenergetica, CNR, Bari), Alberto Bresciani (IRBM, Science Park, Roma)

Publications

- Altamura N. et al. "Tobramycin is a suppressor of premature termination codons" J Cyst Fibros. 2013 Mar 26
- Marzaro G. et al. "Psoralen derivatives as inhibitors of NF-κB/DNA interaction: synthesis, molecular modeling, 3D-QSAR and biological evaluation" J Med Chem. 2013 Feb 17.
- Fabbri E. et al. "Expression of microRNA-93 and Interleukin-8 during Pseudomonas aeruginosa-Mediated Induction of Proinflammation

tory Responses" American Journal of Respiratory Cell And Molecular Biology 2014, Vol X, pp 1-11

Posters

- Borgatti M. et al. "Biological evaluation of psoralen derivatives as inhibitors of NF- B/DNA interaction: molecular modeling, 3D-QSAR, EMSA assays and inhibition of IL-8 gene expression" 18th World Congress on Advances in Oncology and 16th International Symposium on Molecular Medicine, 10-12 Ottobre, 2013, Creta, Grecia.

- FFC Project#2/2012 "**Development of novel strategies to correct the chloride transport defect in cystic fibrosis"**

Galietta J. Luis (Lab. Genetica Molecolare, Ist. "G. Gaslini", Genova), Enrico Millo (Centre of Excellence for Biomedical Research, Università di Genova)

Publications

- Sondo E. et al. "Non-canonical translation start sites in the TMEM16A chloride channel" Biochim Biophys Acta. 2013 Aug 28. pii: S0005-2736(13)00287-3. doi:10.1016/j.bbamem.2013.08.010. [Epub ahead of print]
- Scudieri P. et al. "Association of TMEM16A chloride channel over-expression with airway goblet cell metaplasia" Journal of Physiology 2012; 590:6141-6155
- Scudieri P. et al. "TMEM16A-TMEM16B chimaeras to investigate the structure-function relationship of calcium-activated chloride channels" Journal of Biological Chemistry 2013 Jun 15;452(3):443-55
- Carbone A. et al. "Correction of defective CFTR/ENaC function and tightness of cystic fibrosis airway epithelium by amniotic mesenchymal stromal (stem) cells" J. Cell. Mol. Med. 2014 Jun 3. doi: 10.1111/jcmm.12303.
- Sondo E. et al. "The TMEM16A chloride channel as an alternative therapeutic target in cystic fibrosis" International Journal of Biochemistry & Cell Biology 2014; 52: 73-76

Abstracts

- Pesce M, Bellotti M, Caci E et all "Strategies to correct the chloride transport defect in cystic fibrosis", New frontiers in basic science of cystic fibrosis, Malta ECFS Conference, 26-29 March 2014

- FFC Project#3/2012 "**Study of the pathogenetic and therapeutic role of the Epithelial Na⁺ 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

- FFC Project#4/2012 "**The molecular structure and the folding of the whole Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR)"**

Oscar Moran (Istituto di Biofisica CNR, Genova)

Publications

- Baroni D, Zegarra-Moran O, Moran O. "Functional and pharmacological induced structural changes of the cystic fibrosis transmem-

brane conductance regulator in the membrane solved using SAXS" Cell and Molecular Life Sciences 2014 Oct 2

- Baroni D. et al. "Direct interaction of a CFTR potentiator and a CFTR corrector with phospholipid bilayers" European Biophysics Journal 26 Apr 2014
- Moran O. et al. "On the structural organization of the intracellular domains of CFTR" Int J Biochem Cell Biol. 2014 Jul;52:7-14

Abstracts

- Pollock N. et al. "Purification and biophysical analysis of DF508 and G551D CFTR" NACFC 2013, Salt Lake City, Utah, USA
- Pollock NL, Cant N, Rimington TL et al. "From heterologous expression to homogeneous samples: large-scale production of a human ABC transporter for structural studies" In: Role of multidrug resistance proteins in pharmacokinetics and toxicology, 3-7th September 2013 (Masuria, Poland)
- Belmonte L, Moran O. "Molecular dynamics analysis of the normal and mutated cystic fibrosis transmembrane regulator: nucleotide binding domain interactions" In: CCII Congresso della Società Italiana di Biofisica Pura ed Applicata, 21-24 Settembre 2014 (Palermo, Italia)

- FFC Project #1/2013 "**Mechanism of action of trimethylangelicin in rescuing F508del CFTR functional expression"**

Valeria Casavola (Dip. di Bioscienze, Biotecnologie e Biofarmaceutica, Università di Bari)

Publications

- Rubino R, Bezzetti V, Favia M et all "Pseudomonas aeruginosa reduces the expression of CFTR via post-translational modification of NHERF1" Pflugers Arch 2014 Mar 5
- Favia M. et al. "Trimethylangelicin promotes the functional rescue of mutant F508del CFTR protein in cystic fibrosis airway cells" Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2014;May 9,

Abstracts

- Laselva O, Favia M, Abbattisciani AC et all " Trimethylangelicin (TMA) promotes F508del.CFTR functional rescue in CF airways cells ", New frontiers in basic science of cystic fibrosis, Malta ECFS Conference, 26-29 March 2014

- FFC Project #5/2013 "**Vessel associated progenitor cells as a promising cell-based approach to treat cystic fibrosis disease"**" Graziella Messina (Dip. di Bioscienze, Università degli Studi di Milano)

Abstracts

- Vezzali C, Antonini A, De Stefano D, Bonfanti C, Bacchetta R, Villella V, Maiuri L, Messina G. "Vessel associated progenitor cells in the cell-based therapy of the cystic fibrosis lung disease" 11th ECFS Basic Science Conference, Malta,26-29 March 2014

- FFC Project #6/2013 "**Establishment of a semi-automated evaluation of CFTR function in blood cells for clinical applications"**" Claudio Sorio (Dip. di Patologia, Sez. Patologia generale, Università di Verona), Monica Averna (Dip. di Medicina Sperimentale, Università di Genova), Mario R. Buffelli (Dip. Scienze Neurologiche e del Movimento, Università di Verona)

Publications

- Johansson J et al. "Detection of CFTR protein in human Leukocytes by Flow Cytometry" Cytometry 2014 Jul;85(7):611-20. doi: 10.1002/cyto.a.22456. Epub 2014 Mar 12.
- Ettorre M. et al. "Electrophysiological evaluation of Cystic Fibrosis Conductance Transmembrane Regulator (CFTR) expression in human monocytes" Biochimica et Biophysica Acta vol 1840: 3088-3095

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. Bioc. 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
- Sangiolo 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" 54th Annual Meeting Toronto, Canada October 26 - 30 2004

- Gambardella S. et al. "Different CFTR genotypes induce dissimilar

- expression patterns in CF putative modifier genes" European Human Genetics Conference 2005, Prague 7-10 May 2005;
- Gambardella S. et al. "Different CFTR genotypes induce dissimilar expression patterns in CF putative modifier genes" 28th European CF Conference, Crete, Greece 22-25 June 2005;
 - Gambardella S. et al. "Diversi 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^o Congresso Nazionale S.I.G.U. Verona 24-27 settembre 2002;
 - Belpinati F. et al. "Geni modificatori del fenotipo polmonare in Fibrosi Cistica" 6^o 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^o Congresso Nazionale S.I.G.U. 2004

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

Franco Pagani (ICGEB - Trieste)

Publications

- Buratti E. et al. "Nuclear factor TDP-43 Ninds to the Polymorphic TG Repeats in CFTR Intron 8 and Causes Skipping of Exon: A Functional Link with Disease Penetrance" Am. J. Hum. Genet. 74:1322-1325, 2004
- Amaral M. D. et al. "Quantitative methods for the analysis of CFTR transcripts/splicing variants" Journal of Cystic Fibrosis 3 (2004) 17-23;
- Zuccato E. et al. "An Intronic Polypyrimidine-rich Element Downstream of the Donor Site Modulates Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Exon 9 Alternative Splicing" The Journal of Biological Chemistry - Vol 279, No. 17, Issue of April 23, pp. 16980-16988, 2004
- Pagani F. et al. "Synonyms 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. Calef" Università di Roma - Tor Vergata)

Publications

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

Abstracts

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

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

Giuseppe Castaldo (CEINGE - Biotec. Avanzate s.c.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 Sangiolo (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 pa-

tients: 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^o Congresso Nazionale S.I.G.U. 13 - 15 ottobre 2004, Pisa;
- Bombieri C. et al. "Screening of CFTR gene rearrangements in Italian CF patients" Poster: Molecular Basis of Mendelian Disorder - The American Society of Human Genetics, 54th Annual Meeting, Toronto, Canada, October 26-30, 2004;
- Tomaiuolo R. et al. "Screening di macrodelezioni del gene CFTR in pazienti CF originari del sud Italia" 37^o 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^o 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^o 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 12^h 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^o 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 Bonizzato (Centro FC - Ospedale Civile Maggiore - Verona), Manuela Seia (Lab. Genetica Molecolare ICP - Milano), Antonio Amoroso (Scuola di Genetica Medica - Univ. Trieste)

Publications

- Faa V. et al. "A new insertion / deletion of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene account for 3.4% of cystic fibrosis mutations in Sardinia: implications for population screening" J. Mol Diagn. 2006 Sep; 8(4):499-503
- FFC Project#9/2004 **"Selection and functional characterization of CFTR intronic sequence variations potentially causing atypical forms of CF: modulation of CFTR alternative splicing?"**

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

Publications

- Lucarelli M. et al. "A 96- well formatted method for exon and exon/intron boundary full sequencing of the CFTR gene" Anal. Biochem. 2006 Jun 15; 353(2): 226-35
- Narzi L. et al. "Does cystic fibrosis neonatal screening detect atypical CF forms? Extended genetic characterization and 4-year clinical follow-up" Clin Genet. 2007: 39-46
- FFC Project#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#5/2006 **"Mechanisms of recruitment of adult bone marrow-derived cells to normal and cystic fibrosis airway epithelium"**

Roberto Loi (Dip. Scienze Biomediche, Università di Cagliari)

Publications

- Eisenhauer P. et al. "Endogenous distal airway progenitor cells, lung mechanics, and disproportionate lobar growth following long-term post-pneumonectomy in mice" Stem Cells 2013 Jul;31(7):1330-9
- 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" 13th Italian Cystic Fibrosis Conference, Milan, 30 Nov. - 2 Dec. 2007, J. Cyst Fibrosis 2008; 7, suppl. 3: pp. S12
- Tomaiuolo R. et al. "Molecular analysis of genes encoding CFTR interactors of SLC26 family in CF patients: preliminary results" 13th Italian Cystic Fibrosis Conference, Milan, 30 Nov. - 2 Dec. 2007, J. Cyst Fibrosis 2008; 7, suppl. 3: pp. S12-S13
- 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 Friedrich Ataxia GAA noncoding repeat expansion on Pre-mRNA processing" Am J Hum Genet 83, 77-88, July 2008.

- Goina E. et al. "Binding of DAZAP1 and hnRNP A1/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)

Publications

- Giordano S. et al. "Molecular and functional analysis of the large 5' promoter region of CFTR gene revealed pathogenic mutations in CF and CFTR-related disorders" J Mol Diagn. 2013 May;15(3):331-40

Abstracts

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

- FFC Project# 5/2008 **"Feasibility of a screening program for the pre-conceptional 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#3/2010 **"An induced pluripotent stem cell (iPS)-based approach for the repopulation and phenotypic correction of cystic fibrosis airway epithelium"** Roberto Loi (Dip. Scienze Biomediche, Università di Cagliari)

Abstracts

- Loi R. et al. "Derivation of normal and cystic fibrosis human induced pluripotent stem cells (iPSCs) from airway epithelium" 36th European Cystic Fibrosis Conference (ECFC), Lisboa, 12-15 June, 2013

- 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

- FFC Project#7/2011 **"New strategies for clinical application of non-invasive prenatal diagnosis of cystic fibrosis based on the analysis of fetal mutated alleles in maternal plasma"**

Maurizio Ferrari (Lab. Biologia Clinica Molecolare e Citogenetica, Università Vita-Salute HSR, Milano), Marina Cretich (Ist. di Chimica del Riconoscimento Molecolare, CNR, Milano)

Abstracts

- Galbiati S. et al. "Non-invasive prenatal diagnosis of genetic diseases by advanced technologies" 3rd Congress of the European Society of Predictive Medicine (EUSPM), 9th- 10th March 2013, Riolo Terme (RA), Italy
- Galbiati S. et al. "Non-invasive prenatal diagnosis of genetic diseases by advanced technologies" Clinical Biochemistry (2012) doi:10.1016/j.clinbiochem.2013.05.030
- Galbiati S. et al. "Noninvasive prenatal diagnosis of cystic fibrosis" EUROMEDLAB, Milano, 19-23 May 2013

- Galbiati S. et al. "Fetal DNA in maternal plasma: a noninvasive tool for prenatal diagnosis of genetic diseases by COLD-PCR and Innovative Microarray Substrates" International Meeting on Cell-free DNA, Copenhagen, 2013, 20th- 21st

- FFC Project# 8/2011 **"A field study in an area of extensive carrier screening for cystic fibrosis"** Carlo Castellani (Centro Regionale FC, Azienda Ospedaliera Universitaria, Verona), Luigi Picci (Clinica Pediatrica, Azienda Ospedaliera, Padova)

Abstracts

- Castellani C. et al. "Carrier screening and Neonatal screening for cystic fibrosis: a complex relationship" Presentazione a European Society of Human Genetics Conference, Milan 2014
- Castellani C. et al. Poster "Population carrier screening reduces dramatically Cf incidence: evidence from a twenty years' experience" 28th North American Cf Conference, Atlanta October 9-11 2014
- Castellani C. et al. Poster "Population carrier screening impairs positive predictive value of CF newborn screening: evidence from a twenty years' experience" 28th North American CF Conference, Atlanta October 9-11 2014

- FFC Project# 9/2011 **"Cystic fibrosis: to screen or not to screen? Involving citizens' jury in decision on carrier screening"**

Paola Mosconi (Ist. Ricerche Farmacologiche Mario Negri, Lab. for Medical Research and Consumer Involvement), Carlo Castellani (Centro Regionale FC, Azienda Ospedaliera Universitaria, Verona)

Publications

- Mosconi A, Castellani C, Villani W, Satolli R. "Cystic fibrosis : to screen or not to screen? Involving a Citizens' jury in decisions on screening carrier" Health Expectations doi:10.1111/hex.12261

Abstracts

- Castellani C, Satolli R, Roberto A, Mosconi P "Citizens' jury on cystic fibrosis carrier screening :yes or no?", 28th Annual North American Cystic Fibrosis Conference , Atlanta, October 9-11, 2014

3. MICROBIOLOGY

Microbiologia

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

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

Publications

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

Abstracts

- G. Golini et al. " Distribution of Burkholderia Cepacia complex isolates from patients with cystic fibrosis" 12th ECCMID, Milan, 24-27 April 2002. Clinical Microbiology and Infection 2002; 8 Supp. 1:114

- G. Golini et al. "Distribution of Burkholderia Cepacia complex isolates from patients with cystic fibrosis" 25th European Congress CF Society, Genoa; 20-23 June 2002. Journal of CF 2002; 1 Supp. 1: 127.

- G. Golini et al. "Burkholderia Cepacia infection and clinical course in cystic fibrosis" 26th European Congress CF Society, Belfast; 4-7 June 2003. Journal of CF 2003; 2 Supp. 1:34.

- G. Golini et al. "In vitro of levofloxacin and ciprofloxacin on clinical isolates obtained from patients with cystic fibrosis" 11th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases - Istanbul, Turkey - 1-4 April 2001

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

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

Publications

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

alginate in the lungs of patients with cystic fibrosis and in a mouse model" J. Infect Dis. 2005; 192(3): 410-419

Abstracts

- Montanari S. et al. "Evaluation of the biological cost of *Pseudomonas aeruginosa* hypermutation in a murine model of chronic pulmonary infection" Paediatric Pulmonology, Suppl. 28: 289, 2005. (19th North American Cystic Fibrosis Conference. Baltimore, USA)

- Paroni M. et al. "Pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* clonal strains isolated from CF patients in a murine model of chronic pulmonary infection" 20th Annual North American CF Conference; Denver - Colorado, 2-5 Nov. 2006

- Montanari S. et al. "Cost versus benefit of *Pseudomonas Aeruginosa* hypermutation in the absence or presence of antibiotic treatment" 20th Annual North American CF Conference; Denver - Colorado, 2-5 Nov. 2006
- Montanari S. et al. "Evaluation of the biological cost of hypermutation in *Pseudomonas aeruginosa* from patients with cystic fibrosis" 2nd FEMS Congress of European Microbiologists, Madrid, July 4-8, 2006

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

Renato Fani (Dipart. Biologia Animale e Genetica - Univ. Firenze), Giovanni Taccetti (Dipart. Pediatria - Centro Fibrosi Cistica - Ospedale Meyer - Firenze), Graziana Manno (Dipart. Pediatra - 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 Microbiol Methods. 2010 Mar;80(3):251-6
- Abstracts
- Cocchi P. et al. "Identification of Burkholderia cepacia complex species by SNuPE analysis of recA and gyrB genes" 28th European CF Conference, Crete, Greece 22-25 June 2005;
 - FFC Project#10/2003 **"The quorum sensing of the emerging fibro-cystic pathogen *B. cepacia"***
Vittorio Venturi (ICGEB Trieste)
- Publications
- Venturi V. et al. "Quorum sensing in *B. cepacia* complex" Research in Microbiology 155 (2004) 238-244
 - Bertani I. et al. "Regulation of the N-Acyl Homoserine Lactone-Dependent Quorum-Sensing in Rhizosphere *Pseudomonas putida* WCS358 and Cross-Talk with the Stationary-Phase RpoS Sigma Factor and the Global Regulator GacA" Applied and Environmental Microbiology, Sept. 2004, p. 5496-5502
- Abstracts
- Bertani I. et al. "Negative regulation of N-acyl homoserine lactone quorum sensing in *Pseudomonas putida*" Pseudomonas 2005, 10th International Congress, Marsiglia, 27-31 Aug. 2005
 - FFC Project#10/2004 **"Genome-wide identification of target genes for the design of non-conventional antibiotics against CF related pathogens"**
Giovanni Bertoni (Dipart. Scienze Biomolecolari e Biotecnologie - Univ. Milano)
- Abstracts
- Vidal Aroca F. et al. "Functional genomics of the opportunistic pathogen *Pseudomonas Aeruginosa* by interfering antisense RNA" 25th Congresso Nazionale della SIMGBM, Orvieto 8- 10 giugno 2006;
 - Vidal Aroca F. et al. "Functional genomics of the opportunistic pathogen *Pseudomonas Aeruginosa* by interfering antisense RNA" Summer School - International Univ. Bremen, 28 luglio - 4 agosto 2006;
 - Milani A. et al. "Functional genomics of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* by interferring antisense RNA" 1st European CF Young Investigator Meeting, Lille, Aug. 29-31, 2007
 - FFC Project#11/2004 **"Evaluation of the pathogenicity of environmental and clinical isolates of Burkholderia cepacia complex alone and in the presence of *Ps aeruginosa*"**
Annamaria Bevvino (Dipart. Biotecnologie Agroindustr. e protezione della salute - ENEA - Casaccia - Roma), Fiorentina Ascenzioni (Dipart. Biologia cellulare e dello sviluppo - Univ. La Sapienza Roma), Alessandra Bragonzi (Ist. per il Trattamento speriment. della FC - Osp. San Raffaele - Milano)
- Publications
- Chiarini L. et al. "Burkholderia cepacia complex species: health hazards and biotechnological potential" Trends in Microbiology Vol. 14 No. 6 June 2006; 277-286
 - Pirone L. et al. "Burkholderia cenocepacia strains isolated from cystic fibrosis patients are apparently more invasive and more virulent than rhizosphere strains" Environmental Microbiology (2008) Oct;10(10):2773-84
- Abstracts
- Pirone L. et al. "In vitro and in vivo pathogenicity of Burkholderia cenocepacia strains of clinical and environmental origin" 28th European CF Conference, Crete, Greece 22 - 25 June 2005;
 - Pirone L. et al. "Clinical and environmental Burkholderia cenocepacia strains: evaluation of pathogenicity by in vitro and in vivo models" International Burkholderia Cepacia Working Group meeting April 20 - 23, 2006, Gent, Belgium
 - Pirone L. et al. "Clinical and environmental Burkholderia cenocepacia strains: evaluation of pathogenicity by in vitro and in vivo models" 19th Annual North American CF Conference, Baltimore; October 20 - 23 2005
 - 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 methicillin-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" 30th European CF Conference, Belek, turkey, 13-16 June 2007
 - Cocchi P. et al. "Epidemiologia italiana di staphylococcus aureus meticillino-resistente: risultati di uno studio multicentrico" XII Congresso Italiano Fibrosi Cistica, Firenze, 23-25 Nov. 2006
 - Taccetti G. et al. "Methicillin-resistant *S. Aureus* (MRSA) in cystic fibrosis patients: prevalence and clinical findings" Pediatric pulmonology, Suppl. 31, 2008. 22nd Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Orlando, Florida, 22-25 October 2008, p. 343.
 - Cocchi P. et al. "MLST analysis of an epidemic clone of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) panton-valentine leukocidin (PVL) negative in cystic fibrosis patients" Pediatric pulmonology, Suppl. 31, 2008. 22nd Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Orlando, Florida, 22-25 October 2008, p. 348
 - Campana S. et al. "Community-Aquired MRSA cause earlier infection than Hospital Acquired MRSA in patients with cystic fibrosis" 32nd European Cystic Fibrosis Conference, 10-13 giugno 2009, Brest, France.
 - Cocchi P. et al. "Characterization of SCCmec types involved in persistent MRSA infections in cystic fibrosis patients" 32nd European Cystic Fibrosis Conference, 10-13 giugno 2009, Brest, France.
 - Campana S. et al. "Infection with community-and hospital-acquired MRSA: influence on pulmonary function in CF patients" 23rd Annual North American Cystic Fibrosis Congress, Minneapolis, Minnesota, 15-17 October 2009.
 - Cocchi P. " SCCMEC types involved in persistent MRSA infections in CF patients: a longitudinal study" 23rd Annual North American Cystic Fibrosis Congress, Minneapolis, Minnesota, 15-17 October 2009.
 - FFC Project#7/2005 **"*Stenotrophomonas maltophilia*, an emergent pathogen associated to cystic fibrosis: identification and molecular characterization of virulence determinants as potential targets for new therapeutic strategies"**
Bianca Colonna (Dipart. Biologia Cellulare e dello Sviluppo - Lab. Microbiologia Molecolare - Univ. La Sapienza - Roma), Maurizio Sanginetti (Ist. Microbiologia - Univ. Sacro Cuore - Roma), Mauro Nicoletti (Dipart. Scienze Sanità Pubbli. - Sez. Microbiologia - Univ. La Sapienza - Roma), Mariassunta Casalino (Dipart. Microbiologia - Univ. Roma 3), Ersilia Ficarelli (Dipart. Medicina Pediatrica - Osped. Pediatrico "Bambin Gesù" - Roma)
- Publications
- Di Bonaventura G. et al. "Molecular characterization of virulence determinants of *Stenotrophomonas maltophilia* strains isolated from patients affected by cystic fibrosis". Internat J Immunopath Pharmacol 2007;Vol. 20:529-37
 - E. Rossetto et al. "PCR-based rapid genotyping of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates" BMC Microbiol 2008 Nov 24;8:202.

