

CONSORZIO INTERUNIVERSITARIO

***Istituto Nazionale
Biostrutture e Biosistemi***

4° CONVEGNO NAZIONALE

ROMA, 16-18 NOVEMBRE 2000

***AULA MARCONI - CNR
PIAZZALE ALDO MORO, 7
ROMA***

Comitato Scientifico

Prof. Damiano Gustavo Mita

Prof. Alberto Cangiano

Prof. Claudio Cobelli

Prof. Giulio Magni

Prof. Adelio Rigo

Prof. Vittorio Tomasi

Comitato Organizzatore

Prof. Damiano Gustavo Mita

Dott. Paolo Occhialini

Sig.ra Lucia Occhioni

Segreteria Organizzativa

I.N.B.B.

Viale delle Medaglie D'Oro, 305

00136 Roma

Tel 06/3234195 Fax. 06/3218250

INDICE

<i>Programma IV Convegno Nazionale</i>	<i>Pag. 4</i>
<i>Abstract relazioni ad invito e comunicazioni</i>	<i>Pag. 7</i>
<i>Abstract poster</i>	<i>Pag. 35</i>
<i>Unità di Ricerca INBB</i>	<i>Pag. 65</i>

Informazioni in merito al Consorzio, come: Elenco Aderenti, Statuto e Laboratorio Nazionale possono essere reperite nel sito www.inbb.it

IV CONVEGNO NAZIONALE
Programma

Giovedì 16 novembre 2000

h. 9,30 Registrazione dei partecipanti

h. 10,30 Apertura dei lavori
Saluto del PROF. LUCIO BIANCO (*Presidente CNR*)

h. 10,45 Relazione introduttiva
PROF. DAMIANO GUSTAVO MITA (*Presidente I.N.B.B.*)

h. 11,30 Coffee break

h. 11,45 Tavola Rotonda
“Evoluzione della scienza e della tecnologia: priorità di ricerca e prospettive della docenza”

Partecipano:

ON. ANTONINO CUFFARO (*Sottosegretario MURST*)

PROF. LUCIO BIANCO (*Presidente CNR*)

PROF. GIUSEPPE D’ASCENZO (*Rettore dell’Univ. di Roma “La Sapienza”*)

PROF. CLAUDIO NICOLINI (*Univ. GE - Presidente Polo Nazionale Bioelettronica*)

PROF. ALDO PINCHERA (*Vice Presidente CUN*)

PROF. SANDRO PONTREMOLI (*Rettore Univ. Genova - CRUI*)

PROF. FRANCO SALVATORE (*Presidente Federazione Italiana Società Biologiche*)

PROF. RENATO UGO (*Vice Presidente Assobiotec*)

h. 13,30 Pausa

h. 15,00 **Sessione “Biosistemi e Bioregolazioni”**

Chairman: PROF. VANNI TAGLIETTI

Relazione ad invito: PROF. VITTORIO TOMASI
“Oligonucleotidi antisenso e Molecular Beacons”

Comunicazioni scientifiche

1. Dott. Giuseppe Calamita *“Canale per l’Acqua AQP8: topologia di membrana, organizzazione gnomica ed espressione tissutale”*

2. Prof. Michele Mazzanti *“Il canale ionico al cloro NCC27 è coinvolto nel ciclo cellulare in cellule CHO”*

3. Prof. Egidio D’Angelo *“Memoria e computazione in circuiti neuronali”*

h. 16,50 Coffee break

h. 17,10 **Sessione “Biostrumentazione e Bioelettronica”**

Chairman: PROF. CLAUDIO COBELLI

Relazione ad invito: PROF. MASSIMO GRATTAROLA
“Reti bioartificiali di neuroni”

Comunicazioni scientifiche

1. Prof. Danilo De Rossi *“Attuatori: polimeri conduttori e nanotubi al carbonio”*

2. Dott.ssa Arti Ahluwalia *“Microfabbricazione di strutture organiche e patterning superficiale per l’adesione di biomolecole”*

3. Prof. Sergio Martinoia *“Microlavorazione del silicio e micrometrici per elettrofisiologia non-convenzionale”*

h. 19,00 Chiusura dei lavori della giornata

Venerdì 17 novembre 2000

h. 9,30 **Sessione “Neuroscienze”**

Chairman: PROF. CARLO DI BENEDETTA

Relazione ad invito: PROF. ALBERTO CANGIANO

“Plasticità e competizione sinaptica attività-dipendenti durante lo sviluppo delle giunzioni neuromuscolari”

Comunicazioni scientifiche

- 1. Prof. Gianfranco Gennarini** *“Modelli transgenici per lo studio dell’espressione regolata di glicoproteine adesive assionali nello sviluppo e morfogenesi neurali”*
- 2. Prof. Giuseppe Busetto** *“Attività di scarica dei motoneuroni durante lo sviluppo nel mammifero”*
- 3. Prof. Ferdinando Rossi** *“Ruolo di fattori ambientali nella regolazione delle proprietà intrinseche di crescita e rigenerazione assonale dei neuroni cerebellari”*
- 4. Dott. Agostino Palmeri** *“Effetti della stimolazione magnetica transcranica sul periodo silente della risposta muscolare durante deafferentazione periferica transitoria, nell’uomo”*

h. 11,20 Coffee break

h. 11,40 **Sessione “Cellule”**

Chairman: PROF. LUCIO ANNUNZIATO

Relazione ad invito: PROF. FRANCESCO CLEMENTI

“I recettori colinergici nicotinici: loro ruolo fisiologico in patologia”

Comunicazioni scientifiche

- 1. Prof. Maurizio Tagliatela** *“Modulazione da parte dei ROS e del NO sui canali del K⁺ di tipo HERG”*
- 2. Dott. Paolo Madeddu** *“Angiogenesi terapeutica con gene umano della callicreina nel trattamento delle vasculopatie periferiche”*
- 3. Prof.ssa Stella Annamaria Giuffrida – Prof. Daniele Condorelli** *“Canali intracellulari nel Sistema Nervoso: caratterizzazione molecolare e funzionale”*

h. 13,30 Lunch

h. 15,00 **Sessione “Biotecnologie”**

Chairman: PROF. ANTONINO CASCINO

Relazione ad invito: PROF. IVANO MARCO BERTINI

“Verso la caratterizzazione strutturale del tipo high throughput di metalloproteine paramagnetiche via NMR”

Comunicazioni scientifiche

- 1. Prof. Mosè Rossi** *“Gli enzimi da estremofili: una rivisitazione”*
- 2. Prof. Bruno Samorì** *“Alla scoperta con il Microscopio a Scansione di Forza di come la sequenza pilota le fluttuazioni conformazionali e le proprietà meccaniche locali del DNA”*
- 3. Prof.ssa Rita Casadio** *“La predizione strutturale di proteine di membrana”*

h. 16,50 Pausa

h. 17,10 Tavola Rotonda

“Consorzi Interuniversitari: ruolo e prospettive nel sistema di ricerca nazionale”

Moderatore:

PROF. DAMIANO GUSTAVO MITA

Partecipano:

ON. PROF. VINCENZO SICA (*Sottosegretario MURST*)

ON. GIOVANNI CASTELLANI (*Pres. VII Comm. Camera*)

DOTT. GIOVANNI D’ADDONA (*Capo Dipartimento MURST*)

ON. ALDO D’ALESSIO (*Seg. Gen. Comitato Parlamentare per l’Innovazione Tecnologica*)

PROF. FRANCESCO M. FARANDA (*Presidente CONISMA*)

PROF. DANTE GATTESCHI (*Dir. Consorzio INSTM*)

PROF. MAURO MAGNANI (*Dir. Consorzio Biotecnologie*)

h. 19,00 Chiusura dei lavori della giornata

Sabato 18 novembre 2000

h. 9,00 Sessione “Unità Funzionali Biologiche Supramolecolari”

Chairman: PROF. ADELIO RIGO

Relazione ad invito: PROF. CLAUDIO NICOLINI

“Biofisica degli acidi nucleici”

Comunicazioni scientifiche

1. Prof. Damiano Gustavo Mita *“Biofisica delle interazioni fra gradienti di temperatura ed attività di enzimi immobilizzati”*

2. Prof. Alfredo Colosimo *“Analisi statistica multivariata di segnali biologici spazio- e tempo- dipendenti”*

3. Prof. Antonino Cattaneo *“Protein Know-out”*

4. Prof. Gaetano Irace *“Basi molecolari della stabilità strutturale delle proteine”*

h. 11,00 Coffee break

h. 11,15 Sessione “Biomolecole”

Chairman: PROF. GIULIO MAGNI

Relazione ad invito: PROF. GIUSEPPE ROTILIO

“Biomolecole dello stress ossidativo e della difesa antiossidante”

Comunicazioni scientifiche

1. Dott. Edon Melloni *“Modificazioni post-traduzionali dell'inibitore calpastatina coinvolte nella regolazione della proteolisi calcio-dipendente”*

2. Prof. ssa Bruna Tadolini *“Resveratrolo perossidazione lipidica”*

3. Prof. Carlo Ventura *“Meccanismi molecolari responsabili del differenziamento cardiaco in cellule staminali totipotenti”*

h. 13,30 Chiusura del Convegno

ABSTRACT
DELLE RELAZIONI AD INVITO
E
DELLE COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE

Sessione di Biosistemi e Bioregolazioni

ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES AND MOLECULAR BEACONS

Prof. Vittorio Tomasi

Dipartimento di Biologia – Università degli Studi di Bologna – Via Selmi, 3 40126 Bologna
Tel. 051/2094147 e-mail: tomasi@kaiser.alma.unibo.it

In the field of antisense oligonucleotides, two new aspects are emerging : studies about the mechanism of actions of antisense having a nucleotropic sequence (Tomasi et al ,Nucleosides Nucleotides 1998) and use of molecular beacons to follow antisense induced pre-mRNA alternative splicing.

The interest in antisenses having a sequence leading them to the nucleus is connected mainly to their enhanced efficacy when used in vivo. We have detected one of these sequences ,but many more probably exist (Griffoni et al ,submitted).

Molecular beacons are defined as antisense sequences terminating with regions GC-rich in order to create a terminal hairpin. To 5' end a fluorophore and to 3' end a quencher are inserted. In the native state molecular beacons do not fluoresce, however binding to the target dissociate GC-rich regions and the quencher no more inhibits the fluorophore.

Thus ,molecular beacons not only allow detection and quantification of any mRNA but likely allow to kinetically follows the fate of any mRNA.

These two aspects are accelerating very much the field of antisense oligonucleotides.

CANALE PER ACQUA AQP8: TOPOLOGIA DI MEMBRANA, ORGANIZZAZIONE GENOMICA ED ESPRESSIONE TISSUTALE

Giuseppe Calamita¹, Amelia Mazzone¹, Giovanna Valenti¹, Mariano Rocchi² e Maria Svelto¹

¹Dip. di Fisiologia Generale ed Ambientale e ²Dip. di Anatomia Patologica e di Genetica, Università degli Studi di Bari, Bari. E-mail: calamita@biologia.uniba.it

Le acquaporine (AQP) costituiscono una famiglia di canali per l'acqua proteici largamente distribuiti in natura dove mediano il trasporto osmotico di acqua ed in alcuni casi anche di piccoli soluti anaelettroliti attraverso le membrane plasmatiche. I fenotipi derivanti da mutazioni di geni codificanti per acquaporine stanno dimostrando ruoli fisiologici e fisio-patologici di fondamentale importanza per queste proteine. Notevole interesse è suscitato dalla recente scoperta di AQP8, un'acquaporina di mammifero espressa nell'apparato gastro-enterico ed in quello riproduttore maschile. Nel presente lavoro noi riportiamo (i) la struttura del gene *Aqp8*, (ii) la caratterizzazione biochimica della relativa proteina e (iii) la localizzazione cellulare e subcellulare di AQP8 nell'apparato riproduttore maschile di ratto. Il gene *Aqp8* è strutturalmente costituito da sei esoni e cinque introni. Ad eccezione del sito relativo al primo introne, i siti di *splicing* degli introni rispettano la regola GT-AG. Una serie di elementi di regolazione in *-cis* (GATA, CAAT e Sp1) è riscontrata nel promotore prossimale di *Aqp8* dove, curiosamente, non si riscontra la presenza di un *TATA box* canonico. Analisi di primer extension e RNase protection localizzano tre siti di inizio della trascrizione. Esperimenti di Southern blot e di FISH dimostrano che *AQP8* è un gene in singola copia localizzato sui cromosomi 7F3 e 16p12 rispettivamente di topo ed umano. Analisi bioinformatiche indicano una distinta filogenesi per *AQP8* rispetto alle altre acquaporine di mammifero. Esperimenti di RT-PCR e di RNase protection hanno evidenziato l'espressione di *AQP8* nel testicolo, rene, digiuno, colon, fegato, pancreas, colecisti e placenta. Analogamente alle altre acquaporine, il profilo idrofobico di AQP8 corrisponde a quello di una proteina intrinseca di membrana organizzata in sei segmenti transmembrana e cinque anse di connessione. Mediante immunoblotting del testicolo di ratto, la proteina AQP8 appare come una banda discreta di 25 kDa ed una componente diffusa di 32-40 kDa corrispondente alla forma N-glicosilata. Esperimenti di frazionamento di membrane di testicolo di ratto rivelano la presenza di AQP8 in frazioni di membrane microsomiali oltre che in frazioni di membrane plasmatiche. Studi di immunofluorescenza evidenziano una forte espressione di AQP8 nelle cellule germinali del tubulo seminifero di ratto durante tutte le fasi della spermatogenesi sebbene una maggiore immunoreattività è osservata a livello degli spermatoцитi. In linea con gli studi di immunoblotting, AQP8 è localizzato sia a livello della membrana plasmatica che nella membrana di alcune vescicole intracellulari. Esperimenti di immunocitochimica sono attualmente in corso per localizzare AQP8 anche nell'apparato gastro-enterico. Allo scopo di analizzare alcuni possibili ruoli funzionali di AQP8 quali quello di mediare il trasporto osmotico d'acqua attuato nel corso della spermatogenesi, nella secrezione di bile, succo pancreatico e saliva primaria, nella disidratazione fecale a livello del colon e nel trasporto di fluido attraverso il sincizio trofoblastico della placenta, il nostro laboratorio è impegnato nella generazione di topi transgenici AQP8. Il fenotipo espresso da tali topi potrebbe anche evidenziare ruoli fisiologici non ancora ipotizzati al presente e fornire utili indicazioni su possibili implicazioni di AQP8 in patologie umane di origine molecolare ancora sconosciuta.

Borgnia M.J., Nielsen S., Engel A., Agre P. Cellular and molecular biology of the aquaporin water channels. *Annu Rev Biochem* 1999; 68:425-458.

Ishibashi K., Kuwahara Y., Kageyama A., Tohsaka F., Marumo F., Sasaki S. Cloning and functional expression of a second new aquaporin abundantly expressed in testis. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 237:714-718.

Calamita G., Spalluto C., Mazzone A., Rocchi M., Svelto M. Cloning, structural organization and chromosomal localization of the mouse aquaporin-8 water channel gene. *Cytogenet Cell Genet* 1999; 185:237-241.

Viggiano L., Rocchi M., Svelto M., Calamita G. Assignment of the aquaporin-8 water channel gene (AQP8) to human chromosome 16p12. *Cytogenet Cell Genet* 1999; 84:208-210.

IL CANALE IONICO AL CLORO NCC27 E' COINVOLTO NEL CICLO CELLULARE IN CELLULE CHO.

Prof. Michele Mazzanti

Dipartimento di Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Università La Sapienza, Ple Aldo Moro 5 00185 Roma.

NCC27 è uno dei poche canali ionici nucleari ad essere stato clonato. Si tratta di una proteina di 27 kD che fu originariamente clonata e caratterizzata da una libreria di sottrazione di cDNA specifica per trovare attivazione di gene in macrofagi attivati (1). NCC27 è inaspettatamente piccola per essere un canale ionico. In una recente ricerca (2), abbiamo mostrato evidenze dirette che NCC27 è di fatto una proteina transmembranica che forma un componente essenziale di un canale ionico. Abbiamo anche intrapreso uno studio approfondito di elettrofisiologia al fine di caratterizzare dal punto di vista biofisico questo canale. NCC27 ha un alto grado di omologia con un altro canale di cloro intracellulare denominato p64, originariamente isolato dal rene di bovino (3). Vi sono altri tre canali ionici che sono molto simili a NCC27 descritti recentemente (4) (5) (6). Con l'ultimo membro di questa famiglia, CLIC3, si può osservare che vi è una predominanza di canali ionici al cloro presenti nell'involucro nucleare. CLIC3 ha inoltre la proprietà di legarsi alla mitogen-activated protein kinase, ERK7, suggerendo un suo ruolo nella regolazione della crescita cellulare (6).

Data la localizzazione nucleare di NCC27, la sua ampia distribuzione in diverse cellule e la sua alta conservazione di sequenza tra diverse specie, si ipotizza che NCC27 potrebbe essere coinvolto nella regolazione del ciclo cellulare. Nel presente lavoro dimostriamo come la conduttanza al cloro di NCC27 possa interagire con le fasi del ciclo cellulare.

Reference List

1. Valenzuela, S.M.; Martin, D.K.; Por, S.B.; Robbins, J.M.; Warton, K.; Bootcov, M.R.; Schofield, P.R.; Campbell, T.J.; Breit, S.N. Molecular cloning and expression of a chloride ion channel of cell nuclei. 1997. *Journal of Biological Chemistry* 271, 12575-12582.
2. R. Tonini, A. Ferroni, S. M. Valenzuela, K. Warton, T. J. Campbell, S.N. Breit and M. Mazzanti. 2000. Functional characterization of the NCC27 nuclear protein in stable transfected CHO-K1 cells. *FASEB J.* 14, 1171-1178.
3. Landry, D., Sullivan, S., Nicolaidis, M., Redhead, C., Edelman, A., Field, M., al-Awqati, Q. & Edwards, J. (1993) *Journal of Biological Chemistry*. **268**, 14948-14955.
4. Duncan, R. R., Westwood, P. K., Boyd, A. & Ashley, R. H. (1997) *Journal of Biological Chemistry*. **272**, 23880-23886.
5. Heiss, N. S. & Poustka, A. (1997) *Genomics* **45**, 224-228.
6. Qian, Z., Okuhara, D., Abe, M. K. & Rosner, M. R. (1999) *Journal of Biological Chemistry*. 274, 1621-1627.

MEMORIA E COMPUTAZIONE IN CIRCUITI NEURONALI

Prof. Egidio D'Angelo

Dipartimento di Fisiologia e Farmacologia Cellulari e Molecolari ed INFM, Università di Pavia
Dipartimento di Biologia Evolutiva e Funzionale, Università di Parma

Le funzioni nervose sono basate sulla generazione di segnali elettrici nella membrana cellulare dei neuroni, e sulla interconversione di segnali elettrici e chimici nelle sinapsi. Tali processi elementari, che sono in buona parte chiariti nella loro natura fisico - molecolare, consentono ai neuroni e alle sinapsi di codificare e memorizzare l'informazione. Quest'ultimo processo è noto come plasticità sinaptica. Codificazione e plasticità sono alla base delle operazioni svolte dalle reti neuronali, quali il riconoscimento di immagini o la selezione di azioni motorie appropriate. Si ritiene che l'assemblaggio di reti neuronali in "sistemi nervosi" consenta infine la generazione delle funzioni cognitive e del comportamento.

La rete neuronale del cervelletto è ben caratterizzata, ed il suo output è principalmente motorio e quindi quantificabile (Eccles et al., 1967; Ito, 1984). La funzione della rete cerebellare è stata suggerita dalla "motor learning theory" di Marr (1969) e da numerosi altri modelli teorici. La "motor learning theory" prevede che la memoria cerebellare risieda esclusivamente alla sinapsi tra fibre parallele e cellule del Purkinje, mentre l'input proveniente dalle fibre muscolari trasdurrebbe linearmente la scarica di impulsi convogliati dalle fibre muscolari operando una "sparse codon representation", cioè un arrangiamento combinatorio degli input favorevole per la loro successiva identificazione. Nel nostro laboratorio abbiamo focalizzato l'attenzione sulle funzioni delle fibre muscolari e delle cellule granulari del cervelletto impiegando registrazioni elettrofisiologiche in situ (tecnica del "patch-clamp" in fettine di tessuto). Da una serie di studi sono emerse le seguenti proprietà:

(1) La sinapsi tra fibre muscolari e cellule granulari è plastica, ed aumenta la sua efficienza in modo persistente quando venga stimolata da impulsi ripetuti ad alta frequenza (LTP). La specifica espressione di recettori NMDA nelle cellule granulari è essenziale per l'induzione dell'LTP. L'LTP è espressa sia da un aumento della conduttanza sinaptica che della eccitabilità intrinseca della cellula granulare. L'assenza di LTP in topi atassici con anomalie del recettore NMDA suggerisce un ruolo per l'LTP nel controllo motorio cerebellare.

(2) Grazie all'espressione di specifiche conduttanze di membrana (correnti di K^+ lente simili alla I-M, e correnti di Na^+ persistenti), la cellula granulare è preferenzialmente eccitabile, o risonante, a frequenza teta (circa 10 Hz). Tale proprietà è probabilmente coinvolta nella generazione del ritmo teta misurato in elettroencefalogrammi ottenuti dalla corteccia cerebellare, e potrebbe facilitare l'insorgenza di LTP.

Quindi, l'input cerebellare appare in grado di "apprendere" e "memorizzare" e di regolare la dinamica del flusso di informazione adeguandosi ad uno dei principali ritmi propri del sistema sensori - motorio. Questi ed altri studi indicano che la dinamica della rete neuronale cerebellare è assai più complessa di quanto precedentemente ipotizzato, e suggeriscono la direzione di ulteriori studi sperimentali e teorici sulle funzioni neuronali e sinaptiche del cervelletto.

Referenze:

- D'Angelo E, De Filippi G, Rossi P, Taglietti V (1995) Synaptic excitation of individual rat cerebellar granule cells in situ: evidence for the role of NMDA receptors. *J Physiol (Lond)* 484: 397-413.
- D'Angelo E, De Filippi G, Rossi P, Taglietti V (1998) Ionic mechanism of electroresponsiveness in cerebellar granule cells implicates the action of a persistent sodium current. *J Neurophysiol* 80: 493-503.
- D'Angelo E, Rossi P, Armano S, Taglietti V (1999) Evidence for NMDA and mGlu receptor-mediated long-term potentiation of mossy fibre - granule cell transmission in the rat cerebellum. *J Neurophysiol* 81:277-287.
- Armano S, Rossi P, Taglietti V, D'Angelo E (2000) Long-term potentiation of intrinsic excitability at the mossy fiber - granule cell synapse of rat cerebellum. *J Neurosci*,
- D'Angelo E, Nieuwenhuis T, Maffei A, Armano S, Rossi P, Taglietti V, Fontana A, Naldi G (2000) Theta-frequency bursting and resonance in cerebellar granule cells: experimental evidence and modeling of a slow K^+ -dependent mechanism. *J. Neurosci.*, in press.

Sessione di Biostrumentazione e Bioelettronica

RETI BIOARTIFICIALI DI NEURONI

M. Grattarola, M. Bove*, M. Chiappalone, M. Giugliano, M. Pisciotta, M. Tedesco

Gruppo di Bioelettronica e Tecnologie Neurali, Dipartimento di Ingegneria Biofisica ed Elettronica, Università di Genova - www.bio.unige.it, gratta@dibe.unige.it

*Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università di Genova

Nell'ultimo decennio le conoscenze sulla plasticità sinaptica sono enormemente progredite [1].

Parallelamente, è avvenuto un intenso trasferimento delle tecnologie di microlavorazione dall'elettronica (settore in cui si sono sviluppate) alla biologia cellulare e molecolare.

Cio' ha portato, nel settore delle neuroscienze, allo sviluppo di una nuova tecnica elettrofisiologica, che complementa quelle, ben note, basate sull'utilizzo di capillari di vetro per misure intracellulari e di patch.

Questa nuova tecnica elettrofisiologica prevede l'utilizzo di matrici di microelettrodi *planari* che costituiscono il substrato cui accoppiare preparati neurobiologici in vitro [2,3]. Tali preparati includono colture dissociate di neuroni, fettine "acute" del sistema nervoso centrale e fettine "organotipiche". La matrice di microelettrodi, instaurando un contatto stabile con numerosi neuroni del preparato, permette registrazioni e stimolazioni multisito e protratte nel tempo (settimane), aprendo in tal modo la strada alla caratterizzazione dei preparati *a livello di organizzazione di rete*.

Queste considerazioni saranno sviluppate con riferimento a risultati recentemente ottenuti nel nostro e in altri laboratori.

Ringraziamenti

Lavoro svolto con il contributo del CNR (PF Biotecnologie) e dell'Ateneo di Genova

Riferimenti

[1] T.J. Sejnowski "Synapses get smarter", *Nature*, 382, pp. 758 – 760, (1996)

[2] M. Bove, M. Grattarola, G. Verreschi, "In vitro 2D networks of neurons characterised by processing the signals recorded with a planar microelectrode array", *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 44 n. 10, pp. 964 – 977, (1977)

[3] Y. Jimbo, T. Tateno, H.P. Robinson "Simultaneous induction of pathway-specific potentiation and depression in networks of cortical neurons" *Biophysical Journal*, 76, pp. 670 – 678 (1999)

MICROFABBRICAZIONE DI STRUTTURE ORGANICHE E PATTERNING SUPERFICIALE PER L'ADESIONE DI BIOMOLECOLE E CELLULE

A. Ahluwalia, G. Vozzi, F. Bianchi

Centro Interdipartimentale di Ricerca "E.Piaggio", Università' di Pisa e Istituto di Fisiologia Clinica del CNR, Pisa

La realizzazione di microstrutture con materiali organici è di particolare importanza per lo sviluppo di numerosi sistemi e dispositivi basati sulla micro e nano tecnologia. I possibili settori di applicazione della microfabbricazione sono l'ingegneria tissutale, i microattuatori, i biosensori multiparametrici e lo sviluppo di sistemi di microfluidodinamica. Nel campo dell'ingegneria tissutale e della biosensoristica, sono stati sviluppati alcuni metodi che consentono il controllo spaziale dell'adesione di biomolecole e di cellule usando ad esempio le tecniche della fotolitografia o della deposizione meccanica tramite l'utilizzo di motori di elevata precisione. Un quadro d'insieme dei metodi più promettenti sarà qui presentato. In particolare, sarà illustrato il metodo sviluppato nel nostro laboratorio. Tale tecnica si basa sull'uso di una microsiringa che permette la deposizione di un'ampia gamma di polimeri tramite l'applicazione di una pressione controllata. La siringa è montata sull'asse verticale (z) di un sistema dotato di tre stepper motor con precisione di 0.1 μm per la movimentazione dei tre assi (x-y-z), mentre il substrato (un vetrino) è montato sul piano orizzontale e viene spostato dai motori in modo da descrivere la geometria del pattern desiderato. Un sistema di valvole e sensori mantiene e controlla la pressione applicata alla siringa all'interno di pochi mmHg. Il sistema è interfacciato ad un PC che permette la regolazione della velocità dei motori e la loro posizione relativamente ad un altro motore. Usando un software appositamente sviluppato è possibile realizzare un'ampia gamma di pattern biopolimerici con geometria ben definita. Un termoregolatore a cella di Peltier può essere integrato con i motori orizzontali, e permette di riscaldare o raffreddare il substrato di deposizione in base alle specifiche richieste (per esempio per accelerare l'evaporazione del solvente).

Inoltre per assicurare un'adesione controllata, in particolare delle cellule che, esprimono proteine d'adesione durante la proliferazione, è spesso necessario usare metodi chimici per prevenire la loro adesione in siti non appropriati. Questo lo si ottiene rendendo le superfici di deposizione non adesive tramite due tecniche generali. La prima si basa sull'uso di derivati idrofobici, come silani metilati, mentre la seconda utilizza superfici derivatizzate con PEG, che permette in tal modo di creare una superficie estremamente idrofilica, che non consente la sostituzione delle molecole d'acqua da parte delle proteine. Saranno presentate diverse tecniche di attivazione chimica per il controllo spaziale dell'adesione delle biomolecole ed i loro risultati verranno discussi. Diversi aspetti devono essere considerati inoltre per realizzare biosensori multiparametrici, dove è necessario assicurarsi che un solo tipo di biomolecole aderisca in una data posizione. Tale risultato è spesso ottenuto usando stampi, maschere o piccoli dispositivi meccanici robotizzati che realizzano dei piccoli spot. Un breve quadro d'insieme sarà di seguito presentato.

Bibliografia:

- 1) G. Vozzi, A. Ahluwalia, D. De Rossi, A. Sapienza, "Deposition of 2 and 3D polymer Scaffolds with a well defined geometry for application to Tissue Engineering", sottoposto a Tissue Engineering.

MICROATTUATORI A POLIMERO CONDUTTORE E NANOTUBI DI CARBONIO

Prof. Danilo De Rossi

Centro Interdipartimentale di Ricerca "Enrico Piaggio", Università di Pisa, Via Diotisalvi, 2, Pisa

La conversione diretta di energia elettrica in energia meccanica attraverso le proprietà di alcuni materiali è di fondamentale importanza in Robotica e Bioingegneria. I materiali ferromagnetici ed elettrostrittivi sono i più utilizzati per questo scopo. Tuttavia le possibilità di applicazione di questi materiali sono limitate a causa degli alti voltaggi necessari e le limitazioni della densità di lavoro per ciclo. Attuatori realizzati con polimero conduttore drogato elettrochimicamente sono studiati in molti laboratori da più di dieci anni.

Il processo Faradaico per questi dispositivi simili a batterie richiede una diffusione del drogante all'interno del materiale e cambiamenti strutturali che limitano velocità, durata ed efficienza di conversione energetica.

Ciononostante essi rappresentano materiali molto utili per la realizzazione di microattuatori a conversione diretta di energia per microdispositivi.

Nuovi attuatori sono stati realizzati usando film di nanotubi di carbone (SWNT) come elettrodi di capacità superiore. Nessun drogaggio è necessario per far operare questi dispositivi. Cambiando la tensione elettrica applicata, si inietta una carica negativa nell'elettrodo SWNT, che viene compensata dalla carica dell'elettrolita all'interfaccia elettrodo-soluzione formando il cosiddetto doppio strato. I nuovi attuatori realizzano cambiamenti di dimensioni in direzione dei legami covalenti a causa dall'iniezione della carica per effetto quanto-chimico e del doppio strato.

Come i muscoli biologici gli attuatori realizzati con nanotubi sono costituiti da fasci di nanofibre. Il risultato è un nuovo modello di attuazione in quanto gli SWNT hanno grande area superficiale, alta conducibilità e buone proprietà meccaniche.

Discuteremo in seguito la caratterizzazione del materiale, la creazione di modelli che interpretano i fenomeni elettromeccanici e descriveremo i dispositivi di attuazione con particolare attenzione alle applicazioni in campo bioingegneristico.

MICROLAVORAZIONE DEL SILICIO E MICROMATRICI PER ELETTROFISIOLOGIA NON-CONVENZIONALE

Sergio Martinoia, Roberto Reiteri

N.B.T. Neural and Bioelectronic Technologies Group,
Dipartimento di Ingegneria Biofisica ed Elettronica, Via Opera Pia 11A, 16145, Genova
Tel. 010-3532251
Fax 010-3532133
e-mail. martinoia@dibe.unige.it

Keywords: Matrici di microtrasduttori, microlavorazione, crescita guidata, giunzione neurone-elettrodo.

Sommario

Il crescente sviluppo delle tecnologie microelettroniche per la fabbricazione di circuiti elettronici ha permesso, a partire dagli anni '70 di realizzare dispositivi e (micro)trasduttori sempre più sofisticati e per le più svariate applicazioni. Uno dei settori che ha beneficiato dei continui miglioramenti tecnologici delle metodologie microelettroniche e micromeccaniche, soprattutto in termini di tecniche di microlavorazione e di nuovi materiali, è il settore delle neuroscienze in vitro.

Scopo della presentazione è quello di fornire una rapida panoramica sui principi fondamentali e le tecniche di fabbricazione dei circuiti e dei dispositivi integrati, per poi fornire qualche concreto esempio di fabbricazione di dispositivi per misure elettrofisiologiche. Si forniranno, in seguito, esempi di dispositivi 3-dimensionali e microlavorati utilizzabili come trasduttori per elettrofisiologia non convenzionale e come substrato per la coltivazione di popolazioni cellulari (neuroni) in grado di favorire, guidare la crescita delle arborizzazioni neuronali e la formazione di reti neuronali. In conclusione si affronterà brevemente, dal punto di vista modellistico, il problema dell'accoppiamento tra neurone e dispositivo microelettronico (microtrasduttore) in funzione dell'interpretazione del tipo di segnale elettrofisiologico che viene rilevato.

Bibliografia

BIOELECTRONICS HANDBOOK : Mosfets, Biosensors, Neurons, M. Grattarola and G. Massobrio, Mc Graw Hill, 1998

1. J. Pine. Recording actions potentials from cultured neurons with extracellular microcircuit electrodes. *J. of Neurosci. Meth.*, 2, 19-31. (1980)
2. Gross, G.W., Wen, W. and Lin, J. (1985). Transparent indium-tin oxide patterns for extracellular, multisite recording in neuronal cultures. *J. of Neurosci. Meth.*, 15, 243-252.
3. Fromherz, P., Offenhausser, A., Vetter, T. and Weis, J.A. (1991). Neuron - silicon junction: A Retzius cell of the leech on an insulated-gate field-effect transistor. *Science*, 252, 1290-1293.
4. S.A. Boppart, B. Wheeler, S. Wallace. A flexible perforated microelectrode array for extended neural recordings. *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, 39, 37-42. (1992)
5. J.P.Thiebaud, C.Beuret, M.Koudelka-Hep, M.Bove, S.Martinoia, M.Grattarola, H.Jahnsen, R.Rebaudo, M.Balestrino, J.Zimmer, Y.Dupont: "An array of Pt-tip microelectrodes for extracellular monitoring of activity of brain slices", *Biosensors and Bioelectronics*, 14, pp.61-65 (1999).
6. Curtis, A.S.G., Breckenridge, L., Connolly, P., Dow, J.A.T., Wilkinson, C.D.W. and Wilson, R. (1992) Making real nets: design and criteria, *Med. Biol. Eng. Comput.*, 30: CE33 - CE36.
7. Denyer, M.C., Britland, S.T., Curtis, A.S.G. and Wilkinson, C.D.W. (1997) Patterning living neural networks on microfabricated electrophysiological recording devices, *J. of Cell. Eng.*, 2: 122 - 130.
8. Bove, M., Grattarola, M., Martinoia, S., Verreschi, G. (1995). Interfacing cultured neurons to planar substrate microelectrodes: characterisation of the neuron-to-microelectrode junction. *Bioel. and Bioen.*, 38, 255-265.
9. Grattarola, M. and Martinoia, S. (1993). Modeling the neuron - microtransducer junction: from extracellular to patch recording. *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, 40, 35-41.
10. Grattarola M., Bove, M., Verreschi, G., Giugliano M. (1997). Signal analysis of simulated experiments: *in vitro* synchronised activity of networks of neurons coupled to arrays of planar microelectrodes. *J. of Cell. Eng.*, in press.

EFFETTI DELLA STIMOLAZIONE MAGNETICA TRANSCRANICA SUL PERIODO SILENTE DELLA RISPOSTA MUSCOLARE DURANTE DEAFFERENTAZIONE PERIFERICA TRANSITORIA, NELL'UOMO

A. Palmeri, D.A. Restivo, S. Sapienza

Dipartimento di Scienze Fisiologiche, Università di Catania, Viale A. Doria 6, I-95125 Catania

Fenomeni adattativi nei sistemi motori sono stati studiati mediante l'uso della stimolazione magnetica transcranica (SMT) in soggetti con lesioni nervose periferiche o con deafferentazione reversibile degli arti. Queste ricerche hanno mostrato un aumento della dimensione delle aree di rappresentazione motoria dell'arto cronicamente deafferentato. Inoltre, l'intensità dello stimolo necessaria per produrre un potenziale evocato motorio (PEM) era minore per i muscoli prossimali alla porzione di arto temporaneamente anestetizzata, ritornando ai valori di controllo subito dopo la cessazione dell'anestesia.

Lo scopo del presente studio è stato quello di analizzare le modificazioni del periodo silente (PS) della risposta muscolare alla SMT, nel corso di deafferentazione transitoria dell'arto superiore o inferiore. Il PS consiste in una pausa nell'attività EMGgrafica che segue il PEM, quando la SMT è applicata durante una contrazione muscolare volontaria. La ricerca è stata condotta su 10 soggetti sani (25-56 anni). Durante la seduta sperimentale un braccialetto gonfiabile veniva sistemato al di sotto del gomito o del ginocchio, e gonfiato ad una pressione più alta del 25% rispetto al valore sistolico, per 12 minuti. La SMT era effettuata mediante uno stimolatore magnetico Cadwell MES-10 con terminale a forma di 8, applicato sulle zone craniali corrispondenti alle aree motorie di destra e di sinistra eccitabili a più bassa soglia (intensità dello stimolo: 50% sopra la soglia dello SP). L'attività EMGgrafica era bilateralmente registrata dai muscoli bicipite e quadricipite; latenza e durata del PS venivano misurate prima, durante e dopo il blocco. Relativamente all'arto inferiore, veniva anche studiata l'eccitabilità dei motoneuroni spinali analizzando il rapporto Hmax/Mmax al livello del quadricipite.

L'analisi dei dati ottenuti ha mostrato che la durata del PS nei muscoli prossimali al blocco risultava più corta (circa -28%) rispetto ai valori registrati nei rispettivi muscoli controlaterali non interessati dal blocco. La durata ritornava al valore di partenza dopo la rimozione del braccialetto. Inoltre, la soglia necessaria per evocare i PEM diminuiva (da 65% a 40%) nei muscoli prossimali al blocco. Infine, l'assenza di modificazioni del rapporto Hmax/Mmax ha portato ad escludere che meccanismi adattativi possano verificarsi a livello segmentale.

Nel loro complesso, i risultati del presente studio supportano l'ipotesi che la temporanea rimozione di segnali afferenti possa provocare un incremento dell'eccitabilità corticale, suggerendo anche che l'accorciamento della durata del PS possa essere provocato da una disinibizione delle aree motorie corticali.

Sessione di Neuroscienze

PLASTICITA' E COMPETIZIONE SINAPTICA ATTIVITA'-DIPENDENTI DURANTE LO SVILUPPO DELLE GIUNZIONI NEUROMUSCOLARI

Alberto Cangiano

Dipartimento di Scienze Neurologiche e della Visione

Sezione di Fisiologia

Universita' di Verona

Strada le Grazie 8, 37134 – Verona

Nel campo dell'apprendimento e della memoria, il postulato enunciato da Hebb nel 1949 riscontra ancora generale consenso tra i neurobiologi che affrontano questa tematica dal punto di vista cellulare. Esso afferma che: input nervosi convergenti su uno stesso target potenziano i loro contatti sinaptici qualora abbiano un'attivita' elettrica sincrona con quella del target stesso. Tale postulato e' stato successivamente esteso ai fenomeni di competizione sinaptica durante lo sviluppo. Infatti da tempo e' stata dimostrata l'importanza dell'attivita' elettrica sincrona nella formazione delle connessioni binoculari convergenti sui neuroni della corteccia visiva del gatto (Hubel e Wiesel, *JNeurophysiol.* 28:1041-59,1965). Per studiare questi aspetti dello sviluppo in un modello semplificato, li abbiamo riprodotti in sinapsi neuromuscolari neoformate nel ratto adulto. Per ottenere cio' abbiamo trasposto il nervo fibulare sulla superficie del muscolo soleo ove stabilisce rapidamente nuove sinapsi alloche' viene tagliato il nervo originale. Tale sinaptogenesi riproduce fedelmente le tappe della formazione delle sinapsi che avvengono durante lo sviluppo, compresa l'iniziale innervazione polineuronale delle fibre muscolari e la successiva eliminazione dei terminali nervosi in eccesso. Al termine si raggiunge la situazione matura ove ogni fibra e' innervata da un solo terminale motorio. In questo preparato e' possibile misurare il grado di innervazione polineuronale a tempi diversi di maturazione contando, nel muscolo curarizzato, il numero di input convergenti su ogni fibra muscolare, mediante la registrazione intracellulare dei potenziali di placca evocati dalla graduale stimolazione elettrica del nervo fibulare. A diversi giorni dall'induzione della sinaptizzazione (10-32) abbiamo confrontato l'eliminazione degli input nei muscoli solei reinnervati da nervi fibulari normalmente attivi con quella dei muscoli controlaterali sperimentali nei quali i nervi erano stati stimolati, per l'intero periodo, con treni d'impulsi sovramassimali. Inoltre, per ottenere la completa sostituzione dell'attivita' motoneuronale spontanea con un'attivita' di tipo sincrono, abbiamo bloccato, prossimamente al punto di stimolazione, la conduzione dei potenziali d'azione lungo il nervo fibulare, mediante un manicotto di gomma posto attorno al nervo sciatico e veicolante tetrodotossina. Ad ogni periodo esaminato, la percentuale di fibre poliinnervate per muscolo e' risultata significativamente piu' alta nei lati stimolati rispetto ai lati con attivita' spontanea (rispettivamente $55 \pm 5,9$ SE [n=16] e $18 \pm 2,6$ [n=34], $p < 0.001$, dati complessivi). Preparati con sola stimolazione o con solo blocco di conduzione nervosa sono serviti come controlli. Questi esperimenti offrono un modello relativamente semplice per lo studio del ruolo dell'attivita' elettrica nervosa nel fenomeno della competizione sinaptica ed indicano che l'attivita' asincrona favorisce l'instaurarsi della stessa e quindi l'eliminazione dei contatti in eccesso.

TRANSITORIA SINCRONIZZAZIONE DELL'ATTIVITA' ELETTRICA DELLE UNITA' MOTORIE DEL RATTO IN ETA' PERINATALE

Giuseppe Busetto

Dipartimento di Scienze Neurologiche e della Visione
Sezione di Fisiologia
Universita' di Verona
Strada le Grazie 8, 37134 – Verona

Recenti lavori sperimentali suggeriscono l'ipotesi che i motoneuroni innervanti un medesimo muscolo esprimano un'attivita' di scarica tra loro sincrona. Tale sincronismo scomparirebbe entro le prime due settimane di vita ed i motoneuroni acquisterebbero cosi' il ben noto pattern asincrono. Questa sequenza di eventi avrebbe un ruolo nell'aiutare l'iniziale innervazione polineuronale delle fibre muscolari e successivamente nel permetterne l'eliminazione fino al mantenimento di un solo terminale nervoso per fibra. Infatti l'attivazione sincrona di input neuromuscolari durante lo sviluppo causa una drammatica persistenza dell'innervazione polineuronale (Busetto et al., JNeurosci 20:685-95,2000). Per verificare l'ipotesi iniziale abbiamo registrato l'elettromiogramma nei ratti neonati e durante l'ultimo giorno di gestazione nei muscoli Soleo e Tibiale Anteriore. In registrazioni molto selettive e' possibile isolare l'attivita' elettrica proveniente da due diverse unita' motorie e successivamente misurare la corrispondenza temporale tra le stesse. Entro i primi 4 giorni di vita, il 60% delle coppie di unita' motorie sono risultate altamente correlate (17 coppie, 12 muscoli), mentre nessuna coppia e' risultata correlata dopo la seconda settimana (34 coppie, 9 muscoli). Particolarmente significative sono le registrazioni eseguite sui feti ove il 100% delle coppie di unita' motorie erano altamente correlate (4 coppie, 4 muscoli). Il confronto tra muscoli ha indicato che il muscolo Soleo esprime alla nascita un maggior grado di sincronizzazione rispetto al muscolo Tibiale Anteriore (66% e 29% rispettivamente). Questo dato si confronta molto bene con le misure di innervazione multipla da noi eseguite osservando al microscopio confocale sinapsi neuromuscolari neonatali evidenziate con coloranti vitali fluorescenti. Infatti, al sesto giorno di vita, il muscolo Soleo e' ancora quasi completamente poliinnervato (il 90% delle fibre muscolari mostrano piu' di un terminale nervoso) mentre il muscolo Tibiale Anteriore e' gia' sceso al 40% di poliinnervazione. Alla fine della seconda settimana di vita entrambi i muscoli mostrano valori sotto il 30%. Questi dati concordano con l'ipotesi che, durante le prime fasi dello sviluppo, l'attivita' motoneuronale sincrona permetta l'instaurarsi della polinnervazione delle fibre muscolari e che la successiva attivita' asincrona favorisca l'eliminazione dei contatti in eccesso.

USO DI MODELLI TRANSGENICI PER LO STUDIO DEL SIGNIFICATO DELL'ESPRESSIONE REGOLATA DELLE GLICOPROTEINE ADESIVE ESPRESSE A LIVELLO ASSONICO NELLO SVILUPPO E NELLA MORFOGENESI DEL TESSUTO NERVOSO

G. Gennarini, A. Bizzoca, L. De Benedictis, A. Polizzi, C. Di Benedetta

Dipartimento di Farmacologia e Fisiologia Umana, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Bari, Policlinico, Piazza Giulio Cesare, 70124 Bari. Tel 0805478529; Fax 080 5478417; e-mail: G.Gennarini@tno.it.

La crescita e lo sviluppo delle traiettorie assoniche dipende dall'espressione regolata di un gruppo di glicoproteine di superficie neuronali che, sul piano strutturale, sono accomunate dalla omologia con le regioni costanti o variabili delle immunoglobuline e sul piano funzionale condividono la proprietà di promuovere la crescita neuritica in modelli in vitro. Una di queste molecole è la glicoproteina assonica F3/F11/Contactin.

Al fine di studiare il significato dell'espressione regolata di questa molecola durante lo sviluppo del tessuto nervoso, nel nostro laboratorio abbiamo generato una linea di topi transgenici in cui il cDNA di F3/Contactin è posto sotto il controllo della regione promotrice prossimale del gene TAG-1, codificante una glicoproteina altamente apparentata ad F3, ma provvista di un profilo di sviluppo differente. Infatti TAG-1 è espressa su elementi precursori neuronali ancora in fase premigratoria mentre l'espressione di F3 è piuttosto tipica dei neuroni postmitotici in fase di differenziamento. Il modello prescelto pertanto conduce ad una sovraespressione di F3 in fasi precoci dello sviluppo, quando il gene F3 è normalmente silente o solo debolmente attivo.

Negli animali generati uno specifico fenotipo è stato evidenziato a livello della corteccia cerebellare durante lo sviluppo postnatale. La sovraespressione di F3 conduce ad una riduzione significativa della dimensione globale del cervelletto, maggiormente evidente alla fine della prima settimana di vita postnatale. Peraltro il pattern di foliazione è alterato in maniera significativa con una riduzione nella dimensione dei folia ed un corrispondente aumento della larghezza delle scissure. La larghezza dello strato molecolare è ridotta in maniera significativa alla fine della prima settimana, tale dato indicando una corrispondente riduzione del grado di differenziamento degli elementi granulari. Contemporaneamente, i neuroni di Purkinje dimostrano una significativa riduzione dello sviluppo del loro albero dendritico. Questi effetti sono regolati durante l'ontogenesi e scompaiono alla fine del primo mese di vita quando il fenotipo degli animali transgenici diviene difficilmente distinguibile da quello dei corrispondenti controlli.

Sul piano funzionale, utilizzando la batteria di Fox, è stato possibile dimostrare una significativa alterazione dello sviluppo sensori-motorio, che, peraltro, segue lo stesso profilo ontogenetico delle alterazioni morfologiche descritte.

Nel loro insieme i dati indicano un preciso significato regolatorio delle glicoproteine assoniche del tipo F3/Contactin nell'organizzazione strutturale e funzionale del tessuto nervoso.

RUOLO DI FATTORI AMBIENTALI NELLA REGOLAZIONE DELLE PROPRIETÀ INTRINSECHE DI CRESCITA E RIGENERAZIONE ASSONALE DEI NEURONI CEREBELLARI

Prof. Ferdinando Rossi

Dipartimento di Neuroscienze, Centro Rita Levi Montalcini, Università di Torino, Corso Raffaello 30, I-10125 Torino

Il successo della rigenerazione assonale dipende dalla presenza di condizioni ambientali permissive/promoventi l'allungamento neuritico, e dalla capacità dei neuroni lesi di esprimere i geni necessari per la crescita assonale. In condizioni normali, il programma genetico associato alla crescita assonale viene soppresso al termine dello sviluppo. In seguito ad una lesione nell'adulto, la capacità di riesprimere questi geni varia nelle diverse popolazioni neuronali e secondo le condizioni di lesione. Queste osservazioni indicano che l'espressione dei geni associati alla crescita assonale nei neuroni adulti è costitutivamente inibita da fattori ambientali. Nel sistema nervoso periferico tali fattori sono principalmente derivati dai bersagli periferici delle fibre motorie, sensoriali o vegetative. Per contro, nel sistema nervoso centrale, i meccanismi ed i mediatori di tale regolazione restano in gran parte oscuri.

Per affrontare questo problema abbiamo recentemente studiato le cellule di Purkinje del cervelletto. In seguito ad assotomia nel cervelletto adulto, questi neuroni sono quasi totalmente incapaci di esprimere i geni associati alla crescita assonale. La debole risposta alla lesione è associata ad uno scarso potenziale rigenerativo (anche in presenza di condizioni ambientali permissive) e ad una notevole capacità di sopravvivenza. L'iniezione intraparenchimale nel cervelletto adulto intatto di anticorpi IN-1, contro la proteina della mielina centrale NI-250/Nogo-A, induce la sovraespressione di geni associati alla crescita assonale nelle cellule di Purkinje, accompagnata da un profuso sprouting neuritico nello strato granulare. Questi risultati indicano che il potenziale intrinseco di crescita assonale delle cellule di Purkinje è costitutivamente regolato da fattori ambientali, fra i quali alcune proteine associate alla mielina centrale. Questa conclusione è confermata dallo studio dell'evoluzione della risposta alla lesione e delle capacità rigenerative nel corso dello sviluppo postnatale del cervelletto. Abbiamo infatti osservato che la capacità delle cellule di Purkinje lese di esprimere i geni associati alla crescita assonale e di rigenerare l'assone si riduce progressivamente nel corso dello sviluppo postnatale parallelamente alla maturazione della mielina nella sostanza bianca cerebellare. Questi risultati indicano che il potenziale intrinseco di crescita di questi neuroni è regolato da fattori ambientali diretti a stabilizzare gli assoni e prevenire fenomeni di crescita aberrante. Questo meccanismo di regolazione, che svolge un importante ruolo fisiologico, inibisce di fatto la riattivazione dei programmi di crescita nei neuroni lesi. La comprensione di tali meccanismi è importante per mettere a punto strategie di intervento volte a favorire i processi riparativi del sistema nervoso centrale, stimolando il potenziale intrinseco di crescita dei neuroni.

Sessione di Cellule

CANALI INTERCELLULARI NEL SISTEMA NERVOSO: CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE E FUNZIONALE.

Daniele F. Condorelli e Annamaria Giuffrida Stella.

Dipartimento di Scienze Chimiche, Sezione di biochimica e biologia molecolare, Università di Catania.

Le giunzioni comunicanti (gap junctions) sono composte da aggregati di canali transmembrana che mettono in connessione diretta il citoplasma di cellule adiacenti, realizzando un accoppiamento metabolico ed elettrico. ogni canale intercellulare è formato dall' unione di due emicanali, o connessioni, situati nelle membrane adiacenti, e ogni connessione è composto da 6 subunità proteiche, chiamate connesine (cx), disposte radialmente attorno ad un poro centrale. le connesine sono codificate da una famiglia multigenica, i cui membri sono indicati con la sigla cx seguita dal peso molecolare in kda (per es. cx43). le gap junctions sono presenti in tutti i tessuti ed organi dei vertebrati, incluso il sistema nervoso, dove l'esistenza di una comunicazione intercellulare mediata da gap junctions è stata dimostrata sia in cellule gliali che in cellule neuronali con metodiche morfologiche e fisiologiche. mediante clonaggio con pcr degenerata, abbiamo recentemente identificato, nei roditori (topo e ratto) e nell'uomo, una nuova connessina (cx36), espressa in diverse aree cerebrali, nella retina ed in alcune ghiandole endocrine. esperimenti con neurotossine ed ibridazione in situ suggeriscono che la cx36 è localizzata in cellule neuronali (condorelli et al. european journal of neuroscience, 10:3, 1202-1208, 1998; condorelli df, et al. brain research review, 32, 72-85, 2000). il pattern di espressione della proteina cx36 è stato analizzato nel cervello di ratto adulto e durante lo sviluppo, ed è stato correlato con il pattern di espressione del mrna, valutato mediante ibridazione in situ. la localizzazione neuronale della cx36 è stata confermata combinando l'ibridazione in situ per cx36 mrna con l'immunocitochimica per marcatori neuronali (belluardo et al. brain research, 865, 121-138, 2000).

Abbiamo, inoltre, eseguito il clonaggio ed il sequenziamento del gene umano della cx36 ed analizzato il suo pattern di espressione nel cervello umano attraverso l'ibridazione in situ radioattiva (belluardo et al. journal of neuroscience research 57:740-752, 1999). la determinazione della sequenza del gene umano ha rilevato che la regione codificante della cx36 è altamente conservata dalla razza all'uomo (98% di identità a livello proteico con la cx36 di ratto e di topo e l'80% con la cx35 del pesce persico e della razza) e che la struttura genica è quella tipica del sottogruppo della cx35/36 nelle altre specie (caratterizzato dalla presenza di un singolo introne localizzato all'interno della regione codificante, 71 bp dopo l'inizio del sito di traduzione). la distribuzione della cx36 nelle diverse regioni del sistema nervoso centrale umano è simile a quella osservata nel cervello di ratto. il segnale più intenso, tra le aree cerebrali esaminate con l'ibridazione in situ, è stato osservato nel complesso olivare inferiore, sia nel nucleo principale che nell'accessorio. una modesta marcatura è stata anche osservata in diversi nuclei mieloencefalici, in alcune cellule specifiche della corteccia cerebellare e in una vasta sottopopolazione di cellule della corteccia cerebrale, nell'ilo del giro dentato e nello strato radiato e oriens dell'ippocampo. cellule marcate sono state rilevate in tutte le lamine della sostanza grigia del midollo spinale. il gene umano per la cx36 è stato localizzato, mediante ibridazione in situ fluorescente, nella banda 15q14. le proprietà biofisiche del canale formato dalla cx36 sono state esaminate in cellule n2a e pc-12 transfettate stabilmente con un vettore di espressione per contenente l'intera sequenza codificante della cx36 (srinivas et al. journal of neuroscience 19 (22), 9848-9855, 1999). i canali formati dalla cx36 presentano un valore di conduttanza unitaria molto basso (≤ 15 ps) e sono poco sensibili alle variazioni del voltaggio transgiunzionale. le conduttanze unitarie precedentemente misurate variano dai 30 ps dei canali formati dalla cx45 ai 300 ps dei canali formati dalla cx37. un canale con bassa conduttanza unitaria consentirebbe ai neuroni un controllo più fine dell'intensità dell'accoppiamento elettrotonico.