Abstracts

- De Carolis E. et al. "Analisi proteomica di *Stenotrophomonas Maltophilia*" Congresso Società Italiana di Microbiologia (SIM), Genova 15-18 ottobre 2006.
- Del Chierico F. et al. "Caratterizzazione genetica e molecolare dei geni codificanti il flagello in ceppi di *Stenotrophomonas Maltophilia* isolati da pazienti con fibrosi cistica (FC)" Congresso Società Italiana di Microbiologia (SIM), Genova 15-18 ottobre 2006.
- Di Bonaventura G. et al. "Effetto di concentrazioni sub-inibenti di Moxifloxacina su *Stenotrophomonas Maltophilia* isolati da fibrosi cistica" Congresso Società Italiana di Microbiologia (SIM), Genova 15-18 ottobre 2006.
- FFC Project#8/2005 **“Genetic fingerprinting of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Italian cystic fibrosis patients: comparison with isolates from the environment and other clinical origins in Europe”**

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

Abstracts

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

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

Vittorio Venturi (ICGEB Trieste)

Publications

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

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

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

Abstracts

- Milani A., et al. "Functional genomics of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* by interfering antisense RNA" 1st European CF Young Investigator Meeting, Lille, August 29-31 2007
- FFC Project#7/2006 **“Influence of *Pseudomonas aeruginosa* and CF host on *Burkholderia cenocepacia* pathogenicity”**

Annamaria Bevvino (Dipart. Biotecnologie Agroindustr. e protezione della salute - ENEA - Casaccia - Roma), Fiorentina Ascenzio-

ni (Dipart. Biologia cellulare e dello sviluppo - Univ. La Sapienza Roma), Alessandra Bragonzi (Ist. per il Trattamento sperimentale della FC - Osp. San Raffaele - Milano)

Publications

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

Abstracts

- Pirone L. et al. "Influence of *Pseudomonas aeruginosa* on the growth rate and internalization of *Burkholderia cenocepacia*" 9th Convegno Nazionale FISV, Riva del Garda (TN), 26- 29 Sett. 2007
- Bevvino A. et al. "Influence of *Pseudomonas aeruginosa* on the growth rate and internalization of *Burkholderia cenocepacia*" 13th Italian Cystic Fibrosis Conference, Milan, 30 Nov. - 2 Dec. 2007, J. Cyst Fibrosis 2008; 7, suppl. 3: S16
- Pirone L. et al. "Influence of *Pseudomonas aeruginosa* on biofilm formation and internalization of *Burkholderia cenocepacia* strains" Florence conference on Phenotype MicroArray Analysis of Micro-organism - 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 cepacia 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: 10th 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*" 10th Convegno FISV - Federazione italiana scienze della vita, Riva del Garda (Trento), 24-27 settembre 2009

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

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

Publications

- Vecchietti D. et al. "Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* cell envelope proteome by capture of surface-exposed proteins on activated magnetic nanoparticles" PlosOne 2012 Nov 7(11):e51062

Abstracts

- Bragonzi A. et al. " *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity within clonal strains from patients with cystic fibrosis" 13th Italian Cystic Fibrosis Conference, Milan, 30 Nov. - 2 Dec. 2007, J. Cyst Fibrosis 2008; 7, suppl. 3: S17
- Leone M. et al. "Chemical and biological characterization of lipopolysaccharide and peptidoglycan of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a patient at different stages of cystic fibrosis" Pediatric pulmonology, Suppl. 31, 2008. 22nd Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Orlando, Florida, 22-25 October 2008, p. 265.
- Bragonzi A. et al. "Genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* for the commitment to chronic lung infection" Pediatric pulmonology, Suppl. 31, 2008. 22nd Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Orlando, Florida, 22-25 October 2008, p. 342
- 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 Miocrobiol Biotechnol, August 2009, DOI 10.1007/s00253-009-2199-x, ahead of print.

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

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

Publications

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

Abstracts

- Buroni S. et al. "The role of RND drug efflux transporters in intrinsic antibiotic resistance of *Burkholderia cenocepacia*" 28th National Meeting Società Italiana di Microbiologia generale e Biotecnologie mediche, 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
- Foschiatti M. et al. "Inhibition of cathelicidin activity by bacterial exopolysaccharides" Molecular Microbiology 72, 2009, 1137-1146
- Ieranò T. et al. "Structural and conformational behavior of the two lipopolysaccharide O-antigens produced by the cystic fibrosis pathogen *Burkholderia multivorans*" Chemistry European Journal, 2009, 15:7156:7166
- 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" 37th 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. Ierano, "Analysis of endotoxins from *B. cepacia* complex" European CF Young Investigator Meeting, Lille (France), August 27-29, 2008
- T. Ierano' "Analysis of endotoxins from *B. cepacia* complex" Sum-

mer Course Glycosciences-10th European Training Course on Carbohydrates - Wageningen (The Netherlands), June 9-12, 2008

- Rizzo R. et al. "Structure and Functions of Exopolysaccharides Produced by *Inquilinus limosus*: A Pathogen of Cystic Fibrosis Patients" International carbohydrate symposium, Oslo (Norway), 27 July - 1 August 2008
- Furlanis L. et al. "L'esopolisaccaride batterico come fattore di patogenicità nelle infezioni respiratorie da *Burkholderia cepacia*" 36th Congresso Società Italiana di Microbiologia, Roma (Italy) 12-15 ottobre 2008
- Cescutti P. et al. "Structure-function relationships in cepacian biofilm formation" 14th European Carbohydrate Symposium, Lubeck 3-7 September 2007
- Cescutti P. et al. "Structure-function relationships in cepacian biofilm formation" XVIII convegno dell'Associazione Italiana di Scienza e Tecnologia delle Macromolecole, Catania 16-20 September 2007
- Cescutti P. et al. "Exopolysaccharides as bacterial defence tools: the case of *Burkholderia cepacia* Complex" XIV European Meeting on Carbohydrates, Lubeck, September 3-7, 2007

• FFC Project#14/2006 **"Longitudinal study of *Pseudomonas aeruginosa* resistance: selection and evolution of resistance mechanisms in relation to antibiotic treatment in cystic fibrosis patients"**

Anna Silvia Neri (Dipart. Pediatria - Centro FC - Ospedale Meyer - Firenze), 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" 30th 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)

Publications

- Milani A. et al. "Tgpa, a protein with a eukaryotic-like Transglutaminase domain, plays a critical role in the viability of *Pseudomonas aeruginosa*" PLoS One. 2012;7(11):e50323

Abstracts

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

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

Bianca Colonna (Dipart. Biologia Cellulare e dello Sviluppo - Lab. Microbiologia Molecolare - Univ. La Sapienza - Roma), Maurizio Sangiusti (Ist. Microbiologia - Univ. Sacro Cuore - Roma), Mauro Nicoletti (Dipart. Scienze Sanità Pubbl. - Sez. Microbiologia - Univ. La Sapienza - Roma), Mariassunta Casalino (Dipart. Microbiologia - Univ. Roma 3)

Publications

- Di Bonaventura G. et al. "Molecular characterization of virulence determinants of *Stenotrophomonas maltophilia* strains isolated from patients affected by cystic fibrosis" Int. J. Immunopathol. Pharmacol., 2007, Vol. 20, n. 3, pp. 529-537.
- Roscetto E. et al. "PCR-based rapid genotyping of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates", BMC Microbiol, 2008, 8:202 doi:10.1186/1471-2180-8-202
- Rocco F. et al. "Stenotrophomonas maltophilia isolated from patients affected by cystic fibrosis: genotyping analysis and molecular characterisation of virulence determinants" Int. J. Med. Microbiol., 2009, Jun 30 (Ahead of print)
- Rocco F. et al. "Stenotrophomonas maltophilia genomes: a start-up comparison" Int. J. 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* i solati da fibrosi cistica" 34° Congresso nazionale della Società Italiana di Microbiologia, Genova 15-18 ottobre 2006.
- Prosseda G. et al. "Virulence factors of *Stenotrophomonas maltophilia*, an emergent pathogen associated to cystic fibrosis" 9° Convegno Nazionale FISV, Riva del Garda (TN), 26- 29 Sett. 2007
- Casalino M. et al. "Molecular characterization of *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from cystic fibrosis patients" 9° Convegno Nazionale FISV, Riva del Garda (TN), 26- 29 Sett. 2007
- Di Bonaventura G. et al. "Interazione in vitro tra *Stenotrophomonas maltophilia* e cellule epiteliali bronchiali IB3-1: implicazioni in fibrosi cistica" 35° Congresso nazionale della Società Italiana di Microbiologia, Catania 30 settembre - 3 ottobre 2007
- Ficarelli E. et al. "Stenotrophomonas maltophilia isolated from patients affected by cystic fibrosis: genotyping analysis and molecular characterisation of virulence determinants" 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Barcelona, 19-22 April 2008
- Di Bonaventura G. et al. "Adhesion to and biofilm formation on IB3-1 bronchial cells by Stenotrophomonas maltophilia: implications in cystic fibrosis" 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Barcelona, 19-22 April 2008
- Ficarelli E. et al. "Caratterizzazione molecolare di ceppi di *Stenotrophomonas maltophilia* isolati da pazienti con fibrosi cistica" 36° Congresso nazionale della Società Italiana di Microbiologia, Roma 12-15 ottobre 2008.
- Di Bonaventura G. et al. "Caratterizzazione fenotipica e genotipica della formazione di biofilm da parte di *Stenotrophomonas maltophilia* isolati da pazienti con fibrosi cistica" 36° Congresso nazionale della Società Italiana di Microbiologia, Roma 12-15 ottobre 2008.
- Di Bonaventura G. et al. "Patogenesi microbica in fibrosi cistica: clearance di *Stenotrophomonas maltophilia* ed infiammazione in un modello murino di infezione polmonare" 36° Congresso nazionale della Società Italiana di Microbiologia, Roma 12-15 ottobre 2008.
- Michelacci V. et al. "Identification of genes expressed at the host temperature in *S. maltophilia*, an emergent pathogen in CF patients" 7th Louis Pasteur Conference on Infectious Disease, 11-13 Novembre 2008, Paris, France.
- 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° 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
- Liciardello G. et al. "Pseudomonas corrugata contains a conserved N-acyl homoserine lactone quorum sensing system; its role in tomato pathogenicity and tobacco hypersensitivity response" FEMS Microbiol Ecol 61 (2007) 222-234.
- Steindler L. et al. "The presence, type and role of N-acyl homoserine lactone quorum sensing in fluorescent *Pseudomonas* originally isolated from rice rhizospheres are unpredictable" FEMS Microbiol. Lett. 288 (2008) 102-111.
- Steindler L. et al. "LasI/R and RhI/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 Santangelo, Napoli), Maria Lina Bernardini (Dip. Biol. Cell. - Univ. La Sapienza, Roma)

Publications

- Cigana C. et al. "Pseudomonas aeruginosa Exploits Lipid A and Muropeptides Modification as a Strategy to Lower Innate Immunity during Cystic Fibrosis Lung Infection" PLoS ONE, December 2009, Vol. 4, Issue 12, e8439
- FFC Project#10/2007 "**Iron uptake and quorum sensing in Pseudomonas aeruginosa virulence**" Paolo Visca (Dip. Biologia - Lab. Microbiologia Clinica e Virologia - Univ. Roma 3), Livia Leoni (Dip. Biologia - Lab. Microbiologia Molecolare e Biotecnologie dei Microorganismi - Univ. Roma 3)

Publications

- Gaines J. M. et al. "Regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* *toxA*, *regA* and *ptxR* genes by the iron-starvation sigma factor *PvdS* under reduced levels of oxygen" Microbiology (2007) Vol 153: 4219-33
- Tiburzi F. et al. "Intracellular levels and activity of *PvdS*, the major iron starvation sigma factor of *Pseudomonas aeruginosa*" Mol. Microbiol. (2008) Vol. 67: 213-227
- Rampioni G. et al. "RsaL provides quorum sensing homeostasis and functions as a global regulator of gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*" Mol. Microbiol. (2007) Vol. 66: 1557-1565
- Imperi F. et al. "Membrane-association determinants of the -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*" Envir. Microbiol. (2010) Vol. 12(6): 1630-1642
 - Imperi F. et al. "Molecular basis of pyoverdine siderophore recycling in *Pseudomonas aeruginosa*" Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Dec 1;106(48):20440-5
- Abstracts
- Rampioni G. et al. "RsaL is a global regulator controlling quorum sensing homeostasis and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*" ASM Conference Pseudomonas 2007, Seattle, Washington, 26-30 August 2007, pp. 15-16.
 - Rampioni G. et al. "RsaL, a quorum sensing homeostatic effector controlling virulence and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*" 9° Convegno Nazionale FISV, Riva del Garda (TN), 26-29 Sett. 2007
 - Rampioni G. et al. "RsaL is a global regulator controlling quorum sensing homeostasis and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*" ASM Conference Cell-Cell Communication in Bacteria, Austin, Texas, 7-10 October 2007, p. 41
 - Tiburzi F. et al "A new regulator involved in the control of pyoverdine synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: the role of the LysR-type transcriptional regulator CysB" 28th National Meeting Società Italiana di Microbiologia generale e Biotecnologie microbiche, Spoleto, June 11-13, 2009.
- FFC Project#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 Bevvino (ENEA C.R. Casaccia - Biotecn. Agroindustriale e Protezione della Salute), Fiorentina Ascenzi (Dip. Biologia Cellulare e dello Sviluppo - Univ. La Sapienza)
- Publications
- Bevvino 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" 23rd Annual North American Cystic Fibrosis Congress, Minneapolis, Minnesota, 15-17 October 2009.
 - Farulla I et al "Clinical and environmental *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cenocepacia* strains: dual-species interactions in biofilm and in a mouse model of chronic infection" Environmental Microbiology Meeting (BMMA) 2010, 21-22 May, Bertinoro (FC), Italy
 - Paroni M et al "Pseudomonas aeruginosa and Burkholderia cenocepacia polymicrobial interactions in biofilm and in a murine model of chronic infection" Pseudomonas 2010, Pseudomonas in the Test Tube and in the Environment, 28-29 January 2010, Milan, Italy
 - Bevvino 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" Biosens Bioelectron. 2011 Apr 15;26(8):3444-9.
- Abstracts
- Rampioni G. et al. "Role of the RsaL quorum sensing regulator in *Pseudomonas aeruginosa* pathogenic potential" 28th National Meeting Società Italiana di Microbiologia generale e Biotecnologie microbiche, Spoleto, June 11-13, 2009
 - Rampioni G. et al. "Role of the RsaL quorum sensing regulator in *Pseudomonas aeruginosa* pathogenic potential" Pseudomonas XII Conference, August 3-17 2009, Hannover, Germany
 - Rampioni G. et al. "The RsaL quorum sensing regulator controls surface motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*" Eurobiofilms, Rome, 2-5 September 2009
 - Longo F. et al. "Picking up *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing regulators" 28th National Meeting Società Italiana di Microbiologia generale e Biotecnologie microbiche, Spoleto, June 11-13, 2009
 - Massai F. et al. "Development and validation of screening systems for the identification of *Pseudomonas aeruginosa* virulence inhibitors" 28th National Meeting Società Italiana di Microbiologia generale e Biotecnologie microbiche, Spoleto, June 11-13, 2009
- FFC Project#10/2008 **"Essential proteins of *Pseudomonas aeruginosa* other membrane biogenesis as novel targets for new anti-microbial drugs design and synthesis"**
- Alessandra Polissi (Dipartimento Biotecnologie e Bioscienze - Università Bicocca Milano), Gianni Dehò (Dipartimento Scienze Biomolecolari e Biotecnologie - Università di Milano), Cristina De Castro (Dipartimento di Chimica e Biochimica Organica - Università di Napoli "Federico II"), Martino Bolognesi (Dipartimento Scienze Biomolecolari e Biotecnologie - Università di Milano), Laura Cipolla (Dipartimento Biotecnologie e Bioscienze - Università Bicocca Milano), Luca De Gioia (Dipartimento Biotecnologie e Bioscienze - Università Bicocca Milano)
- Publications
- Sommaruga S. et al. "Structure prediction and functional analysis of KdsD, an enzyme involved in lipopolysaccharide biosynthesis" Biochemical and Biophysical Research Communication, 388 (2009) 222-227
 - 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 immu-

nomodulatory 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
- Galici V. et al. "Clinical impact of Methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection in cystic fibrosis patients: a longitudinal multicenter Italian study" NACFC 2013, Salt Lake City, Utah, 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 fibrosis: antimicrobial and anti-biofilm activity of natural and designed α -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 Cutruzzolà (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
- Antoniani D. et al. "The immunosuppressive drug azathioprine inhibits biosynthesis of the bacterial signal molecule cyclic-di-GMP by interfering with intracellular nucleotide pool availability" Appl Microbiol Biotechnol. 2013 Aug;97(16):7325-36

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-March 5 2010, Ventura, CA, USA
- Pini A. et al. "A novel tetrabranched antimicrobial peptide that neutralizes bacterial lipopolysaccharide and prevents septic shock *in vivo*" 12th Naples Workshop on bioactive peptides-2nd Italy-Korea Symposium on antimicrobial peptides. 4-7 June 2010, Naples, Italy
- Pini A. et al. "A novel tetrabranched antimicrobial peptide that neutralizes bacterial lipopolysaccharide and prevents septic shock *in vivo*" 31st European Peptide Symposium, 5-7 September 2010, Copenhagen, DK

- FFC Project#15/2009 **"The role of RND transporters in Burkholderia cenocepacia life by microarray analysis"**

Giovanna Riccardi (Dipart. Genetica e microbiologia - Università degli Studi di Pavia)

Publications

- Perrin E. et al. "Exploring the HME and HAE1 efflux systems in the genus *Burkholderia*" BMC Evolutionary Biol (2010), 10:164
- 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 opportunis-

tic 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, Procaroti 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 Settembre 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 Micro-organisms, Firenze, 13-15 Settembre 2010
- Pasca MR. et al., "Pompe di efflusso e farmacoresistenza 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, 12th 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 Soya (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 FFC#8/2010 **"Decreased apical expression of CFTR by *Pseudomonas aeruginosa* infection: role of NHERF1 phosphorylation"**
Anna Tamаниni (Lab. Patologia Molecolare, Lab. Analisi Cliniche ed Ematologiche, Az. Ospedaliera Universitaria Integrata, Verona), Stephan Reshkin (Dip. Fisiologia Generale ed Ambientale, Università di Bari)

Abstracts

- Rubino R, Bezzzerri V, Favia M et al "Pseudomonas aeruginosa reduces the expression of CFTr in airways via post traslational modification of NHERF1", New frontiers in basic science of cystic fibrosis, Malta ECFS Conference, 26-29 March 2014

- 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.
- Montuschi P. et al. "Letter to Editor- Nuclear Magnetic Resonance-based Metabolomics Discriminates Primary Ciliary Dyskinesia from Cystic Fibrosis" *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* Vol 190 No 2

- FFC Project#10/2010 **"Exploring thermostable quorum quenching lactonases to counteract bacterial infections in cystic fibrosis"** Giuseppe Manco (Istituto di Biochimica delle Proteine CNR, Napoli); Davide Andrenacci (Istituto di Genetica e Biofisica CNR, Napoli)

Publications

- Porzio E. et al. "Mn²⁺ 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" 12th 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

- Minandri F. et al., "Promises and failures of gallium as an antibacterial agent" Future Microbiology, 2014, 9(3), 379-397
- Bonchi Carlo "Repurposing of gallium-based drugs for antibacterial therapy" Biofactors 2014 May-Jun;40(3):303-12. doi: 10.1002/biof.1159. Epub 2014 Feb 14.
- Frangipani Emanuela Pyochelin Potentiates the Inhibitory Activity of Gallium on *Pseudomonas aeruginosa* Antimicrob Agents Chemother 2014 Sep;58(9):5572-5. doi: 10.1128/AAC.03154-14. Epub 2014 Jun 23.