ANGIOGENESI TERAPEUTICA CON GENE UMANO DELLA CALLICREINA NEL TRATTAMENTO DELLE VASCULOPATIE PERIFERICHE

Paolo Madeddu, Costanza Emanuelli, Maria Bonaria Salis, Tiziana Stacca, Luisa Carta, Alessandra Pinna, Leonardo Gaspa

Laboratorio Nazionale del Consorzio Interuniversitario Nazionale di Biostrutture e Biosistemi, Osilo, Sassari

L'ischemia causata da malattie ostruttive vascolari rappresenta la principale causa di morbilità e mortalità nei paesi industrializzati, tanto da essere stata definita "la nuova epidemia del terzo millennio". Studi del nostro gruppo hanno dimostrato che il sistema callicreina-chinine é presente con tutte le sue componenti nella parete vascolare e che l'espressione di tale sistema é variamente modulato da processi (*Am J Hypertens.* 1993; *Hypertension.* 1994). La callicreina é una serin-proteasi che rilascia le chinine, potenti sostanze vasodilatatrici, dal substrato chininogeno. Le chinine attivano recettori di membrana e stimolano il rilascio di NO e prostaciclina. Il recettore B₂ é costitutivamente espresso a livello vascolare, mentre il recettore B₁ viene indotto in condizioni patologiche simil-infiammatorie, quali l'ischemia tissutale. Nostri studi hanno dimostrato che il potenziamento della generazione di chinine mediante terapia genica con callicreina umana accelera processo di riparazione vascolare ed antagonizza il rimodellamento responsabile di restenosi (*Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000; *Br J Pharmacol.* 2000). La nostra scoperta che l'assenza congenita del recettore B₂ porta a fibrosi miocardica (*Circulation.* 1999), ci ha inoltre indotto ad ipotizzare che la callicreina, tramite la generazione di chinine, possa essere implicata nei processi di vasculogenesi ed angiogenesi. Tale ipotesi é stata messa alla prova in un modello animale di ischemia periferica, che simula la situazione presente in pazienti affetti da arteriopatia periferica oclusiva. Ad una settimana dall'induzione di ischemia mediante asportazione dell'arteria femorale, abbiamo somministrato un vettore adenovirale contenente il gene umano della callicreina sotto il controllo del promoter del citomegalovirus (Ad.CMV-cHK) nel muscolo adduttore ischemico di topo. Questo intervento ha consentito di conseguire un raddoppiamento della densità capillare muscolare ed a tale risposta angiogenica é conseguito un incremento del 40% del flusso ematico e la preservazione della carica energetica del muscolo ischemico. Abbiamo inoltre documentato che gli effetti benefici della callicreina umana sono mediati dalla stimolazione della via metabolica dell'NO. Tale approccio si é dimostrato efficace anche in condizioni, quali l'ipertensione arteriosa, caratterizzate da disfunzione endoteliale e difettoso potenziale angiogenico spontaneo. Il riconoscimento di una nuova sostanza con proprietà angiogenica apre nuove prospettive terapeutiche in patologia vascolare.

Sessione di Biotecnologie

ATTEMPTS OF HIGH THROUGHPUT STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF PARAMAGNETIC METALLOPROTEINS BY NMR

Prof. Ivano Bertini

Centro Risonanze Magnetiche, Università degli Studi di Firenze, Via Luigi Sacconi, 6 – 50019 Sesto Fiorentino (FI)
E-mail: bertini@cerm.unifi.it

A key feature of any structural genomics effort is that it must operate in high-throughput mode. For NMR spectroscopy to be an important player in this new area of science, it is thus mandatory that solution structure determination of proteins is substantially speeded up. To this end, new methodologies are being developed, based on the exploitation of hyperfine-based structural constraints. These constraints are based on the structural information contained in the hyperfine interaction between unpaired electron(s) and nuclei, which is readily quantifiable by NMR. In addition, the presence of unpaired electrons can give rise to orientation effects in the magnetic field, which again can be exploited for structure determination. Several metalloproteins are paramagnetic and thus naturally carry unpaired electrons. Paramagnetic metal ions can be introduced also in diamagnetic metalloproteins, e.g. by replacing calcium with lanthanides.

Once the structure of a protein is known, sequence similarity relationships permit the modelling of the structures of all ortholog proteins. Thus, a careful selection of targets for structural determination allows researchers to obtain quickly structures of large ensembles of proteins. The problem then arises of validating the obtained structures. Bioinformatics tools here play an important role, as they make it possible to perform theoretical validations. On the other hand, experimental validations can also be carried out. However, they require that the protein is produced. Examples will be given of Cu-transporting proteins, Fe₂S₂ ferredoxins and cytochromes.

LA PREDIZIONE STRUTTURALE DI PROTEINE DI MEMBRANA

Prof.ssa Rita Casadio

CIRB e laboratorio di Biofisica, Dipartimento di Biologia Evoluzionistica e Sperimentale, Via Irnerio 42, 40126 Bologna. Tel. 051-2094005; Fax 051-242576.

e-mail: casadio@alma.unibo.it, <http://www.biocomp.unibo.it>

La genomica funzionale si avvale di tools adatti alla analisi di sequenze in grado di predire le caratteristiche funzionali e strutturali dei geni espressi a partire dalla sequenza di residui che compongono la proteina. A questo scopo il nostro gruppo di ricerca ha implementato alcuni predittori basati su reti neurali per predire la topologia delle proteine localizzate nella membrana interna ed esterna. Le due classi di proteine di membrana sono diverse in struttura: mentre le proteine della membrana interna (citoplasmatica) interagiscono con il doppio strato lipidico mediante domini ad alfa elica, quelle della membrana esterna sono caratterizzate dalla presenza di strutture a botte che svolgono ruoli diversi a seconda del tipo di proteina. Due insiemi di addestramento per le reti neurali sono stati selezionati dalla banca dati di proteine cristallizzate. Per le proteine di membrana del primo tipo, l'insieme comprende 31 catene attualmente note con risoluzione atomica; per le proteine a botte l'insieme comprende 13 strutture. In entrambi i casi particolare attenzione e' stata rivolta a selezionare strutture con un basso valore di identita' sequenziale ($\leq 25\%$). L'addestramento delle reti viene fatto utilizzando come input l'informazione evolutiva dedotta dopo avere allineato ogni sequenza degli insiemi utilizzati con le proteine della banca dati di sequenze. Le caratteristiche dei predittori implementati possono essere cosi' riassunte: elevata efficienza della predizione ($> 78\%$) e capacita' di definire il modello transmembrana corretto utilizzando le uscite della rete quando vengono utilizzati sulle proteine a struttura nota mai viste dalla rete (procedura di jack knife). Una caratteristica del predittore per le proteine all-alfa di membrana e' quella di respingere tutte le proteine con botte. Questo risultato si e' rivelato molto utile nell'implementare un classificatore con cui le proteine di membrana possono essere distinte nei due insiemi: all-alfa o botte beta in relazione alla loro presenza nella membrana interna od esterna. Il classificatore e' disponibile al nostro sito web.

GLI ENZIMI DA ESTREMOFILII: UNA RIVISITAZIONE

Prof. Mosé Rossi

Istituto di Biochimica delle Proteine ed Enzimologia-CNR, Via Marconi 10, 80125, Napoli
Dipartimento di Chimica Organica e Biologica, Università Federico II, Napoli

Lo studio dei meccanismi molecolari dell'adattamento della vita a condizioni estreme di microrganismi ha, in questi ultimi anni, prodotto importanti informazioni su di essi e sulla struttura dei loro componenti cellulari. Riferendoci all'adattamento alle alte temperature, esistono microrganismi capaci di crescere sino a 113°C, che contengono macromolecole quali DNA, RNA e proteine che sono stabili o stabilizzate a queste temperature. Si sono ottenute importanti informazioni sui meccanismi molecolari della stabilizzazione.

Gli enzimi, in particolare, sono stati oggetto degli studi più approfonditi, in quanto essi hanno le caratteristiche di essere termostabili, termoattivi, stabili e attivi in presenza di solventi organici e tensioattivi e stabili all'attacco di proteasi.

Queste proprietà degli enzimi hanno destato grande interesse nel campo dello studio del rapporto tra struttura e funzione delle proteine e nello studio dell'adattamento "naturale" delle proteine alle alte temperature. Per le proprietà descritte, tali enzimi rappresentano una reale innovazione in vari campi applicativi.

Tre enzimi da *Sulfolobus solfataricus* hanno, nel nostro laboratorio, fornito risultati molto interessanti: una β -glicosidasi di cui si è determinata anche la struttura, un'alcool deidrogenasi e una DNA polimerasi.

I risultati ottenuti dagli esperimenti sulla β -glicosidasi hanno fornito importanti informazioni sui meccanismi molecolari della termostabilità e termoattività di tale enzima che, mediante ingegneria proteica, è stato trasformato in una glicosintasi (1, 2).

Gli studi sull'alcool deidrogenasi hanno permesso di dimostrare chiaramente che la termoattività e la termostabilità, anche se correlati strutturalmente, possono essere indipendentemente modificati (3).

Gli studi sulla DNA polimerasi ci hanno permesso di ottenere mutanti con una maggiore processività e, quindi, con più interesse applicativo nella long chain PCR (4, 5).

Lo sviluppo di un vettore "shuttle" capace di trasportare geni in *Sulfolobus* ed *E.coli* permetterà di affrontare la genetica molecolare degli estremofili e studiare i meccanismi molecolari dell'adattamento alle alte temperature.

Referenze

- 1) C. Aguilar, I. Sanderson, M. Moracci, M. Ciarabella, R. Nucci, M. Rossi, L.H. Pearl: Crystal structure of the β -glycosidase from the hyperthermophilic Archaeon *Sulfolobus solfataricus*: resilience as a key factor in thermostability. *Journal of Molecular Biology* 271, 789-802, 1997.
- 2) M. Moracci, A. Trincone, G. Perugino, M. Ciarabella, M. Rossi: Restoration of the Activity of Active-Site Mutants of the Hyperthermophilic β -Glycosidase from *Sulfolobus solfataricus*: Dependence of the Mechanism on the Action of External Nucleophiles. *Biochemistry*, 37(42): 17262-270, 1998
- 3) A. Giordano, R. Cannio, F. La Cara, S. Bartolucci, M. Rossi, C. Raia: Asn249Tyr Substitution at the Coenzyme Binding Domain Activates *Sulfolobus solfataricus* Alcohol Dehydrogenase and Increases Its Thermal Stability. *Biochemistry*, 38(10), 3043-3054, 1999
- 4) F.M. Pisani, M. De Felice, M. Rossi: Amino acid residues involved in determining the processivity of the 3'-5' exonuclease activity in a family B DNA polymerase from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Biochemistry*, 37(42): 15005-12, 1998
- 5) F.M. Pisani, M. De Felice, F. Carpentieri, M. Rossi: Biochemical characterisation of clamp-loader complex homologous to eukaryotic factor C from hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Journal of Molecular Biology* 301, 617-73, 2000.

**ALLA SCOPERTA CON IL MICROSCOPIO A SCANSIONE DI FORZA DI COME LA SEQUENZA
PILOTI LE FLUTTUAZIONI CONFORMAZIONALI E LE PROPRIETA'
MECCANICHE LOCALI DEL DNA**

B. Samori', G. Zuccheri, A. Bergia

Dipartimento di Biochimica, via Irnerio 48, 40126 Bologna

L'energia di deformazione del DNA gioca un ruolo cruciale nei suoi processi di impaccamento e nelle sue funzioni nella cellula. Uno sforzo considerevole e' stato speso da molti gruppi di ricerca nello sviluppare metodologie sperimentali e teoriche in grado di valutare le curvature e flessibilita' locali lungo la catena del DNA. Questi studi furono di norma condotti su sequenze espressamente progettate con curvature e flessibilita' anomale. Abbiamo messo a punto metodologie sperimentali in grado di ottenere questo risultato su qualsiasi sequenza del DNA tramite la Microscopia a Scansione di Forza . Su questa base e' stato possibile studiare correlazioni fra le proprieta' statiche e e quelle dinamiche locali lungo una catena di DNA e la loro dipendenza dalla stabilita' termodinamica delle sequenze coinvolte.

Sessione di Unità Funzionali Biologiche Supramolecolari

BIOFISICA DEL DNA

Prof. Claudio Nicolini

Università degli Studi di Genova, Corso Europa, 30 16132 Genova – e-mail: distbimo@ibf.unige.it

Nel corso degli anni la ricerca sulla struttura-funzione del DNA, dai singoli geni al genoma nel suo insieme, ha toccato i più diversi aspetti clinici, fondamentali e strumentali coinvolgendo tutti i settori dell'INBB e della Biofisica, da quella molecolare a quella applicata al confine colla Elettronica (Bioelettronica) da un lato e colla Medicina (Tecnologie Biomediche) dall'altro.

La letteratura citata documenta tale evoluzione nella caratterizzazione sia dei vari ordini di struttura del DNA a partire da quella primaria sino alla quaternaria, dalle spettropolarimetria, analisi di immagini 3D ad alta risoluzione e calorimetria differenziale a scansione alla Risonanza Magnetica Nucleare Multidimensionale ed alla Microscopia alla Risoluzione Atomica, sia dell'espressione genica nei vari sistemi cellulari umani, dall'elettroforesi all'utilizzo di microarrays via micromachining o tecnologie LB e di Laser o CCD dedicati accoppiati a sofisticate analisi matematico-statistiche. Questa overview intende rappresentare una sintesi di tale sforzo vissuto in prima persona da entrambi i lati dell'Oceano Atlantico, con una certa enfasi nei recenti sviluppi del DNA Chip dalle forze implicazioni sanitarie ed industriali, oggetto di recentissime ricerche nazionali di avanguardia ed altamente competitive.

Nicolini, A. Kozu, T. Borun, and R. Baserga. "Chromatin Changes During the HeLa Cell Cycle". *J.BIOL. CHEM.* (1975) 250: 3381-3385.

Nicolini, N. Sally, and S. Baserga. "Effect of Chromosomal Proteins Extractable with Low Concentration NaCl on Chromatin Structure of Resting and Proliferating Cells". *PROC. NAT. ACAD. USA* (1975) 72:2361-2365.

Nicolini, and R. Baserga. "Chromatin Structure and Function in Proliferating cells". *BIOPHYSICA ET BIOCHEMICA ACTA*, 458, 109-134 (1976).

Nicolini C., F. Kendall and R. Baserga. "DNA Structure in Sheared and Unsheared Chromatin" *SCIENCE*. 192: 796-798 (1976)

Nicolini C., W.A.Linden, S. Zietz and C.T.Wu "Objective Identification of Non-proliferating Cells in a Melanoma B16 Tumor", *NATURE*, 163-176, 270 (1977)

Nicolini C., F. Kendall, C. Desai, B. Clarkson and J. Fried "The G0-G1 Transition of WI-38 Cells. I. Laser Flow Microfluorimetric Studies". *EXP. CELL. RES.* 106: 111-117 (1977)

Nicolini C., F. Kendall and W. Giaretti "Objective Identification of Cell Cycle Phases and Subphases by Automated Image Analysis". *BIOPHYSICAL JOURNAL*, 19: 163-176 (1977)

Nicolini "Chromatin Structure; from nuclei to genes" (invited review) *ANTICANCER RESEARCH* 3, 63-86, 1983.

Nicolini, V. Trefiletti, B. Cavazza and E. Patrone "Quaternary and quaternary DNA structure in native nuclear chromatin: microcalorimetric characterization" *SCIENCE* 219: 176-178 (1983)

Nicolini et al. "Nuclear pores and Interphase Chromatin: high-resolution image analysis and freeze etching" *J. CELL SCIENCE* (1984) 72, 75-87

Nicolini C., Belmont A.S., Zietz S. "Differential Scattering of Circularly Polarized Light by Chromatin Modeled as a Helical Array of Dielectric Ellipsoids Within the Born Approximation" *BIOPOLYMERS*, (1985) 24:1301-1321.

Diaspro, M. Bertolotto, L. Vergani, C. Nicolini "Polarized light scattering of nucleosomes and polynucleosomes. In situ and in vitro studies", *IEEE TRANSACTION ON BIOMEDICAL ENGINEERING*, 38, 670-8 (1991)

Nicolini, M. Adami, F. Antolini, F. Beltram, M. Sartore & S. Vakula " Biosensors: a step to bioelectronics", *PHYSICS WORLD*, 5, 5, 30-34, (1992)

Nicolini C., Catasti P., Szilagyi L., Yau P. "Effect of selective removal of chromosomal proteins on the DNA internal motions within nucleosomes during the cell cycle", *BIOCHEMISTRY*, 32, 64-65, 1993.

Nicolini C., Facci P., Allia P., Scanning Probe Microscopy of Nucleosomes and Polynucleosomes, *NANOBIولوجY* 4, 105-115, 1996.

Nicolini C., Erokhin V., Facci P., Guerzoni S., Rossi A., Paschkevitch P., "Quartz balance DNA sensor", *BIOSENSORS & BIOELECTRONICS* 12, 613-618, 1997.

Maccioni E., Vergani L., Dembo A., Mascetti G., Nicolini C., "X-ray small angle scattering study of chromatin as a function of fiber length", *MOLECULAR BIOLOGY REPORTS* 25, 73-86, 1998.

1. M. Sartore, M. Adami, M.K. Ram, C. Nicolini, A controlled atmosphere chamber for atomic force microscopy investigations, *REV. SCI. INSTRUM.*, 2000 (in press).

BIOFISICA DELLE INTERAZIONI FRA GRADIENTI DI TEMPERATURA ED ATTIVITÀ DI ENZIMI IMMOBILIZZATI

Prof. Damiano Gustavo Mita

Dipartimento di Medicina Sperimentale - Seconda Università di Napoli – S. Maria di Costantinopoli, 16 – 80138 Napoli

Quando una membrana catalitica ed idrofobica viene posta in un bioreattore operante in condizioni non-isoterme si osserva un aumento di attività enzimatica rispetto a quella esibita nello stesso bioreattore operante in condizioni isoterme paragonabili. Gli aumenti percentuali di attività, dell'ordine del 20-40 % con una differenza di temperatura di 1°C attraverso la membrana catalitica, dipendono dall'enzima e dal metodo di immobilizzazione utilizzato. Questi aumenti, inoltre, sono stati trovati decrescenti all'aumentare della concentrazione del substrato e della temperatura media del bioreattore non-isotermo e crescenti all'aumentare della differenza di temperatura applicata e della idrofobicità della membrana catalitica.

Verranno discussi alcuni risultati particolari ottenuti immobilizzando separatamente beta galattosidasi, penicillina G acilasi o ureasi su membrane planari di teflon o nylon. Il processo di immobilizzazione enzimatica è stato ottenuto mediante grafting chimico o con radiazioni gamma di opportuni monomeri sulle membrane inerti di teflon o nylon.

I risultati ottenuti sono stati interpretati in termini di influenza del trasporto di substrato attraverso la membrana catalitica indotto dal processo di termodialisi. Con il nome di termodialisi si intende il trasporto selettivo di materia attraverso una membrana idrofobica, porosa e non selettiva, che separa due soluzioni mantenute a differenti temperature. La forza termodinamica responsabile di questo trasporto di materia è il gradiente di temperatura.

Tenendo presente il processo di termodialisi, sono state elaborate equazioni differenziali la cui soluzione ha permesso di ottenere i profili di concentrazione del substrato nella membrana catalitica, in presenza ed assenza di catalisi, come pure in condizioni isoterme e non-isoterme. Da questi profili di concentrazione sono stati dedotti gli andamenti degli incrementi percentuali di attività catalitica della membrana in funzione della concentrazione del substrato e della temperatura media del bioreattore non isotermo, confermando in tal modo il ruolo del processo di termodialisi, e quindi dei gradienti di temperatura, nel modulare l'attività di membrane catalitiche in questo tipo di bioreattori.

Estendendo il concetto di bioreattore non-isotermo è stato inoltre realizzato, per la prima volta al mondo, un biosensore non-isotermo per la determinazione del glucosio mediante immobilizzazione di glucosio ossidasi. I risultati sperimentali hanno dimostrato che il biosensore non-isotermo rispetto al funzionamento in condizioni isoterme presenta alcuni vantaggi, come ad esempio:

1) maggiore sensibilità; 2) più basso limite di rilevabilità della concentrazione di glucosio; 3) tempi di risposta più rapidi; 4) correnti dinamiche e stazionarie maggiori.

Bibliografia

Mohy Eldin M.S., Portaccio M., Diano N., Rossi S., Bencivenga U., D'Uva A., Canciglia P., Gaeta F.S. and Mita D.G., Influence of the microenvironment on the activity of enzymes immobilized on teflon membranes grafted by gamma-radiation. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 7, 251-261 (1999).

Santucci M., Portaccio M., Rossi S., Bencivenga U., Gaeta F.S. and Mita D.G., "A glucose biosensor operating under non-isothermal conditions: the dynamic response". *Biosensors and Bioelectronics*, 14, 737-747 (1999)

Santucci M., Portaccio M., Mohy Eldyn M.S., Pagliuca N., Rossi S., Bencivenga U., Gaeta F.S. and Mita D.G., "Glucose determination by means of a new reactor/sensor system operating under non-isothermal conditions". *Enzyme and Microbial Technology*, 26, 593-604 (2000).

El-Masry M.M., De Maio A., Di Martino S., Diano N., Bencivenga U., Rossi S., Grano V., Canciglia P., Portaccio M., Gaeta F.S. and Mita D.G., "Modulation of immobilized enzyme activity by altering the hydrophobicity of nylon grafted membranes. Part 1: isothermal conditions". *J. Mol. Catal. B: Enzymatic.*, 9, 219-230,(2000).

El-Masry M.M., De Maio A., Di Martino S., Bencivenga U., Rossi S., Manzo B.A., Pagliuca N., Canciglia P., Portaccio M., Gaeta F.S. and Mita D.G., "Modulation of immobilized enzyme activity by altering the hydrophobicity of nylon grafted membranes. Part 2: Non-isothermal conditions". *J. Mol. Catal. B: Enzymatic.*, 9, 231-244 (2000).

Mita D.G. " Biocatalytic membranes operating under non-isothermal conditions: fundamentals and applications *Research Advances in Biotechnology and Bioengineering*, 1, 1-15 (2000)

ANALISI STATISTICA MULTIVARIATA DI SEGNALI BIOLOGICI SPAZIO- E TEMPO-DIPENDENTI.

Prof. Alfredo Colosimo

Dip.to di Scienze Biochimiche - Univ. di Roma "La Sapienza" (colosimo@caspur.it)
P.le A. Moro, 5 - 00185 Roma - (tel/fax 0039-06-49910957)

Scopo di questa linea di ricerca é la messa a punto e l'utilizzazione di tecniche statistiche multivariate utilizzabili, nello studio di problemi biologici complessi, a diversi livelli: da quello molecolare fino a quelli a massimo grado di integrazione. A titolo esemplificativo verranno discusse due situazioni molto diverse fra loro:

A) Pattern di ricorrenza nella struttura primaria di proteine. L'uso combinato della Analisi delle Ricorrenze e della Analisi in Componenti Principali nello studio della struttura primaria della beta-lattamasi e dei suoi mutanti naturali e artificiali ha permesso di distinguere fra mutazioni puntuali letali (naturali) e non-letali (artificiali) con un'accuratezza di circa l'85% (ref. 1). Utilizzando lo stesso approccio é stato possibile individuare, fra le strutture primarie di 13 rubredoxine batteriche, quella appartenente all'unica specie termofila presente (*Pyrococcus furiosus*). Il notevole potere euristico di questo metodo, relativamente semplice, lo rende di grande utilità potenziale per l'ingegneria genetica (ref. 2).

B) Effetti della temperatura su popolazioni ittiche del Nord-Atlantico Il pattern di correlazioni temporali tra la transizione dallo stato giovanile a quello adulto (recruitment) nei merluzzi (*Gadus morhua*) e la temperatura superficiale marina é stato studiato utilizzando serie temporali riferite alla regione circostante la Penisola di Kola (Mare di Barents), e al Mare del Nord. Nella regione di Kola si evidenziano due effetti indipendenti della variabilità nella temperatura sulla dinamica del recruitment, suggerendo l'esistenza di due meccanismi differenti. Nel Mare del Nord la situazione é più semplice, e i dati sono compatibili con un unico meccanismo di interazione. Inoltre, l'effetto generale della temperatura sul recruitment dei merluzzi ha direzioni opposte nelle due regioni: correlazione diretta nel Mare di Barents ed inversa nel Mare del Nord. Ciò é probabilmente dovuto all'esistenza di un regime ottimale di temperatura per il recruitment corrispondente ad una situazione intermedia tra il 'freddo' Mare di Barents ed il 'caldo' Mare del Nord (ref. 3).

Referenze

1. Zbilut J.T., A. Giuliani, C.L. Webber and A. Colosimo., (1998), "Recurrence Quantification Analysis in structure/function relationships in proteins: an overview of a general methodology applied to the case of beta-lactamase", *Prot. Engineer.*, 11: 87-93.
2. Giuliani A., R. Benigni, P. Sirabella, J. P. Zbilut , and A. Colosimo, (2000) "Non linear methods in the analysis of protein sequences: a case study on rubredoxins", *Biophys. J.*, 78:136-149
3. Sirabella P., Giuliani A., Colosimo A. and Dippner J. (2000), "Deconvolving the climate effects on cod recruitment by principal component analysis and canonical correlations". *Marine Ecology Progress Series*, in the press.

BASI MOLECOLARI DELLA STABILITA' STRUTTURALE DELLE PROTEINE

Gaetano IRACE¹, Ettore Bismuto¹, Pier Luigi MARTELLI², Anna De Maio³, Damiano Gustavo Mita³, Rita CASADIO^{2,4} &

¹Dipartimento di Biochimica e Biofisica, Seconda Università di Napoli.

Via Costantinopoli 16, 80138 Napoli, ITALY.

²Biocomputing Group, Centro Interdipartimentale per le Ricerche Biotecnologiche,

Università degli Studi di Bologna, Via Irnerio 48, 40126 Bologna, ITALY.

³Dipartimento di Fisiologia Umana e Funzioni Biologiche Integrate, Seconda Università di Napoli, Via Costantinopoli 16, 80138 Napoli.

⁴Laboratorio di Biofisica, Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Bologna, Via Irnerio 42, 40126 Bologna, ITALY.

La conoscenza delle basi molecolari della stabilità strutturale delle proteine è di fondamentale importanza per la comprensione dei meccanismi preposti al *folding* nonché dei limiti entro i quali è stata possibile la comparsa della vita. Sebbene la vita è possibile entro un intervallo di oltre 200°C, l'organizzazione strutturale delle proteine isolate dagli organismi che popolano gli ambienti più freddi non è significativamente differente rispetto a quella degli organismi che vivono alle temperature più alte. Le proteine necessitano di due importanti caratteristiche per essere efficienti macchine catalitiche: la prima è rappresentata dall'organizzazione spaziale del sito catalitico, che deve essere in grado di abbassare l'energia del complesso attivato, e la seconda da un supporto strutturale stabile ospitante il sito funzionale. E' luogo comune che stabilità e funzione dipendano da un sottile bilancio tra interazioni stabilizzanti e destabilizzanti. In particolare, le seconde concorrono ad impartire quella flessibilità intrinseca che consente alla macromolecola di funzionare in maniera corretta. La conformazione di una proteina non è unica ma piuttosto un insieme dinamico di conformazioni in rapido equilibrio che differiscono l'una dall'altra per piccoli dettagli strutturali. Il comportamento dinamico di una proteina dipende dalle fluttuazioni termiche che rendono possibili i processi di interconversione tra una subconformazione e l'altra. Le nostre precedenti ricerche hanno contribuito a mostrare che l'analisi del decadimento emissivo dei fluorofori proteici, in primo luogo i residui triptofanilici, è uno dei metodi più appropriati per studiare il comportamento dinamico delle macromolecole proteiche. Infatti, la dinamicità della struttura proteica determina la comparsa di una distribuzione, più o meno ampia, di velocità di decadimento emissivo, che può essere messa in relazione con la flessibilità strutturale dei microintorni in cui sono localizzati i residui fluorescenti. In questi ultimi anni, la nostra attenzione si è concentrata sul decadimento emissivo di un enzima tetrameric, la β -galattosidasi, isolata da un microorganismo estremofilo, il *Solfobolus sulfataricus*, la cui struttura tridimensionale è stata recentemente risolta. Il decadimento emissivo di questa proteina è estremamente complesso a causa della presenza di 17 residui triptofanili per subunità. L'analisi dei dati ha evidenziato la presenza di due classi di residui triptofanilici, una delle quali è caratterizzata da microintorni dinamici ed accessibili al solvente, l'altra da microintorni strutturalmente più rigidi e praticamente inaccessibili (1). La prima classe di residui è stata messa in relazione con le regioni molecolari implicate nella formazione del sito catalitico; queste regioni mostrano un notevole incremento di flessibilità strutturale all'aumentare della temperatura, coerente con l'incremento dell'attività catalitica (2). Viceversa, le regioni molecolari strutturalmente più rigide sono state identificate come determinanti di stabilità; ciò è avvalorata dall'osservazione che la flessibilità conformazionale di queste regioni è scarsamente influenzata dall'aumento di temperatura. La correlazione tra tempi di vita dello stato eccitato dei residui triptofanilici e mobilità del microintorno in cui essi sono localizzati è stata ulteriormente corroborata ricostruendo il decadimento emissivo a partire da studi di simulazione dinamica (3).

Recentemente la nostra attenzione si è diretta allo studio del decadimento emissivo della β -galattosidasi da *Aspergillus oryzae*, un microorganismo mesofilo. L'organizzazione strutturale di questa proteina, ricostruita mediante studi di simulazione dinamica, è sostanzialmente simile a quella dell'omologa proteina isolata da *Solfobolus sulfataricus*. I risultati ottenuti mostrano che il decadimento emissivo mostra due componenti che, analogamente a quanto osservato per l'enzima termofilo, possono essere messi in relazione con residui triptofanilici localizzati in segmenti flessibili e segmenti rigidi della matrice proteica. Tuttavia, nell'enzima mesofilo, le regioni strutturalmente più rigide sono, comunque, dotate di maggiore flessibilità se comparate a quelle della proteina termofila. L'intrappolamento dell'enzima mesofilo in 1% agarosio determina un irrigidimento della struttura proteica e rende il decadimento emissivo abbastanza simile a quello osservato per la proteina da *Solfobolus sulfataricus*. Le conclusioni sono consistenti con i dati di simulazione dinamica su modelli proteici in cui sono imposte restrizioni sui residui amminoacidici disposti sulla superficie proteica.

Sessione di Biomolecole

BIOMOLECOLE DELLO STRESS OSSIDATIVO E DELLA DIFESA ANTIOSSIDANTE

Prof. Giuseppe Rotilio

Dipartimento di Biologia Università di Roma "Tor Vergata"

Il diossigeno e i suoi attivatori biologici, i metalli di transizione ferro e rame legati a proteine specifiche, sono le fonti energetiche in batteri e mitocondri ma sono anche i generatori di radicali liberi molto reattivi e ossidanti. Dall'equilibrio tra fattori proossidanti e antiossidanti (enzimi o molecole di spegnimento non catalitico, spesso di origine alimentare) nasce il concetto di regolazione redox dei fenomeni cellulari, dalla trascrizione genica alla trasduzione ormonale, dall'apoptosi alla risposta infiammatoria, dalla trasformazione neoplastica alla motilità vascolare.

Saranno presentati recenti risultati del nostro laboratorio che riguardano due aree patologiche distinte in cui i radicali liberi sembrano avere un ruolo determinante: l'infezione virale e le malattie neurodegenerative. La costruzione di modelli sperimentali adeguati permette di esplorare aspetti particolari dell'evento patologico con risultati che occorre estrapolare con molta prudenza. Un approccio "biased" dalla teoria generale ha limiti intrinseci insuperabili, ma può generare interventi terapeutici mirati che giustificano l'utilizzo di una chiave di lettura redox per gli svariati quadri fenomenologici delle patologie umane.

MODULAZIONE POST-TRADUZIONALI DELL'INIBITORE CALPASTATINA COINVOLTE NELLA REGOLAZIONE DELLA PROTEOLISI CALCIO DIPENDENTE.

Melloni, E., Salamino, F., De Tullio, R., Averna, M., Minafra, R., and Pontremoli, S.

Università degli Studi di Genova, Dipartimento di Medicina Sperimentale,
Sezione di Biochimica, Genova.

La calpastatina, l'inibitore naturale della proteasi calcio dipendente calpaina, va incontro ad una serie di modificazioni molecolari che sembrano essenziali per adattare la molecola a suoi vari compiti. La molecola della calpastatina è costituita da cinque domini: uno N-terminale e quattro domini inibitori omologhi.

Nelle cellule sono espresse diverse forme di calpastatina, dovute a splicing alternativo. La regione più sensibile alle modificazioni post-trascrizionali è quella N-terminale: questa regione viene modificata in modo tessuto specifico mediante espressione di specifici esoni, che determina l'inserzione di segmenti contenenti siti per modificazioni post-traduzionali. Anche il numero di domini inibitori ripetitivi può variare; la forma più rappresentata di calpastatina nel cervello di ratto è costituita dal dominio N-terminale e da un singolo dominio ripetitivo. Questa forma sembra essere quella più efficiente, in quanto contiene tutte le informazioni presenti nel dominio N-terminale e il sito inibitorio ha perso interferenze steriche dovute agli altri domini ripetitivi.

Nelle cellule non stimulate la calpastatina è in forma aggregata e localizzata vicino al nucleo. Un aumento della concentrazione intracellulare di calcio determina una redistribuzione della calpastatina che diffonde nel citosol come proteina solubile. Se questa condizione viene prolungata nel tempo, la quantità totale di calpastatina tende a diminuire considerevolmente, suggerendo una sua degradazione. Queste modificazioni di localizzazioni intracellulari sono funzionali, in quanto consentono alla calpaina di attivarsi senza interferenze da parte dell'inibitore che viene reso disponibile solo al momento opportuno.

Questi movimenti sono dovuti a modificazioni post-traduzionali reversibili a cui va incontro la calpastatina nelle varie condizioni intracellulari. Nelle condizioni normali, l'inibitore è nella forma fosforilata, che favorisce la sua aggregazione e sottrazione dal citosol. L'aumento del calcio all'interno della cellula determina la defosforilazione della calpastatina e una sua redistribuzione nel citosol. Questo processo è perfettamente reversibile ed è catalizzato in un senso dalla proteina chinasi cAMP dipendente (PKA) e nell'altro da una fosfo-proteina fosfatasi (PPasi) che diventa attiva solo in seguito ad un aumento intracellulare di calcio.

La fosforilazione PKA dipendente controlla quindi i livelli di calpastatina citosolica, mentre la fosforilazione mediata dalla proteina chinasi C (PKC) sembra essere più interessata alla modulazione dell'efficienza inibitoria e delle selettività dell'inibitore.

RESVERATROL INHIBITION OF LIPID PEROXIDATION

Bruna Tadolini^{a,c}, Claudia Juliano^b, Luisella Piu^b, Flavia Franconi^b and Luciana Cabrini^d.

^aDipartimento di Scienze Biomediche, ^bDipartimento di Scienze del Farmaco, University of Sassari; ^cIstituto Nazionale Biostrutture e Biosistemi, Osilo, Sassari; ^dDipartimento di Biochimica, Università di Bologna.

To define the molecular mechanism(s) of resveratrol inhibition of lipid peroxidation we have utilized model systems that allow us to study the different reactions involved in this complex process. Resveratrol proved a) to inhibit more efficiently than either Trolox or ascorbate the Fe^{2+} catalyzed lipid hydroperoxide-dependent peroxidation of sonicated phosphatidylcholine liposomes; b) to be less effective than Trolox in inhibiting lipid peroxidation initiated by the water soluble AAPH peroxy radicals; c) when exogenously added to liposomes, to be more potent than α -tocopherol and Trolox, in the inhibition of peroxidation initiated by the lipid soluble AMVN peroxy radicals; d) when incorporated within liposomes, to be a less potent chain-branching antioxidant than α -tocopherol; e) to be a weaker antiradical than α -tocopherol in the reduction of the stable radical DPPH. Resveratrol reduced Fe^{3+} but its reduction rate was much slower than that observed in the presence of either ascorbate or Trolox. However, at the concentration inhibiting iron catalyzed lipid peroxidation, resveratrol did not significantly reduce Fe^{3+} , contrary to ascorbate. In their complex, our data indicate that resveratrol inhibits lipid peroxidation mainly by scavenging lipid peroxy radicals within the membrane, like α -tocopherol. Although it is less effective, its capacity of spontaneously entering the lipid environment confers on it great antioxidant potential.

MOLECULAR GENOMICS OF CARDIOGENESIS IN EMBRYONAL STEM CELLS

Carlo Ventura and Margherita Maioli

National Laboratory of the National Institute of Biostructures and Biosystems and Polo Nazionale della Bioelettronica – PST Elba, 07033 Osilo, Italy.

The zinc finger-containing transcription factor GATA-4 and the homeodomain Nkx-2.5 govern crucial developmental fates and have been found to promote cardiogenesis in embryonic cells exposed to the differentiating agent dimethyl sulfoxide (DMSO). Nevertheless, intracellular activators of these transcription factors are largely unknown. Here, we show that pluripotent P19 cells express the prodynorphin gene, an opioid gene encoding for the dynorphin family of opioid peptides. P19 cells were also able to synthesize and secrete dynorphin B, a biologically active end-product of the prodynorphin gene. DMSO-primed GATA-4 and Nkx-2.5 gene expression was preceded by a marked increase in prodynorphin gene expression and dynorphin B synthesis and secretion. The DMSO effect occurred at the transcriptional level. Noteworthy, in the absence of DMSO, dynorphin B triggered GATA-4 and Nkx-2.5 gene expression and led to the appearance of both β -myosin heavy chain (MHC) and myosin light chain-2V transcripts, two markers of cardiac differentiation. Moreover, dynorphin B-exposed cells were positively stained in the presence of MF 20, a mouse monoclonal antibody raised against MHC. Opioid receptor antagonism and inhibition of opioid gene expression by a prodynorphin antisense phosphorothioate oligonucleotide blocked DMSO-induced cardiogenesis, suggesting an autocrine role of an opioid gene in developmental decisions.

We next explored whether the differentiating response elicited by this gene may involve the orchestration of multiple motifs of gene expression. For this purpose, RNA samples from P19 cells at different stages of dynorphin B-induced cardiomyogenesis were reverse-transcribed into double stranded cDNAs and processed through a method called “serial analysis of gene expression” (SAGE). In this method, short sequence tags were isolated from cells cultured in the absence or presence of the opioid agonist, concatenated and cloned. The sequence of the clones allowed development of a profile for the gene expression. Quantitative data regarding the prevalence of an expressed gene was derived from the frequency that a given sequence was found. Furthermore, new transcripts corresponding to novel tags could be identified. Sage analysis revealed that exposure of ES cells to dynorphin B, besides activating cardiogenic and cardiac specific genes, resulted in the induction of a more complex program of gene expression. This program included different opioid genes, genes encoding for multiple transcription factors and signaling molecules within PKC/MAPK/PI3K cascades, pro-apoptotic genes and genes involved in cell cycle progression.

Hence, the SAGE method appears to pave the way for a large-scale analysis of genome function and may provide a valid opportunity to take a glimpse as how the intricate machinery of cells is driven by genes.

ABSTRACT
DEI POSTER

**THE ICLN PROTEIN INVOLVED IN CELL VOLUME REGULATION: STRUCTURAL,
PHARMACOLOGICAL AND ELECTROPHYSIOLOGICAL ASPECTS OF THE RECONSTITUTED
WILD TYPE CHANNEL AND SOME MUTANTS.**

**S. Rodighiero, G. Meyer, C. Bazzini, G. Bottà, M.L. Garavaglia, °H. Fürst, °M. Gschwentner, °M Ritter,
°M. König, °M. Paulmichl.**

Almost all cells respond to a cell swelling by activating a volume regulated anion channel. Even if the current has been well characterised, the molecular identification of the channel protein is still lacking. One of the main candidate is the ICLn protein, whose role in volume decrease (RVD), though well assessed, is still unclear. Experiments with the purified ICLn protein reconstituted in planar lipid bilayer showed that ICLn is able to spontaneously insert in the membrane, behaving as an ion permeable pore. The wild type (WT) reconstituted channel gives rise to a current blocked by nucleotides, similarly to the native swelling dependent current ($I_{Cl,swell}$), but shows a more pronounced cation selectivity. Ca^{2+} is able to influence the selectivity of the reconstituted channel by shifting the relative permeability towards anions and it causes a significant decrease of the open probability (P_o). The structure of the selectivity filter and the pharmacological profile of the reconstituted channel were investigated by site directed mutagenesis. After mutating the aminoacid G49, the sensitivity to the nucleotide block was lost, so confirming previous data that suggested a central role of this aminoacid in the nucleotide binding. Indirect structural information on the putative pore forming region has been obtained by mutating a histidine (H64) that should lie in the predicted pore region of ICLn, according to the beta-barrel based 3D model for the protein. The experiments suggest that H64 accesses to the ion-conducting tunnel of the pore even if it's not involved in the Ca^{2+} effect on the selectivity. Mutation experiments aimed to investigate the role of four acidic aminoacids (E41, D48, D69, E76) in mediating the Ca^{2+} modulation revealed that at least E41 and D48 are likely to be involved in a calcium-binding site, as the addition of Ca^{2+} could not significantly affect the selectivity of the mutants. Moreover, in the case E41C mutant the influence on the P_o exerted by Ca^{2+} was also lost. Data show that ICLn can indeed act as an ionic channel, thus suggesting it could represent one of the main component of the molecular structure responsible for the native $I_{Cl,swell}$. Anyway, as some differences exist between the native and the reconstituted current, it can't be ruled that other molecular partners intervene in native condition.

Dept. of General Physiology and Biochemistry, University of Milan, Via Celoria 26 - 20133 Milano, Italy,
°Dept. of Physiology, University of Innsbruck, Fritz-Pregl-Strasse 3, A-6020 Innsbruck, Austria

STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF THE TRANSCRIPTIONAL REGULATOR NadR BY LIMITED PROTEOLYSIS

N. Raffaelli, F. Mazzola, G. Orsomando*, A. Amici, M. Emanuelli, G. Magni

Istituto di Biochimica, Facoltà di Medicina, *Dipartimento di Biotecnologie Agrarie ed Ambientali, Università di Ancona.

In *E.coli* and *S.typhimurium* NAD biosynthesis is under control of the transcriptional repressor NadR. This protein specifically binds to the so-called NAD box, a consensus inverted DNA repeat that is found upstream of genes involved both in the de novo synthesis (*nadA* and *nadB*) and in the recycling routes (*pncB*). Regulation by NadR probably occurs in response to internal NAD concentrations, although this has never been shown directly. In addition to its role as a transcriptional regulator, NadR is also involved in the transport of NMN across the cytoplasmic membrane. Both *E. coli* and *S. typhimurium* have the unusual ability to transport the intact pyridine mononucleotide moiety across the membrane; in this process the activity of the integral membrane protein NMN permease (PnuC) is modulated by NadR, which stops activating the PnuC transport system following NAD accumulation. Recently we have demonstrated that NadR is also endowed with a NMN adenylyltransferase activity, being able to directly synthesize NAD from the NMN imported into the cell. All together these results led to the proposal of an attractive model in which NadR behaves as an allosteric protein: in the presence of high NAD levels it might assume a conformation which allows both repression of NAD biosynthetic genes transcription and inhibition of NMN transport system, conversely, when NAD levels are low, NadR might associate with the membrane allowing full expression of biosynthetic genes, stimulating NMN uptake and directly converting the imported NMN to NAD. The C-terminal half of the protein is suspected to modulate NMN transport; the N-terminal half contains the NMN adenylyltransferase activity and the first 60 amino acids at the N-terminus seem to be involved in the specific binding to DNA. The central region of the protein contains a Walker-type ATP-binding motif and appears important for signaling the transition of NadR between the repressor and transport forms. In order to get insight into the domain organization of NadR and to verify the predicted conformational change upon NAD binding, we conducted limited proteolysis experiments on the pure recombinant protein. When limited proteolysis digestion with trypsin was carried out with the protein in the absence of nucleotides, several peptide fragments were generated. Studies on the kinetics of digestion revealed that both the the N-terminus (encompassing amino acid 1-61), and the C-terminus (encompassing amino acid 325/338-410) were particularly susceptible to proteolysis, suggesting that these regions are very flexible and highly exposed to the solvent. When proteolysis was conducted in the presence of NAD, the same susceptibility was observed, but the fragment 62-325/338 was not further digested, even after 2 hours incubation at a trypsin:NadR ratio of 1:18. The same results were obtained by carrying out digestions with a broader-specificity protease such as subtilisin. To investigate the specificity of the nucleotide interaction, further digestions were carried out in the presence of ATP, AMP, CTP, ribose-5-phosphate, NMN and DNA. Only ATP, AMP and CTP gave the same proteolytic digestion pattern obtained in the presence of NAD. The inaccessibility of the residues of the 36 kDa fragment, recognized by the proteases in the absence of effectors, strongly suggests a conformational change of this region within the complex nucleotide-NadR structure. Experiments are in progress in order to assess wether such region retains both the NMN adenylyltransferase activity and the ability to specifically bind to DNA.

**PURIFICATION, MICROSEQUENCING, CLONING AND EXPRESSION OF HUMAN ERYTHROCYTES
PYRIMIDINE 5'-NUCLEOTIDASE (PN-I) AND ITS IDENTIFICATION AS P36 INTERFERON- α
INDUCED PROTEIN .**

Amici A, Emanuelli M, Raffaelli N, Naponelli V, Magni G

Istituto di Biochimica, Università di Ancona, Italy,

During differentiation, human erythrocyte lose their RNA content by its degradation and release of the resulting nucleotides. Specific pyrimidine nucleotidases have been identified. They degrade pyrimidine monophosphates to the corresponding nucleosides, that diffuse outside the cells. Severe hereditary states have been identified in a relatively large number of individuals with a wide geographic distribution. The genetic defect is transmitted as an autosomal recessive trait. Impaired degradation of RNA results in aggregates of intact or partially degraded ribosomal nucleoprotein. This provide the most distinctive hematologic finding in this disease resulting in a pronounced basophilic stippling on the Wright's-stained peripheral smears. Futhermore accumulation of pyrimidine nucleotides were observed in patients which were deficient in pyrimidine nucleotidases activity both in the cases of genetic defect and lead poisoning (aquired deficiency). The pyrimidine specific 5'-nucleotidase (PN-I) was purified in our laboratory from human erythrocytes yielding a homogeneous preparation. The protein (34,000 Mw) was digested by CNBr and trypsin and the peptides obtained were micropurified and microsequenced. The resulting sequences were electronically searched for similarity at the NCBI with the BLAST tools. High identities were found to several cDNA sequences of the human ESTs data bank (dbEST) and to four peptides derived from the IFN- α induced protein, p36, in Raji cells (1). PN-I's cDNA has been PCR amplified by specific primers and the product has been sequenced for confirmation, and inserted in pT7-7 plasmid which has been used to transform BL 21 DE3 *E. coli*. The recombinant cDNA expressed a 286-residue protein yielding a fully active enzyme, whose kinetic and molecular properties are indistiguishable from those already reported (2) for the non recombinant protein . Rabbit antisera rised against two peptides chosen from PN-I tryptic digention, recognized both wild-type and recombinant PN-I.

1) Rich SA, Bose M, Tempst P, Rudolphsky U, J Biol Chem (1996) 271:1118-1126.

2) Amici A, Emanuelli M, Magni G, Raffaelli N, Ruggieri S. FEBS Letters (1997) 419:263-267.

PURIFICATION AND PROPERTIES OF A NEW ELICITIN-LIKE PROTEIN FACTOR FROM *PHYTOPHTHORA NICOTIANAE*, ENDOWED WITH PHOSPHOLIPASE ACTIVITY

Orsomando G., Lorenzi M., Lanciotti S., Frega N.G., Ruggieri S.

Dipartimento di Biotecnologie Agrarie e Ambientali, Università di Ancona

During the interaction with host plants, the phytopathogenic oomycete *Phytophthora* spp. secretes bioactive signal molecules, which are involved in the development of resistance/susceptibility responses on the plant. In particular, it has been shown that the in vitro cultured *Phytophthora* spp. fungal pathogens release into the culture medium different protein factors, collectively named elicitins, many of which have been purified and characterized, and shown to mimic the Hypersensitive Reaction (HR) and/or Systemic Acquired Resistance (SAR) when applied to tobacco cultured cells or plants. Among these are the α - and β -elicitins, a 10-kDa protein family, showing acidic or basic isoelectric point, respectively. Following individual elicitin isolation and purification, many studies have been carried out in order to establish (i) the sequence of morfo-pathological events occurring on the host plants in response to elicitin administration, (ii) their structure, including protein sequence and 3D structure, and (iii) defense and necrosis-inducing structural determinants (1). However, to date, little is known concerning the putative interaction site (receptor) on the host plant plasma membrane and the molecular mechanism of signal-transduction triggering the necrotic process. Recently, different authors have reported about the ability of individual elicitins to bind membrane sterols and about their structural homology to secretory phospholipases A₂ (2,3). This latter finding is especially intriguing in view of the observation that products released by the phospholipase action might act as intracellular second messengers, e.g. linolenic acid, a precursor of jasmonic acid (4), and therefore might play a role in the activation of host defense signalling pathways. These observations prompted us to scrutinize for the phospholipase activity of elicitins or elicitin-like proteins from *Phytophthora nicotianae*, the causal agent of crown and root rot of tomato and of the “black shank” disease on tobacco.

From *P. nicotianae* culture filtrates, we have carried out the purification to homogeneity of a protein factor, designated P1, highly homologous to a new elicitin-like protein, whose partial purification has been recently reported from *P. capsici* and *P. cryptogea* (5). The purification procedure of P1 from *P. nicotianae* involved four chromatographic steps, respectively, on DEAE Fast Flow, Resource RPC, TSK-DEAE and C18 column chromatography. The isoelectric point of the P1 protein is 4.15. SDS-PAGE of the purified protein showed a single band, corresponding to a molecular mass of 10 kDa. N-terminal automated Edman sequencing confirmed the homogeneity of the protein and showed the presence of trans-4-hydroxyproline, a post-translationally-modified amino acid residue whose presence has been shown in plants and fungi and putatively involved in glycosyl linkage formation in the cell wall glycoprotein. The primary sequence, determined by automated Edman degradation of both tryptic and CNBr-digested fragments, showed about 50% homology with the elicitins conserved sequence. Similarly to elicitins, the purified P1 protein factor from *P. nicotianae* induces necrosis when applied on tobacco leaves. In addition it appears to possess phospholipase A₂ activity, being able to specifically hydrolyze the ester bond at the sn-2 position of various phospholipid substrates.

References:

- 1- Lloyd M. Yu, (1995) PNAS USA, 92, 4088-4094
- 2- Mikes V, et al., (1998) BBRC 245, 133-139
- 3- Bouaziz S, et al., (1994) Biochemistry 33, 8188-8197
- 4- Brady A, et al., (1983) BBRC 111, 470-477
- 5- Nespoulous C, et al., (1999) FEBS Lett., 452, 400-406

PROPOFOL ENHANCES HYDROPHOBIC BARRIER OF BIOLOGICAL MEMBRANES

Fabris, S., Momo, F., Stevanato, R.

Dipartimento di Chimica Fisica, Università di Venezia

In a recent study we investigated a possible involvement of the NO system in the mitochondrial effects of propofol (2,6-diisopropylphenol, DPP), a widely used anaesthetic.

From the experimental evidences it appeared that a synergism exists between NO and the anaesthetic, which leads to the full abolition of the respiration and which should involve directly respiratory chain components, ATPase structure or membrane integrity.

These results could have relevant implications also in the pharmacological field and, at this moment, we are investigating the mechanisms of reaction of propofol with NO and GSNO and the possible formation of active species; anyway, in the present work, we discuss that side of the problem which concerns the interaction of propofol with the membrane, its partitioning and accumulation into the lipid bilayer, to achieve information about the drug distribution and the modifications that can be produced in the lipid organisation of the membrane bilayer.

Dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) and egg yolk phosphatidylcholine (EYPC) multilamellar liposomes were used as membrane model systems and studied by means of differential scanning calorimetry (DSC) and spin labelling techniques.

It resulted that DPP is highly lipophilic molecule which in a water dispersion of multilamellar liposomes is almost exclusively present in the lipid phase with a pronounced preference to accumulate in the innermost region of the bilayer; moreover, the effects of these molecules on the lipid organisation, monitored through the modifications of the DSC profiles and of the order parameter, can be coherently interpreted in terms of the disorder produced in the membrane by small bulky groups. To enhance the phenomena we used a rather high 20 mM concentration of dopant; anyway a limited effect on the order parameter can be observed yet at 2 mM DPP concentration, roughly corresponding to a 2÷100 ratio of DPP to phospholipids.

We monitored also the permeability of the membranes to Ni^{2+} and to Ni iminodiacetic acid (Ni-IDA) using the accessibility parameter k' as defined by continuous wave ESR saturation experiments: the accessibility profile of the charged ion Ni^{2+} roughly repeats the hydrophobicity profile, indicating that Ni^{2+} diffusion through the bilayer is limited to the water phase. In the presence of DPP the Ni^{2+} accessibility is strongly reduced, particularly in the inner region of the membrane, while, in the case of Ni-IDA, a polar, neutral molecule, the presence of DPP does not influence its capability of penetrating the bilayer. This is a further demonstration that DPP accumulates in the deepest side of the bilayer, and, being highly lipophilic, strengthens the hydrophobic barrier and makes the membrane less permeable to water and polar solutes.

APOPTOSIS OF DIFFERENTIATING NEURONAL CELLS: A POSSIBLE LINK BETWEEN PURINE DISMETABOLISMS AND NEUROLOGICAL DISORDERS

Pesi R.¹, Micheli V.², Jacomelli G.², Peruzzi L.³, Camici M.¹, Garcia-Gil M.¹, Allegrini S.⁴ and Tozzi M.G.⁴

¹Dipartimento di Fisiologia e Biochimica, Università di Pisa, Italy; ²Dipartimento di Biologia Molecolare – Sezione di Chimica Biologica; Università di Siena, Italy; ³Istituto di Clinica Pediatrica – Policlinico Le Scotte, Università di Siena, Italy; ⁴Dipartimento di Scienze del Farmaco, Università di Sassari, Italy.