Abstracts

- Buroni S. et al., "The role of RND efflux transporters in Burkholderia cenocepacia life" International Burkholderia cepacia working group - 15th annual meeting. Praga, 13-16 Aprile 2011
- Longo F. et al., "Picking up novel *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing regulators" FEMS 2011- 4th 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- 4th 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- 4th Congress of European Microbiologists. Geneva, 26-30 giugno 2011
- Bazzini S. et al. "New insight into Burkholderia cenocepacia RND efflux systems" SIMGBM 2011- 29th Congress of Italian Microbiologists. Pisa, 21-23 settembre 2011
- Longo F. et al. "Picking up novel *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing regulators" SIMGBM 2011- 29th 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- 29th 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" 35th European Cystic Fibrosis Conference- 6-9 June 2012, Dublin

• FFC Project #11/2011 "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"

Clementina Elvezia Cocuzza (Dip. Medicina Clinica e Prevenzione, Università di Milano-Bicocca), Lisa Cariani (Fond. IRCCS Ca' Granda, Osp. Maggiore Policlin., Dip. Pediatria, Milano), Daria Giacomini (Dip. Chimica, Università di Bologna)

Publications

- Cervellati R. et al. "Monocyclic β -lactams as antibacterial agents: facing antioxidant activity of N-methylthio-azetidinones" Eur J Med Chem. 2013 Feb;60:340-9. doi: 10.1016/j.ejmech.2012.12.024. Epub 2012 Dec 20.
- Galletti P. et al. "Antibacterial agents and cystic fibrosis: synthesis and antimicrobial evaluation of a series of N-thiomethylazetidinones" ChemMedChem. 2011 Oct 4;6(10):1919-27. doi: 10.1002/cmdc.201100282. Epub 2011 Aug 10.
- Braschi I, Blasioli S, Fellet C, Lorenzini R, Garelli M, Giacomini D. "Persistence and degradation of new beta-lactam antibiotics in the soil and water environment" Chemosphere 2013; 93: 152-159
- Cervellati R, Galletti P, Greco E, Cocuzza C.E. et al. "Monocyclic betalactams as antibacterial agents: facing antioxidant activity of N-methyl-azetidinones" European Journal of Medicinal Chemistry 2013; 60: 340-349

Abstracts

- Soldati R, Galletti P, Pori M , Giacomini D. "Synthesis of new bioactive betalactam derivates (from dual activity compounds to integrin inhibitors through differentiating agents)" XXV Congresso Società Chimica Italiana

• 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, Università 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
- Papaleo MC. et al. "Bioactive volatile organic compounds from Antarctic (sponges) bacteria" N Biotechnol. 2013 Apr 22 doi:pii: S1871-6784(13)00044-7. 10.1016/j.nbt.2013.03.011. [Epub ahead of print]
- Romoli R. et al. "GC-MS volatolomic approach to study the antimicrobial activity of the antarctic bacterium *Pseudomonas* sp. TB41" Metabolomics, June 2013
- Fondi M et al. "Draft genomes of three Antarctic Psychrobacter strains producing antimicrobial compounds against Burkholderia cepacia complex, opportunistic human pathogens" Mar Genomics. 2014 Feb;13:37-8. doi: 10.1016/j.margen.2013.12.009. Epub 2014 Jan 5.

Abstracts

- Papaleo MC. et al. "Volatile organic compounds (VOCs) from antarctic communities bacteria inhibiting cystic fibrosis pathogens" 12th 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
- Imperi F. et al. "Repurposing the antimycotic drug flucytosine for suppression of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity" Proc Natl Acad Sci USA, 2013 Apr 8
- Imperi F. et al. "Pseudomonas aeruginosa pyoverdine" SciBX 6(15), April 8, 2013
- Frangipani E, Visaggio D, Heeb S et al. "The Gac/Rsm and cyclic -di-GMP signalling networks coordinately regulate iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa*" Environmental Microbiology doi:10.1111/1462-9220
- Malvezzi Campeggi F. "Latest advances in drug repurposing for Cystic Fibrosis lung infections" Journal of Postdoctoral Research Vol 2:2
- Rampioni G, Leoni L, Williams P. "The art of antibacterial warfare: Deception through interference with quorum sensing-mediated communication" Bioorg Chem. 2014 Aug;55:60-8. doi: 10.1016/j.bioorg.2014.04.005. Epub 2014 Apr 21.

• FFC Project#14/2011 "Development of new host defence like peptides and lipopeptides against lung pathogens: in vitro and in vivo studies"

Maria Luisa Mangoni (Dip. Scienze Biochimiche, Univ. "La Sapienza", Roma), Shai Yechiel (Dep. of Biological Chemistry, The Weizmann Institute of Science, Israel)

Publications

- Luca V. et al. "Esculetin(1-21), an amphibian skin membrane-active peptide with potent activity on both planktonic and biofilm cells of the bacterial pathogen *Pseudomonas aeruginosa*" Cell Mol Life Sci. 2013 Aug;70(15):2773-86. doi: 10.1007/s00018-013-1291-7. Epub 2013 Mar 16.
- Tia Sergev-Zarko et al. "A comparative study on the mechanism of biofilm inhibition and degradation by antimicrobial peptides" manuscript in preparation

Abstracts

- Luca V, Cappiello F, Casciaro B., Mangoni ML. "Antipseudomonal

activity of the amphibian antimicrobial peptide Esculetin (1.21) and plausible mode of action" 2014 FISV-XIII Congress (Pisa, 24-27 September)

- FFC Project#16/2011 **"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"** Serena Quattrucci (Dip. Pediatria e Neuropsichiatria Inf., Univ. "La Sapienza", Polcl. Umberto I, Centro fibrosi cistica, Roma), Maria Trancassini (Dip. Salute Pubblica e Malattie Infettive, Università "La Sapienza" Roma), Serena Schippa (Dip. Salute pubblica e Malattie Infettive, Univ. La Sapienza, Roma), Mauro Nicoletti (Dip. Scienze Biomediche, Università "G. D'Annunzio", Chieti)

Publications

- Lebba V. et al. "Bdellovibrio bacteriovorus directly attacks *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* Cystic fibrosis isolates" *Front Microbiol.* 2014 Jun 5:5:280. doi: 10.3389/fmicb.2014.00280. eCollection 2014.

- 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

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

Annamaria Bevilino (Unità per lo Sviluppo Sostenibile e Innovazione Sistema Agro-Industriale, ENEA, Roma), Alessio Mengoni (Dip. Biologia dell'Evoluzione, Università di Firenze), Giovanni Taccetti (Centro FC, Ospedale "A. Meyer", Firenze), Ersilia Fiscarelli (Laboratorio Microbiologia, Ospedale "Bambin Gesù", Roma), Graziana Manno (Dip. di Scienze Pediatriche, Università di Genova)

Publications

- Bevilino A, Bragonzi A. "The evolving polymicrobial composition in the airways of patients with cystic fibrosis: implications for disease progression and clinical management" www.currentmedicalliterature.com 2013 CML-Cystic fibrosis

Abstracts

- Bevilino A. et al. "Investigation of cystic fibrosis airway microbiome in patients showing a severe decline in lung function and not responding to conventional antimicrobial therapy" 36th European Cystic Fibrosis Conference (ECFC), Lisboa, 12-15 June, 2013
- Bevilino A. et al. "Microbiota composition in the airways of cystic fibrosis with severe decline in lung infection" NACFC 2013, Salt Lake City, Utah, USA
- Fiscarelli E, Paganin P, Tuccio V, Chiancianesi M, Taccetti G, Lucidi V, De Alessandri A, Mengoni A, Bevilino A. "Airway microbiota in cystic fibrosis patients with a severe decline in lung function" 24th ECCMID 10-13 May, Barcelon, Spain

- FFC Project#10/2012 **"A very promising drug against *Burkholderia cenocepacia*"** Giovanna Riccardi (Dipartimento di Biologia e Biotecnologie, Università di Pavia)

Publications

- Udine C. et al. "Phenotypic and genotypic characterisation of *Burkholderia cenocepacia* J2315 mutants affected in homoserine lactone and diffusible signal factor-based quorum sensing systems suggests interplay between both types of systems" *PLoS One.* 2013;8(1):e55112
- Perrin E. et al. "A census of RND-superfamily proteins in the *Burkholderia* genus" *Future Microbiol.* 2013 Jul;8:923-37

- FFC Project#12/2012 **"Naturally occurring antimicrobials to counteract lung infections in cystic fibrosis patients: Cecropin A-Melittin (CA-M) hybrid peptides and polymixins"**

Alba Silipo (Dip. Scienze Chimiche, Università "Federico II", Napoli), Giovanni Di Bonaventura (Dip. Scienze Biomediche, Università Chieti-Pescara)

Publications

- Di Lorenzo F. et al. "Persistent cystic fibrosis isolate *Pseudomonas aeruginosa* strain RP73 exhibits an under-acylated LPS structure responsible of its low inflammatory activity" *Mol Immunol.* 2014 May 21. pii: S0026-5890(14)00084-4. doi: 10.1016/j.molimm.2014.04.004. [Epub ahead of print]

- Kukavica-Ibrulj I. et al. "Assessing *Pseudomonas aeruginosa* Virulence and the Host Response Using Murine Models of Acute and Chronic Lung Infection" *Methods Mol Biol.* 2014;1149:757-71. doi: 10.1007/978-1-4614-0473-0_58.

Abstracts

- Vitiello G. et al. "Investigation of liposome-based membranes formed by lipopolysaccharides and their interaction with hybrid antimicrobial peptides" Poster Communication. XXIV Congresso della Società Italiana di Spettroscopia Neutronica (SISN), Milano 11-12 Settembre 2013.
- Silipo A. "STD NMR as a tool for studying protein-ligand interactions", PhD Lecture in Gliwice, Department of Organic Chemistry, Bioorganic Chemistry and Biotechnology, Faculty of Chemistry, Silesian University of Technology, Gliwice, Poland http://www.chemia-bioorganiczna.polsl.pl/default.htm
- Molinaro A. "Structural Glycoscience", 4-6 Nov 2013, Grenoble, France, COST Training School nell'ambito della COST Action BM1003. http://www.cost-bm1003.info/

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

Andrea Battistoni (Dip. Biologia, Università Tor Vergata, Roma)

Publications

- D'Orazio M, Cerasi M, Mastropasqua MC et all "Pseudomonas aeruginosa capability to colonize the CF lung may be favored by its remarkable ability to recruit zinc under conditions of limited metal availability" *Journal of Cystic Fibrosis Suppl Goteborg* 13,S3

Abstracts

- D'Orazio M, Cerasi M, Mastropasqua MC et al. "Pseudomonas aeruginosa capability to colonize the CF lung may be favored by its remarkable ability to recruit zinc under conditions of limited metal availability" Poster presented at the ECFS 2014 Meeting, Goteborg

- FFC Project # 8/2013 **"Exploring pyrazinamide derivatives as novel *Pseudomonas aeruginosa* inhibitors: unexploited antibacterial molecules for a new antibiotics target"**

Federica Briani (Dip. di Bioscienze, Università degli Studi di Milano)

Publications

- Delvillani F, Sciadroni B, Peano C et all "Tet-Trap a genetic approach to the identification of bacterial RNA thermometers: applications to *Pseudomonas aeruginosa*" *RNA* 2014 Oct 21

Abstracts

- Bergamini G, Stellari F, Sandri A et all " Azitromycin effect on lung inflammation induced by *Pseudomonas aeruginosa* released proteases as shown by *in vivo* imaging in IL-8 transiently transgenized mice", 28th Annual North American Cystic Fibrosis Conference , Atlanta, October 9-11, 2014

- FFC Project#10/2013 **"Anti-virulence therapy against *Pseudomonas aeruginosa*: identification of antibiotic drugs and development of inhalable Niclosamide and Flucytosine formulations"**

Livia Leoni (Dip. di Scienze, Università "Roma Tre"), Francesca Ungaro (Dip. di Farmacia, Università di Napoli Federico II), Francesco Imperi (Dip. di Biologia e Biotecnologia, Università "La Sapienza", Roma), Ersilia Fiscarelli (Ospedale e Ist. di ricerca "Bambin Gesù", Lab. Microbiologico fibrosi cistica, Rome)

Publications

- D'Angelo I, Conte C, La Rotonda MI, Miro A, Quaglia F, Ungaro F. "Improving the efficacy of inhaled drugs in cystic fibrosis:Challenges and emerging drug delivery strategies" *Adv Drug Deliv Rev* 2014; 30: 92-111
- Imperi f, Leoni L, Visca P. "Antivirulence activity of azithromycin in *Pseudomonas aeruginosa*" *Frontiers in Microbiology* 2014;5: 178
- Llamas MA, Imperi F, Visca P, Llamont IL. "Cell-surface signaling in *Pseudomonas*: stress response, iron transport and pathogenicity" *FEMS Microbiol Rev* 2014; 38:569-97

- FFC Project#11/2013 **"Inhalable dry powders for chemically-modified human Cationic AntiMicrobial Peptides (CAMPs): moving toward *in vivo* application"** Eugenio Notomista (Dip. Biologia, Università di Napoli "Federico II"), Francesca Ungaro (Dip. di Farmacia, Università di Napoli Federico II)

Publications

- D'Angelo I, Casciaro B, Mangoni ML et al. "Improving the efficacy of inhaled drugs in cystic fibrosis: Challenges and emerging drug delivery strategies" *Adv Drug Deliv Rev* 2014 Aug 30;75C:92-111

Abstracts

- D'Angelo I, Casciaro B, Mangoni ML et al. "Nano-Embedded Microparticles for Lung Delivery of Antimicrobial Peptides against *P.*

"Aeruginosa Infections: Overcoming Lung Barriers." In: 2nd International Conference on Nanotechnology in Medicine, University College London, Royal Free Hospital Campus, United Kingdom 26-28 February 2014. Selected as oral presentation

- FFC Project#12/2013 "Preclinical development of the antimicrobial peptide M33 and onset of regulatory procedures for clinical trials"

Alessandro Pini (Dip. di Biotecnologie Mediche, Università di Siena)

Publications

- Brunetti J, Lelli B, Scali S, Falciani C, Bracci L, Pini A. "A Novel

Phage-Library-Selected Peptide Inhibits Human TNF- α Binding to Its Receptors" *Molecules* 2014; 19:7255-7268

- FalcianiC, Lozzi I, Scali L, Brunetti J, Bracci L, Pini A. "Site-specific pegylation of an antimicrobial peptide increases resistance to *Pseudomonas aeruginosa* elastase" *AminoAcids* 2014; 45(5):1403-1407

Abstracts

- Brunetti J, Falciani C, Lozzi I, Roscia G, Quercini L, Ibb E, Bracci L, Pini A. "A novel synthetic antimicrobial peptide. A new weapon for multidrug resistant bacteria?" 14th Naples Workshop on Bioactive Peptides, June 12-14, 2014

4. INFLAMMATION

Infiammazione

- FFC Project# 3/2002, FFC#10/2005 e FFC#17/2006 "Roles of azithromycin other than bactericidal: relevance for therapy of cystic fibrosis"

Paola Melotti (Lab. Patologia Molecolare - Centro FC - Ospedale Civile Maggiore - Verona)

Publications

- Cigana C. et al. "Azithromycin selectively reduces tumour necrosis factor alpha levels in Cystic Fibrosis airway epithelial cells" *Antimicrobial agents and chemotherapy*, Mar. 2007, vol. 51, No. 3, p. 975-981
- Cigana C. et al. "Anti-inflammatory effects of azithromycin in cystic fibrosis airway epithelial cells" Elsevier, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 350 (2006) 977-982
- Nicolis E. et al. "The GCC repeat length in the 5'UTR of MRP1 gene is polymorphic: a functional characterization of its relevance for cystic fibrosis" *BMC Med Genet.* 2006 Feb 7;7:7.
- Cigana C. et al. "Effects of Azithromycin on the Expression of ATP Binding Cassette Transporters in Epithelial Cells from the Airways of Cystic Fibrosis Patients" *J. of Chemotherapy* (2007) 19; 643:649
- Bergamini G. et al. "Effects of Azithromycin (AZM) on Glutathione-S-Transferases (GST)s in cystic fibrosis airways cells" *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2009 Aug;41(2):199-206

Abstracts

- Cigana C. et al. "Azythromycin reduces tumour necrosis factor alpha expression in CF airway epithelial cells" The 20th Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Denver, Colorado, Nov. 2-5, 2006
- Bergamini G. et al. "Azithromycin (AZM) decreases Glutathione-S-Transferase (GST)-T1 expression and activity in CF airway epithelial cells" 30th European Cystic Fibrosis Conference, Belek, Turkey, 13-16 June 2007
- Cigana C. et al. "Possible mechanisms of action of azithromycin in cystic fibrosis" 15th ERS Annual Congress. Copenhagen, Denmark - September 17-21 2005.
- Cigana C. et al. "Anti-inflammatory effects of azithromycin in cystic fibrosis airway epithelial cells" 16th European Congress of Immunology. Paris, 6-9 September 2006.
- Cigana C. et al. "Reduction of tumour necrosis factor alpha (TNF α) expression by azithromycin (AZM) in CF airway epithelial cells" *Journal of Cystic Fibrosis*, 29th European Cystic Fibrosis Conference. Copenhagen, 15-18 June 2006.
- Nicolis E. et al. "Analisi della ripetizione GCC nel promotore del gene Multidrug Resistance-Associated Protein 1 (MRP1) in pazienti con Fibrosi Cistica (FC)" 6^o Congresso Nazionale S.I.G.U. Società Italiana di Genetica Umana - Verona 24 - 27 settembre 2003;
- Cigana C. et al. "Differential expression of the multidrug resistance-associated protein 1 in isogenic CF and non-CF human bronchial epithelial cells" *Journal of Cystic Fibrosis* 3 (2004) S4-S9 27th European CF Conference. Birmingham, UK 12 - 17 June 2004
- Pasetto M. et al. "Inhibitory effects of azithromycin on interleukin 8 expression by CF airway epithelial cells" *Journal of Cystic Fibrosis* 3 (2004) S20-S25 27th European CF Conference. Birmingham, UK 12 - 17 June 2004
- Pasetto M. et al. "Inhibitory effects of azithromycin on interleukin 8 production by Cystic Fibrosis airway epithelial cells" *Paediatric Pulmonology* - The 18th annual North American CF Conference - America's Center, St. Louis, Missouri, October 14-17, 2004;
- Cigana C. et al. "ATP binding cassette proteins: differential expression in isogenic cystic fibrosis and non-cystic fibrosis human bronchial epithelial cell lines" 7^o Congresso Nazionale S.I.G.U. - Pisa 13 - 15 Ottobre 2004;
- Nicolis E. et al. "Is the GCC repeat polymorphic length in the Multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1) gene relevant for

regulating transcriptional activity constitutively and in response to azithromycin (AZM)?" 28th European CF Conference - Crete. Greece: 22-25 June 2005;