Lesch-Nyhan syndrome is a metabolic-neurological syndrome caused by the X-linked deficiency of the purine salvage enzyme hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT). Metabolic consequences of HGPRT deficiency have been clarified, but the connection with the neurological manifestations is still unknown (1). Many efforts have been spent to find other alterations in purine nucleotides in different cells of Lesch-Nyhan patients. A peculiar finding was the measure of appreciable amount of Z-nucleotides in red cells (2). In the erythrocytes of 7 patients with Lesch-Nyhan syndrome we found a significantly higher IMP-GMP specific 5'-nucleotidase activity (cN-II) with respect to healthy controls. The same alteration was found in one individual with partial HGPRT deficiency displaying a severe neurological syndrome, and in two slightly hyperuricemic patients with a psychomotor delay. Since ZMP was a good substrate for 5'-nucleotidase producing Z-riboside, we incubated murine and human cultured neuronal cells with this nucleoside and found that it is toxic for our models, promoting apoptosis. Furthermore Z-riboside prevents the neuronal differentiation in the presence of retinoic acid while it is non toxic for differentiated cells. This finding suggests an involvement of the toxicity of the Z-riboside in the pathogenesis of neurological disorders in Lesch-Nyhan syndrome and possibly in other pediatric neurological syndromes of uncertain origin.

1) Nyhan WL. *Annu. Rev. Med.* **24** 41-60 (1993)

2) Sidi Y and Mitchell BS. *J. Clin. Invest.* **76** 2416-2419 (1985)

REGULATION OF CYTOSOLIC 5'-NUCLEOTIDASE (cN-II): LIMITED PROTEOLYSIS ORIGINATES TWO ENZYME FORMS WITH DIFFERENT REGULATORY PROPERTIES

R. Pesi¹, S. Allegrini², M. Camici¹, F. Sgarrella², S. Eriksson³, M. G. Tozzi².

¹ Dipartimento di Fisiologia e Biochimica, Università di Pisa, via S. Maria, 55 56100 Pisa, Italia. ² Dipartimento di Scienze del Farmaco, Università di Sassari, via Muroni, 23/A, 07100 Sassari, Italia. ³ Department of Veterinary Medical Chemistry, SLU, The Biomedical Centre, SE 75123 Uppsala, Sweden.

Cytosolic 5'-nucleotidase (cN-II) is an ubiquitous enzyme which catalyses both the hydrolysis of IMP, GMP and their deoxyderivatives and the transfer of phosphate to a nucleoside or a nucleoside analogue (1). The enzyme is activated by ATP, ADP, BPG and is inhibited by phosphate (2). Kinetic studies indicate that, even though ADP and BPG act separately, only at high non physiological concentrations, there is a synergistic effect of the two compounds. In fact, the presence of physiological ADP concentration significantly lowers the amount of BPG necessary to exert an activatory effect on the enzyme (3). In a previous paper, we demonstrated the presence in calf thymus of two enzyme forms (54 kDa and 59 kDa, respectively) displaying different electrophoretic and chromatographic characteristics. The slower moving form, separated from the other by affinity chromatography, was activated to a greater extent by ADP and BPG, and the synergistic effect was absent (4). We here demonstrate that the two different forms of the enzyme stem by limited proteolysis of both purified calf thymus cytosolic 5'-nucleotidase and calf thymus recombinant enzyme.

Both calf thymus and recombinant purified cN-II (Form A, 59kDa), during storage at 4°C originate a protein with a lower apparent MW (Form B, 54 kDa). The same result was obtained by incubation of form A with thrombin at 25°C overnight. Since the protein does not contain consensus sequences for thrombin, the cleavage might be due to a contaminant not identified proteolytic activity. We demonstrate that the proteolytic activity generates a 10 kDa peptide which remains associated to the protein. In fact, the B form and the peptide dissociate only after denaturation with SDS. The limited proteolysis causes the same modification in the regulatory properties of the enzyme previously described in the calf thymus enzyme (4). Both form A and B have the same N-terminal sequence, indicating that the proteolysis involve the C-terminus of the protein. Our preliminary results on both deletion and point mutants indicate that the protein C-terminal region is involved in the interaction with activators. The presence of both forms in different rat organs and in calf thymus treated with protease inhibitors suggests that the limited proteolysis might occur in the cell and might have a physiological role in the regulation of the enzyme activity.

1. Baiocchi, C. *et al.* 1996 *Biochem. J.* 317, 797-801
2. Pesi, R. *et al.* 1994 *Arch. Biochem. Biophys.* 312, 75-80
3. Pesi R. *et al.* 1996 *Biochim. Biophys. Acta.* 1294, 191-194.
4. Pesi R. *et al.*, 1998 *Biol. Chem.* 379, 699-70
5. Allegrini S. *et al.* 1997 *Biochem J.* 328, 483-487

COSTRUZIONE DI UN BIOSENSORE AMPEROMETRICO ENZIMATICO PER L'AMBIENTE UTILIZZANDO L'ENZIMA LACCASI.

Cambria M.T., Ragusa S., Vianello F.*, Pastorino L. **

Dipartimento di Scienze Chimiche-Università di Catania

*Dipartimento di Chimica biologica - Università di Padova

**Dipartimento DISTBIMO - Università di Padova

L'enzima laccasi (benzendiolo: ossigeno ossidoreduttasi, E.C. 1.10.3.2) è una glicoproteina contenete 4 ioni rame (Cu^{2+}) per mole di proteina. Essa è largamente distribuita in natura sia in alcune piante sia in molte specie fungine. Si tratta di un enzima tipicamente extracellulare che viene sintetizzato costitutivamente dalle sospensioni cellulari e secreto nel mezzo di coltura. In particolare, la laccasi prodotta da un ceppo di *Rigidoporus* è stata purificata nel nostro laboratorio fino all'apparente omogeneità ed alcuni parametri strutturali e cinetici sono stati determinati. L'analisi elettroforetica in SDS dell'enzima purificato ha mostrato una banda unica corrispondente ad un peso molecolare di circa 54 Kda, confermata dalla spettrometria di massa MALDI. La determinazione del pI ha evidenziato la presenza di 2 bande molto vicine, rispettivamente a pH 3,2 e 3,25, corrispondenti a due forme isoenzimatiche. Sono state determinati alcuni parametri cinetici quali Km (0,04 mM), V_{max} ($2,7 \times 10^{-3}$ Mm/min) e K_{cat} ($4,8 \times 10^6 \text{ min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$). L'attività specifica dell'enzima è di circa 30 $\mu\text{moli}/\text{min}/\text{mg}$ di proteina. Inoltre la laccasi presenta una larga specificità per i substrati fenolici e una notevole stabilità in differenti condizioni di pH e di temperatura. Di particolare interesse appaiono i dati concernenti la stabilità termica dell'enzima che risulta essere piuttosto elevata ($T_m = 92,5^\circ\text{C}$), vicina a quella di un organismo termofilo. Tale stabilità può essere posta in relazione con la struttura della proteina prevalentemente a β -sheet, come da noi dimostrato in esperimenti preliminari in trasformata di Fourier. Le caratteristiche strutturali e funzionali dell'enzima da noi evidenziate, hanno suggerito una sua possibile utilizzazione in sistemi immobilizzati per la costruzione di un biosensore amperometrico enzimatico capace di evidenziare la presenza di composti fenolici nell'ambiente. Esperimenti preliminari sono stati eseguiti presso il Dipartimento di Chimica biologica dell'Università di Padova dal gruppo del Prof. Rigo. E' stato impiegato un sistema a tre elettrodi con cella di misura da 500 μl : un elettrodo di lavoro in pasta di grafite, polarizzato a 200 mV, un elettrodo di riferimento ad Ag/AgCl e un contro elettrodo in platino. Le misure sono state effettuate in tampone fosfato 20 mM, contenete KCl 10 mM a pH 7, equilibrato con aria. L'enzima è stato iniettato nella cella di misura a pulse di 80 ng/ml. La curva di calibrazione ottenuta in seguito ad aggiunta di concentrazioni crescenti di 1,4-idrochinone, in presenza di laccasi, ha dimostrato che la reazione è lineare. Lo stesso sistema è stato utilizzato per la determinazione dei composti fenolici presenti nei residui acquosi della spremitura meccanica delle olive. La concentrazione riscontrata è risultata essere 0,2 mM.

Esperimenti collaterali sono stati eseguiti presso il Laboratorio di Biofisica del DISTBIMO dell'Università di Genova allo scopo di valutare la possibilità di immobilizzare la laccasi su un adatto supporto solido che ne consenta una attività stabile. In particolare, è stata determinata la variazione della pressione superficiale di un monostato di laccasi al variare dell'area per molecola all'interfaccia aria/acqua (isoterma π -A). I risultati ottenuti indicano che il processo è lineare nell'ambito dei valori di pressione applicati.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Cambria M.T. et al (2000) Protein express. purif. 18: 141-147
- 2) Cambria A. et al (2000) Congresso Naz. SIB, Napoli, 21-23 Sett 2000, A 109
- 3) Ragusa S., Vianello F. Scuola Nazionale di Biofisica, Bressanone (Bz)12-15 Sett. 2000

MOLECULAR DISSECTION OF CARIOGENESIS IN PLURIPOTENT STEM CELLS

Margherita Maioli and Carlo Ventura

Department of Biomedical Sciences, Division of Biochemistry, Laboratory of Cardiovascular Research, University of Sassari, Italy; and National Laboratory of the National Institute of Biostructures and Biosystems, Osilo (Sassari), Italy.

The zinc finger-containing transcription factor GATA-4 and the homeodomain Nkx-2.5 govern crucial developmental fates and have been found to promote cardiogenesis in embryonic cells exposed to the differentiating agent dimethyl sulfoxide (DMSO). Nevertheless, intracellular activators of these transcription factors are largely unknown. Here, we show that pluripotent P19 cells express the prodynorphin gene, an opioid gene encoding for the dynorphin family of opioid peptides.

P19 cells were also able to synthesize and secrete dynorphin B, a biologically active end-product of the prodynorphin gene. DMSO-primed GATA-4 and Nkx-2.5 gene expression was preceded by a marked increase in prodynorphin gene expression and dynorphin B synthesis and secretion. The DMSO effect occurred at the transcriptional level.

Noteworthy, in the absence of DMSO, dynorphin B triggered GATA-4 and Nkx-2.5 gene expression and led to the appearance of both α -myosin heavy chain (MHC) and myosin light chain-2V transcripts, two markers of cardiac differentiation. Moreover, dynorphin B-exposed cells were positively stained in the presence of MF 20, a mouse monoclonal antibody raised against MHC.

Opioid receptor antagonism and inhibition of opioid gene expression by a prodynorphin antisense phosphorothioate oligonucleotide blocked DMSO-induced cardiogenesis, suggesting an autocrine role of an opioid gene in developmental decisions.

RELAZIONE TRA LIVELLI INTRACELLULARI DI GLUTATIONE E ATTIVITÀ TRANSACETILASICA PAF-DIPENDENTE COA –INDIPENDENTE

M.L. Balestrieri, L. Longobardi, A. Giovane, L. Quagliuolo, C. Balestrieri, L. Servillo

Dipartimento di Biochimica e Biofisica, Seconda Università degli Studi di Napoli, via Costantinopoli 16, Napoli

La Transacetilasi PAF-dipendente CoA-indipendente (TA) è un enzima di membrana coinvolto nel metabolismo del PAF (Fattore di Attivazione Piastrinico) e dei suoi analoghi. Questo enzima è in grado di modificare le funzioni biologiche del PAF trasferendo il gruppo acetile dal PAF a lisofosfolipidi accettori (attività TA_L) o alla sfingosina (attività TA_S). La reazione di transacetilazione ha come prodotti finali il 2-lisoPAF (biologicamente inattivo) e analoghi del PAF (TA_L) o C_2 -ceramide (TA_S). In particolare, la TA_L , la cui attivazione mediante fosforilazione è mediata dai recettori purinergici $P2_u/P2Y_2$ (1), contribuisce alla biosintesi di un analoghi acilici del PAF, detti acil-PAF, in cellule endoteliali stimolate con ATP (2). La TA è stata purificata all'omogeneità da membrane di rene di ratto (4) ed è emerso che la sequenza aminoacidica dei peptidi isolati dal digerito triptico presenta una notevole omologia con la sequenza aminoacidica dedotta ottenuta dal cDNA della PAF-acetilidrolasi II (AH II) citosolica e che possiede tre attività enzimatiche e cioè l'attività TA_L , TA_S e AH. Lo scopo del presente lavoro è di determinare se l'attività transacetilasica è legata ai livelli intracellulari di glutatione il quale con il suo ciclo redox protegge le cellule dai radicali liberi e controlla lo stato ossido-riduttivo dei gruppi tiolici proteici.

Le cellule endoteliali da arteria polmonare bovina (CPAE) sono state coltivate in mezzo MEM contenente il 20% di siero bovino. I saggi di attività TA_L , TA_S , e AH sono stati eseguiti sugli omogenati preparati da cellule endoteliali stimolate con 1mM ATP come descritto precedentemente (2,3,4). La frazione di membrana è stata preparata a partire dagli omogenati cellulari centrifugando la frazione postnucleare (supernatante da 500 x g) a 100.000 x g per 60 min. L'attività transacetilasica è stata saggiata sia sulla frazione di membrana che sul citosol per determinare la traslocazione dell'enzima in seguito ad attivazione. Per studiare la relazione tra i livelli intracellulari di glutatione e l'attività transacetilasica le cellule endoteliali sono state preincubate con agenti che riducono i livelli tiolici quali L-butionina-(SR)-sulfossimina (BSO) e diamide (DA) o con agenti che incrementano i livelli tiolici come N-acetilcisteina (NAC). L'attività transacetilasica è stata determinata misurando l'incorporazione di [3 H] acetato nei lisofosfolipidi contenenti colina durante stimolazione con ATP.

I risultati ottenuti indicano che la stimolazione con ATP determina la traslocazione della TA dal citosol alla membrana e induce in maniera specifica l'attività TA_L ma non ha alcun effetto sull'attività TA_S e AH. I risultati indicano, inoltre, che l'induzione dell'attività TA_L in seguito a stimolazione delle cellule endoteliali con ATP è in relazione ai livelli intracellulari di glutatione. Infatti, ad una riduzione dei livelli tiolici intracellulari indotta dalla preincubazione con BSO o DA si osserva un incremento dell'attività transacetilasica. Al contrario, l'attività transacetilasica risulta inibita quando, durante la preincubazione con NAC, i livelli tiolici intracellulari incrementano. In conclusione, questi dati suggeriscono che l'attività transacetilasica è in qualche modo regolata dai livelli intracellulari di glutatione.

1. Balestrieri ML *et al.* (1998) *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 1998, Vol.56, No.5-6, Pp.363-375
2. Balestrieri ML *et al.* (1997) *Journal of Biological Chemistry*, 1997, Vol.272, No.28, Pp.17431-17437
3. Blank ML *et al.* (1981) *Journal of Biological Chemistry*, 1981, 256, 175-178
4. Karasawa K *et al.* (1999) *Journal of Biological Chemistry*, 1994, Vol.274, No.13, Pp. 8655-8661

CARATTERIZZAZIONE ISOTERMA E NON ISOTERMA DI MEMBRANE DI NYLON GRAFTATE CHIMICAMENTE: DIPENDENZA DALLA PERCENTUALE DI GRAFTING.

A. De Maio,^a El-Mansry M.,^a S. Di Martino,^a N. Diano,^a E. Zito,^a S. Rossi,^a P. Canciglia,^b F.S. Gaeta^a e D.G. Mita^a.

- a) Università di Napoli
- b) Università di Messina.

Sono state preparate cinque membrane catalitiche immobilizzando beta-galattosidasi da *A. oryzae* su membrane planari di Nylon di pori 0.2 μm attivate mediante grafting chimico con differenti percentuali di butilmetacrilato (BMA). Esametildiammina (HMDA) e gluteraldeide (Glu) sono state utilizzate rispettivamente come spacer ed agente legante.

Scopo della ricerca è stato individuare in che modo venissero influenzati i parametri fisici, biofisici e biochimici di queste membrane catalitiche differenti solo per il percento di grafting.

Per la caratterizzazione fisica delle membrane catalitiche è stato studiato l'andamento del flusso idraulico e termooosmotico in funzione del percento di grafting. I risultati indicano inequivocabilmente che all'aumentare del grafting, aumenta il flusso idraulico e diminuisce quello termosmotico. L'immobilizzazione, dunque, ha l'effetto di ridurre l'idrofobicità delle membrane trattate rispetto a quelle non trattate.

Per l'aspetto biochimico, è stata studiata la dipendenza dell'attività catalitica dalla temperatura e dal pH della soluzione di substrato. I risultati mostrano che la temperatura ottimale dell'enzima immobilizzato è spostata verso valori di temperatura più elevati rispetto a quella dell'enzima libero, a dimostrazione del fatto che l'immobilizzazione produce un effetto stabilizzante sull'attività enzimatica.

Dal punto di vista biofisico è stata studiata la dipendenza dell'attività catalitica di ciascuna membrana dalla concentrazione del substrato, in condizioni isoterme e non isoterme. I risultati hanno mostrato che: 1) la velocità di reazione enzimatica dipende dal percento di grafting; 2) le velocità di reazione enzimatiche in condizioni non isoterme sono sempre più alte di quelle in condizioni isoterme; 3) a parità di percento di grafting, l'affinità per il substrato è sempre maggiore in condizioni non isoterme. Questo risultato incoraggia lo sviluppo della tecnica dei bioreattori non isotermi in quanto un recupero di affinità per il substrato da parte di un enzima immobilizzato aumenta l'efficienza di un processo catalitico.

**IMMOBILIZZAZIONE DI UREASI SU MEMBRANE DI NYLON GRAFTATE CHIMICAMENTE:
CARATTERIZZAZIONE DELL'ATTIVITÀ CATALITICA
IN CONDIZIONI ISOTERME E NON ISOTERME**

El-Sherif H.,^a P.L. Martelli,^b R. Casadio,^b M. Portaccio,^a U. Bencivenga,^a V. Grano,^a D. Durante,^a P. De Luca^a e D.G. Mita^a.

- a) Università di Napoli
- b) Università di Bologna.

L'enzima ureasi è stato immobilizzato su membrane di Nylon trattate mediante grafting chimico col monomero idrofobico butilmetacrilato (BMA). Esametildiammina (HMDA) e gluteraldeide (Glu) sono state utilizzate come spaziatore ed agente legante, rispettivamente. Abbiamo studiato l'idrolisi dell'urea da parte dell'ureasi in vista dell'applicazione di questo sistema enzimatico alla risoluzione di problemi ecologici, quali il trattamento delle acque reflue dell'irrigazione dei campi.

L'attività catalitica delle membrane è stata studiata in funzione della temperatura, del pH e della concentrazione di substrato in condizioni isoterme e non isoterme. I risultati hanno mostrato uno spostamento del pH e della temperatura ottimale tra enzima libero ed immobilizzato ed incoraggiano l'utilizzo di queste membrane in processi biotecnologici in condizioni acide ed ad alte temperature.

Attraverso simulazione computazionale è stato elaborato un modello tridimensionale dell'enzima libero al fine di comprendere l'interazione enzima-membrana ed il ruolo del β -mercaptoetanolo nell'aumentare la stabilità delle membrane catalitiche.

L'attività catalitica della membrana è stata studiata anche in presenza di gradienti di temperatura. In condizioni non isoterme l'attività catalitica è risultata maggiore di quella misurata in confrontabili condizioni isoterme. Inoltre i valori delle costanti cinetiche K_m e V_{max} in condizioni non isoterme sono risultati rispettivamente più bassi e più alti rispetto agli analoghi valori ottenuti in confrontabili condizioni isoterme. Gli incrementi percentuali di attività sono risultati diminuire all'aumentare della temperatura media e della concentrazione di urea. E' stato anche identificato un parametro che correla l'incremento percentuale di attività enzimatica in condizioni non isoterme con l'idrofobicità della membrana catalitica: tale parametro è il rapporto tra la permeabilità termoosmotica e quella idraulica.

SPIN STATE TRANSITIONS IN NANOSTRUCTURES OF CYTOCHROME P450SCC-ADRENODOXIN COMPLEX

Paola Ghisellini, Cristina Paternolli and Claudio Nicolini

Department Biophysical M&O Technologies, University of Genoa, Corso Europa 30, Genoa (Italy)

Cytochromes P450 are a vast superfamily of enzymes that metabolize a large number of xenobiotics and endogenous compounds. This enzyme is very interesting in pharmacological and toxicological fields and for its application in biosensors. Cytochromes P450 are hemoproteins containing a single heme group (iron protoporphyrin IX) with the central iron atom ligated to a cystein residue of apoprotein. In hemoproteins, iron can exist in either the ferrous or ferric redox states as well as at least two possible spin states, commonly referred to as low spin and high spin.

It has been known that enzymatic properties of cytochrome P450 are related to their spin state that corresponds to two distinct configurations of 3d electrons in heme iron. Spectrally low-to-high and high-to-low spin conversions of cytochrome P450 are well determined as shift of Soret band which is located at 393 nm (high spin) or 416 nm (low spin). Spin state equilibrium of cytochrome P450_{scc} is influenced by temperature, pH, and depends on binding with substrates and its redox partner protein adrenodoxin (Adx)[1].

Langmuir-Blodgett films of cytochrome P450_{scc}, of P450_{scc}-Adx complex and alternated layers of Adx and P450_{scc} have been obtained [2,3].

Preliminary studies were performed at air-water interface by π - A isotherms and surface potential measurements. To investigate the interactions between cytochrome P450_{scc} and adrenodoxin, thin films were transferred for each type of structures on quartz oscillators and calculated the mass density as function of the number of layers [4].

It was found that in the LB films, cytochrome P450_{scc} exists only in the low-spin form. It can be inferred that in monolayers, self organised at the air-water interface, hemoprotein molecules are kept under the control of strong intermolecular protein-protein interactions. The strength of these interactions is quite sufficient to fix definite conformational and spin states in P450_{scc} molecule. The structure of the organised P450_{scc} layers is too rigid and neither cholesterol nor Adx are capable to influence the hemoprotein spin state.

Keywords: cytochrome P450_{scc}, adrenodoxin, spin-state, Langmuir-Blodgett films, nanogravimetry

References

- 1) Schenkman J.B. and Griem H. (1993), Protein-protein interactions in Cytochrome, Berlin: Springer-Verlag 527-545.
- 2) Guryev O., Dubrovsky T., Chernogolov A., Dubroskaya S., Usanov S. and Nicolini C., (1997) Langmuir 13, 299-304.
- 3) Erokhin V., Carrara S., Guerzoni S., Ghisellini P., Nicolini C., Thin Solid Films 327-329, 636-638, 1998.
- 4) O'Sullivan C.K., Guilbault G.G., (1999) Biosensors & Bioelectronics 14, 663-667.

MOLECULAR ARCHITECTURES BASED ON CYTOCHROME P450-GST FUSION PROTEIN FOR NANOELECTRONICS

Cristina Paternolli, Paola Ghisellini and Claudio Nicolini

Department of Biophysical M&O Technologies, University of Genoa, Corso Europa 30, Genoa (Italy)

Cytochromes P450 was obtained as fusion protein using an expression system in *Escherichia Coli*. Expression vector containing the cDNA encoding the mature form of P4502B4 was transformed in *E.coli* strain and transcription induced with isopropyl- β -thiogalactopyranoside (IPTG).

Langmuir-Schaefer, layer-by-layer and self-assembling techniques were used to form thin films of Glutathione S-transferase (GST) fusion protein on solid surfaces [1]. In particular Langmuir-Blodgett technique gives the possibility to realize alternate structures stabilized by binding affinity between GST-fusion protein and glutathione that was adsorbed at a monolayer of octadecylamine.

Spectrophometric analysis of GSH films was realized after conjugation with CDNB (1- chloro 2,4 dinitrobenzene) monitoring the absorbance at 340 nm.

Preliminary characterization at air-water interface was performed by π -A isotherms and surface potential measurements, while the structural characterization of the films was obtained by means of spectrophotometry and Brewster Angle Microscopy.

It was found that Langmuir-Schaefer technique is a good procedure to realize highly ordered and stable structures of cytochrome P4502B4 fusion protein.

Preliminary study of an optical sensor for styrene based on this hemoprotein was performed.

Detection of the binding between the cytochrome P450 and toxic compound (substrate) was realized by UV/Vis spectroscopy in controlled atmosphere.

Keywords: cytochrome P450, fusion-protein, Langmuir-Blodgett films, Brewster angle microscopy

References

- 1) F. Antolini, S. Paddeu, C. Nicolini, 1995, *Langmuir*, 11, 2719-2725.
- 2) O. Guryev, V. Erokhin, S. Usanov, C. Nicolini, *Biochemistry and Molecular Biology International*, 1996, 39(1), 205-214.

RISOLUZIONE DELLE PROPRIETÀ EMISSIVE DEI RESIDUI TRIPTOFANILICI NEL PROCESSO DI DENATURAZIONE DELL'APOMIOGLOBINA

Ivana Sirangelo, Simona Tavassi e Gaetano Irace

Dipartimento di Biochimica e Biofisica, Seconda Università di Napoli. Via Costantinopoli 16, 80138 Napoli.

Le mioglobine estratte da mammifero contengono due residui triptofanilici altamente conservati localizzati nella regione N-terminale (elica A), invariabilmente in posizione 7 e 14. Allo scopo di individuare il contributo di ciascun residuo alle proprietà emissive dell'apomioglobina, sono state prodotte due proteine ricombinanti nelle quali i triptofani sono stati sostituiti alternativamente con residui di fenilalanina. Le proteine mutate W7F e W14F si esprimono regolarmente in *Escherichia coli* e conservano l'organizzazione strutturale della mioglobina selvatica. Infatti, sia gli spettri di dicroismo circolare nel lontano ultravioletto che lo spettro di assorbimento nella regione di Soret sono praticamente coincidenti con quelli relativi alla mioglobina selvatica.

Le proprietà emissive dei due residui triptofanilici sono state risolte analizzando le variazioni di fluorescenza indotte da agenti denaturanti quali acidi e guanidina. La denaturazione indotta da acidi a bassa concentrazione di sali, è un processo a tre stati con la formazione intorno a pH 4.0 di un intermedio parzialmente strutturato, in cui solo le eliche A, G ed H sono organizzate. L'andamento dell'intensità di fluorescenza in funzione del pH è complesso e può essere suddiviso in tre distinte regioni: da pH 8.0 a pH 5.5 si osserva un decremento dell'intensità di fluorescenza del 25% senza apprezzabile variazione del massimo di emissione della proteina selvatica e dei due mutanti W7F e W14F; da pH 5.5 a pH 4.0 l'intensità di fluorescenza della proteina selvatica e del mutante W14F aumenta mentre quella del mutante W7F si mantiene costante; infine, tra pH 4.0 e pH 2.0 l'intensità di fluorescenza delle tre proteine decresce con spostamento del massimo a 350 nm. I risultati indicano che la diminuzione di fluorescenza osservata tra pH 8.0 e pH 5.5, attribuita in precedenza alla formazione di un complesso di trasferimento di carica tra il triptofano 14 ed il residuo di istidina H119, è in realtà prodotta da un cambiamento conformazionale di piccola entità che influenza il microintorno di entrambi i residui triptofanilici. La formazione dello stato intermedio a pH 4.0 è associata ad un incremento di intensità di fluorescenza e ad uno spostamento del massimo di emissione da 330 a 335 nm del triptofano W7 ma non di quello in posizione 14 la cui intensità rimane costante. Questa variazione indica che la formazione dell'intermedio comporta destrutturazione della regione contenente il residuo di lisina K79 che smorza selettivamente la fluorescenza del residuo W7 nello stato nativo.