- Cigana C. et al. "Azithromycin (AZM) inhibits Nuclear Factor-kB (NF-kB) activity and expression of interleukin 8 (IL8) in CF airway epithelial cells" *Journal of Cystic Fibrosis* 4 (2005) S26-S33; 28th European CF Conference - Crete. Greece: 22-25 June 2005;
- Cigana C. et al. "Effects of macrolides on interleukin 8 expression in cystic fibrosis airway epithelial cells" 4th National Conference SIICA; Brescia - June 8-11 2005;
- Cigana C. et al. "Regulation of pro-inflammatory transcription factors by azithromycin in Cystic Fibrosis airway epithelial cells" 2005 North American Cystic Fibrosis Conference - Baltimore, Maryland October 20-23 2005;
- Nicolis E. et al. "Meccanismi non antibiotici dell'Azitromicina: rilevanza per la terapia della fibrosi cistica" X Congresso Nazionale di Fibrosi Cistica - Palermo, 27-30 ottobre 2004
- Cigana C. et al. "Possible mechanisms of action of Azithromycin in cystic fibrosis" ERSNET, 2005
- Melotti P. "Detection of bacterial secretion variations among *Pseudomonas aeruginosa* strains by multidimensional protein identification technology" Rediscovering Biomarkers, San Diego, July 23-24 2007
- Bergamini G. et al. "Azithromycin (AZM) decreases Glutathione-S-Transferase (GST)-T1 and M1 (GSTM1) expression and activity in CF airway epithelial cells" North American Cystic Fibrosis Conference, Anaheim, California, 3-6 Oct. 2007
- Cigana C. et al. "Relevance of oxygen limitation on *Pseudomonas aeruginosa* strains: effects on released proteins expression" North American Cystic Fibrosis Conference, Anaheim, California, 3-6 Oct. 2007
- Cigana C. et al. "Mudpit analysis of *Pseudomonas aeruginosa* secretome: consequences of oxygen limitation in clinical and laboratory strains" 13th Italian Cystic Fibrosis Conference, Milan, 30 Nov. - 2 Dec. 2007, *J. Cyst Fibrosis* 2008; 7, suppl. 3: S16
- Cigana C. et al. "Proteins released from *Pseudomonas aeruginosa* (PA) referent and clinical strains under microaerobiosis and their effects on cystic fibrosis airways" 31st European CF Conference, Prague, June 11-14, 2008
- Melotti P. et al. "Effects of Azithromycin on regulation of metallo-proteases released by *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) clinical strains" NACFC 2012, Orlando, Florida, USA
- Melotti P. et al. "Molecular imaging of the anti-inflammatory effects of azithromycin in the lung" NACFC 2013, Salt Lake City, Utah, 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 17th 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. 18th 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 Dechechci (Lab. Patologia Molecolare - Centro FC - Ospedale Civile Maggiore - Verona)

Publications

- Dechechci M. C. et al. "MPB-07 reduces the inflammatory response to *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic fibrosis bronchial cells" Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. May 2007, Vol. 36 PP. 615-624

Abstracts

- Dechechci M. C. et al. "Uso di correttori del difetto di maturazione di CFTR come strategia per controllare la risposta infiammatoria all'infezione da *P. aeruginosa* in cellule epiteliali respiratorie" XII Congresso Italiano della Fibrosi Cistica, Montepaone (CZ), 29-31 maggio 2006
- Dechechci M.C. et al. "Defective CFTR enhances PAO1-stimulated inflammatory response in epithelial cells" 2005 ECFS Conference - New frontiers in Basic Science of Cystic Fibrosis - 14 - 17 April, Portugal;
- Dechechci M.C. et al. "Increased *Pseudomonas aeruginosa* induced inflammatory response in epithelial cells expressing mutated CFTR" Journal of Cystic Fibrosis 4 (2005) S17-S25; 28th European CF Conference, Heronissos, Crete, Greece; 22-25 June 2005
- Dechechci M.C. et al. "The inflammatory response of CF airway cells to *Pseudomonas aeruginosa* is reduced by 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

- Bezzzeri V. et al. "Transcription factor oligodeoxynucleotides to NF-kB Inhibit Transcription of IL-8 in Bronchial Cells" Am J Respir Cell Mol Biol. 2008 Jul;39(1):86-96
- Borgatti M. et al. "Induction of IL-6 gene expression in a CF bronchial epithelial cell line by *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on transcription factors belonging to the Sp1 superfamily" BBRC 357 (2007) pp. 977-983.
- Piccagli L. et al. "Doking of molecules identified in bioactive medicinal plants extract into the p50 NF-kappaB transcription factor: correlation with inhibition of NF-kappaB/DNA interactions and inhibitory effects on IL-8 gene expression" BMC Structural Biology, 2008 Sep 3;8:38

Abstracts

- Bezzzeri 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 γ -glutamyltransferase?" Journal of Cystic Fibrosis, 7 (2008) pp. 174-178.

- FFC Project# 15/2006 "**Contribution of alterations in metal and glutathione homeostasis to the bacterial infections typical of Cystic Fibrosis and examination of the possible protective role of lactoferrin and antioxidants**"

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

Publications

- Berluti F. et al. "Bovine lactoferrin inhibits the efficiency of invasion of respiratory A549 cells of different iron-regulated morphological forms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*" Int J Immunopathol Pharmacol., 2008 Jan-Mar;21(1):51-9

- FFC Project# 16/2006 "**Effect of correctors of defective CFTR on the *Pseudomonas aeruginosa*-dependent inflammatory response in respiratory epithelial cells**"

Maria Cristina Dechechci (Lab. Patologia Molecolare - Centro FC - Ospedale Civile Maggiore - Verona), Frederic Becq (Inst. De Physiologie Biologie Cellulaire - Poitiers (France), Roberto Gambari (Dipart. di Biochimica e Biologia Molecolare - Università di Ferrara)

Publications

- Dechechci M. C. et al. "Anti-inflammatory effect of miglustat in bronchial epithelial cells" Journal of Cystic Fibrosis, 7 (2008) pp. 555-565.

Abstracts

- Dechechci M. C. et al. "Miglustat and DGJ reduce the inflammatory response to *Pseudomonas aeruginosa*, TNF-alpha and IL-1beta in bronchial epithelial cells" NACFC, 2007, Anaheim, California
- Dechechci M. C. et al. "Correctors of F508del CFTR reduce the inflammatory response to *Pseudomonas aeruginosa* in CF respiratory epithelial cells" ECFS Conference 2007, Tavira, Algarve (Portugal), April 25-29
- Dechechci M. C. et al. "Miglustat, an inhibitor of the synthesis of glycosphingolipids, has an anti-inflammatory signal *in vitro* and *in vivo*" Pediatric pulmonology, Suppl. 31, 2008. 22nd Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Orlando, Florida, 22-25 October 2008, pp. 257-258.
- Dechechci M. C. et al. "Uso di correttori del difetto di maturazione di CFTR come strategia per controllare la risposta infiammatoria all'infezione da *P. aeruginosa* in cellule epiteliali respiratorie" XII Congresso Italiano della Fibrosi Cistica, 2006, Firenze, November 23-25.
- Dechechci M. C. et al. "Anti-inflammatory effect of miglustat in bronchial cells" 13th Italian Cystic Fibrosis Conference, Milan, 30 Nov. - 2 Dec. 2007, J. Cyst Fibrosis 2008; 7, suppl. 3: p. S18
- Nicolis E. et al. "Inhibition of pro-inflammatory genes in CF bronchial epithelial cells by medicinal plant extracts" 13th Italian Cystic Fibrosis Conference, Milan, 30 Nov. - 2 Dec. 2007, J. Cyst Fibrosis 2008; 7, suppl. 3: p. S18
- Dechechci M. C. et al. "Anti-inflammatory effect *in vitro* and *in vivo* of miglustat, an inhibitor of the synthesis of glycosphingolipids" XIV Congresso italiano della fibrosi cistica - IV Congresso nazionale Sifc, Torino, 27-29 novembre 2008

- FFC Project# 5/2007 "**Novel particulate systems for the delivery of an oligonucleotide decoy to Nuclear Factor-kB: a potential strategy for treating cystic fibrosis"**"

Fabiana Quaglia (Dipart. Chimica Tossicologica E Farmaceutica - Univ. Federico II Napoli), Rosa Carnuccio (Dip.to di Farmacologia Sperimentale, Università di Napoli Federico II)

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- κ 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" 49th Simposio AFI, Rimini 10-12 giugno 2009
- Giovino C. "Veicolazione polmonare di un oligonucleotide decoy contro NF- κ B per il trattamento della fibrosi cistica: progettazione e sviluppo di Large Porous Particles a base di PLGA" 8th Scuola avanzata per Dottorandi di ricerca del settore farmaceutico tecnologico applicativo, Recent 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 antiestenosis agents" AAPA Italian University Network, Fisciano, March 6-7, 2009
- De Stefano D. Et al. "ODN decoy to NF- κ B released from respirable

PLGA large porous particles: a potential for treating cystic fibrosis?" 34° National Congress of the Italian Pharmacology Society, Rimini, October 14-17, 2009

- 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" 4th 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

- Bezzetti V. et al. "Transcription Factor Oligodeoxynucleotides to NF-kB Inhibit Transcription of IL-8 in Bronchial Cells" Am J Respir Cell Mol Biol. 2008 Jul;39(1):86-96
- Nicolis E. et al. "Pyrogallol, an active compound from the medicinal plant Emblica officinalis, regulates expression of pro-inflammatory genes in bronchial epithelial cells" Int Immunopharmacol. 2008 Dec 10;8(12):1672-80
- Piccagli L. et al. "Doking of molecules identified in bioactive medicinal plants extract into the p50 NF-kappaB transcription factor: correlation with inhibition of NF-kappaB/DNA interactions and inhibitory effects on IL-8 gene expression" BMC Structural Biology, 2008 Sep 3;8:38
- Gambari R. et al. "Decoy oligodeoxyribonucleotides and peptide nucleic acids-DNA chimeras targeting nuclear facto 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

- Bezzetti V. Et al. "Transcription factor (TF) decoy strategy to silence expression of pro-inflammatory genes in cystic fibrosis (CF) bronchial epithelial cell line" 2nd European CF Young Investigator Meeting, 2008, Lille, France
- Cabrini G. et al. "Decoy" molecules for nuclear transcription factors and regulation of expression of proinflammatory genes" 13th Italian Cystic Fibrosis Conference, Milan, 30 Nov. - 2 Dec. 2007, J. Cyst Fibrosis 2008; 7, suppl. 3: pp. S18.
- Nicolis E. et al. "Isolation of active anti-inflammatory compounds from medicinal plant extracts" Pediatric pulmonology, Suppl. 31, 2008. 22nd Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Orlando, Florida, 22-25 October 2008, p. 259.
- Tamanini A. et al. "Effect of furocoumarin derivatives on *P. aeruginosa*-dependent pro-inflammatory response in bronchial epithelial cells" Pediatric pulmonology, Suppl. 31, 2008. 22nd Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Orlando, Florida, 22-25 October 2008, pp. 260-261.
- Nicolis E. et al. "Does anti-inflammatory treatment have any effect on PAO1 dependent induction of the antimicrobial genes?" Pediatric pulmonology, Suppl. 31, 2008. 22nd Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Orlando, Florida, 22-25 October 2008, pp. 261-262.
- Piccagli L. et al. "Anti-inflammatory molecules obtained from virtual screening of a furocoumarin database against NF-kB" 23rd Annual North American Cystic Fibrosis Congress, Minneapolis, Minnesota, 15-17 October 2009.
- Nicolis E. et al. "Nigella arvensis extract inhibits the induction of IL-8

gene in bronchial epithelial cells" 23rd Annual North American Cystic Fibrosis Congress, Minneapolis, Minnesota, 15-17 October 2009.

- Tamanini A. et al. "Combined effects of furocoumarin compounds as anti-inflammatory and CFTR potentiation in CALU-3 epithelial cells" 23rd Annual North American Cystic Fibrosis Congress, Minneapolis, Minnesota, 15-17 October 2009.

- FFC Project #14/2007 "Influence of CFTR mutations in bactericidal activity of human macrophages"

Paola Del Porto (Dipart. di Biologia Cellulare e dello Sviluppo - Università "La Sapienza", Roma), Fiorentina Ascenzioni (Dipart. di Biologia Cellulare e dello Sviluppo - Università "La Sapienza", Roma), Serena Quattucci (Centro Regionale FC - Policlinico "Umberto I", Roma)

Abstracts

- Soccia V. et al. "Influence of CFTR mutations on bactericidal activity of human macrophages" 32nd European Cystic Fibrosis Conference, Brest, France 10 - 13 June 2009 (awarded as best poster in "Inflammation")
- Soccia 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

- Mattosio 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^E and 2DE: a comparative study" Mol BioSystems 12 Nov 2010 doi:10.1039/C0MB00135J
- 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)
- Ciavardelli D. et al. "Proteomic and ionomic profiling reveals significant alterations of protein expression and calcium homeostasis in cystic fibrosis cells" Mol Biosyst. 2013 Jun 7;9(6):1117-26.

Abstracts

- Berluti F. et al "Lactoferrin modulates gene expression of cystic fibrosis bronchial cells invaded by iron and zinc modulated biofilm of *Burkholderia cenocepacia* clinical isolates" IXth International Lactoferrin Conference, Beijing, China, October 18-22, 2009.
- Ammendolia MG. et al "Bovine lactoferrin interacts with cable pili of *Burkholderia cenocepacia*" IXth 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

- Dehecchi M.C. et al. "Anti-inflammatory effect of miglustat: sphingolipid metabolism as a therapeutic target for CF lung inflammation" 23rd Annual North American Cystic Fibrosis Congress, Minneapolis, Minnesota, 15-17 October 2009
- Dehecchi M.C. et al. "Lack of efficacy of dexamethasone in reducing the inflammatory response to *P. aeruginosa* in a cell line derived from bronchial epithelium of a CF patient" 23rd Annual North American Cystic Fibrosis Congress, Minneapolis, Minnesota, 15-17 October 2009
- Dehecchi 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
- Dehecchi M.C. et al. "Down modulation of neutrophil chemotactic signalling by targeting the metabolism of sphingolipids" *Pediatr. Pulmonol.* 2010 44th Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Baltimore, MD, U.S.A., 2010
- Dehecchi MC et al "Modulation of sphingolipids metabolism reduces the neutrophil chemotaxis in human and murine respiratory models in vitro and in vivo" 1^o Conferenza Aziendale sulla Ricerca: La patologia Polmonare - Verona, 25 maggio 2010

- FFC Project#13/2008 **"Pre-clinical evaluation of new vitamin E-based anti-inflammatory agents in CF"**

Francesco Galli (Dipart. Med. Interna - Sez. Bioch. Appl. E Scienze Nutrizionali - Univ. Perugia), Luigi Iuliano (Dipart. Med. Interna e va-scolare - 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 Garlenda (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" Innocoem
- 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 22nd 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" 31st European Cystic Fibrosis Conference, 11-14 June 2008, Prague, Czech Republic, *J Cystic Fibrosis*, vol. 7 (2), June 2008.
- Cigana C et al. "MudPIT analysis of *Pseudomonas aeruginosa* secretome: consequences of oxygen limitation in clinical and laboratory strains" 31st European Cystic Fibrosis Conference, 11-14 June 2008, Prague, Czech Republic, *J Cystic Fibrosis*, vol. 7 (3), June 2008 pp. S16
- Bergamini G. et al. "Proteomic analysis of proteins released from *Pseudomonas aeruginosa* clinical and laboratory strains: effect of azithromycin" 23rd Annual North American Cystic Fibrosis Congress, Minneapolis, Minnesota, 15-17 October 2009
- Bergamini et al. "Proteomic analysis of proteins released from *Pseudomonas aeruginosa* clinical and laboratory strains: effects of azithromycin" New Frontiers in Basic Science of Cystic Fibrosis. Tavira (Portugal), April 15-19 (2009) *Journal of Cystic Fibrosis*, (2009) Vol 9, Supplement 1, p. S40
- Bergamini G et al. "Proteomic analysis of proteins released from *Pseudomonas aeruginosa* clinical and laboratory strains: effects of azithromycin." *Pediatric Pulmonology*, (2009) Vol 44, Supplement 32, p 242.
- Melotti P. et al. "Effects of Azithromycin on regulation of metallo-proteases 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 adapta-**

tion 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 Dechechchi (Lab. di Patologia Molecolare, Lab. Analisi Chimico-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: 10.1161/rccm.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
- Cifani N. et al. "Reactive-oxygen-species-mediated P. aeruginosa killing is functional in human cystic fibrosis macrophages" PLoS One. 2013 Aug 19;8(8):e71717. doi: 10.1371/journal.pone.0071717

Abstracts

- Cifani N. et al., Bactericidal activity of human CF macrophages against *Pseudomonas aeruginosa*. 34th 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 γ -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 polymorphonucleate granulocytes to elevated Gamma-glutamyltransferase in cystic fibrosis sputum" PLoS One. 2012;7(4):e34772. Epub 2012 Apr 4.
- Corti A. et al. " γ -Glutamyltransferase catabolism of S-nitrosoglutathione modulates IL-8 expression in cystic fibrosis bronchial epithelial cells" Free Radic Biol Med. 2013 Jun 29;65C:360-370.
- Corti A. et al. "Cystic fibrosis elevated gamma-glutamyltransferase, and lung transplant outcome" Transplant International 2012; 25:e123-e124

• 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
- Louet 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
- Bezzerrini V. et al. "Phospholipase C- β 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 Ca²⁺ 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 PKC restores the effectiveness of chemotherapeutic agents in chemoresistant cells" Cell Cycle 11(5):1040-48
- Anelli T. et al. "Ero1 α Regulates Ca²⁺ 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 Ca²⁺ and apoptosis" Cell Calcium 52:36-43.
- Marchi S. et al. Selective modulation of subtype III IP3R by Akt regu-