La denaturazione dell'apomioglobina selvatica indotta da guanidina comporta due successive transizioni, la prima delle quali porta alla comparsa di una forma parzialmente strutturata in cui si osserva un aumento della fluorescenza dei residui triptofanilici ed uno spostamento del massimo di emissione da 330 a 335 nm. La seconda transizione determina una forte riduzione dell'intensità di fluorescenza ed un ulteriore spostamento del massimo da 335 a 350 nm. Contrariamente a quanto accade nella formazione dell'intermedio indotta da acidi, l'incremento di fluorescenza osservato a basse concentrazioni di guanidina è dovuto principalmente al W14.

In conclusione, le variazioni di fluorescenza osservate in presenza dei due differenti agenti denaturanti permettono di caratterizzare il comportamento di ciascun residuo triptofanilico e di correlarlo agli eventi molecolari che si succedono nel corso del processo di denaturazione. Inoltre, i risultati lasciano ipotizzare che il cammino di denaturazione dell'apomioglobina sia fortemente influenzato dalla natura chimica dell'agente denaturante.

BIOCATALYTIC LB ASSEMBLIES WITH NANOMETER SCALE RESOLUTION BASED ON PENICILLIN G ACYLASE

T.S.Berzina^{1,2} L.Pastorino³, V.I.Troitsky^{2,4}, E.Bernasconi⁵ and C.Nicolini^{3,4}

¹Consorzio Interuniversitario "Istituto Nazionale di Biostrutture e Biosistemi" – I.N.B.B., Viale Medaglie d'Oro 305, 00136 Roma

²Department of Physics & INFN, University of Parma, viale delle Scienze, 43100 Parma, Italy

³Department of Biophysical M&O Sciences and Technologies, University of Genoa, Corso Europa 30, 16132, Genoa, Italy

⁴Polo Nazionale Bioelettronica - Parco Scientifico e Tecnologico dell'Elba, Corso Europa 30, 16132, Genoa, Italy

⁵Antibioticos, via Winckelmann 1, 20146 Milan, Italy

The recently developed "protective plate" method [1] offers the possibility to include protein layers into an LB assembly without the contact of protein molecules with the air-water interface thus avoiding their denaturation. Due to its peculiarities complex layered structures with nanometer scale resolution in the direction normal to the film plane can be easily built up. This method was already used for the deposition of LB films with incorporated layers of horse radish peroxidase [2] and glutathion S-transferase and its efficiency for activity preservation and stability improvement was shown.

In present work, this technique was applied for the deposition of biocatalysts with active layers of penicillin G acylase (PGA), an enzyme widely used for medicine production. Easy selection of LB and adsorbed layers for orientation, cross-linking, and protection of protein molecules resulted in the creation of appropriate environments for the preservation of PGA functions. Several structures were tested regarding such performances as the enzymatic activity value, the level of PGA detachment in aqueous solutions, and the possibility of multiple use of the sample for reaction implementation. As the result, the multilayer structure, which satisfies the requirements for biocatalytic applications, was found. It is composed of LB monolayer of octadecylamine, adsorbed layers of glutaraldehyde and PGA, and protective monolayer of stearic acid. In this film approximately one PGA monolayer was adsorbed. The enzymatic activity reached 25-30% of the activity value of the equivalent amount of protein in the solution which is a good result for an immobilized enzyme. It is remarkable that no PGA detachment and no change of its activity were observed after several repeated measurements.

Further modification of the deposition procedure was aimed at increasing the effective activity per unit of the substrate surface by adsorption of a thicker protein layer in one technological cycle. However, this layer should not be closely packed. On the contrary, a three-dimensional frame-like structure is preferable to allow the substrate molecules to penetrate into the film. This was achieved by the introduction of cross-linker molecules directly onto the surface where PGA adsorption was to take place. In this case there are two oppositely directed diffusion flows near the surface and due to the interaction of protein and cross-linker molecules the required frame is formed. At the same time, the total amount of introduced cross-linker is so small that it does not cause protein coagulation in the solution. LB assemblies with the average thickness of active protein layer of at least few dozens of monolayers can be prepared in this way. The enzymatic activity of such films per unit of the substrate surface was 20-25 times higher than that of the assemblies with one adsorbed monolayer. Again the protein detachment from the surface was almost absent and the performances were not changed during successive measurements within few days.

Finally the method is proposed of biocatalytic LB assembly deposition onto flexible supports of unlimited length without the exposure of protein layer to air medium, which is promising for industrial applications.

1. V.I.Troitsky, M.Sartore, T.S.Berzina, D.Nardelli, C.Nicolini, *Rev.Sci.Instr.*, 67 (1996) 4216

2. T.S.Berzina, L.Piras, V.I.Troitsky, *Thin Solid Films*, 327-329 (1998) 621.

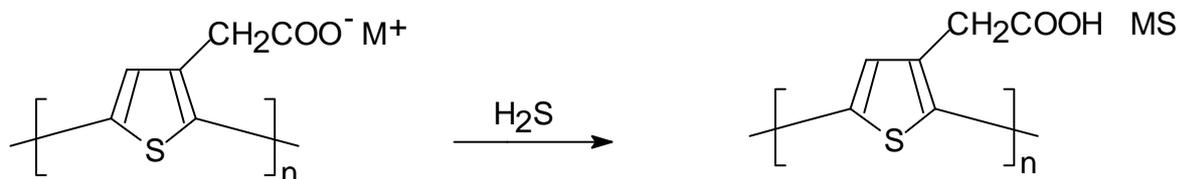
HETEROSTRUCTURE BASED ON CONDUCTING POLYMER/COPPER SULFIDE NANOPARTICLES

R. Narizzano^a, V. Erokhin^b, S. Stagni^a, N. Sarkar^b and C. Nicolini^{a,b}.

^a Department of Biophysical M & O Sciences and Technologies, University of Genoa, Corso Europa 30, 16132 Genoa, Italy

^b Fondazione ELBA, Via del Babuino 181, 00187 Rome, Italy

The assembly of nanoparticles into organic conducting heterostructure or superlattices are of great importance in current material science as well as in molecular electronics [1]. Poly(3-thiopheneacetic acid) [PTAA] have been used as organic conducting and photoactive material. The Poly(3-thiopheneacetic acid) was prepared by chemical oxidative polymerization [2], and the films has been fabricated by means of Langmuir techniques obtaining ordered structure with controlled thickness. These approach for the fabrication of heterostructured nanoparticles films involves the construction of an conducting polymer layers containing metal ions, which are then exposed to a reactive gas according to the following scheme:



The semiconductor nanoparticles are grown directly in the film as the reactive gas diffuses through the film and reacts with the entrained metal ions. Particle formation process was monitored by gravimetric measurements. Morphology of the resultant films was studied by Brewster angle microscopy.

Photoinduced charge transfer between PTAA and copper sulfate semiconducting nanoparticles in solid state has been studied in this work. Photovoltaic performances of the system, due to the photogeneration of excited species that are dissociated at the polymeric/nanoparticles interface due to the difference in the value of electron affinity of the materials, are investigated. The estimation of the electrical conductivity at different temperatures of the system was performed by using current voltage measurements.

[1] G. Mingyuan, R. Bernd, K. Stefan, *Adv. Mater.* 1997, 9, 802.

[2] G. Daoust, M. Leclerc, *Macromolecules* 1991, 24, 455.

A NEW APPROACH FOR THE DEPOSITION OF NANOSTRUCTURED BIOCATALYTIC FILMS

L.Pastorino¹, V.I.Troitsky^{2,3}, T.S.Berzina^{2,4}, E.Bernasconi⁵ and C.Nicolini^{1,3}

¹Department of Biophysical M&O Sciences and Technologies, University of Genoa, Corso Europa 30, 16132, Genoa, Italy

²Department of Physics & INFN, University of Parma, v. delle Scienze, 43100 Parma, Italy

³ Polo Nazionale Bioelettronica - Parco Scientifico e Tecnologico dell'Elba, Corso Europa 30, 16132, Genoa, Italy

⁴Consorzio Interuniversitario "Istituto Nazionale di Biostrutture e Biosistemi" – I.N.B.B., Viale Medaglie d'Oro 305, 00136 Roma

⁵Antibioticos, via Winckelmann 1, 20146 Milan, Italy

Different approaches are suitable for manipulation at the nanometer scale level with inorganic and organic materials, including molecular and biomolecular compounds. Potential ways include manipulation with separate molecules, nanostructure fabrication on the surface using new lithographic methods (*e.g.*, AFM and STM) as well as an engineering of monolayer assemblies with predetermined structure. In present work, monolayer engineering was applied for the fabrication of biocatalytic nanostructured thin films on the basis of penicillin G acylase (PGA). The PGA has penicillin G as the substrate molecule. In the industrial process, 6-aminopenicillanic acid (6-APA) is produced from penicillin G. The 6-APA is further utilized for the synthesis of numerous compounds. This was a strong motivation for our work.

General approach, which was used to find the best film architecture, can be described as follows. We divide the film into three functional blocks. Functions of the bottom block are to provide high adhesion of the film to the surface of solid support, to bind the enzyme molecules, and to orient them in a proper way. Function of the middle block is to catalyze the reaction while the top block provides the protection for enzyme layer. The purpose to deposit such protective coating is to facilitate the storage of biocatalyst and to increase the period of the enzymatic activity preservation. The necessary property of the protective film must be also the possibility of its easy removal from the surface before the reaction implementation, without the deterioration of active medium. It is difficult to provide all functions simultaneously for the particular block if it is composed of only one compound. The best way to solve this problem is to separate different functions between different sub-layers. For example, the bottom block can be made of three sub-layers. The first sub-layer deposited directly onto the surface of solid support should be strongly bound to the latter. The second sub-layer should influence the orientation of protein molecules (*e.g.*, due to electrostatic interaction) and, at the same time, should be attached well to the first sub-layer. The destination of the third sub-layer is to bind the protein molecules. The protein layer can be adsorbed over this structure with or without the presence of binding and stabilizing agents in the solution.

Twelve different structures based on this idea were deposited and studied. In addition other immobilization techniques such as adsorption from the solution onto the surfaces activated in different ways, deposition by LS technique, and membrane confinement were also applied for the comparison of the results.

C.Nicolini, *Trends in Biotechnology*, 15 (1997) 395

V.I.Troitsky, T.S.Berzina, A.Petrigliano, C.Nicolini, *Thin Solid Films*, 284-5(1996) 122

ANALYSIS OF ARTERIAL STENOSIS INDUCED BY SURGICAL INJURY IN RAT CAROTIDS AND APPLICATION OF ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES

Forte A*, Galderisi U*, Di Micco G^o, Guarino FM[#], Cipollaro M*, De Feo M^o, Gregorio R^o, Esposito F*, Bianco MR[#], Vollono C[#], Berrino L*, Angelini F[#], Renzulli A^o, Cotrufo M^o, Rossi F* and Cascino A*

*Department of Experimental Medicine, Section of Pharmacology, ^oDepartment of Cardiothoracic and Respiratory Sciences, Second University of Naples, [#]Department of Department of Evolutive and Comparete Biology, University of Naples "Federico II", Naples, Italy

Restenosis is a pathophysiological phenomenon occurring in 20-40% of patients following percutaneous transluminal coronary angioplasty (PTCA). This process can occur also after endarterectomy. Besides smooth muscle cells (SMCs) proliferation, restenosis after arterial injury can be caused by: a) accumulation of extracellular matrix, composed of tenascin, collagen, fibronectin and proteoglycans; b) migration of SMCs from the media to the intima; c) remodeling, a morphological change due to a redistribution of vessel wall components; d) thrombus deposition at the injury site. Many drug and device trials have been carried out to limit this phenomenon, often with unsatisfactory results. At present, different animal models are used to study the stenosis process. Balloon angioplasty is the most widely used tool to induce stenosis in the arteries of rats, pigs, rabbits and dogs. Other animal models are based on vein-to-artery grafts or synthetic vascular grafts.

In this communication a new model of surgical injury for the induction and development of stenosis in rat common carotids is described. This model differs from balloon angioplasty or vein graft systems since it involves the entire vessel wall layers and mimics the injury occurring during arterial grafts and endarterectomy. Molecular and histological data concerning the analysis of arterial stenosis induced in rat common carotids by the vascular surgery approach are presented. In order to characterize the stenotic process induced in this model, the expression pattern of genes known to be involved in cell cycle progression, differentiation and apoptosis was analyzed using the semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction technique (RT-PCR) on RNA extracted from surgically treated and not treated carotids at different times following arterial injury. Alternatively, carotid histological cross-sections were analyzed upon hemallume-eosin, Van Gieson's or Galgano's trichrome staining, in order to evaluate the morphological changes of the vessel wall 30 days after surgical injury. Our data demonstrate that this model of surgical injury induces in about 30% of treated rats neointima proliferation, and in about 70% of remaining treated rats induces the processes responsible for negative remodeling, namely significant accumulation of extracellular matrix and fibers and disorganization of arterial tunics.

We are also testing the effectiveness of c-myc phosphorothioate antisense oligonucleotides in limiting the stenosis process induced by the above described surgical injury model. c-myc is a proto-oncogene that is quickly induced in cells after arterial injury and, in general, after the expression of proliferative signals and codes for a transcriptional factor actively involved in the early steps of the passage from the G₁ to the S cell cycle phase. The molecular data we present in this communication clearly demonstrate that the antisense oligonucleotide induce a decrease of the mRNA coding for c-myc both *in vitro* and *in vivo*. We have also analyzed by RT-PCR the effect of c-myc mRNA decrease on other genes involved in cell cycle progression, differentiation and apoptosis.

Acknowledgments: MURST/CNR "Biomolecole per la salute umana" L. 95/95, by Regione Campania P.O.P. (1997) "Farmaci antiipertensivi" and Legge N° 41, Progetto "DNA Antisenso e Farmaci Antiipertensivi".

HOW STRONG IS THE COORDINATION BOND BETWEEN A HISTIDINE TAG AND NI-NITRILOTRIACETATE? AN EXPERIMENT OF MECHANOCHEMISTRY ON SINGLE MOLECULES

Matteo Conti¹, Giuseppe Falini², Bruno Samori¹

¹ Biochemistry department, University of Bologna (Italy)
via Imerio, 48 - 40126 Bologna; Tel. 051 2094388 - Fax: 051 354387
e-mail: samori@alma.unibo.it

² G. Ciamician chemistry department, University of Bologna
via Selmi, 3 - 40126 Bologna; Tel. 051 2099569
e-mail: falini@ciam.unibo.it

A number of extensively used methods of increasing importance in molecular biology are based on the ability of the nickel(II) ion, when chelated by nitrilotriacetate (NTA), to selectively bind proteins containing stretches of consecutive histidine residues (His). Hochuli et al. established this field of applications when they discovered that proteins containing isolated histidines lead to complexes that are less stable than those arising from proteins having two consecutive His-tags at one terminus (2 x His-tag). Indeed, a stretch of six consecutive His-tags (6 x His-tag) is now commonly appended to the primary sequence of recombinant proteins, making it possible to isolate them selectively from a flow of crude cell lysate by means of a Ni-NTA functionalized chromatographic matrix and to immobilize them on biosensors for biomolecular interaction analysis. The stability of the anchoring of the His-tagged proteins is challenged in both cases by the frictional force exerted on them by the flow. Such interplay between external forces and chemical processes can now be transferred to the single-molecule level thank to the recent developments of nanoscale manipulation techniques. (1,2,3)

We simulated the process involved in the Ni-NTA protein separation techniques by reproducing the approach, the binding, the stretching and the unbinding under external forces between individual His-tags and individual Ni-NTA chelating groups in a single-molecule experiment with the Scanning Force Microscope (SFM). This experiment revealed that they can make either of two types of complex with markedly different stabilities, and with different “energy landscapes” along their force-driven dissociation pathway. In addition it clearly shows how single molecule experiments can give crucial insights about binding processes that cannot be accessed by means of solution methods. Traditional determinations of binding constants provide only information that is averaged on the entire ensemble of the molecules and on the overall time of the experiment. The single molecule manipulation herein reported shows how insights are obtained on the instantaneous states of the individual Ni-NTA and His-tag groups along their binding or unbinding pathways.

STUDIO DELLA DINAMICA, DELLA CURVATURA E DELLA FLESSIBILITÀ DEL DNA A DOPPIA ELICA CON IL MICROSCOPIO A FORZA

Giampaolo Zuccheri, Anna Bergia, Anita Scipioni,¹ Pasquale De Santis,¹ Bruno Samorì

Dipartimento di Biochimica "G. Moruzzi" via Imerio, 48 - 40126 Bologna, Italy
Telefono: +39-051-2094388; fax: +39-051-2094387; e-mail: giampa@alma.unibo.it
¹Dipartimento di Chimica, Università di Roma "La Sapienza"

Le caratteristiche dinamiche di acidi nucleici e proteine sono venute alla ribalta negli ultimi anni come importanti fattori per la comprensione della loro funzione biologica, specie durante i processi di interazione macromolecolare. Il microscopio a scansione di forza¹ (SFM o AFM) si è dimostrato un valido strumento per le determinazioni strutturali a medio raggio su acidi nucleici e complessi nucleo-proteici.²

Mediante l'utilizzo dell'SFM siamo riusciti a visualizzare e ad analizzare quantitativamente la struttura a medio raggio di molecole di DNA deposte su superfici planari in condizioni quasi fisiologiche di idratazione. Mediante l'osservazione in fluido³ possiamo fare studi della dinamica delle molecole di DNA in tempo reale e riprodurre condizioni di interazione tra il DNA ed altre macromolecole in soluzione.

L'analisi statistica della struttura, accoppiata a quella dinamica della stessa struttura ci permette una caratterizzazione sempre migliore di parametri come la curvatura dipendente dalla sequenza o la flessibilità, anch'essa dipendente dalla sequenza.

La costruzione di particolari sequenze di DNA dotate di simmetria interna diadica ha permesso uno studio al microscopio senza il bisogno di utilizzare delle etichette macromolecolari che renderebbero più complessa l'interpretazione dello studio. Per le molecole simmetriche è sempre possibile conoscere la sequenza delle basi su ciascun punto del profilo del DNA nelle immagini SFM.

Di pari passo, abbiamo effettuato un'analisi computazionale della curvatura e della flessibilità delle stesse sequenze di DNA utilizzate nello studio, per comprendere a pieno i dati sperimentali e poter fare ipotesi sui fenomeni chimico-fisici collegati.

I dati ricavati dimostrano l'utilità del microscopio SFM per questo tipo di analisi strutturale e, in particolare, per determinazioni della curvatura e della flessibilità locale di lunghe molecole di DNA.

1. Binnig, G., C. F. Quate, and C. Gerber. 1986. Atomic Force Microscope. *Physical Review Letters*. 56: 930-3.
2. Bustamante, C. and C. Rivetti (1996). "Visualizing protein-nucleic acid interactions on a large scale with the scanning force microscope." *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 25: 395-429.
3. Zuccheri, G., R. Th. Dame, et al. (1998). "Conformational fluctuations of supercoiled DNA molecules observed in real time with a scanning force microscope." *Applied Physics A*. 66: S585-S589.

ANALISI STRUTTURALE DEL GENOMA DEL VIRUS B19 CON LA MICROSCOPIA A SCANSIONE DI FORZA (SFM)

Anna Bergia[§], Giampaolo Zuccheri[§], Giorgio Gallinella[#], Monica Musiani[#] e Bruno Samori[§]

[§]Dipartimento di Biochimica “G. Moruzzi” via Imerio, 48 - 40126 Bologna, Italy
Telefono: +39-051-2094388; fax: +39-051-2094387; e-mail: annabergia@libero.it

[#]Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale – Divisione di Microbiologia via Massarenti, 9 – 40138 Bologna, Italy

Lo studio delle proprietà strutturali del genoma del Parvovirus B19 è di fondamentale importanza per la comprensione del meccanismo di replicazione del DNA virale all'interno della cellula ospite. Tale molecola di DNA, a singola catena e di 5600 basi, può essere di polarità positiva o negativa e presenta due estremità con sequenze invertite e quasi perfettamente palindromiche.¹ Ciascuna estremità può quindi sia accoppiarsi (secondo Watson e Crick) con l'altra, sia ripiegarsi su se stessa. Questa seconda possibilità comporta la formazione di siti di *autoprimering* a partire dai quali può avvenire la replicazione del DNA virale.

Studi di questo genoma possono essere condotti su molecole di DNA virale purificate con metodi classici. In questo modo però, le catene di polarità opposta contenute nei diversi virioni si accoppiano per formare molecole a doppio filamento e le informazioni sulla struttura del DNA all'interno del virione si perdono. Un processo di denaturazione al calore condotto su molecole virali purificate, seguito da un rapido raffreddamento a temperatura ambiente, dimostra chiaramente la tendenza delle regioni terminali palindromiche ad auto-accoppiarsi.

Informazioni sulla struttura del genoma virale all'interno del virione si possono ottenere solo se si mettono a punto condizioni sperimentali che impediscano lo stabilirsi di nuove associazioni tra le molecole di DNA virale e contemporaneamente non distruggano le interazioni intramolecolari esistenti. Questo obiettivo è stato raggiunto effettuando una lisi *in situ* di virioni di B19 adsorbiti ad una opportuna distanza l'uno dall'altro su una superficie di mica e successivamente guardando con il Microscopio a Forza (SFM)² la stessa area superficiale. Il DNA virale rilasciato in queste condizioni appare lineare, a singolo filamento e senza strutture terminali.

1. Deiss, V., J. D. Tratschin, M. Weitz, and G. Siegl. 1990. Cloning of the human parvovirus B19 genome and structural analysis of its palindromic termini. *Virology* 175: 247-54.
2. Binnig, G., C. F. Quate, and C. Gerber. 1986. Atomic Force Microscope. *Physical Review Letters*. 56: 930-3.

ELECTROPHYSIOLOGICAL FEATURES DURING ALCOHOLIC INTOXICATION

F. Melis, M.A. Caria, A. Solinas, C. Severino, C. Tavera, O. Mameli

Dept. Biomedical Sciences, Human Physiology Division, Sassari Univ. Medical School, Viale San Pietro 43/B, I-07100 Sassari, Italy.

The present study tries to point out, in rats, the electrophysiological features which could underlie the appearance of motor impairment in alcoholism, especially remarking the function exerted by the cerebellum, as known involved in motor control by the connections with the cerebral cortex and the spinal cord. In particular, the experiments were aimed at reaching two main goals: *i*) to specify the electrophysiological effects induced by ethanol on the cerebellar cortex neuronal excitability, and *ii*) to verify the possible antagonist action of drugs, generally used in clinical practice, on the effects produced by the alcohol at cerebellar level. The animals were subdivided into two groups, *control animals* and *treated animals*, which received saline and a 30% ethanol solution (1,8 g/kg) respectively, by applying the same infusion protocol (6 ml/kg i.v., 0,3 ml/min). Results showed that ethanol is able to induce opposite effects on the neuronal excitability of cerebellar Purkinje and granuli cells (P- and G-cells), producing a marked increase of the spontaneous electrical activity of P-cells and a more slight decrease of the discharge rate of G-cells. In addition, in a third animal group the antagonist action of *metadoxine*, a drug particularly effective in the treatment of chronic alcoholics, was tested by performing the usual infusion procedure (400 mg/kg dissolved in 6 ml of saline, 0.3 ml/min i.v.). It has been shown that the drug is able to re-establish the neuronal excitability of P- and G-cells, dramatically altered by previous ethanol administration. In conclusion, these observations suggest that variation of the cerebellar cortex neuronal excitability could underlie the appearance of the alcoholic ataxia, proposing a neurobiological approach to test new therapeutic strategies in alcoholism.

GENE THERAPY WITH HUMAN TISSUE KALLIKREIN CORRECTS DEFECTIVE ANGIOGENIC RESPONSE TO ISCHEMIA IN SHR

C. Emanuelli¹, MB. Salis¹, TP. Stacca¹, L Carta¹, A Pinna¹, J. Chao³, L. Gaspa¹, P. Madeddu^{1,2}

1 Sezione di Terapia Genica del Laboratorio Nazionale dell'Istituto Nazionale di Biostrutture e Biosistemi (I.N.B.B.) Osilo;

2 Istituto di Clinica Medica, Università di Sassari;

3 Medical University of South Carolina, Charleston, USA.

RATIONALE AND OBJECTIVE: Endothelial dysfunction contributes to altered angiogenic response to ischemia in atherosclerosis and diabetes. The impact of arterial hypertension, another condition characterized by endothelial dysfunction, on ischemia-induced angiogenesis remains to be explored. This issue has fundamental clinical relevance due to the frequent association of arterial hypertension and occlusive vascular disease. The aim of our study was twofold: 1) we evaluated whether spontaneous angiogenesis in response to hindlimb ischemia is defective in spontaneously hypertensive rats (SHR); 2) we determined the efficacy of angiogenesis gene therapy with human tissue kallikrein (HK) in accelerating the recovery of ischemic hindlimb.

METHODS: Hindlimb ischemia was induced by surgical excision of the left femoral artery in Wistar Kyoto rats (WKY) and SHR. A dose of 5×10^9 plaque forming units of an adenoviral vector containing the HK gene (Ad.CMV-cHK), or reporter gene (Ad.CMV-LacZ), or 150 μ L saline were injected into the ischemic adductor at 7 days after surgery. Perfusion recovery was evaluated at 1, 7, 14 e 28 days after the induction of ischemia by laser Doppler flowmetry. Muscular capillary density was determined at 28 days from surgery. Normoperfused adductors were used as controls.

RESULTS: In WKY, ischemia increased capillary density (from 266 ± 20 to 633 ± 73 cap/mm², $P < .001$), whereas the angiogenic response was defective in SHR (from 276 ± 20 to 354 ± 48 cap/mm², $P = N.S.$). Moreover, perfusion recovery was reduced and delayed in SHR. Local injection of Ad.CMV-cHK enhanced neovascularization in both strains (WKY: 729 ± 31 vs. 621 ± 14 cap/mm² in saline-injected rats, $P < .05$; SHR: 625 ± 18 vs. 348 ± 38 cap/mm² in saline-injected rats, $P < .01$) and accelerated hemodynamic recovery. These effects were more pronounced in SHR than in WKY ($P < .01$). Ad.CMV-cHK-injected rats did not show differences compared with those injected with saline.

CONCLUSIONS AND PERSPECTIVES: Our data indicate that in SHR muscular capillary density is not altered under basal conditions. However, the spontaneous angiogenic response to ischemia is defective in this genetic model of hypertension. The altered angiogenic potential did not preclude improvement of recovery by HK. These results underline the importance of hypertension in worsening the evolution of tissue ischemia and provide a new tool to treat occlusive vascular disease.

ANGIOGENESIS GENE THERAPY WITH HUMAN TISSUE KALLIKREIN

C Emanuelli 1, MB Salis 1, T Stacca 1, J Chao 3, Gaspa L 1, P Madeddu 2

1) Sezione di Terapia Genica del Laboratorio Nazionale di Biostrutture e Biosistemi, Osilo;

2) Istituto di Clinica Medica,

3) Università di Sassari; Medical University of South Carolina, Charleston, USA.

Background: Delivery of angiogenic factors is emerging as a new therapeutic strategy for peripheral vascular disease. We investigated if gene therapy with human tissue kallikrein (HK), a protease that cleaves kininogen to generate kinins, augments spontaneous angiogenesis and tissue perfusion in a mouse model of hindlimb ischemia. Results: Hindlimb ischemia, caused by femoral artery removal, increased capillary density (from 344 ± 15 to 641 ± 54 cap/mm² at 21 days after surgery, $P < .001$) and expression of the kinin B1 receptor gene in the adductor muscle. Blockade of the B1 receptor by the antagonist desArg⁹-[Leu⁸]-BK (50 nmol/kg body wt per day, IP) blunted the spontaneous angiogenic response to ischemia ($P < .01$), while B2 receptor antagonism was ineffective. Seven days after ischemia was induced in the left hindlimb, 3.6×10^8 plaque forming units (p.f.u.) of adenovirus containing the HK gene under control of cytomegalovirus enhancer/promoter sequence (Ad.CMV-cHK) or the reporter gene (Ad.CMV-LacZ) were injected in the ischemic adductor. Fourteen days later, capillaries were increased in Ad.CMV-cHK-infected muscles (969 ± 32 versus 541 ± 18 cap/mm² in Ad.CMV-LacZ, $P < .001$). This angiogenic effect was associated with enhanced blood flow to the ischemic limb, as documented by the use of laser Doppler flowmetry or radioactive microspheres, and with preserved muscular energetic charge. Chronic blockade of kinin B1 or B2 receptors prevented Ad.CMV-cHK-induced angiogenesis.