- lates ER Ca²⁺ 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
 - Lebiedzinska 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 Dechechci (Lab Patologia Molecolare, Lab Analisi chimico Cliniche ed Ematologiche, Az Osp Univ, Verona); Roberto Gambari (Dip. Biochimica e Biologia Molecolare - Univ Ferrara)
- Publications
- Dechechci MC. et al., "Modulators of Sphingolipid Metabolism Reduce Lung Inflammation" *Am J Respir Cell Mol Biol*, *In press*
 - Dechechci 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
- Dechechci 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)
 - Dechechci 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
 - Dechechci 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
 - Dechechci MC. et al. "Inhibitors of glucosylceramide synthase (GlcCerT) reduce the transcription of IL-8 induced by *P. aeruginosa* in CF bronchial cells" ECFC Basci Science Conference Tirrenia - Pisa, Italy 30 March - 2 April 2011
 - Dechechci 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
 - Dechechci 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.
 - Dechechci 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
- 23 - 26 August 2011
- Dechechci 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
 - Dechechci 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
 - Dechechci 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: design, 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 B (NF- B) 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- 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 R. "Recent patents on the therapy based on the transcription factor decoy approach" *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 2011 Nov;21(11):1755-71
 - Lampronti I. et al. "Modulation of the expression of the proinflammatory IL-8 gene in cystic fibrosis cells by extracts deriving from olive mill waste water" *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013;2013:960603. doi: 10.1155/2013/960603. Epub 2013 Jul 7.
- 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 Fcγ 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
 - Garlenda 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 EFI/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]
 - Vélez 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
 - Garlanda C, Riva F, Bonavita E, Mantovani A. "Negative regulatory receptors of the IL-1 family" Seminars in Immunology 2013; 25:408-415
- 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)
- Publications
- Veraldi N, Hughes AJ, Rudd TR et al. "Heparin derivates for the targeting of multiple activities in the inflammatory response" Carbohydrate Polymers 2015; 117:400-407
- Abstracts
- Veraldi N. et al. "Heparin derivatives as potential anti-inflammatory agents 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.
 - Iannitti RG. et al. "Th17/Treg imbalance in murine cystic fibrosis is linked to indoleamine 2,3-dioxygenase deficiency but corrected by kynureinines" Am J Respir Crit Care Med. 2013 Mar 15;187(6):609-20
- 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#18/2011 **"Inflammasome activation and IL-1 β mediated inflammation triggered by *Pseudomonas aeruginosa*: a rationale for novel therapeutic approaches in cystic fibrosis patients"** Maria Lina Bernardini (Dip. Biologia e Biotecnologie, Università "La Sapienza", Roma), Antonio Molinari (Dip. Chimica organica e biochimica, Università di Napoli), Cecilia Garlanda (Fondazione Humanitas per la Ricerca, Milano), Abdelmounaim Allaoui (Lab. Batteriologia Molecolare - Facoltà di Medicina - Libera Università di Bruxelles)
- Publications
- Garlanda C. et al. "Decoys and Regulatory "Receptors" of the IL-1/Toll-Like Receptor Superfamily" Front Immunol. 2013 Jul 9;4:180. doi: 10.3389/fimmu.2013.00180. eCollection 2013.
 - Riva F. et al. "TIR8/SIGIRR is an Interleukin-1 Receptor/Toll Like Receptor Family Member with Regulatory Functions in Inflammation and Immunity" Front Immunol. 2012 Oct 29;3:322. doi: 10.3389/fimmu.2012.00322. eCollection 2012.
- FFC Project#19/2011 **"Phospholipase C beta (PLCB) as candidate therapeutic target in CF lung proinflammatory signaling"** Giulio Cabrini (Dip. Patologia e Diagnostica, Università di Verona), Paolo Pinton (Dip. Medicina Sperimentale e Diagnostica, Università di Ferrara)
- Abstracts
- Cabrini G, Bezzetti V, Fabbri E et al " *P. aeruginosa* and modulation of IL-8 gene expression in bronchial epithelial cells", New frontiers in basic science of cystic fibrosis, Malta ECFS Conference, 26-29 March 2014
- 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, 10th Joint Annual Meeting, 11-14 September 2012, Geneva, Switzerland
 - Cigana C. et al. "Host response to *Pseudomonas aeruginosa* adaptation during chronic infection" 35th 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

- Cigana C. et al. "Defining critical players in inflammation and tissue damage during infection with *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in mice" NACFC 2013, Salt Lake City, Utah, USA
- C. Riva, C. Cigana, NI. Lorè, I. De Fino, L. Spagnuolo, A. Bragonzi "Inflammatory response and tissue damage induced by chronic lung infection with *Pseudomonas aeruginosa* patho-adaptive variants" 8th European CF Young Investigator Meeting Paris, France, 19-21 February 2014, 3rd Phd Workshop, Università degli Studi di Milano, Milan, Italy, 26-27 June 2014, Milan meets Immunology Meeting, Milan, Italy, 16 April 2014
- Cigana C, Lorè NI, Riva C, De Fino I, Spagnuolo L, Mondino A, Carrani L, Colombo C, Sipione B, Bragonzi A. "Pseudomonas aeruginosa adaptation is associated to sustained lymphocytosis and tissue damage during chronic infection in murine models and humans" 28th Annual North-American Conference, Atlanta, GA (USA), 9-11 October 2014
- Funiciello F, Soldati R, Galletti P, Giacomini D. "Monocyclic beta-lactams and cystic fibrosis: facing antioxidant and antimicrobial activity of N-thiomethyl-azetidinones" 13a giornata scientifica borsisti CINMPIS, presentazione orale, Perugia 18.12.2013

• FFC Project#21/2011 Phosphodiesterases type-4 (PDE4) as a novel target to reduce neutrophilic lung inflammation in cystic fibrosis

Virgilio Evangelista (Lab. di Biologia e Farmacologia Vascolare, Consorzio Mario Negri Sud, Chieti), Mario Romano (Lab. Medicina Molecolare, Ce.S.I., Università di Chieti-Pescara)

Abstracts

- Totani L, Amore C, Piccoli A et al "Phosphodiesterases type-4 (PDE4) as a novel target to control neutrophilic lung inflammation in cystic fibrosis", New frontiers in basic science of cystic fibrosis, Malta ECFS Conference, 26-29 March 2014

• FFC Project#22/2011 "Targeting ceramide metabolism as a pharmacological strategy in cystic fibrosis"

Riccardo Ghidoni (Lab. Biochimica e Biologia Molecolare, Dip. Medicina, Osp. S. Paolo, Università di Milano)

Publications

- Caretti A. et al. "Anti-inflammatory action of lipid nanocarrier-delivered myriocin: therapeutic potential in cystic fibrosis" Biochim Biophys Acta. 2013 Oct 18. pii: S0304-4165(13)00458-3. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.10.018. [Epub ahead of print]
- Caretti A, Bragonzi A, Facchini M et al. "Antiinflammatory action of lipid nanocarrier -delivered myriocin: therapeutic potential in cystic fibrosis" Biochimica et Biophysica Acta 2014; 1840:586-594
- FFC Project#23/2011 "Polyethylenimine-engineered respirable particles delivering a decoy oligonucleotide to NF- κ B: 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- κ B: 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
- De Stefano D. et al. "A decoy oligonucleotide to NF- κ B delivered through inhalable particles prevents LPS-induced rat airway inflammation" Am J Respir Cell Mol Biol. 49(2013):288-95.

Abstracts

- De Stefano D. et al. "NF- B decoy ODN release from respirable and biodegradable PEI/PLGA particles inhibits MUC2 expression in 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-kb" 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
- Ungaro F et al. "Improving therapy of lung inflammation by inhalable powders for prolonged release of a decoy oligonucleotide

against NF- κ B" 3rd Conference on Innovation in Drug Delivery: Advances in Local drug Delivery, September 22-25, 2013, Pisa, Italy. Selected as oral presentation.

- De Stefano D. et al. "A decoy oligonucleotide to NF- κ B delivered through inhalable particles inhibits the lung inflammation induced by LPS in rat" 36mo Congresso Nazionale della Società Italiana di Farmacologia, October 23-26, 2013, Torino, Italy.

• FFC Project#14/2012 "Structure-activity relationships (SAR) of neoglycoconjugates derived from deoxynojirimycin as possible therapeutic agents for cystic fibrosis lung disease, by modulating the metabolism of sphingolipids"

Maria Cristina Dechechci (Lab. Patologia Molecolare, Laboratorio Analisi AOUI, Verona), Frédéric Becq (Inst. Physiologie et Biologie Cellulaires, Université de Poitiers, France)

Publications

- Lampronti I. et al. "Modulation fo the expression of the proinflammatory IL-8 gene in Cystic Fibrosis by extracts deriving from olive mill waste water" Evid Based Complement Alternat Med. 2013;2013:960603. doi: 10.1155/2013/960603. Epub 2013 Jul 7
- Bezzzerri V, Avitabile C, Dechechci MC, Lampronti I, Borgatti M, Montagner G, Cabrini G, Gambari R, Romanelli A. "Antibacterial and anti-inflammatory activity of a temporin B peptide analogue on an in vitro model of cystic fibrosis." Journal of Peptide Science 2014 Oct;20(10):822-30.
- Loberto N. et al. "GBA2-Encoded b-Glucosidase Activity Is Involved in the Inflammatory Response to *Pseudomonas aeruginosa*" PLoS One 2014 Aug 20;9(8):e104763. doi: 10.1371/journal.pone.0104763. eCollection 2014.

Abstracts

- Tebon M. et al. "Non-lisosomial beta-glucosidase 2 (GBA2) as a target of the anti-inflammatory effect of miglustat" ECFS Basic Science Conference, 20-24 March 2013, Malaga, Spain
- Tebon M., Cantù C., Lovato V., Bezzzerri V., Tamanini A., Lampronti I., Marchetti N., Gambari R., Aureli M., Loberto N., Bassi R., Sonnino S., Dechechci M.C. and Cabrini G. "Non-Lysosomal Beta-Glucosidase 2 (Gba2) as a target of the Anti-Inflammatory Effect of Miglustat." 10th ECFS Basic Science Conference
- Munari S, Susanna Khalil S, Nicoletta Loberto N, Lovato V, Bezzzerri V, Tamanini A. et al. "Structure-activity-relationships (sar) of neoglycoconjugates derived from Deoxynojirimycin as possible anti-inflammatory agents for CF lung disease" 11th ECFS Basic Science Conference
- Loberto N, Tebon M, Lampronti I et al. "Involvement of the non-lysosomal β -glucosylceramidase gba2 in the inflammatory response to pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis" 2nd International Workshop on Molecular Medicine of Sphingolipids. 12-17 ottobre 2014. Kloster Banz, Germania. Oral Presentation

• FFC Project#15/2012 "The Heme-oxygenase 1 (HO-1) as modulator of Cystic Fibrosis lung disease" Valeria Raia (Dipartimento di Pediatria, Università "Federico II", Napoli), Emanuela Bruscia (Dep. Pediatrics, Respiratory Medicine, Yale University School of Medicine), Luigi Maiuri (IERFC, San Raffaele, Milano)

Publications

- Zhang PX. et al. "Reduced caveolin-1 promotes hyperinflammation due to abnormal heme oxygenase-1 localization in lipopolysaccharide-challenged macrophages with dysfunctional cystic fibrosis transmembrane conductance regulator" J Immunol. 2013 May 15;190(10):5196-206. doi: 10.4049/jimmunol.1201607. Epub 2013 Apr 19.

Abstracts

- Villela V. et al. "The Heme-oxygenase 1 (HO-1) as modulator of cystic fibrosis lung disease" 7th European CF Young Investigators meeting, February 27-March 1, 2013

• FFC Project#16/2012 "Targeting pathogenic pathways leading to inflammatory Th17 responses in cystic fibrosis: a drug discovery approach"

Luigina Romani (Dip. Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche, Università di Perugia)

Publications

- Iannitti RG, Casagrande A, De Luca A et al. "Hypoxia promotes danger-mediated inflammation via receptor for advanced glycation end products in cystic fibrosis" American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 2013; 188:1338-1350
- Bedke T, Iannitti RG, De Luca A et al. "Distinct and complementary roles for Aspergillus fumigatus-specific Tr1 and Foxp3(+) regulatory T cells in humans and mice" Immunol Cell Biol 2014;92:659-70

Abstracts

- Iannitti RG, Giovannini G, Cunha C et al. "Cystic fibrosis Th17/Treg imbalance to Aspergillus fumigatus: insights for novel anti-inflammatory strategies and immunogenetic screening" North American Cystic Fibrosis Conference (NACFC) Orlando (Florida, USA), 11-13 October, 2012. Gordon Research Conference "Immunology of Fungal Infections". Galveston (TX, USA), 13-18 January, 2013.
- Borghi M, Iannitti RG, De Luca A et al. "Targeting pathogenic pathways leading to inflammatory responses in Cystic Fibrosis" Meeting "Fungi in the setting of inflammation, allergy and autoimmune diseases: Translating basic science into clinical practices". BorgoRicci Torchiera (SA, Italy), April 13-16, 2014
- Romani L. "IDO/Kynurenine: A novel anti-inflammatory Th17 counteracting pathway in CF" 37th European Cystic Fibrosis Conference. Gothenburg (Sweden), June 11-14, 2014

- FFC Project#18/2012 **"Cystic Fibrosis liver disease: the role of CFTR as regulator of epithelial innate immunity"**

Mario Strazzabosco (Dip. Medicina Clinica e Prevenzione, Università Milano-Bicocca, Milano)

Abstracts

- Fiorotto R. et al. Src tyrosine kinase mediates the increased TLR4-dependent stimulation of innate immune response to endotoxins in Cftr-defective cholangiocytes" annual meeting of the "American Association for the Study Liver Diseases", November 1st-5th 2013
- Fiorotto R. et al. "Src tyrosine kinase mediates the increased TLR4-dependent stimulation of innate immune responses to endotoxins in Cftrdefective cholangiocytes" Presented at ICI satellite meeting, SM7, "Endotoxin, TLR4 signaling, and beyond". Cinisello Balsamo (MI), Italy, 21st August 2013
- Fiorotto R, Villani A, Scirpo R et al "CFTR controls TLR4 responses of the biliary epithelium by regulating C-SRC tyrosine kinase activation", 28th Annual North American Cystic Fibrosis Conference , Atlanta, October 9-11, 2014
- FFC Project#13/2013 **"Lactoferrin-loaded niosomes in reducing inflammation and infection of cystic fibrosis airway epithelium"**
Francesca Berluti (Dip. Salute Pubblica e Malattie infettive, Università "La Sapienza", Roma)

Publications

- Frioni A, Conte MP, Cutone A et al. "Lactoferrin differently modulates the inflammatory response in epithelial models mimicking human inflammatory and infectious diseases" Biometals 2014 Oct;27(5):843-56

- Valenti P, Catizone A, Frioni A, Berluti F. "Lactoferrin and cystic fibrosis airway infection. In "Diet and Exercise in Cystic Fibrosis" (Ronald Ross Watson) Academic Press, Waltham" Book: WATSON-9780128000519 Chapter: 09

Abstracts

- Berluti F, Frioni A, Cutone A et al. "Lactoferrin modulates inflammatory and iron network in different epithelial cell models mimicking human infection and inflammatory diseases" XI International Conference on Lactoferrin, 6-10 October 2013, Rome, Italy

- FFC Project#19/2013 **"The role of vascular endothelium in cystic fibrosis inflammation"**

Mario Romano (Dip. Scienze Sperimentali e Cliniche, Lab. Medicina Molecolare, Università "G. D'Annunzio", Chieti-Pescara), Licia Totani (Dip. di Farmacologia Traslazionale, Consorzio Mario Negri Sud), Marco Marchisio (Dip. Medicina e Scienze dell'Invecchiamento, Università "G. d'Annunzio" Chieti-Pescara)

Abstracts

- Totani L, Recchiuti A, Piccoli A et al "The involvement of vascular endothelium in cystic fibrosis lung inflammation", New frontiers in basic science of cystic fibrosis, Malta ECFS Conference, 26-29 March 2014

- FFC Project#20/2013 **"Sphingolipid targeting in inflammation and fungal infection"**

Paola Signorelli (Dip. di Scienze della Salute, Facoltà di Medicina, Università di Milano), Elisa Borghi (Dip. di Scienze della Salute, Facoltà di Medicina, Università di Milano), Silvano Sozzani (Dip. Medicina Molecolare e Traslazionale, Università degli Studi di Brescia)

Abstracts

- Perdoni F, Cirasola D, Ortalli G et al. "Antifungal activity of Myriocin, a sphingolipid metabolism inhibitor, on pathogenic fungi" Third Meeting of the ECMM/ISHAM Working Group on Fungal Respiratory Infections in Cystic Fibrosis, Angers- France, 5-6 June 2014 (oral communication)
- Perdoni F, Riva A, Signorelli P et al. "Nanocarrierdelivery of Myriocin, a sphingolipid metabolism inhibitor with antifungal activity, into fungal biofilms" 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases in Barcelona, Spain, 10 - 13 May 2014 (poster)
- Perdoni F, Biggiogera M, Cirasola D. et al. "Antifungal activity of Myriocin, a sphingolipid metabolism inhibitor, on fungal biofilms: a preliminary study." ESCMID Study Group for Biofilm (ESGB) Meeting "Biofilm-based Healthcare-associated Infections: from Microbiology to Clinics", Rome 9-10 October 2014

5. CLINICAL RESEARCH

Ricerca clinica

- FFC Project 2005 **"Infection Control".**

Roberto Buzzetti (Fondazione per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica)

Publications

- Buzzetti R. et al. "Controllo e prevenzione delle infezioni respiratorie nel paziente affetto da fibrosi cistica" Edit. Fondazione per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica. Verona, 2005
- Festini F. et al. "Isolation measures for prevention of infection with respiratory pathogens in cystic fibrosis: a systematic review" Journal of Hospital Infection (2006) 64, 1-6

- FFC Project#18/2004 **"Early eradication of *P. aeruginosa* and subsequent colonization in cystic fibrosis patients"**

Giovanni Taccetti (Dipart. di Pediatria, Centro Regionale FC, Azienda Ospedaliera Universitaria Meyer)

Publications

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

- FFC Project# 19/2004 **"Quality control and update of follow-up data in the Italian cystic fibrosis registry: a starting point for the analysis of clinical data and the dissemination of results"**

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

Abstracts

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

- FFC Project#16/2005 **"Diabetes, glucose intolerance and hypoglycemia in Cystic Fibrosis"**

Carla Colombo (Dipart. Pediatria - Centro FC - Fond. IRCCS Osp. Maggiore Polic. Mangiagalli e Regina Elena - Milano), Alberto Battezzati (Fond. Centro San Raffaele del Monte Tabor - Milano)

Publications

- Battezzati A. et al. "Spontaneous hypoglycaemia in patients with cystic fibrosis" European Journal of Endocrinology 2007; 156: 369-376
- 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" 13th Italian Cystic Fibrosis Conference, Milan, 30 Nov. - 2 Dec. 2007, J. Cyst Fibrosis 2008; 7, suppl. 3: pp. S22-S23.
- Battezzati A. et al. "Insulin secretory defects identified from OGTT modelling are related to subsequent diabetes and worse pulmonary function in CF patients" Pediatric pulmonology, Suppl. 31, 2008. 22nd Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Orlando, Florida, 22-25 October 2008, p. 344-345
- FFC Project 2006 **"The CAIRO Project" (Analysis and review of the international scientific literature from the CF registries)**

Roberto Buzzetti (Componente del Comitato di Consulenza Scientifica della Fondazione per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica), Donatello Salvatore (U. O. Pediatria, Azienda Ospedaliera San Carlo, Potenza)

Publications

- Buzzetti R. et al. "An overview of international literature from cystic fibrosis registries: 1. Mortality and survival studies in cystic fibrosis", Journal of Cystic Fibrosis 9 (2010) 75-83
- Salvatore D. et al. "An overview of international literature from cystic fibrosis registries: 2. Neonatal screening and nutrition/growth", Journal of Cystic Fibrosis 9 (2010) 75-83
- 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", 13th Italian Cystic Fibrosis Conference, Milan, 30 Nov. - 2 Dec. 2007, J. Cyst Fibrosis 2008; 7, suppl. 3: pp. S8-S9
- FFC Project#19/2006 "**Prolonging the duration on site of short peripheral venous catheters used to administer intravenous antibiotic courses in adult subjects with cystic fibrosis. A randomized controlled trial to evaluate the effect of different concentrations of antibiotic in normal saline solution**" Filippo Festini (Dipart. Pediatria - Centro FC Ospedale Meyer- Firenze)

Abstracts

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

- FFC Project#20/2006 "**Prevention of pulmonary exacerbations in children with Cystic Fibrosis, through the modification of intestinal microflora**"

Alfredo Guarino (Dipart. Pediatria - Univ. Federico II Napoli), Carla Colombo (Dipart. Pediatria - Centro FC - Fond. IRCCS Osp. Maggiore Polic. Mangiagalli e Regina Elena - Milano), Lorenzo Morelli (Tecnologie analitiche ed avanzate - Univ. Piacenza)

Publications

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

Abstracts

- Guarino A. et al. "Probiotics in cystic fibrosis: help from old friends" Pediatric pulmonology, Suppl. 31, 2008. 22nd Annual North American Cystic Fibrosis Conference, Orlando, Florida, 22-25 October 2008, pp. 130-131.