Conclusions: Local delivery of Ad.CMV-cHK accelerates angiogenesis and functional recovery in a mouse model of hindlimb ischemia. Adenovirus-mediated HK gene therapy may constitute an alternative strategy for patients with extensive peripheral vascular disease in whom traditional revascularization procedures are unsuitable.

ADENOVIRUS-MEDIATED HUMAN TISSUE KALLIKREIN GENE DELIVERY INHIBITS NEOINTIMA FORMATION INDUCED BY INTERRUPTION OF BLOOD FLOW IN THE MOUSE

MB Salis,¹ C Emanuelli,¹ J Chao,³ L Gaspa¹, P Madeddu^{1,2}

¹Gene Therapy Section of the National Laboratory of the National Institute of Biostructures and Biosystems (I.N.B.B.), Osilo, Italy;

²Institute of Internal Medicine, School of Medicine, University of Sassari, Sassari, Italy; ³Department of Biochemistry and Molecular Biology, Medical University of South Carolina, Charleston, SC, USA.

Tissue kallikrein cleaves kininogen to produce vasoactive kinin peptides. Binding of kinins to bradykinin B2 receptors on vascular endothelial cells stimulates the release of nitric oxide and prostacyclin, thus activating the cGMP and camp pathways. In this study, we evaluated the effects of adenovirus-mediated human tissue kallikrein gene (Ad.CMV-cHK) delivery in a mouse model of arterial remodeling induced by permanent alteration in shear stress conditions. Mice underwent ligation of the left common carotid artery and were injected intravenously with saline or 1.8×10^9 plaque-forming units Ad.CMV-cHK or control virus, Ad.CMV-LacZ. Fourteen days after surgery, morphometric analysis revealed that Ad.CMV-cHK treatment reduced neointima formation by 52% ($P < .05$) compared with the control given Ad.CMV-LacZ. Expression of human tissue kallikrein mRNA was detected in mouse artery, aorta, kidney, heart and liver, and recombinant human kallikrein levels were measured in the urine and plasma of mice receiving kallikrein gene delivery. Kallikrein gene transfer resulted in increases in urinary kinin, cGMP, and cAMP levels. In knockout mice with disruption of the kinin B2 receptor gene, the protective action of Ad.CMV-cHK on neointima formation was significantly reduced ($P < .05$) compared with wild-type controls (J129 Sv mice). In contrast, the effect of Ad.CMV-cHK was amplified ($P < .05$) in transgenic mice overexpressing human B2 receptor as compared with wild type controls (c57/B16 mice). Thus, the inhibitory effect of recombinant kallikrein on structural alterations caused by interruption of blood flow appears to be mediated by the B2 receptor. These results provide new insights into the role of the tissue kallikrein-kinin system in vascular remodeling and suggest application of gene therapy with human tissue kallikrein to treat restenosis and atherosclerosis.

ROLE OF CALCITONIN GENE-RELATED PEPTIDE AND KININS IN POST-ISCHEMIC INTESTINAL REPERFUSION.

Paolo Madeddu, Costanza Emanuelli, Maria Bonaria Salis, Anna Franca Milia, Alessandra Pinna, Tiziana Stacca, Leonardo Gaspa

Gene Therapy Section of the National Laboratory of the National Institute of Biostructures and Biosystems (I.N.B.B.)
via Brigata Sassari, 13 07033 Osilo (Sassari)

The involvement of bradykinin (BK), calcitonin gene-related peptide (CGRP), and tachykinins during mesenteric post-ischemic reperfusion was studied in anesthetized rats by using antagonists for BK B2, CGRP1, or tachykinin NK1 receptor, or by capsaicin-induced desensitization. B2 or CGRP1 receptor antagonists or desensitization attenuated the transient hypotension and plasma protein and leukocyte infiltration of intestinal wall observed during post-ischemic reperfusion. These effects were abolished by B2 antagonism in capsaicinized rats, while NK1 blockade was ineffective. Our results suggest that BK and CGRP contribute to systemic vasodilatation and microvascular leakage during mesenteric reperfusion. Pharmacological blockade of these systems could help preventing hypotension and intestinal injury consequent to reperfusion.

ALTERAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA ASSOCIATA ALLA FORMAZIONE ED ALLA MATURAZIONE DEI CONTATTI SINAPTICI IN NEURONI DI INVERTEBRATO IN COLTURA

Gagliardi S., Cibelli G., Diana G., Di Benedetta C., Ghiradi M., Montarolo P.G., Policastro V. e F. Vitiello.

Dipartimento di Farmacologia e Fisiologia Umana, Università degli Studi di Bari, P.le G. Cesare, 11 70124 - Bari (Italia).

Dipartimento di Neuroscienze, Università degli Studi di Torino, Corso Raffaello, 30 – 10125 Torino (Italia)

Nel sistema nervoso di invertebrato un modello molto utile per lo studio dei meccanismi molecolari che sottendono alla formazione ed alla fisiologia del contatto sinaptico è quello costituito dal neurone serotonergico C1 del ganglio cerebrale e dal suo bersaglio fisiologico, il neurone postsinaptico B2, sito nel ganglio buccale del mollusco polmonato *Helix*. *In vitro*, i due neuroni ricostituiscono un circuito funzionalmente attivo con formazione di sinapsi chimiche. In questo studio si è inteso individuare le eventuali differenze nell'espressione genica del neurone C1 in due situazioni distinte: formazione di sinapsi con il suo bersaglio fisiologico, B2; crescita in presenza di un bersaglio non fisiologico. Mediante analisi PCR, è stato possibile confrontare i trascritti genici differenzialmente espressi da singole cellule C1 coltivate nelle suddette condizioni. E' stata così dimostrata l'esistenza di una varietà di prodotti genici la cui espressione era indotta nel neurone C1 solo a seguito del contatto sinaptico attivo con il bersaglio cellulare fisiologico. I nostri risultati forniscono la prova sperimentale diretta circa l'influenza che segnali retrogradi provenienti dal bersaglio hanno sull'espressione genica del neurone presinaptico durante la formazione ed il rimaneggiamento, dovuto a fenomeni di plasticità, del contatto sinaptico. La caratterizzazione dei trascritti genici differenzialmente espressi è tuttora in corso, al fine di riconoscere quei geni la cui attivazione sia implicata in questo processo.

MOLECULAR CLONING, HETEROLOGOUS EXPRESSION, AND EVIDENCE FOR NOVEL ENZYMATIC FEATURES OF HUMAN NMN ADENYLYLTRANSFERASE.

M.Emanuelli, F.Carnevali, F.Pierella, F.Saccucci*, A.Amici, N.Raffaelli, e G.Magni.

Istituto di Biochimica ed Istituto di Biologia e Genetica*, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Ancona.

The pyridine coenzyme NAD⁺ plays significant roles beyond its participation in redox metabolism and in various types of ADP-ribosylation. In fact, the cellular NAD⁺ concentration modulates the expression of stress response proteins, and high levels of NAD⁺ reduce the time required for cellular rescue from DNA damage (1). Therefore, a better understanding how human NAD⁺ biosynthesis is regulated may be of vital importance in developing effective approaches for preventing and treating cancer.

Since many years we have been studying the enzyme NMN adenylyltransferase, that catalyzes the conversion of NMN and ATP to NAD and inorganic pyrophosphate (2). This enzymatic activity has been correlated with crucial cellular events and it is involved in the metabolism of the potent antitumor agent, tiazofurin (3). As part of an on-going study on the role played by this enzyme in the regulation of NAD cellular levels, we successfully isolated a full-length cDNA encoding NMN adenylyltransferase from a human placenta cDNA library (4). The sequence of 1329 bp contains a full-length 837-bp coding region, corresponding to a 31.9 kDa protein whose deduced primary structure exhibits high homology with consensus sequences found in other NMN adenylyltransferases. Northern blots detected a major 3.1-kilobase mRNA transcript as well as a minor 4.1-kilobase transcript in all human tissues examined. In several cancer cell lines, lower levels of mRNA expression were clearly evident. The gene encoding the human enzyme was mapped to chromosome band 1p32-35. High-efficiency bacterial expression yielded 1.5 mg of recombinant enzyme per liter of culture medium. Kinetic parameters of human recombinant enzyme are indistinguishable from those of the native enzyme. Further studies on the substrate specificity showed that the enzyme can replace ATP with various purine and pyrimidine nucleoside triphosphates and provide new directions for future studies on metabolic pathways involving human NMN adenylyltransferase.

REFERENCES

1. E.L. Jacobson et al., Mol. Cell. Biochem. 193 (1999) 69.
2. G. Magni et al., Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 73 (A) (1999) 135.
3. H.N. Jayaram et al., Biochem. Pharmacol. 35 (1986) 587. M. Emanuelli et al., J. Biol. Chem., in press.

UNITÀ DI RICERCA

DEL

CONSORZIO INTERUNIVERSITARIO

“ISTITUTO NAZIONALE BIOSTRUTTURE E BIOSISTEMI”

(in ordine alfabetico del nome del Responsabile Scientifico)

(PO Professore Ordinario, PA Professore Associato, RU Ricercatore Universitario, DR Dottorando di Ricerca;
BC Borsista, Contrattista; PT Personale Tecnico; A Altro)

UNITA' DI RICERCA INBB
Napoli

Responsabile Scientifico

Prof. Alberto Abbruzzese Saccardi

Linea di Ricerca

Ruolo delle modifiche post-traduzionali del fattore eucariotico di inizio della sintesi proteica 5A (eIF-5A) nei meccanismi di proliferazione e morte cellulare programmata in cellule tumorali umane.

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Abbruzzese Saccardi Alberto PO Alberto.Abruzzese@unina2.it

Non Aderenti INBB

Caraglia Michele DR mcaraglia@yahoo.com
Marra Monica DR Alberto.Abruzzese@unina2.it
Giuberti Gaia DR Alberto.Abruzzese@unina2.it
D'Alessandro Anna Maria. BC Alberto.Abruzzese@unina2.it

Sede Unità di Ricerca

II Università di Napoli, Dipartimento di Biochimica e Biofisica "F. Cedrangolo".

Via Costantinopoli, 16 80138 Napoli

indirizzo

081/5665871-3 081/5665863. Alberto.Abruzzese@unina2.it
Telefono Fax e-mail

Sezione INBB di appartenenza

Napoli

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Il fattore eucariotico di inizio della sintesi proteica 5A (eIF-5A) è una proteina di peso molecolare 18, 000 che promuove la formazione del primo legame peptidico durante la sintesi proteica. Le modifiche post-traduzionali poli-ammino-dipendenti del suo residuo di lisina 50 in ipusina è di fondamentale importanza per la regolazione della sua attività biologica. I nostri studi verteranno sulla comprensione dei meccanismi attraverso i quali l'eIF-5A regola la proliferazione e l'apoptosi.

Risultati ottenuti

L'osservazione che l'interferone alfa (IFN α) inibisce la proliferazione cellulare, aumenta l'espressione dell'EGF-R e riduce la sintesi di ipusina ci induce a ritenere che tale aminoacido possa avere qualche ruolo specifico durante la crescita cellulare. Abbiamo, inoltre, riscontrato che l'IFN α è in grado di indurre nelle cellule KB apoptosi e l'aggiunta di EGF è in grado di antagonizzare tale effetto. L'apoptosi indotta da IFN α avviene in parallelo ad un incremento della espressione e della funzione dell'EGF-R e ad una riduzione dei livelli di ipusina; verificheremo anche se altri agenti in grado di indurre apoptosi (arabinoside citosina, etoposide, il ligando di Fas) siano in grado di modulare la sintesi di ipusina in diverse linee cellulari tumorali umane. Quindi valuteremo gli eventuali "cross-talk" esistenti tra il pathway dell'EGF-R ed eIF-5A mediante tecniche di coimmunoprecipitazione. Trasferiremo le cellule tumorali con plasmidi codificanti per i dominanti negativi dei vari componenti del *pathway* dell'EGF-R e studieremo successivamente i livelli di ipusina in tali cellule. Inoltre valuteremo gli effetti sia sulla proliferazione che sull'apoptosi di vari inibitori della sintesi dell'ipusina in associazione con l'IFN α allo scopo di incrementare l'attività antitumorale di quest'ultimo. Inoltre abbiamo già parzialmente caratterizzato la struttura secondaria e terziaria dell'eIF5A (manoscritto in preparazione) e l'ulteriore caratterizzazione del sito contenente l'ipusina (strategico per l'attività dell'eIF5A) permetterà uno screening farmacologico su base computazionale di molecole potenzialmente inibitrici del fattore. Successivamente verrà valutata la loro attività antitumorale da sole od in combinazione all'interferone alfa su cellula di carcinoma epidermoide umano.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000

- 1) M. Caraglia, A. Passeggio, S. Beninati, A. Leardi, L. Nicolini, S. Improta, A. Pinto, A.R. Bianco, P. Tagliaferri and A. Abbruzzese "Interferon $\alpha 2$ recombinant and epidermal growth factor modulate proliferation and hypusine synthesis in human epidermoid cancer KB cells" *Biochem. J.*, 324, 737-741 1997
- 2) A. Leardi, M. Caraglia, C. Selleri, S. Pepe, C. Pizzi, R. Notaro, A. Fabbrocini, M. Musicò, A. Abbruzzese, A.R. Bianco, P. Tagliaferri "Desferioxamine increases iron depletion and apoptosis induced by ara-c on human myeloid leukemic cells." *Br. J. Haematol.*, 102(3), 746-752, 1998.
- 3) S. Beninati, V. Gentile, M. Caraglia, A. Lentini, P. Tagliaferri, and A. Abbruzzese "Tissue transglutaminase expression affects hypusine metabolism in BALB-C 3T3 cells" *FEBS Letters*, 437, 34-38, 1998
- 4) G. Lupoli, G. Vitale, M. Caraglia, M.R. Fittipaldi, A. Abbruzzese, P. Tagliaferri, A.R. Bianco "Familial non medullary thyroid carcinoma: a new clinical entity" *The Lancet*, 20: 637-6391, 1999.
- 5) M. Caraglia, D. Barbarulo, E. Di Gennaro, M. Marra, P. Tagliaferri, A. Abbruzzese and A. Budillon. Upregulated EGF receptors undergo to rapid internalization and ubiquitin-dependent degradation in human cancer cells exposed to 8-Cl-cAMP *FEBS Letters* 447(2-3):203-208, 1999.
- 6) M. Caraglia, E. Di Gennaro, D. Barbarulo, M. Marra, P. Tagliaferri, A. Abbruzzese, A. Budillon "Upregulated EGF receptors undergo to rapid internalization and ubiquitin-dependent degradation in human cancer cells exposed to 8-Cl-cAMP" *FEBS Letters*, 447: 203- 209, 1999
- 7) A. Budillon, E. Di Gennaro, M. Caraglia, D. Barbarulo, A. Abbruzzese and P. Tagliaferri "8-Cl-cAMP antagonizes mitogen-activated protein kinase activation and cell growth stimulation induced by epidermal growth factor" *Br. J. Cancer*, 81: 1134-1141, 1999.
- 8) M. Caraglia, A. Abbruzzese, A. Leardi, S. Pepe, A. Budillon, G. Baldassarre, C. Selleri, S. De Lorenzo, A. Fabbrocini, G. Giuberti, G. Vitale, G. Lupoli, A. R. Bianco, and P. Tagliaferri "Interferon- α induces apoptosis in human KB cells through a stress-dependent mitogen activated protein kinase pathway that is antagonized by epidermal growth factor" *Cell Death Differ.*, 6: 773-780, 1999.
- 9) M. Caraglia, A. Budillon, G. Vitale, G. Lupoli, P. Tagliaferri and A. Abbruzzese "Modulation of molecular mechanisms involved in protein synthesis machinery as a new tool for the control of cell proliferation" *Eur. J. Biochem.* 267: 3919-3936, 2000
- 10) Lentini, F. Autuori, P. Mattioli, M. Caraglia, A. Abbruzzese, S. Beninati "Evaluation of the efficacy of potential antineoplastic drugs on tumour metastasis by computer-assisted image analysis" ***Eur. J. Cancer***, 36(12):1572-1577, 2000.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Il gruppo di ricerca si occuperà dello studio delle interazioni molecolari tra l'eIF-5A e i fattori che compongono le cascate metaboliche alla base della trasduzione del segnale dell'interferone alfa e del recettore per l'EGF. Inoltre verrà chiarita l'importanza biologica di tali interazioni nella regolazione della proliferazione e dell'apoptosi delle cellule tumorali epiteliali. Verrà studiata la struttura tridimensionale del sito contenente l'ipusina dell'eIF-5A allo scopo di selezionare degli inibitori specifici in grado di potenziare l'effetto antitumorale di agenti antineoplastici convenzionali tra i quali l'interferone alfa, la citosina arabinoside ed il cisplatino.

Collaborazioni internazionali in atto

Igarashi, K Faculty of Pharmaceutical Sciences Chiba University 1-33, Yayoi-cho, Inage-ku Chiba 263-8522, Japan
Park, MH OPCB, NIDCR Bldg 30, Rm 211 NIH Bethesda MD 20892-4340

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Cromatografo ad alta pressione, Cappa a flusso laminare, Apparecchi per elettroforesi verticali ed orizzontali provvisti di generatore, Microscopio a contrasto di fase, Elettroporatore, Fluoroimager

Parole Chiave

Ipusina; Apoptosi; Epidermal growth factor receptor; interferone, cellule tumorali.

UNITA' DI RICERCA INBB
Bari

Responsabile Scientifico
Prof. Mario N. Armenise

Linea di Ricerca

Bioelettronica

titolo

Elaborazione ottica dei segnali in Applicazioni Medicali

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Armenise Mario

PO

armenise@poliba.it

Non Aderenti INBB

Passaro Vittorio

RU

passaro@poliba.it

Diana Roberto

DR

diana@libero.it

De Leonardis

fdeleonardis@libero.it

Sede Unità di Ricerca

Politecnico di Bari - Laboratorio di Optoelettronica, Dipartimento di Elettrotecnica ed Elettronica

Indirizzo

Via Edoardo Orabona 4, 70125 Bari, Italia

Sezione INBB di appartenenza

Bari

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

L'attività recentemente svolta ha riguardato la modellistica, progettazione e simulazione di originali architetture ottiche integrate per applicazioni medicali. Lo studio è stato principalmente rivolto a nuovi tipi di sensori per la misura della concentrazione di alcune soluzioni biologiche e per l'immunoanalisi.

Risultati

È stato modellizzato, progettato e simulato uno spettrofotometro differenziale ottico integrato, completo di sorgente laser, guide d'onda a canale, cuvette per l'analisi, reticoli di diffrazione e fonorivelatori. Le potenziali applicazioni di questo biosensore sono varie quanto le molecole che possono essere depositate nelle regioni sensibili (cuvette). Da questo tipo di dispositivo può trarre beneficio la pratica medica, non solo nel campo delle analisi cliniche ma anche in vista della fabbricazione di farmaci e di organi di trapianto, come il pancreas artificiale per i diabetici. Nell'ambito delle applicazioni medicali, il dispositivo può effettuare delle analisi che si affiancano alle tradizionali tecniche di monitoraggio immunologico. Inoltre, esistono potenzialità di applicazione anche fuori dal campo medico: infatti, si potrebbe utilizzare questo strumento per analizzare la qualità e genuinità degli alimenti e per rilevare i livelli di inquinamento ambientale.

Un altro sensore studiato fa uso di reticoli di diffrazione alla Bragg in fibra ottica. In questo caso, volendo rivelare la presenza di uno specifico anticorpo in un campione di liquido organico (per esempio, sangue), si fissa sulla superficie del core della fibra uno strato di antigene complementare. La formazione dei complessi anticorpo-antigene crea uno straterello proteico superficiale che modifica il cladding della fibra, e quindi la propagazione del fascio laser nella fibra. Con alcune semplici varianti, si possono rivelare o misurare i più svariati parametri biomedici

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000

[1] G. Lorusso, V.M.N. Passaro, M. Bobbo, M.N. Armenise, “Nuova Architettura per Elaborazione Ottica dei Segnali in Applicazioni Medicali”, Elettroottica 1998.

[2] O. Lazzizzera, V.M.N. Passaro, R. Diana, M.N. Armenise, “Sensore a Reticolo in Fibra Ottica per Diagnostica Medica”, Elettroottica 1998.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Nei prossimi tre anni si prevede di continuare nell'attività di modellistica e progettazione intrapresa, possibilmente con il supporto di qualche ente di ricerca o partner industriale.

Collaborazioni internazionali

University of Glasgow, UK

City University of Hong Kong

ALCATEL

IROE-CNR, Firenze

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

- a) misure d'indice modale in guide ottiche a 0.488 μm , 0.6328 μm , 1.15 μm , e 1.55 μm col metodo delle “m-lines”;
- b) misure di dispersione cromatica in guide planari da 454 nm a 514 nm;
- c) misure di in-plane e out-of-plane scattering per guide ottiche;
- d) misure di attenuazione ottica in guida con la tecnica dei tre prismi e con l'ausilio di telecamera Hamamatsu interfacciata a PS2/IBM per l'acquisizione automatica dei dati;
- e) misure di accoppiamento end-fire e di perdite di inserzione con l'ausilio di micro-posizionatori piezoelettrici;
- f) forni di diffusione per la fabbricazione di guide in niobato di litio (diffusione di Ti);
- g) apparecchiature per scambio protonico per la fabbricazione di guide ottiche;
- h) impianto di “reactive ion etching”;
- i) Laser ad Argon multiriga nel visibile e nell'UV (364 nm) per la scrittura di reticoli con tecnica olografica;
- j) PC vari e programmi automatici per analisi, progetto e simulazione di componenti e circuiti in ottica guidata.

Parole Chiave

Ottica Integrata, Elaborazione Ottica dei Segnali, Diagnostica Medica, Sensoristica, Biofotonica

UNITA' DI RICERCA INBB
Bologna

Responsabile Scientifico
Prof. Giorgio Baccarani

Linea di Ricerca
Sviluppo di una telecamera “intelligente” per applicazioni outdoor

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Giorgio Baccarani PO Gbaccarani@deis.unibo.it

Non Aderenti INBB

Riccardo Rovatti RU Rrovatti@deis.unibo.it

Alessandro Bevilacqua DT abevilacqua@deis.unibo.it

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Elettronica, Informatica e Sistemistica
Viale Risorgimento, 2 – 40136 Bologna
051 209-3012 051 209-3073

Sezione INBB di appartenenza

Bologna

UNITA' DI RICERCA INBB
Pavia

Responsabile Scientifico
Prof. Balduini Cesare

Linea di Ricerca

Meccanismi biochimici di controllo della attivazione piastrinica

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Balduini Cesare PO balduini@unipv.it

Non Aderenti INBB

Torti Mauro PA bioscipa@unipv.it

Tira M. Enrica bioscipa@unipv.it

Bertoni Alessandra BC bioscipa@unipv.it

Canobbio Ilaria DR bioscipa@unipv.it

Viola Manuela DR bioscipa@unipv.it

Paganini Simona DR bioscipa@unipv.it

Sede Unità di Ricerca

Universita' degli Studi di Pavia - Dipartimento di Biochimica - Sezione di Scienze -

Via Bassi n. 21 -27100 Pavia

indirizzo

0382/507236 0382/507240 bioscipa@unipv.it

telefono fax balduini@unipv.it

Sezione INBB di appartenenza

Pavia

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

I programmi di ricerca dell'U.O. sono indirizzati allo studio delle seguenti tematiche.

1. Ruolo delle proteine Rap nelle piastrine - Rap1B e Rap2B sono proteine GTP leganti a basso P.M. che nelle piastrine quiescenti si trovano ancorate alla membrana plasmatica. In seguito ad attivazione piastrinica queste proteine traslocano al citoscheletro con un meccanismo aggregazione dipendente, del quale non sono note le basi molecolari e il significato funzionale. Scopo del nostro lavoro è quello di definire gli aspetti molecolari dell'interazione proteine-Rap citoscheletro identificando la componente citoscheletrica e la porzione di Rap responsabili dell'interazione. Tali indagini vengono condotte utilizzando proteine Rap mutate e citoscheletri ricostituiti "in vitro".
2. Ruolo dei recettori adesivi nell'attivazione piastrinica - L'adesione costituisce il primo evento della attivazione piastrinica e si realizza tramite l'intervento di recettori il cui ruolo è anche quello di concorrere all'innescamento di quella serie di fenomeni che portano all'attivazione. Il nostro gruppo da molti anni si occupa dell'integrina $\alpha II_b \beta 3$ ed ha concorso a chiarire la dipendenza tra alcuni eventi intracellulari e la normale funzionalità di questo componente.

L'adesione piastrinica può anche coinvolgere il complesso glicoproteico GPIb-V-IX ed è mediata in questo caso dal fattore di vonWillebrand (vWF). Lo studio di questo componente è particolarmente interessante in quanto esso è in grado di legarsi sia al complesso GPIb-V-IX sia al complesso $\alpha II_b \beta 3$ in piastrine attivate. I nostri studi sono volti a chiarire da un lato i meccanismi di interazione del vWF con la superficie piastrinica, dall'altro gli eventi intracellulari conseguenti all'interazione.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000

- 1) P.Sini, A.Denti, M.E.Tira, C.Balduini"; Role of decorin on in vitro fibrillogenesis of type I collagen"; Glycoconjugate J., 14, 871-874, 1997
- 2) M. Torti, E.Tolnai Festetics, A.Bertoni, R.Moratti, C.Balduini, F.Sinigaglia; "Lysophosphatidic acid induces protein tyrosine phosphorylation in the absence of phospholipase C activation in human platelets"; Platelets, 8, 181-187, 1997
- 3) H.Jao, X. Cui, M.Torti, C.Chang, L.D. Alexander, E.G. Lapetina, J.G. Douglas; "Arachidonic acid mediates angiotensin II effects on p21ras in renal proximal tubular cells via the tyrosine kinase-Shc-Grb2-Sos pathway"; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 7417-7421, 1998
- 4) M. Torti, E. Tolnai Festetics, A. Bertoni, F. Sinigaglia, C. Balduini; "Thrombin induces the association of cyclic ADP-ribose synthesizing CD38 with the platelet cytoskeleton"; FEBS Lett., 428, 200-204, 1998
- 5) M. Torti, E. Tolnai Festetics, A. Bertoni, F. Sinigaglia, C. Balduini; "Cytoskeleton-dependent inhibition of the ADP-ribosyl cyclase activity of CD38 in thrombin-stimulated platelets"; FEBS Lett., 431, 19-22, 1998
- 6) Torti M., Tolnai Festetics E., Bertoni A., Sinigaglia F., Balduini C.; Clustering of Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ Differently Regulates Tyrosine Phosphorylation of pp72^{syk}, PLC β_2 and pp125^{FAK} in Concanavalin A-stimulated Platelets; Thromb.Haemost. 81, 124-130, 1999
- 7) Torti M., Bertoni A., Canobbio I., Sinigaglia F., Lapetina E.G., Balduini C.; Rap1B and Rap2B Translocation to the Cytoskeleton by von Willebrand Factor Involves Fc γ II Receptor-mediated Protein Tyrosine Phosphorylation; J.Biol.Chem. 274, 13690-13697, 1999
- 8) Torti M., Bertoni A., Canobbio I., Sinigaglia F., Lapetina E.G., Balduini C.; Interaction of the low molecular weight GTP-binding protein Rap2 with the platelet cytoskeleton is mediated by direct binding to the actin filaments; J.Cell.Biochem. 75, 675-685, 1999
- 9) M.Torti, A.Bertoni, I.Canobbio, F.Sinigaglia, C.Balduini; "Hydrolysis of NADP⁺ by platelet CD38 in the absence of synthesis and degradation of cyclic ADP-ribose 2'-phosphate"; FEBS Lett. 455, 359-363, 1999
- 10) Torti M., Bertoni A., Sinigaglia F., Balduini C., Payrastra B., Plantavid M., Chap H., Mauco G.; The platelet cytoskeleton regulates the aggregation-dependent synthesis of phosphatidylinositol 3,4- bisphosphate induced by thrombin; FEBS Letters 466, 355-358, 2000

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

L'interesse del nostro gruppo negli anni prossimi sarà prevalentemente indirizzato allo studio del ruolo che i meccanismi adesivi hanno nel modulare la funzionalità piastrinica. Verranno indagati diversi recettori adesivi (GPIb-V-IX, CD38, GPIIb-IIIa) e verranno caratterizzati gli eventi intracellulari conseguenti alla loro interazione con ligandi specifici. Particolare attenzione verrà dedicata alla identificazione degli elementi di trasduzione del segnale coinvolti ed alla sequenza con la quale intervengono. Verranno anche proseguiti gli studi relativi al coinvolgimento del citoscheletro in questi meccanismi.