- FFC Project#21/2006 "**Efficacy of slow release insulin in cystic fibrosis patients with glucose 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" 23rd Annual North American Cystic Fibrosis Congress, Minneapolis, Minnesota, 15-17 October 2009.
- Taccetti G. et al. "Pseudomonas aeruginosa eradication in cystic fibrosis: preliminary data from a randomized multi center study of two different early antibiotic treatment protocols" The 24th Annual North American CF Conference, October 21-23, 2010, Baltimore, Maryland
- Cocchi P et al "Diffusion of MRSA strains in the Italian CF population: a multicenter study" The 24th Annual North American CF Conference, October 21-23, 2010, Baltimore, Maryland
- Dolce D. et al "Immunological monitoring of *P. aeruginosa* eradication in cystic fibrosis patients: comparison of methods" The 24th Annual North American CF Conference, October 21-23, 2010, Baltimore, Maryland
- Dolce D. et al. "Evaluation of antibody titer anti-*P. aeruginosa* in patients undergoing eradication therapy" NACFC 2012, Orlando, USA
- Taccetti G. et al. "Is early eradication treatment against *P. aeruginosa* associated with the emergence of other non-fermenter gram negatives" NACFC 2013, Salt Lake City, Utah, 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" 23rd Annual North American Cystic Fibrosis Congress, Minneapolis, Minnesota, 15-17 October 2009.
- Dal Molin A et al "Multicenter prospective study about complications of totally implantable central venous access ports in Italian people with CF: preliminary results" J Cyst Fibros. 2009; 8 (Suppl.2):S95

- FFC Project#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. Anestesia e Rianimazione)

Publications

- Ricci D. et al. "The use of CO₂ 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 Cistiche - Dipart. Medicina Pediatrica - Azienda Ospedaliera Universitaria Meyer - Firenze) Francesca Pardo (Centro Regionale Fibrosi Cistiche - 2^o 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.
- Bruzzese E. et al. "Age-Relation pattern of intestinal microflora in children with cystic fibrosis", 44th 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" 35th 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, TV)

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
- De Leo F. et al. "Lung-MRI to monitoring cystic fibrosis (CF) patients with pulmonary exacerbation" 36th ECFS Conference, 12-15 June, 2013 Lisbon, Portugal
- FFC Project#26/2011 **"Testing human monocytes as a new tool for clinical and preclinical research in CF"** Claudio Sorio (Dip. di Patologia e Diagnostica, Università di Verona), Mario Rosario Buffelli (Dip. Scienze Neurologiche, Neuropsicologiche, Morfologiche e Motorie, Università di Verona)

Publications

- Bellisola et al. "The identification of cystic fibrosis (CF) cells and their pharmacological correction by mid-infrared microspectroscopy and unsupervised data analysis methods" ScienceJet 2014;3:51
- Calderer S. et al. "Challenging the diagnosis of Cystic Fibrosis in a patient carrying the 186-8T/C allelic variant in the CF Transmembrane Conductance Regulator gene" BMC Pulm Med. 2014 Mar 13;14:44. doi: 10.1186/1471-2466-14-44.

- FFC Project#20/2012 **"Early antibiotic treatment for MRSA eradication in cystic fibrosis patients: a randomised multicentre study"**

Giovanni Taccetti (Centro Regionale Fibrosi Cistica, AOU "A. Meyer", Firenze), Diana Costantini (Centro FC, Lab. Patologia Clinica, Fondazione IRCCS Ca' Granda, Milano), Mirella Collura (Centro FC, Ospedale "G. Di Cristina", Palermo), Giuseppe Magazzù (Centro FC, Messina), Valeria Raia (Centro FC, Napoli)

Abstracts

- Galici V, Cocchi P, Colombo C, Cariani I, Lucidi V, Fiscarelli E, Raia V, Terlizzi V, Taccetti G. "Early antibiotic treatment for MRSA eradication in cystic fibrosis patients: a randomized multicenter study" 28th North American Conference, Atlanta , GA
- FFC Project#21/2013 **"Clinical implications of the natural history of insulin secretory and sensitivity defects in cystic fibrosis"**

Alberto Battezzati (International Center for the Assessment of Nutritional Status (ICANS) - DeFENS Università di Milano), Carla Colombo (Dip. Scienze Materno Infantili, Università di Milano, Centro regionale FC), Andrea Mari (Istituto di Ingegneria Biomedica, ISIB-CNR, Padova)

Abstracts

- Battezzati A, Bedogni G, Zazzeron L et al. "Defective beta cell function measured during OGTT is a long term diabetes predictor in cystic fibrosis" Pediatric Pulmonology, Volume 49, Issue S38, Article first published online: 4 SEP 2014

FFC Facilities

• **Cystic Fibrosis animal Core facility (CFaCore)**

Alessandra Bragonzi (Fondazione Centro San Raffaele)

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

• **Cystic Fibrosis Database (CFDB)**

Roberto Buzzetti (Fondazione Ricerca FC)

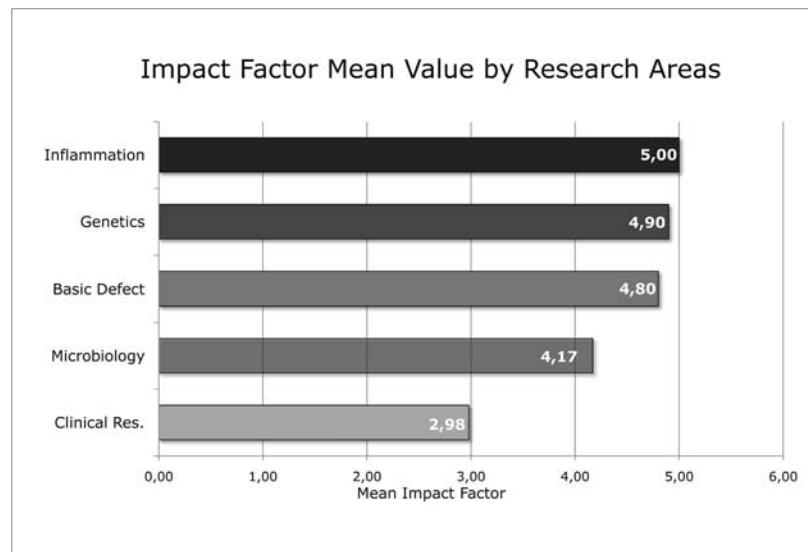
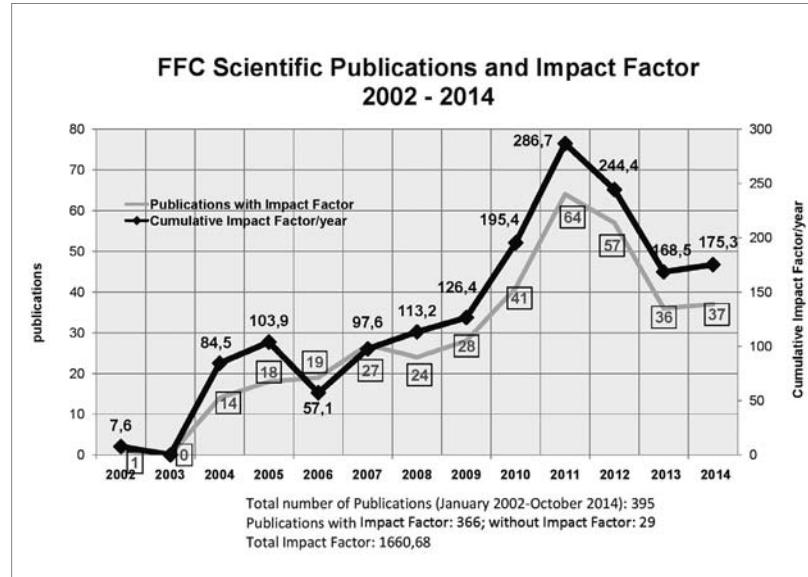
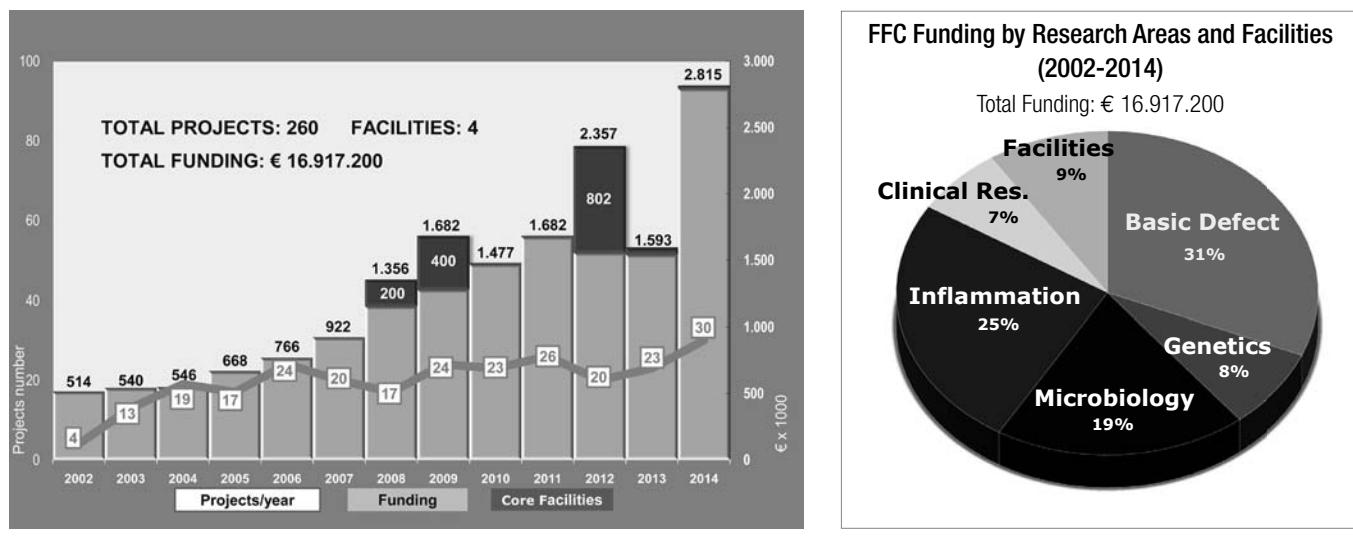
Publications

- Buzzetti R et Al. "CFDB (cystic fibrosis database): a new web-based tool for cystic fibrosis specialists". Pediatr Pulmonol. 2014 Sep;49(9):938-40.

Appendix 2

2002-2014 FFC Projects, publications and impact factor

Progetti FFC 2002-2014, pubblicazioni e impact factor



Institutes and Laboratories involved in the 260 projects funded by Italian CF Research Foundation 2002-2014

Istituti e Laboratori attivi nei 260 progetti finanziati da FFC dal 2002 al 2014

ITALY

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., Università Chieti-Pescara Centro FC, Teramo
- Dip. Scienza Clinica Sperimentale, Centro Eccellenza Invecchiamento, Univ. Chieti-Pescara

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 Toxicologica e Farmaceutica, Univ. Federico II, Napoli - Dip. Farmacologia Sperimentale, Napoli
- Dip. Chimica e Biochimica organica, Univ. Federico II, Napoli - TIGEM, Telethon, Napoli
- Dip. di Farmacia, 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
- Centro FC, Napoli
- Istit. Farmacia, Università 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, Università di Trieste

- Dip. Scienze Biomediche, Università di 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 "La Sapienza", 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 Sperimentali, Fondazione S. Lucia, Roma
- Dip. Scienze di Sanità Pubblica - Univ. "La Sapienza", Roma
- Dip. di Medicina interna e vascolare - Univ. "La Sapienza", Roma
- Lab. di Microbiologia Ospedale Pediatrico Bambin Gesù, Roma
- Serv. Supporto FC, Osp. Bambin Gesù, Roma
- Lab. Microbiologia Molecolare e Biotecnologia dei Microrganismi, Dip. Biologia, "Università Roma Tre"
- Lab. Microbiologia Clinica e Virologia, Dipartimento di Biologia, "Università Roma Tre", Roma;
- Dip. Scienze Biochimiche - Università "La Sapienza", Roma
- 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
- Dip. Malattie Infettive, Parassitarie e Immunomediate, Istituto superiore di sanità, Roma
- Dip.to Biologia, Univ. Roma "Tor Vergata"

LIGURIA

- Istituto di Biofisica -CNR, Genova
- Dip. di Scienze Farmaceutiche
- Università di Genova, Genova- Lab. di Fisiopatologia dell'Uremia -Istituto G. Gaslini, Genova
- Lab. Genetica umana E.O. Ospedali Galliera, Genova
- Lab. Genetica Molecolare -Istituto G. Gaslini, Genova
- Lab. Medicina Molecolare -Istituto G. Gaslini, Genova

- Lab. Centrale Analisi -Istituto G. Gaslini, Genova
- Sezione Microbiologia -DISCAT, Genova
- ARPAL (Agenzia Reg. Protezione Ambiente Ligure), Genova
- Lab. Diagnostica e Ricerca Malattie Infettive, Dip. Pediatria-Istituto G. Gaslini, Genova
- Dip. Pediatria - Lab. Microbiologia - Istituto G. Gaslini, Genova
- Dip. Pediatria - Centro Fibrosi Cistica - Istituto G. Gaslini, Genova
- Sezione di Epidemiologia e Biostatistica, Istituto G. Gaslini, Genova
- Dip. Medicina Sperimentale - Istituto G. Gaslini, Genova
- Dip. Medicina Sperimentale - Università degli Studi di Genova
- Lab. Fisiopatologia molecolare dei canali ionici - Centro Biotecnologie Avanzate, Ist. Gaslini, Genova
- Istituto Italiano di Tecnologia (IIT), 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 Bioscienze - 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, Università di Milano
- Dip. Scienze Molecolari Agroalimentari, Università di Milano
- Dip. Biotecnologie e Bioscienze - Università Bicocca, Milano
- Dipartimento di chirurgia e medicina interdisciplinare - 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 IRCSS, Ca' Granda, Milano
- Istituto europeo per la ricerca sulla fibrosi cistica (I.E.R.F.C.) Fondazione ONLUS c/o HSR, Milano
- Dip. Medicina Molecolare e Traslazionale, Università degli Studi di Brescia
- Dip. di Scienze della Salute, Facoltà di Medicina, Università di Milano
- International Center for the Assessment of Nutritional

- Status (ICANS) - DeFENS Università di Milano
- Istituto Ricerche Cliniche e Biochimiche "G. Ronzoni", Milano
- Dip.to Biotecnologie e Medicina Traslazionale, Univ Milano
- Unità Patogeni Batterici Emergenti, Di. Immunologia, Trapianto e Mal. Infettive, HSR, Milano
- CUSSB Centro Statistica Scienze Biomediche, Univ. Vita e Salute San Raffaele, Milano

MARCHE

- Centro Fibrosi Cistica-Ospedale dei Bambini - Centro FC, Ancona

PIEMONTE

- Centro FC Adulti Divisione Malattie Respiratorie, Dip. di Scienze Biologiche e Cliniche-Università di Torino, Ospedale S. Luigi Gonzaga, Orbassano (TO)
- Dip. di Genetica, Biologia e Biochimica -Università di Torino,Torino
- Dip. di Patologia Clinica, S.S. di Diagnostica Molecolare e Test Genetici Integrati, Torino
- Dip. Discipline medico chirurgiche, Sez. Anestesia e rianimazione, Univ. Torino
- Dip. di Scienza e Tecnologia del Farmaco, Università di Torino
- Dip. di Scienze cliniche e biologiche, Università di Torino
- Centro di biotecnologia molecolare, Università di Torino
- Dip. Biologia Molecolare e Scienze della Salute, Univ. Torino

PUGLIA

- Dip. Fisiologia Generale ed Ambientatale - Università di Bari, Bari
- Servizio Fibrosi Cistica-Ospedale di Cerignola, Cerignola
- Dip. Scienze Biomediche - Università di Foggia
- Dipartimento di Pediatria - Policlinico - Università di Bari
- Istituto Biomembrane e Bioenergetica, CNR, Bari

SARDEGNA

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

SICILIA

- Istituto di Biofisica-CNR, Palermo
- Centro Fibrosi Cistica-Policlinico, Messina,
- Centro Regionale FC-Ospedale dei Bambini "G. di Cristina", Palermo
- Istituto per lo Studio dei Materiali Nanostrutturati, CNR, Palermo
- Dipartimento Scienze e Biotecnologie Molecolari e Biomolecolari, Università degli Studi di Palermo
- Dip.to Scienze Biologiche, Chimiche, Farmaceutiche e Tecnologie. Univ. 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.to Ricerca Traslazionale, Lab Patologia Generale, Univ. Pisa
- Dip. di Pediatria-Centro Fibrosi Cistica - Ospedale Meyer, Firenze
- Servizio Fibrosi Cistica-Ospedale di Livorno, Livorno
- Dip. Patologia Sperimentale, Biotecnologie Mediche, Infettivologia ed Epidemiologia -Università di Pisa, Pisa
- Unità Bioinformatica, Centro di Ricerche Chiron, Siena
- Lab. Fisiologia Microbica e Biotecnologia, Dip. Biologia Molecolare, Policlinico "Santa Maria alle Scotte", Università di Siena
- Dipartimento Diagnostica di Laboratorio Servizio di Diagnostica Genetica- Azienda Ospedaliero 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
- Dip. Biologia, Univ. Firenze
- Dip. Scienze Sanitarie, Unità Farmacologia Clinica e Oncologia, Univ. Firenze

UMBRIA

- Dipart. Medicina Interna - Sez. Biochimica Applicata e Scienze Nutrizionali - Università degli Studi di Perugia
- Dipart. Medicina Sperimentale e Scienze Biomediche - Università degli Studi di Perugia
- Dip. Medicina Sperimentale e Scienze Biomediche, Univ di Perugia
- Dip. Biotecnologie, Università di Siena

VENETO

- Medicina Interna, Università degli Studi di Verona, Verona
- Medicina Interna, Università degli Studi di Verona, Verona
- Istituto Veneto Medicina Molecolare, Padova
- Servizio Clinico di Genetica e Screening neonatale, Centro Fibrosi Cistica, Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata, Verona
- Dip. di Patologia e Diagnostica, Sezione immunologia, Università degli Studi di Verona, Verona
- Sezione di Anatomia ed Istologia, Dip. di Scienze Morfologico-Biomediche, Università degli Studi di Verona, Verona
- Lab. Patologia Molecolare, Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata, Verona
- Centro Fibrosi Cistica, Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata, Verona
- Dip. Scienze della Vita e della Riproduzione, Sezione di Biologia e Genetica, Università degli Studi di Verona
- Dip. Scienze Biomediche e Chirurgiche, Divisione di Nefrologia -Università degli Studi di Verona, Verona
- Dip. di Patologia - Patologia Generale - Università degli Studi di Verona, Verona
- Lab. di Microbiologia, Azienda Ospedaliera Universitaria di, Verona
- Facoltà di Scienze della Formazione, Università degli Studi di Verona, Verona
- Dip. Scienza e Tecnologia del Farmaco, Università degli Studi di Verona, Verona
- Dip. Scienze Farmaceutiche, Università degli Studi di Padova
- Dip.to Farmaceutica e Scienze Farmacologiche, Univ. Padova
- Dip. Chimica Biologica, Università degli Studi di Padova
- Dip. Scienze Neurologiche e del Movimento - Università degli Studi di Verona
- Srvizio fibrosi cistica, Ospedale Ca' Foncello, Treviso
- Ist. di Clinica Pediatrica, AO e Università degli studi Padova
- Istituto di Ingegneria Biomedica, ISIB-CNR, Padova
- Dip. Scienze Biomediche , Univ. Padova
- Dip. Medicina, Unità Nefrologia, Azienda Ospedaliera- Universitaria, Verona
- Dip. Patologia e Diagnostica, Sez. Microbiologia, Univ. Verona

EUROPE

BELGIUM

- Dept. of Clinical Chemistry, Catholic University of Louvain
- St. Luc University Hospital, Louvain
- Lab. of Molecular Bacteriology ULB, Faculty of Medecine, Bruxelles
- Université Catholique de Louvaine, Brussels

FRANCE

- Institute of Cell Physiology and Biology, University of Poitiers
- Pediatric Cystic Fibrosis Center of Troussseau Hospital - Inserm U938 / UPMC, Paris

GERMANY

- Institute of Medical Microbiology and Hygiene, University of Tübingen
- Institute für Medizinische Mikrobiologie, Univeristats Klinikum, Munster

IRELAND

- Queen's University Belfast, Respiratory Medicine Research Group, Belfast

SWITZERLAND

- Dept. of Pediatrics, University Hospital and Faculty of Medecine, Geneva
- Polyphor Ltd, Switzerland, Geneva

THE NETHERLANDS

- Dept. Gastroenterology & Hepatology, Erasmus University Medical Center, Rotterdam

UNITED KINGDOM

- Dept. of Respiratory Medicine, Freeman Hospital, The Medical School University of Newcastle
- School of Biological Science, University of Liverpool
- Division of Pharmacology, Pharmacy and Biomedical Science, University of Portsmouth

OUTSIDE EUROPE

CANADA

- Dept. of Microbiology and Immunology, University of Western Ontario, London, Ontario, Canada

ISRAEL

- Schulich Faculty of Chemistry Technion - Israel Institute of Technology, Haifa
- Dept. of Biological Chemistry, The Weizmann Institute of Science, Haifa
- Clinical Microbiology and Immunology, Tel Aviv University

UNITED STATES

- Dept. Pediatrics, Respiratory Medicine, Yale University School of Medicine

Appendix 4

International reviewers of FFC projects

ASIA

Hong Kong

Dennis Lo Yuk Ming

India

Amit Misra

Israel

Batsheva Kerem
Orit Reish
Hanoch Senderowitz

Japan

Hiroshi Kubo

AUSTRALIA

Scott Bell
Margaret Cooley
Tim Kidd
Manohar Garg
Allan Glanville
John Massie
John Mattick
David Reid
Louis Rendina
Cynthia Withchurch

CANADA

Adré Cantin
Tom Clandinin
Lori Burrows
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 Zielenky

EUROPE

Austria

Thomas Eiwegger

Belgium

Karim Amighi
Gilles Brackman
Jean Jacques Cassiman

Tom Coenye

Pierre Cornelis
Harry Cuppens
Christiane De Boeck
Ingeborg Liebaers
Savvas Savvides
Peter Vandamme

Czech Republic

Jan Krejsek

Denmark

Oana Ciocfa
Niels Højby
Christian Koch
Marie Johannesson
Jette Elisabeth Kristiansen
Søren Molin

France

Emmanuel Andres
Frederic Becq
Christelle Coraux
Laurent Debarbieux
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-Bèchot
Jean-Marc Rolain
Marie Catherine Romey
Juliet Royet
Isabelle Sermet
Virginie Scotet
Pascal Trouvè
Clarisse Vandebruck

Germany

Robert Bals
Michael De Vrese
Jahn Dieter
Gerd Döring
Stephan Fischer
Christoph Freiberg
Matthias Griese
Erick Gulbins
Dominik Hartl
Andreas Hector
Jürgen Heesemann
Barbara Kahl
Winfried Kern
Wolfgang Kuebler
Karl Kunzelmann
Frank-Michael Müller
Markus Pietsch
Hermann Schillers
Ursula Seidler
Stefan Stamm
Gratiana Steinkamp
Burkhard Tuemmler
Christiane Wolz

Greece

George Makrydimas

Ireland

Siobhán McClean

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 Bertranpetit
Ana Bustamante-Aragones
Xavier Estivill

Sweden

Ute Romling
Birgitta Strandvik
Peter Zygmunt

Switzerland

Leo Eberl
Hans Peter Fisher
Bernard Rossier

The Netherlands

Touw Daan
Hugo De Jonge
Peter Klijn
Lidewij Henneman
Charlotte Robroeks
Bernt Van Der Blink

U.K. – Northern Ireland

Matthew Avison
Maria G. Belvisi
Charlotte Billington
James Birchall
Marina Botto
Alan R. Brown
Andrew Bush
Philip Calder
Steven Conway
Jane Davies
Louise Donnelly
Robert Dorner
Alistair Duff
Stuart Elborn
Madeleine Ennis
Glenda Esmond
Thomas Evans
Alain Filloux
Andres Floto
Peter Gahan
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
 Hui-leng Tan
 Paola Vergani
 John Widdicombe
 Craig Winstanley

SOUTH 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
 David Bedwell
 John Paul Clancy
 Lisa Schwiebert

California

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

Evan Powers

Paul Quinton

Charles M. Strom

Alan Verkman

Jeffrey Wine

Colorado

Frank Accurso

Brian Day

Brian Doctor

Jerry A. Nick

Scott Sagel

Herbert Schweizer

Marty Zamora

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
 Patrick Sinn
 Joseph Zabner

Kansas

John Gatti

Kentucky

Stefan Stamm
 Jay Zwischenberger
 Joseph Zwischenberger

Louisiana

Jay K. Kolls
 Guoshun Wang

Maine

Robert Owens

Maryland

Biswas Roopa
 Gary Cutting
 Robert K. Ernst
 William Guggino
 Sam Lai
 Gary Mansfield
 Christian Merlo
 Peter Mogayzel
 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
 Bruce Levy
 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
 Thalachalloor Mohanakumar

New Hampshire

Dean Madden

New York

Isabel Aznarez
 Nazzarena Ballatori

David Goldfarb

Alice Prince

Lisa Saiman

Patricia Sime

Stefan Worgall

Tilla S. Worgall

North Carolina

Adler Kenneth B.

Robert Aris

Michael Boyle

Charles Esther

Andrew Ghio

Michael Knowles

Marianne Muhlebach

John Riordan

Gabriel Sherif

Ohio

Amal Amer

Melvin Berger

Maria Britto

James Chmiel

Mitchell Drumm

Dana S. Hardin

Daniel Hassett

Scott Harness

Craig Hodges

Lloyd Horrocks

Valerie Hudson

Christopher Karp

Thomas J. Kelley

Michael Konstan

Sanjay Rajagopalan

Adriano Tonelli

Daniel Wozniak

Oregon

Bruce L. Geller

Xuheong Liu

Pennsylvania

Robert Bucki

Raymond Frizzell

David Orenstein

Douglas Wilson

Tennessee

John Christman

Michael Laposata

Vasiliy V. Polosukhin

Texas

Carolyn Cannon

Philip Thomas

Utah

Valerie Hudson

Guy Zimmerman

Vermont

Daniel J. Weiss

Virginia

Joanna Goldberg

Dennis E. Ohman

Bruce Rubin

Washington

Moira Aitken

Jane Burns

Chris Goss

E. Peter Greenberg

Lucas Hoffmann

Samuel I. Miller

Matt Parsek

Margaret Rosenfeld

Wisconsin

Philip Farrel

Don Sanders

FFC Research funding

Appendix 5

CF research costs supported by FFC Foundation (€)														
Research area	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2002-2014
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 2 proj.	195.000 7 proj.	375.000 8 proj.	470.000 4 proj.	235.000 6 proj.	505.000 6 proj.	335.000 9 proj.	1.604.000 68 proj.	5.006.000
2. Genetics	90.000 3 proj.	113.000 4 proj.	110.000 2 proj.	80.000 3 proj.	113.000 2 proj.	105.000 3 proj.	130.000 2 proj.	310.000 5 proj.	60.000 1 proj.	78.000 1 proj.	60.000 1 proj.	78.000 1 proj.	1.279.000	
3. Microbiology	18.000 1 proj.	105.000 3 proj.	145.000 4 proj.	232.000 9 proj.	29.000 7 proj.	260.000 5 proj.	270.000 6 proj.	395.000 8 proj.	373.000 7 proj.	343.000 5 proj.	336.000 6 proj.	230.000 6 proj.	3.093.000	
4. Inflammation	211.000 1 proj.	55.000 1 proj.	163.000 4 proj.	123.000 3 proj.	113.000 3 proj.	163.000 5 proj.	345.000 6 proj.	485.000 8 proj.	520.000 7 proj.	440.000 5 proj.	529.000 8 proj.	615.000 11 proj.	4.057.000	
5. Epidemiology & Clinical Res	20.000 1 proj.	53.000 3 proj.	31.000 2 proj.	75.000 4 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.	180.000 3 proj.	153.000 3 proj.	1.092.000	
Core facilities														1.485.700
Direct 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	1.510.000	2.700.000	16.012.700
Research projects	4 proj.	13 proj.	19 proj.	24 proj.	20 proj.	17 proj.+1F.	24 proj.+1F.	23 proj.+1F.	26 proj.+1F.	20 proj.+4F.	23 proj.+1F.	30 proj.+1F.	260 proj.+4F.	
Management costs	21.500	32.000	46.000	54.000	61.000	65.000	76.000	82.000	85.000	97.000	87.000	83.000	115.000	904.500
TOTAL COSTS	513.500	540.000	546.000	668.000	766.000	922.000	1.356.000	1.682.000	1.476.500	1.682.200	2.357.000	1.593.000	2.815.000	16.917.200

Research investment 2002 - 2014:

16.917.200,00 €

Research support at Verona CF centre 1997 - 2002:

777.217,00 €

Total research investment 1997 - 2014:

17.694.417,00 €

FFC projects 2012-2014 adopted by donors

Progetti FFC 2012-2013-2014 adottati da donatori

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

Adottato parzialmente da Danone SpA (€ 40.000), completamento adozione riservato



FFC#2/2012

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

Responsabile: Luis Galietta (Lab. Genetica Molecolare, Ist. "G. Gaslini", Genova)

Costo: € 160.000

Adottato totalmente da: **Donatori SMS solidale 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** (€ 24.500), **Amici per la Ricerca di Milano** (€ 16.700), **Delegazione FFC di Varese** (€ 17.000), **Iniziativa di Natale 2012** (€ 3.800)



FFC#3/2012

Studio del ruolo patogenetico e terapeutico del canale epiteliale del Na+ (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

Adottato parzialmente da Danone SpA (€ 35.000), completamento adozione riservato



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

Adottato parzialmente da Danone SpA (€ 50.000) completamento adozione riservato



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 totalmente 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), **Delegazione FFC di Lodi** (€ 8.000), **Delegazione FFC di Rovigo** (€ 8.000), **Cartasi** (€ 20.000), **Unicredit Banca** (€ 8.000)

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, Univ. 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

Adottato totalmente da: **Associazione Trentina FC onlus in ricordo di Vanessa Weber** (€ 10.000), **Delegazione FFC di Latina** (€ 20.000), **Delegazione FFC di Cecina** (€ 8.000), **Delegazione FFC di Imola** (€ 14.000), **Associazione Davide e Guido - Insieme - Fibrosi Cistica Trust** (€ 8.000)



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

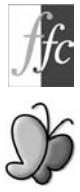
Antimicrobici di origine naturale per combattere le infezioni polmonari in pazienti affetti da fibrosi cistica: peptidi ibridi Cecropina A-Melittina e polimixine

Costo: € 50.000

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC del Lago di Garda**

Costo: € 50.000

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 totalmente da: **Delegazione FFC di Minerbe** (€ 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** (€ 14.000) **Delegazione FFC di Soverato** in ricordo di Emanuela Luly (€ 10.000)

FFC#14/2012

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

Responsabile: Maria Cristina Decheccchi (Lab. Patologia Molecolare, Laboratorio Analisi AOUI, Verona)
Costo: € 120.000



Adottato totalmente da: **Donatori visitatori della mostra "Picasso, capolavori dal Museo Nazionale Picasso di Parigi"** (€ 67.448), **Festa d'Estate Villa Sigurtà Verona** (€ 8.000), **Delegazione FFC del Lago di Garda con i Gruppi di Chivasso, Isola Bergamasca, Arezzo** (€ 44.552)

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 Soverato** in ricordo di Elena (€ 8.000), **Delegazione FFC di Torino** (€ 50.000), **Latteria Montello SpA** (€ 10.000), **LIFC con Associazioni Regionali per Campagna Nazionale FFC 2012** (€ 42.000)



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

Adottato totalmente da: **Paolo Faganelli con gli amici golfisti** in onore di Gigio Ruspa



FFC#17/2012
Il ruolo dell'endotelio vascolare nell'infiammazione della fibrosi cistica



Responsabile: Mario Romano (Dip. Scienze Biomediche, Univ. Chieti-Pescara, Lab. Med. Molecolare)
Costo: € 70.000



Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Pavia** (€ 10.000), **Donatori numero solidale 2013** (€ 60.000)



Poste mobile **noverca** **TELECOM ITALIA** **INFOSTRADA**
FASTWEB **TWT** **coop.voce** **teletu**

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



Adottato parzialmente da: **Zambon Group Farmaceutici** (€ 14.400), **Delegazione FFC di Bergamo** (€ 10.000), **Delegazione FFC Valdadige** (€ 8.600)
Adottabile per € 37.000

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 totalmente da: **Gruppo di Sostegno FFC di Seregno** (€ 15.000), **Antonio Guadagnini e Figlio Srl** (€ 8.000), **Delegazione FFC di Fermo** (€ 8.000), **Delegazione FFC di Cuneo Alba** (€ 10.000), **Delegazione FFC Il Sorriso di Jenny Cerea** (€ 9.000)

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)

FFC#1/2013

Analisi del meccanismo di azione mediante il quale la trimetilangelicina (TMA) ripristina l'espressione funzionale della proteina F508del CFTR



Responsabile: Valeria Casavola (Dip. di Bioscienze, Biotecnologie e Biofarmaceutica, Università di Bari)
Costo: € 100.000



Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Vicenza**

FFC#2/2013

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



Responsabile: Roberto Loi (Dip. Scienze Biomediche, Unità di Oncologia e Patologia Molecolare, Università di Cagliari)
Costo: € 25.000



Adottato totalmente da: **Studio Gia.Da Onlus**

FFC#3/2013

Correttori della ΔF508-CFTR derivanti da disegno computazionale e da composti naturali, classificati come sicuri, per una rapida applicazione clinica



Responsabile: Mauro Mazzei (Dipartimento di Farmacia, Università di Genova)
Costo: € 100.000



Adottato parzialmente da: **Progetto Foreverland** (€ 62.000). **Da adottare per € 38.000**



FFC#4/2013

CFTR in organoidi epiteliali: rilevanza per lo sviluppo di farmaci e la diagnosi della fibrosi cistica



Responsabile: Paola Melotti (Centro fibrosi cistica, AOUI Verona)
Costo: € 30.000



Adottato totalmente da: **Delegazioni FFC di Palermo, Vittoria- Ragusa e Catania 2**

FFC#5/2013

Una promettente terapia cellulare per la cura della Fibrosi Cistica: i progenitori cellulari associati ai vasi

Responsabile: Graziella Messina (Dip. di Bioscienze, Università degli Studi di Milano)

Costo: € 60.000



Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Bologna** (€ 45.000) in ricordo della Signora Serafica Meliota, **Delegazione FFC di Ferrara** (€ 15.000) in ricordo di Paola Ricci Donna ed Amica Speciale

FFC#6/2013

Messa a punto di una procedura semi automatizzata per la misura dell'attività di CFTR nei leucociti umani per applicazioni cliniche

Responsabile: Claudio Sorio (Dip. di Patologia, Sez. Patologia generale, Università di Verona)

Costo: € 40.000



Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Minerbe Verona** (€ 12.000), **Delegazione FFC di Imola e Romagna** (€ 28.000)

FFC#7/2013

Cellule epiteliali nasali: un nuovo approccio per la diagnosi di Fibrosi Cistica e delle sue forme atipiche

Responsabile: Giuseppe Castaldo (CEINGE-Biotecnologie Avanzate scarl, Napoli)

Costo: € 60.000



Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Latina** (€ 20.000), **Delegazione FFC di Sondrio Valchiavenna** (€ 10.000), **Cartasì** (€ 10.000), **Raffaele Madonna** (€ 20.000)



FFC#8/2013

Rivalutare molecole antibatteriche neglette come nuovi antibiotici contro specifici bersagli molecolari: derivati della pirazinamide come nuovi inhibitori di *Pseudomonas aeruginosa*

Responsabile: Federica Briani (Dip. di Bioscienze, Università degli Studi di Milano)

Costo: € 32.000



Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Montebelluna "La Bottega delle donne"**



FFC#9/2013

Infezioni da *Staphylococcus aureus* in pazienti con fibrosi cistica: sviluppo di nuovi beta-lattamici e molecole linezolid-simili come nuovi potenziali agenti antibatterici e valutazione in vitro e in vivo dei nuovi composti

Responsabile: Clementina Elvezia Cocuzza (Dip. di Chirurgia e Medicina interdisciplinare, Università Milano Bicocca)

Costo: € 52.000



Adottato totalmente da: **Gruppo di Sostegno FFC di Seregno** (€ 16.500), **Delegazione FFC di Cecina** (€ 15.500), **Delegazione FFC della Valpolicella** (€ 20.000)



FFC#10/2013

Terapie anti-virulenza contro *Pseudomonas aeruginosa*: identificazione di farmaci anti-biofilm e sviluppo di formulazioni inalatorie di Niclosamide e Flucitosina

Responsabile: Livia Leoni (Dip. di Scienze, Università "Roma Tre")

Costo: € 120.000



Adottato totalmente da: **Gruppo di Sostegno FFC di Tremestieri Messina** (€ 8.000), **Delegazione FFC di Verbania V.C.O.** (€ 12.000), **Delegazione FFC di Messina** (€ 10.000), **Delegazione FFC di Verona** (€ 20.000), **Antonio Guadagnin Figlio srl** (€ 8.000), **Delegazione FFC di Genova** (€ 10.000), **Delegazione FFC di Cosenza 2** (€ 8.000), **Delegazione FFC di Siena** (€ 8.000), **Loifur srl** (€ 10.000), **Amici per la Ricerca di Bassano** (€ 26.000)



LOIFUR



FFC#11/2013

Polveri inalabili per la somministrazione di peptidi antimicrobici umani (CAMP) chimicamente modificati: verso l'applicazione in vivo

Responsabile: Eugenio Notomista (Dip. Biologia, Università di Napoli "Federico II")

Costo: € 42.000



Adottato totalmente da: **Dompè Farmaceutici** (€ 10.000), **Delegazione FFC di Montescaglioso Matera** (€ 8.000), **Delegazione FFC di Foggia** (€ 8.000), **Delegazione FFC di Cerea Il Sorriso di Jenny** (€ 8.000), **Delegazione FFC di Reggio Calabria** (€ 8.000)

FFC#12/2013

Sviluppo preclinico del peptide antimicrobico M33 e inizio delle procedure regolatorie per la sperimentazione nell'uomo

Responsabile: Alessandro Pini (Dip. di Biotecnologie Mediche, Università di Siena)

Costo: € 90.000



Adottato totalmente da: **Delegazione FFC del Lago di Garda con i Gruppi di Sostegno di Chivasso, dell'Iso-la Bergamasca e di Arezzo** (€ 60.000), **Delegazione FFC di Verona** (€ 30.000)

FFC#13/2013

Veicolazione con niosomi della lattoferrina: effetto sulla riduzione dell'infiammazione e dell'infezione in epители respiratori affetti da fibrosi cistica

Responsabile: Francesca Berlotti (Dip. Salute Pubblica e Malattie infettive, Università "La Sapienza", Roma)



Costo: € 47.000

Adottato totalmente da: **Delegazioni FFC di Palermo, Vittoria- Ragusa e Catania 2**

FFC#14/2013

Rilevanza fisiopatologica dei glicosaminoglicani nelle infezioni croniche da *Pseudomonas aeruginosa* e validazione di nuovi approcci terapeutici per modularne l'infiammazione e il danneggiamento del tessuto polmonare

Responsabile: Cristina Cigana (Infections and Cystic Fibrosis Unit, HSR, Milano)

Costo: € 80.000



Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Milano**

FFC#15/2013

Effetti dell'acido lipoico sulla regolazione della proteostasi per il controllo dell'infiammazione in fibrosi cistica

Responsabile: Daniela De Stefano (I.E.R.F.C. - Fondazione ONLUS c/o HSR, Milano)

Costo: € 43.000



Adottato parzialmente da: **LIFC Associazione Lucana Onlus** (€ 15.000), **LIFC Associazione Emiliana Onlus** (€ 10.000), **LIFC con Associazioni regionali per la Campagna nazionale FFC 2013** (€ 8.000), **Assist Group** (€ 10.000)

FFC#16/2013

Fosfodiesterasi tipo-4 (PDE4) e recettori β2 adrenergici come potenziali bersagli farmacologici per ridurre l'infiltrazione neutrofilica e il danno polmonare nella fibrosi cistica. Studi preclinici e identificazione di biomarcatori di efficacia

Responsabile: Virgilio Evangelista (Dip. di Farmacologia Cellulare e Trasnazionale, Cons. Mario Negri Sud, Chieti)

Costo: € 90.000



Adottato totalmente da: **LIFC con Associazioni Regionali per la Campagna Nazionale FFC 2013** (€ 65.000), **Delegazione FFC di Lecce** (€ 10.000), **LIFC Associazione Emiliana Onlus** (€ 15.000)

FFC#17/2013

Studio pre-clinico di un nuovo approccio immunoterapeutico basato sulla somministrazione aerosolica di liposomi asimmetrici per potenziare la risposta immunitaria microbicida

Responsabile: Maurizio Fraziano (Dip. di Biologia, Università "Tor Vergata", Roma)

Costo: € 50.000

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Novara** (€ 10.000), **Delegazione FFC di Soverato** (€ 10.000), **Delegazione FFC di Montescaglioso Matera** (€ 8.000), **Delegazione FFC di Altamura Bari** (€ 8.000), **Delegazione FFC di Tradate Gallarate** (€ 14.000)



FFC#18/2013

Sviluppo di un modello di topo con fibrosi cistica, transgenico per IL-8/NF-KB, per il monitoraggio in vivo e a lungo termine della risposta infiammatoria indotta da batteri trattati e non con azitromicina

Responsabile: Maria M. Lleò (Dip. di Patologia e Diagnostica, Sez. Microbiologia, Università di Verona)

Costo: € 52.000

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Belluno con i Rocciatori di Fonzaso**



FFC#19/2013

Il ruolo dell'endotelio vascolare nell'infiammazione della fibrosi cistica

Responsabile: Mario Romano (Dip. Scienze Sperimentali e Cliniche, Lab. Medicina Molecolare, Università "G. D'Annunzio", Chieti-Pescara)

Costo: € 62.000

Adottato parzialmente da: **Delegazione FFC di Pavia** (€ 10.000), **Donatori numero solidale 2013** (€ 10.000), **Gruppo di Sostegno FFC di Isili - Cagliari** (€ 8.000), **Delegazione FFC di Genova** (€ 10.000), **Delegazione FFC di Imola e Romagna con Magia srl** (€ 8.000), **Delegazione FFC di Alba-Cuneo** (€ 8.000), **Famiglia Catalano** in ricordo di Riccardo (€ 8.000)



FFC#20/2013

Potenziale anti-infiammatorio e anti-fungino di inhibitori del metabolismo degli sfingolipidi in Fibrosi Cistica

Responsabile: Paola Signorelli (Dip. di Scienze della Salute, Facoltà di Medicina, Università di Milano)

Costo: € 105.000

Adottato totalmente da: **Fondazione Bruno Maria Zaini**

FFC#21/2013

Implicazioni cliniche della storia naturale dei deficit di secrezione e sensibilità insulinica in fibrosi cistica

Responsabile: Alberto Battezzati (International Center for the Assessment of Nutritional Status (ICANS) - DEFENS Università di Milano)

Costo: € 95.000

Adottato parzialmente da: **Compass Gruppo Mediobanca** (€ 8.000), **Donatori numero solidale 2014** (€ 52.000). Da adottare per € 35.000



FFC#22/2013

Fare o non fare lo screening del portatore sano del gene per la fibrosi cistica? La voce dei cittadini e della comunità scientifica

Responsabile: Paola Mosconi (Ist. di Ricerche Farmacologiche "Mario Negri" Laboratory for medical research and consumer involvement)

Costo: € 55.000

Adottato totalmente da: **Latteria Montello SpA** (€ 10.000), **"Un fiore per Valeria" Assemini - Cagliari** (€ 8.000), **Delegazione FFC di Pavia** (€ 10.000), **Delegazione FFC di Cecina Rosignano** (€ 10.000), **Gruppo di Sostegno FFC amici di Magenta - Milano** (€ 9.000), **Gruppo di Sostegno FFC di Riola Sardo** (€ 8.000)



ATTIVITÀ SOCIALI



FFC#23/2013

L'utilizzo della TAC torace nel monitoraggio dei pazienti pediatrici affetti da Fibrosi Cistica influenza l'approcchio clinico e terapeutico?

Responsabile: Harm Tiddens (Erasmus Medical Centre, Sophia Children's hospital, Department of Paediatric Pulmonology and Department of Radiology, Rotterdam)

Costo: € 30.000



Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Pesaro** (€ 20.000), **Audemars Piguet** (€ 10.000)



FFC#1/2014

Identificazione e validazione di nuove molecole ottenute da studi computazionali e saggi biologici per il superamento di codoni di stop prematuri in cellule FC

Responsabile: Laura Lentini (Dip. di Biologia, Scienze Chimiche e Farmaceutiche e Tecnologie -STEBICEF, Sez. di Biologia Cellulare, Università di Palermo)

Costo: € 38.000

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Palermo e di Vittoria Ragusa-Catania** 2

FFC#2/2014

Un approccio razionale nello sviluppo di nuovi farmaci per il trattamento della Fibrosi Cistica

Responsabile: Alberto Luini (Centro Nazionale Ricerche, Dip. di Scienze Biomediche, Istituto di Biochimica delle Proteine, Napoli)

Costo: € 80.000

Adottato parzialmente da: **Loifur Srl** (€ 10.000), **Delegazione FFC di Imola e Romagna** (€ 30.000)

Adottabile per € 40.000



FFC#3/2014

CFTR in organoidi epiteliali: rilevanza per lo sviluppo di farmaci e la diagnosi della fibrosi cistica

Responsabile: Paola Melotti (Centro Fibrosi Cistica, Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata di Verona)

Costo: € 30.000

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Treviso Montebelluna "La Bottega delle Donne"**

FFC#4/2014

La struttura molecolare e il ripiegamento dell'intero Regolatore Transmembrana della Fibrosi Cistica (CFTR): siti per i correttori

Responsabile: Oscar Moran (Istituto di Biofisica, Consiglio Nazionale delle Ricerche-CNR, Genova)

Costo: € 45.000

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Bologna**



FFC#5/2014

Un approccio basato su piccoli RNA per la correzione dei difetti di splicing del gene CFTR: analisi della efficacia in cellule primarie bronchiali

Responsabile: Franco Pagani (Centro Internazionale di Ingegneria Genetica e Biotecnologie- ICGB, Trieste)

Costo: € 38.000

Adottato totalmente da: **Gruppo di Sostegno FFC di Sassari Castelsardo** (€ 15.000), **Delegazione FFC di Minerbe** (€ 23.000)



FFC#6/2014

Sviluppo di nuove procedure per l'identificazione di farmaci diretti verso il recettore CFTR: un approccio multidisciplinare mediante saggi di interazione in risonanza plasmonica di superficie supportata da strategie bioinformatiche su infrastrutture HPC

Responsabile: Marco Rusnati (Dip. di Medicina Molecolare e Traslazionale, Università di Brescia, Unità Analisi Interazione Macromolecolare-Sez. di Oncologia Sperimentale e Immunologia)

Costo: € 38.000

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Foggia** (€ 8.000), **Latteria Montello S.p.A.** (€ 15.000), **Delegazione FFC di Manciano - Grosseto** (€ 15.000)



FFC#7/2014

Un approccio chinasi-diretto per ristabilire la funzionalità di F508delCFTR

Responsabile: Andrea Venerando (Dip. Scienze Biomediche, Università di Padova)

Costo: € 40.000

Adottato totalmente da: **Open d'Italia Golf**



Adottato parzialmente da: **Delegazione FFC di Olbia**

Tempio (€ 8.000)

Adottabile per € 33.000

FFC#8/2014

Disegno e sintesi di analoghi della trimetilangelicina (TMA) per ottimizzare le applicazioni cliniche per la fibrosi cistica: attività anti-infiammatoria, potenziatore CFTR e correttore CFTR

Responsabile: Roberto Gambari (Dip. di Scienze della Vita e Biotecnologie, Sez. di Biochimica e Biologia Molecolare, Università di Ferrara)

Costo: € 45.000

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Bologna** (€ 30.000), **Delegazione FFC di Ferrara** (€ 15.000)

**FFC#14/2014**

Sviluppo di BMAP18 come farmaco peptidico per le infezioni polmonari batteriche: uno studio per migliorarne l'efficacia nell'ambiente polmonare della FC

Responsabile: Marco Scocchi (Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Trieste)

Costo: € 26.000

Adottato totalmente da: **Studio Gi.Da. Onlus**

FFC#15/2014

Infezioni nei pazienti con fibrosi cistica: effetto delle variazioni genetiche di PTX3 sulla produzione e sulle funzioni della PTX3 endogena

Responsabile: Cecilia Garlanda (Fondazione Humanitas per la Ricerca, Rozzano, Milano)

Costo: € 40.000

Adottato parzialmente da: **Gruppo di sostegno FFC di Seregno** (€ 19.000), **Delegazione FFC di Messina** (€ 10.000)

Adottabile per € 11.000

**FFC#9/2014**

Geni modificatori legati alla malattia polmonare da Pseudomonas aeruginosa in fibrosi cistica

Responsabile: Alessandra Bragonzi (Unità di Infezioni e Fibrosi cistica, Divisione di Immunologia, Trapianti e Malattie infettive, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano)

Costo: € 78.000

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Milano**

FFC#10/2014

Indagine del microbioma delle vie aeree nei pazienti con fibrosi cistica che presentano un severo declino della funzione polmonare: un'opportunità per una terapia personalizzata basata sul microbioma

Responsabile: Annamaria Bevvivino (Unità Tecnica per il Sistema di Sviluppo Sostenibile e Innovazione Agroindustriale, ENEA Agenzia Nazionale Italiana, Centro Ricerche Casaccia, Roma)

Costo: € 48.000

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Villa D'Almè Bergamo** (€ 10.000), **Gruppo di Sostegno FFC di Reggello Firenze** (€ 10.000), **Gruppo di Sostegno FFC di Lainate** (€ 10.000), **Delegazione FFC di Verbania V.C.O.** (€ 18.000)

**FFC#11/2014**

Sviluppo e test preclinico di un nuovo peptide antimicrobico per il trattamento di infezioni polmonari indotte da Pseudomonas aeruginosa

Responsabile: Maria Luisa Mangoni (Dip. di Scienze Biochimiche, Università "La Sapienza", Roma)

Costo: € 53.000

Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Siena** (€ 20.000), **Delegazione FFC di Sondrio Valchiavenna** (€ 10.000), **Delegazione FFC di Cerea Il Sorriso di Jenny** (€ 8.000), **Delegazione FFC di Pavia** (€ 15.000)

**FFC#12/2014**

Polveri inalabili per la somministrazione di peptidi antimicrobici umani (CAMP) chimicamente modificati: verso l'applicazione in vivo

Responsabile: Eugenio Notomista (Dip. di Biologia, Università di Napoli "Federico II")

Costo: € 22.000

Adottato parzialmente da: **Antonio Guadagnin e Figlio** (€ 8.000). Adottabile per € 14.000

**FFC#17/2014**

I canali TRPA1 come nuovi target molecolari per le terapie antiinfiammatorie dei polmoni FC

Responsabile: Giulio Cabrini (Laboratorio di Patologia Molecolare, Dip. di Patologia e Diagnostica, Università di Verona)

Costo: € 50.000

Adottabile

FFC#18/2014

Terapie inalanti con Glutathione in fibrosi cistica: quanto sono utili, quanto sicure? Messa a punto di un modello murino di fibrosi cistica per il monitoraggio dell'infiammazione in vivo e la valutazione di trattamenti alternativi

Responsabile: Alessandro Corti (Dip. di Ricerca Traslazionale NTMS - Lab. Patologia Generale, Università di Pisa)

Costo: € 56.000

Adottato parzialmente da: **Delegazione FFC della Valpolicella** (€ 30.000), **Delegazione di Latina** (€ 10.000)

Adottabile per € 16.000

**FFC#19/2014**

Il Ca²⁺ mitocondriale media l'attivazione dell'inflammazoma esasperando la risposta infiammatoria nell'infezione da Pseudomonas aeruginosa

Responsabile: Paolo Pinton (Dip. di Morfologia, Chirurgia e Medicina Sperimentale, Lab. Trasduzione del Segnale, Università di Ferrara)

Costo: € 62.000

Adottabile

FFC#20/2014

Identificazione e caratterizzazione di peptidi umani in grado di neutralizzare LPS batterici: potenziali strumenti per il controllo dell'infiammazione polmonare in fibrosi cistica

Responsabile: Eliodoro Pizzo (Lab. di Struttura e Fun-

**FFC#13/2014**

Utilizzo di inibitori della proteina Disolfuro Isomerasi extracellulare per controllare le infezioni polmonari da Burkholderia cenocepacia

Responsabile: Francesca Pacello (Dip. di Biologia, Università di Roma "Tor Vergata")

Costo: € 41.000

zione delle Proteine-SFP, lab. group-presso il Dip. di Biologia, Università di Napoli "Federico II")
Costo: € 35.000

Adottabile

FFC#21/2014

Resolvin D1 per il trattamento dell'infiammazione ed infusione cronica in fibrosi cistica

Responsabile: Antonio Recchiuti (Dip. di Scienza Clinica e Sperimentale e Centro di Eccellenza sull'Invecchiamento-CeSl, Università "G. d'Annunzio", Chieti-Pescara)

Costo: € 65.000

Adottabile

FFC#22/2014

Antagonisti della risposta infiammatoria mediata da linfociti Th17 nella Fibrosi Cistica: valutazione pre-clinica dell'efficacia di Anakinra

Responsabile: Luigina Romani (Dip. di Medicina Sperimentale, Università di Perugia)

Costo: € 70.000

Adottato parzialmente da: **Delegazione FFC di Pesaro** (€ 25.000).

Adottabile per € 45.000



FFC#23/2014

Meccanismi e Rilevanza Clinica della Disfunzione Endoteliale nella Fibrosi Cistica

Responsabile: Mario Romano (Dip. di Scienze Sperimentali e Cliniche, Lab. di Medicina Molecolare Molecolare, Università "G. D'Annunzio", Chieti-Pescara)

Costo: € 60.000

Adottabile

FFC#24/2014

Ruolo della glucocerebrosidasi GBA2 nell'infiammazione polmonare in fibrosi cistica: dal meccanismo molecolare a nuove strategie terapeutiche

Responsabile: Sandro Sonnino (Dip. di Biochimica Medica e Medicina Traslazionale, Univ. di Milano)

Costo: € 76.000

Adottabile

FFC#25/2014

PI3Kγ: un nuovo bersaglio terapeutico per riattivare il CFTR e ridurre l'infiammazione e l'ostruzione delle vie aeree nella fibrosi cistica

Responsabile: Emilio Hirsch (Dip. di Biotecnologie Molecolari e Scienze per la Salute, Università di Torino, Centro di Biotecnologia Molecolare)

Costo: € 50.000

Adottabile



FFC#26/2014

Compromissione del sistema delle IgA secretorie ed immunità mucosa nella fibrosi cistica: ruolo nella patologia polmonare e nella suscettibilità all'infezione batterica, e ruolo delle alterazioni epiteliali correlate al difetto di CFTR nella regolazione della "transcitosis" recettore-mediata delle IgA

Responsabile: Charles Pilette (Université Catholique de Louvain, Brussels)

Costo: € 48.000



Adottato parzialmente da: **Delegazione FFC di Lecce** (€ 15.000). **Adottabile per € 33.000**

FFC#27/2014

Trasmissibilità e significato clinico delle diverse sottospecie di Mycobacterium abscessus in pazienti con fibrosi cistica

Responsabile: Enrico Tortoli (Unità Patogeni Batterici Emergenti, Divisione di Immunologia, trapianto e Malattie Infettive, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano)

Costo: € 80.000

Adottabile

FFC#28/2014

Studio in vitro del potenziale ruolo profibrotico di Everolimus su diversi tipi di cellule polmonari e ricerca di nuovi biomarker per ottimizzare il trattamento immunosoppressivo con inibitori di mTOR in pazienti con fibrosi cistica sottoposti a trapianto di polmone

Responsabile: Gianluigi Zaza (Unità di Nefrologia, Dip. di Medicina, Azienda Universitaria Ospedaliera, Verona)



Costo: € 38.000
Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Torino** (€ 20.000), **Delegazione FFC di Lodi** (€ 8.000)
Delegazione di Latina (€ 10.000)

FFC#29/2014

Proprietà del muco delle vie aeree in fibrosi cistica: loro modifica a causa di cambiamenti nell'attività di CFTR e dopo applicazione di bicarbonato

Responsabile: Olga Luisa A. Zegarra (U.O.C. Genetica Medica, Istituto "Giannina Gaslini", Genova)

Costo: € 35.000



Adottato totalmente da: **Delegazione FFC di Genova** (€ 15.000), **Delegazione FFC di Cecina Rosignano** (€ 20.000)

Progetto strategico 2014-2017

Progetto FFC /TFCF "Task Force for Cystic Fibrosis"

Responsabile: Luis Galietta (Lab. Genetica Molecolare, Ist. G. Gaslini, Genova)

Costo: complessivo € 1.250.000; fase I € 200.000

Adottato totalmente I fase da: **Energy T.I. Group S.p.A. Milano** (€ 180.000), **LIFC Associazione Siciliana Onlus** (€ 20.000)



Servizi alla Ricerca (Facilities) 2012-2014

Servizio "CFaCore" (Cystic Fibrosis Animal Core Facility) 2 (2012-2015)

Responsabile: Alessandra Bragonzi (Istituto di Ricerca San Raffaele, Milano)

Costo: € 512.000



Adottato parzialmente da: **Patrizio Pignato** lascito testamentario (€ 50.000), **Novartis Farma SpA** (€ 10.670), **Delegazione FFC di Pavia** (€ 10.000), **Delegazione FFC di Marsala Trapani** (€ 8.000), **Delegazione FFC di Villa D'Almè Bergamo** (€ 12.000), **Loris Camprini** con il libro "Un milione di chilometri in moto" (€ 20.000), **LIFC Associazione FC Sardegna Onlus** (€ 8.000), **Fashionart Concept** (€ 10.000), **Residuo non utilizzato adozioni progetti 2009-2010** (€ 135.006), **Pirelli & C. SpA** (€ 20.000), **Affigem** (€ 8.000), **Gare Golf** (€ 20.000), **Raffaele Madonna** (€ 10.000)

Adottabile per € 190.324

Servizio "QuantiGENE" (Quantificazione della espressione genica) (2012-2014)

Responsabile: Giulio Cabrini (Laboratorio Patologia Molecolare, Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata, Verona)

Costo: € 30.000



Adottato totalmente da: **Delegazione FFC della Valpolicella Verona**



Omnia Medic



Servizio "Colture Primarie" (Primary Cell Cultures) 1 (2012-2014)

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)

CFDB Cystic Fibrosis Data Base 2 (2013-2014)

Responsabile: Roberto Buzzetti

Costo: € 50.000



Adottato parzialmente da: **LIFC con Associazioni Regionali per Campagna Nazionale FFC 2012** (€ 24.000)

Adottabile per € 26.000

CFDB Cystic Fibrosis Data Base 3 (2014-2015)

Responsabile: Roberto Buzzetti

Costo: € 20.000

Adottabile

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
Vice Presidente: Matteo Marzotto
Consiglieri: Eugenio Bertolotti
Sandro Caffi
Paolo Del Debbio
Giuseppe Ferrari
Gianni Mastella
Giulio Pedrollo
Michele Romano
Luciano Vettore

Direzione Scientifica
– Direttore Scientifico: Gianni Mastella
Tel. 045 8123567
e-mail: gianni.mastella@ospedaleuniverona.it
– Vicedirettore Scientifico: Graziella Borgo
Tel. 045 8127027 / 346 5126013
e-mail: borgograziella@gmail.com

Comitato di Consulenza Scientifica
Presidente: Lucio Luzzatto
Consulenti: Giorgio Berton
Paola Bruni
Roberto Buzzetti
Gian Maria Rossolini

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
- 5 x mille dell'IRPEF

Le donazioni sono deducibili fino al 10% del reddito complessivo
e comunque non oltre 70.000 euro/anno (art. 14 legge n. 80/2005)

Redazione:

Gianni Mastella, Graziella Borgo,
Tecla Zarantonello, Laura Fratta

Grafica ed impaginazione:

Ada Frapparti

Stampa:

Tipolitografia Artigiana snc
San Giovanni Lupatoto (VR)
Stampato il 18 novembre 2014



Certificazione IID 2008/10
Aderiamo agli standard
della Carta della Donazione

www.fibrosicisticaricerca.it



**Fondazione Ricerca
Fibrosi Cistica - Onlus**
italian cystic fibrosis research foundation

In collaborazione con



Azienda Ospedaliera
Universitaria Integrata
Verona