Collaborazioni internazionali in atto

- Eduard G. Lapetina - Case Western Reserve University - Cleveland, Ohio - USA
- G. Mauco - Inserm, Unite' 326 - Toulouse - FRANCIA
- S. Shattil - Department of Vascular Biology - The Scripps Research Institute - 10550 North Torrey Pines Road, VB-5- La Jolla, California 92037 - U.S.A.

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

- Aggregometri
- HPLC - FPLC
- Lettori piastre ELISA
- Centro Grandi Strumenti (NMR - Spettrometri di massa - Confocale - Microscopia elettronica, ecc.)

Parole Chiave

Piastrine, Trasduzione del segnale, Recettori adesivi, Citoscheletro

UNITA' DI RICERCA INBB
Sassari

Responsabile Scientifico:

Prof. C. Ombretta Becciu Mameli

Linea di Ricerca:

Alterazioni patologiche della funzionalità del sistema cardio-respiratorio durante epilessia sperimentalmente indotta

Composizione del Gruppo:

Aderenti INBB

Becciu Mameli C. Ombretta	PO	fisiou@ssmain.uniss.it
Caria Marcello A.	PA	mcaria@ssmain.uniss.it
Melis Francesco	RU	melis@ssmain.uniss.it

Non Aderenti INBB

Sanna Giancarlo	PT	fisiou@ssmain.uniss.it
Monti Andrea	PT	fisiou@ssmain.uniss.it
Tavera Candido F.	PT	fisiou@ssmain.uniss.it

Sede Unità di Ricerca:

Università degli Studi di Sassari, Facoltà di Medicina e Chirurgia; Dipartimento di Scienze Biomediche, Sezione di Fisiologia Umana; Viale San Pietro 43/B, 07100 Sassari;

tel: 079.228289,

fax: 079.228298

e-mail: fisiou@ssmain.uniss.it

Sezione INBB di Appartenenza

Catania

Riassunto della attività svolta negli ultimi tre anni

La attività scientifica svolta presso la Sezione di Fisiologia Umana ha riguardato i seguenti temi di ricerca:

- a) complicanze aritmiche in corso di epilessia sperimentale;
- b) controllo plurisensoriale della attività neuronale del dodicesimo nucleo;
- c) influenza della somministrazione degli ormoni tiroidei sulla eccitabilità dei neuroni ippocampali;
- d) influenza dei metalli pesanti sulla attività delle aree cerebrali e del tronco dell'encefalo;
- e) biodisponibilità del Propofol nelle diverse frazioni ematiche e nel tessuto cerebrale.

Complicanze aritmiche in corso di epilessia sperimentale: i risultati ottenuti hanno messo in evidenza che l'induzione di focolai epilettici a livello dell'ipotalamo e del tronco dell'encefalo, sperimentalmente indotti mediante applicazione topica di Penicillina-G, sono capaci di "triggerare" risposte cardiache caratterizzate da bradiaritmie di diversa gravità. E' stato ipotizzato che il fenomeno della morte improvvisa, talvolta osservato nei pazienti epilettici, possa essere ricondotto ad un quadro aritmico particolarmente severo, verosimilmente sostenuto da complicazioni del quadro metabolico e della funzione respiratoria, che nel 20% delle osservazioni effettuate accompagnano le manifestazioni epilettiche.

Controllo plurisensoriale della attività neuronale del dodicesimo nucleo: è stato evidenziato che i neuroni ipoglossali soggiacciono ad un complesso sistema di controllo, atto ad assicurare il corretto atteggiamento posturale della lingua nella cavità orale, in risposta ad informazioni che provengono dalle retine, dai nervi periferici e dai recettori labirintici. Recentemente è stata ipotizzata una associazione vista-olfatto, capace di modulare la attività dei neuroni ipoglossali in preparazione dei muscoli linguiali alla ricezione del cibo durante la fase orale della digestione.

Influenza della somministrazione degli ormoni tiroidei sulla eccitabilità dei neuroni ippocampali: i risultati ottenuti hanno messo in evidenza che in ratti adulti, resi artificialmente ipotiroidei mediante somministrazione di propiltiouracile, la somministrazione mediante microiniezione locale di T4 induce una significativa modificazione della attività elettrica dei neuroni del giro dentato dell'ippocampo. I dati disponibili suggeriscono un possibile ruolo di neuromodulazione da parte degli ormoni tiroidei, che acquista particolare rilievo in considerazione della funzione svolta dall'ippocampo nei fenomeni cognitivi dell'apprendimento e della memoria, come è noto gravemente deficitarli in corso di disfunzioni tiroidee. Questo approccio sperimentale fornisce inoltre un ulteriore supporto alla comprensione degli effetti che gli ormoni tiroidei esercitano, non solo a livello dell'ippocampo, ma, più in generale, sulle strutture del sistema nervoso centrale.

Influenza dei metalli pesanti sulla attività delle aree cerebrali e del tronco dell'encefalo: i risultati ottenuti hanno dimostrato che la somministrazione di acetato di piombo è capace di indurre sicuri effetti neurotossici a livello del sistema nervoso centrale, come testimoniano le alterazioni del riflesso vestibolo-oculare (VOR), riscontrate anche a bassissime concentrazioni della sostanza a livello sia plasmatico che cerebrale. Queste osservazioni, che hanno consentito di individuare il tronco dell'encefalo come un possibile "target" dell'azione del piombo, rendono meno probabile una possibile influenza del metallo sulle aree del lobo frontale corticale, soprattutto in considerazione della assenza di disturbi di tipo comportamentale durante il trattamento con la sostanza intossicante. Gli esperimenti

effettuati consentono di suggerire che l'esplorazione del VOR potrebbe rappresentare un test efficace per la valutazione funzionale del sistema nervoso centrale esposto a bassi livelli di piombo ematico e tessutale.

Biodisponibilità del Propofol nelle diverse frazioni ematiche e nel tessuto cerebrale: lo scopo di questa ricerca è stato quello di studiare, mediante esperimenti acuti eseguiti su conigli, la biodisponibilità del Propofol in tutte le frazioni ematiche, nel liquido cerebro-spinale (CSF) e nel tessuto cerebrale durante i diversi livelli di anestesia indotta dalla somministrazione del farmaco per via endovenosa. Lo studio è stato intrapreso al fine di verificare l'esistenza di una correlazione tra la biodisponibilità del Propofol nei diversi compartimenti fluidi dell'organismo e nel tessuto cerebrale e l'effetto anestetico del farmaco. I risultati ottenuti hanno dimostrato una disomogenea distribuzione del farmaco nei diversi compartimenti, con massime concentrazioni all'interno dei globuli rossi e nel tessuto cerebrale e minime nel plasma e nel CSF. Queste osservazioni hanno fornito un valido contributo alla comprensione delle caratteristiche farmacologiche evidenziate dal farmaco nelle fasi di induzione e di mantenimento dell'anestesia.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000

1. De Riu P.L., Petruzzi V., Caria M.A., Mameli O., Casu A.R., Nuvoli S., Spanu A., Madeddu G. - β -endorphin and cortisol levels in plasma and CSF following acute experimental spinal traumas. - *Physiol. Behav.*, 62, 1-5, 1997.
2. Mameli O. - Epilepsy and sudden death. - *Epilepsia*, 38, S57-S59, 1997.
3. Mameli O., Caria M.A., Melis F., Severino C., Solinas A., Mameli P., Mameli S., Padua G., Massarelli G., Pintus A. - Autonomic derangement may complicate cardiac neurogenic arrhythmias in experimental epilepsy. - *Eur. J. Neurosc.*, 10, 20.45, 1998.
4. Mameli O., Caria M.A., Melis F., Severino C., Solinas A., Mameli P., Mameli S., Padua G., Massarelli G., Pintus A. - Pathological changes in cardio-pulmonary system during experimental epilepsy. - *Eur. J. Physiol.*, 437 (4), R35, 70, 1999.
5. Mameli O., Melis F., Caria M.A., Solinas A., Mameli S., De Riu P.L. - Epileptic discharge of cortical, subcortical and spinal neurons in penicillin induced experimental epilepsy - *Arch. Ital. Biol.*, 137, 29-46, 1999.
6. Caria M.A., Melis F., Stanzani S., Russo A., Cataudella T., Palmieri G., Lai L., Milia M., Solinas A., Severino C., Mameli O. - Electrophysiological and neuroanatomical findings in olfactory-hypoglossal connections. - *Physiol. Res.*, 48, S60, 1999.
7. Melis F., Caria M.A., Mameli S., Mameli P., Massarelli G., Pintus A., Lai L., Milia M., Solinas A., Severino C., Mameli O. - Autonomic dysfunction as a possible complication in sudden epileptic death. - *Physiol. Res.*, 48, S95, 1999.
8. Mameli O., Melis F., Caria M.A., Solinas A., Milia M., De Riu P.L., Tocco M.G., Ibba A. - A test for early detection of heavy metal neurotoxicity. - 20th Journées Internationales Méditerranéennes, *Medicine du Travail*, 1999.
9. Melis F., Caria M.A., Stanzani S., Russo A., Cataudella T., Palmieri G., Lai L., Milia M., Severino C., Mameli O. - The interpeduncular nucleus as a putative link of olfactory inputs to the hypoglossal nucleus - *Eur. J. Physiol.*, 348 (2), R20, 70, 1999.
10. De Riu P.L., De Riu G., Testa C., Mulas M., Caria M.A., Mameli S., Mameli O. - Disposition of propofol between red blood cells, plasma, brain, and cerebrospinal fluid in rabbits. - *Eur. J. Anaesthesiol.*, 17, 18-22, 2000.

Prospettive ed obiettivi degli ultimi tre anni

I temi di ricerca saranno ulteriormente sviluppati nei prossimi tre anni:

In particolare, per quanto attiene il fenomeno della morte improvvisa, osservato in taluni pazienti affetti da epilessia, saranno indagati ulteriori aspetti della funzionalità cardio-respiratoria e, più in generale, dell'equilibrio omeostatico dell'organismo, che potrebbero risultare profondamente alterati durante l'evoluzione clinica delle manifestazioni epilettiche, fino ad essere causa di morte nelle situazioni più drammatiche.

Relativamente al controllo plurisensoriale della attività dei neuroni ipoglossali, saranno eseguiti ulteriori esperimenti, di carattere sia neuroanatomico che neurofisiologico, con lo scopo di identificare le stazioni nucleari impegnate nella via di trasmissione olfattivo-ipoglossale; inoltre, al fine di precisare con chiarezza l'entità e la natura delle afferenze al dodicesimo nucleo, saranno contemporaneamente studiate le proiezioni provenienti dalle aree corticali motorie e dalla corteccia cerebellare, le quali sicuramente concorrono al complesso e delicato controllo della motilità linguale.

Particolarmente suggestiva appare l'ipotesi di una funzione di neuromodulazione esercitata dagli ormoni tiroidei a livello dei neuroni ipocampali, soprattutto in prospettiva di una possibile futura applicazione di questo risultato ad altre strutture del sistema nervoso centrale.

Sono inoltre in corso di svolgimento alcuni interessanti esperimenti sulla azione dell'etanolo sulla attività elettrica delle cellule di Purkinje cerebellari, che potrebbero rivelare, da un punto di vista neurofisiologico, i meccanismi che presiedono alla comparsa dei disturbi motori osservati in corso di intossicazione acuta o cronica da assunzione di sostanze alcoliche; non è trascurabile il ruolo che questo studio potrebbe svolgere nel guidare i protocolli di terapia attualmente utilizzati per contrastare l'atassia da abuso di sostanze alcoliche.

Collaborazioni internazionali in atto:

Istituto di Fisiologia Umana, Univ. Cattolica del Sacro Cuore, Roma

Dipartimento di Scienze Fisiologiche, Univ. degli Studi di Catania, Catania

Lab. Motor Physiology, The Rockefeller University, New York, USA

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca:

La attività di ricerca viene condotta in due moderne e funzionali unità di neurofisiologia, ciascuna delle quali principalmente equipaggiata dalla seguente attrezzatura:

sistema di registrazione dalle unità neuronali (microelettrodi, microdrive ad avanzamento elettronico, preamplificatori, oscilloscopi);

sistema di stimolazione delle strutture nervose (microelettrodi, stimolatori, isolatori di stimolo);

sistema informatico dotato di apposito software per l'acquisizione e l'elaborazione dei segnali nervosi;

set-up per istologia (dispositivo per la lesione elettrolitica del tessuto nervoso, macchina per la produzione del ghiaccio secco, criostato, microscopi da tavolo, materiale per istologia: coloranti, vetreria, ecc.);

un tavolino vestibolare;

set-up completo di registrazione da fette isolate;

Parole Chiave:

Epilessia, tronco dell'encefalo, complicanze aritmiche, edema alveolare, modelli neurologici

UNITA' DI RICERCA INBB
Bologna

Responsabile Scientifico
Prof. Ferdinando Bersani

Linea di Ricerca

- 1) Interazioni tra campi elettromagnetici e biosistemi.
- 2) Modelli neuronali.

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Bersani Ferdinando. P.A. bersani@df.unibo.it

Non Aderenti INBB

Castellani Gastone R.U. gasto@kaiser.alma.unibo.it

Remondini Daniel D.R. remondini@df.unibo.it

Sede Unità di Ricerca

Bologna- Dipartimento di Fisica via Berti Pichat 6/2- 40127 Bologna.

indirizzo

051 209 51 22

051 209 50 50

bersani@df.unibo.it

telefono

fax

e-mail

Sezione INBB di appartenenza

Bologna

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Per quanto riguarda il 1° tema di ricerca abbiamo svolto ricerche nell'ambito dell'interazione tra campi elettromagnetici e sistemi cellulari, con particolare riguardo agli effetti genotossici.

Attualmente siamo impegnati in un progetto europeo (Reflex) e in un progetto nazionale (Murst 5%).

Per quanto riguarda il secondo tema abbiamo studiato la rete neurale BCM, e le sue relazioni con le proprietà di neuroni reali.

Risultati ottenuti

- 1) E' stata verificata l'assenza di effetti genotossici in linfociti umani con esposizione a campo magnetici a 50 Hz. Attualmente abbiamo messo a punto sistemi di esposizione a radiofrequenza per lo studio degli effetti di tali campi sui linfociti e colture cellulari.
- 2) Abbiamo ottenuto dei risultati riguardanti le proprietà della rete BCM e alcune possibili relazioni con neuroni reali.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000

- 1) Scarfi MR, Prisco F, Lioi MB, Bersani F, Franceschetti G, Zeni O, Di Pietro R, Della Noce M, Franceschi C, Iafusco D, Motta M, Stoppoloni G. Cytogenetic effects induced by extremely low frequency pulsed magnetic field in lymphocytes from Turner's syndrome subjects. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 43: 221-226, 1997.
- 2) Castellani GC, Giberti C, Franceschi C, Bersani F. Stable state analysis of an immune network model. *Int. Journ. Of Bifurcation and Chaos*, 8(6), 1285-1301, 1998
- 3) Scarfi MR, Lioi MB, Zeni O, Della Noce M., Franceschi C. and Bersani F. Micronucleus frequency and cell proliferation in human lymphocytes exposed to 50 Hz sinusoidal magnetic fields. *Health Physics*, 76 (3): 244-250, 1999.
- 4) Ventura C, Maioli M, Pintus G, Gottardi G, and Bersani F. ELF-pulsed magnetic fields modulate opioid peptide gene expression in myocardial cells. *Cardiovascular Res.*, 45: 1054-1064, 2000
- 5) Bersani F ed., "Electricity and Magnetism in Biology and Medicine" Kluwer Academic/Plenum Publisher 1999 NY

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

- 1) Svolgere un programma di ricerca nazionale e un progetto europeo sull'interazione tra campi elettromagnetici e biosistemi, con particolare riguardo ai segnali della telefonia mobile.
- 2) Continuare nella ricerca sulle reti neurali biologiche e le loro possibili applicazioni.

Collaborazioni internazionali in atto

Partners europei del progetto Reflex

Brown University - Lab. For Neural Systems diretto da L.N. Cooper.

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Sistemi di misura e di generazione per campi elettromagnetici.

Computer e workstations per elaborazione dati

Parole Chiave

Campi elettromagnetici - effetti biologici - Reti neurali - modelli neurali.

UNITA' DI RICERCA INBB
Firenze

Responsabile Scientifico
Prof. Ivano Bertini

Linea di Ricerca

Caratterizzazione strutturale di metalloproteine

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Bertini Ivano	PO	bertini@cerm.unifi.it
Banci Lucia	PO	banci@cerm.unifi.it
Viezzoli Maria Silvia	RU	viezzoli@cerm.unifi.it

Non Aderenti INBB

Piccioli Mario	RU	piccioli@cerm.unifi.it
Turano Paola	RU	
Rosato Antonio	RU	
Cramaro Fiorenza	DR	
Poggi Luisa	DR	
Arnesano Fabio	DR	
Bartalesi Ilaria	DR	
Felli Isabella	BC	
Del Conte Rebecca	BC	
Ciofi Simone	BC	
Hajieva Parvana	DR	
Allegrozzi Marco	DR	
Molteni Elena	DR	
Provenzani Alessandro	DR	
Barbieri Renato	BC	
Thompsett Andrew	BC	
Pierattelli Roberta	A	

Sede Unità di Ricerca

Centro Risonanze Magnetiche - Università degli Studi di Firenze, Via Sacconi 6 -50019 – Sesto Fiorentino
indirizzo

055-4209272	055-4209271	bertini@cerm.unifi.it
<i>telefono</i>	<i>fax</i>	<i>e-mail</i>

Sezione INBB di appartenenza

Bologna

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Il primo step per la comprensione delle proprietà funzionali delle proteine e' rappresentato dalla determinazione della sua struttura. L'Unita' operativa ha focalizzato la sua attenzione su alcune metalloproteine, in particolare quelle contenenti ioni metallici paramagnetici e si e' posto l'obiettivo di caratterizzarne la struttura, di "monitorare" i cambiamenti conformazionali tra stati diversi (per es. tra proteina ossidata e proteina ridotta) e di studiare la mobilità interna del sistema. Sistemi che sono stati oggetto di indagine in questi anni: superossido dismutasi, calmodulina, citocromo c, citocromo b5, citocromo b562, ferredossine

Risultati ottenuti

Durante gli ultimi tre anni sono state ottenute le strutture in soluzione, via NMR, delle seguenti proteine e di alcuni loro mutanti

Citocromo b5 (da topo e da coniglio), Ferredossina F7S8 da Bacillus schlegelii, Citocromo c6, Mutante monomero della superossido dismutasi umana (M2E133Q), Citocromo c da lievito (forma ridotta), Citocromo b562 Mutante R98C del citocromo b662.

Inoltre si sono ottenuti interessanti risultati sulle proprietà dinamiche di alcune di queste proteine. Infatti equilibri conformazionali o processi di scambio, che avvengono sulla scala dei ms- μ s possono essere studiati attraverso misure di tempi di rilassamento (T1 ρ) di un etero-nucleo (es. 15N)Attraverso l'analisi di questi dati sono stati determinati i tempi di correlazione di questi fenomeni di scambio. Nel caso del citocromo b5, per esempio, e' risultato evidente che la forma ossidata e' piu' mobile della forma ridotta, per quanto riguarda movimenti relativi a questa scala di tempi.

Moti piu' veloci possono essere stati studiati misurando i tempi di rilassamento longitudinali e trasversali del 15N e i NOE 15N-1H degli NH ammidici del "backbone". Con questo approccio sono stati confrontate le forme ossidate e

ridotte di vari citocromi e si è potuto osservare che in tutti i casi finora esaminati, la forma ossidata è più flessibile di quella ridotta. Ciò significa che nonostante le due forme siano strutturalmente molto simili, le proprietà dinamiche risultano molto diverse.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000

1. Arnesano, F., L. Banci, I. Bertini, I.C. Felli. The solution structure of oxidized rat microsomal cytochrome b5. *Biochemistry* 37: 173-184, 1998.
2. Aono, S., D. Bentrop, I. Bertini, A. Donaire, C. Luchinat, Y. Niikura, A. Rosato. Solution structure of the oxidized Fe7S8 ferredoxin from the thermophilic bacterium *Bacillus schlegelii* by ¹H NMR spectroscopy. *Biochemistry* 37: 9812-9826, 1998.
3. Banci, L., M. Benedetto, I. Bertini, R. Del Conte, M. Piccioli, M.S. Viezzoli. Solution structure of reduced monomeric Q133M2 Copper, Zinc Superoxide Dismutase. Why is SOD a dimeric enzyme? *Biochemistry* 37: 11780-11791, 1998.
4. Arnesano, F., L. Banci, I. Bertini, I.C. Felli, D. Koulougliotis. Solution structure of the B form of oxidized rat microsomal cytochrome b5 and backbone dynamics via 15N rotating frame NMR relaxation measurements: Biological Implications. *Eur.J.Biochem.* 260: 347-354, 1999.
5. Banci, L., I. Bertini, J.G. Huber, G.A. Spyroulias, P. Turano. Solution structure of reduced horse heart cytochrome c. *JBIC* 4: 21-31, 1999.
6. Bentrop, D., I. Bertini, R. Iacoviello, C. Luchinat, Y. Niikura, M. Piccioli, C. Presenti, A. Rosato. Structural and dynamical properties of a partially unfolded Fe4S4 protein: the role of the cofactor in protein folding. *Biochemistry* 38: 4669-4680, 1999.
7. Arnesano, F., L. Banci, I. Bertini, J. Faraone-Mennella, A. Rosato, P.D. Barker, A.R. Fersht. The Solution structure of oxidized *Escherichia coli* cytochrome b562. *Biochemistry* 38: 8657-8670, 1999.
8. Arnesano, F., L. Banci, I. Bertini, S. Ciofi-Baffoni, P.B. Barker, Johnson C.M., de Lumley Woodyear T. Structural consequences of B - to C - type heme conversion in oxidized *Escherichia coli* cytochrome b562. *Biochemistry* 39: 1499-1514, 2000.
9. Banci, L., I. Bertini, A. Rosato, S. Scacchieri. Solution structure of oxidized microsomal rabbit cytochrome b5. Factors determining the heterogeneous binding of the heme. *Eur J Biochem* 267: 755-766, 2000.
10. Bertini, I., C.O. Fernández, B.G. Karlsson, J. Leckner, C. Luchinat, B.G. Malmström, A.M. Nersissian, R. Pierattelli, E. Shipp, J.S. Valentine, A.J. Vila. Structural information through NMR hyperfine shifts in blue copper proteins. *J.Am.Chem.Soc.* 122: 3701-3707, 2000.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

La disponibilità della sequenza del genoma di molti organismi rappresenta una grossa sfida per la caratterizzazione strutturale e funzionale dei "prodotti del gene" (RNA, proteine). L'analisi delle sequenze dei genomi permette l'identificazione di geni che codificano per migliaia di proteine, di cui molte ancora ignote. L'unità di ricerca si propone pertanto di individuare alcune di queste proteine o classi di proteine, con particolare attenzione a quelle che contengono ioni metallici e a quelle che possono essere importanti anche per un'applicazione in campo medico.

Il gruppo si propone quindi di caratterizzarle da un punto di vista strutturale con 2 tipi di approccio:

- a) sulla base del gene che codifica per una certa proteina questa può essere overespressa e isolata. La struttura in soluzione può essere determinata attraverso tecniche di risonanza magnetica nucleare. Attraverso la stessa tecnica si potranno ottenere informazioni sulle caratteristiche dinamiche della molecola e saranno anche studiate le interazioni con inibitori, oppure con altre proteine che ne rappresentano i partners fisiologici.
- b) La struttura di alcune di queste proteine potrà essere predetta attraverso un processo di calcolo che permette di modellare proteine con struttura ignota su proteine simili le cui struttura è stata risolta.
- c)

Collaborazioni internazionali in atto

A. Fersht (Cambridge, U.K.)

K.N. Timmis (Braunschweig, Germany)

M. Tien (Penn State, PA, USA)

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Spettrometro NMR 800 MHz

Spettrometro NMR 700 MHz

Spettrometro NMR 600 MHz

Spettrometro NMR 500 MHz

Spettrometro NMR 400 MHz

"Field cycling" rilassometro

Parole Chiave

Metalloproteine - Struttura - Relazione struttura-funzione - Mobilità

UNITA' DI RICERCA INBB
Catania

Responsabile Scientifico
Prof. Antonio Cambria

Linea di Ricerca

Estrazione e purificazione di enzimi per possibili applicazioni biotecnologiche

titolo

Costruzione di un biosensore amperometrico enzimatico per l'ambiente utilizzando l'enzima laccasi

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Cambria Antonio	PO	cambrian@mbox.unict.it
Cambria Maria Teresa	BC	cambrint@mbox.unict.it

Non Aderenti INBB

Ragusa Santa	Post-Doc	sragusa@dipchi.unict.it
Pontorno Valentina	DR	
Pagano Adriana	DR.	

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Scienze chimiche - Sezione di Biochimica - Università di Catania

Viale A.Doria, 6 95125 Catania

095.7384242 - 337195

cambrian@mbox.unict.it

Sezione INBB di appartenenza

Catania

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

- 1) Studi strutturali e funzionali di alcuni composti organometallici dello stagno
- 2) Azione di alcuni tiazolo derivati come inibitori della monoamminossidasi.
- 3) Struttura e funzione di superossidodismutasi vegetali e batteriche.
- 4) Interazioni molecolari in modelli di vescicole fosfolipidiche.
- 5) Meccanismo di inibizione e sito do legame di alcuni antagonisti del recettore metabotropico del glutamato.
- 6) Purificazione e caratterizzazione della laccasi fungina

Risultati ottenuti

Tutti gli obiettivi soprariportati sono stati raggiunti mediante pubblicazioni su riviste iinternazionali

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000

1. Castelli F., Cambria M.T., Mazzone P., Pignatello R. Interaction of monoamine oxidase inhibitors with dipalmitoyl phosphatidylcholine liposomes. A comparison between structure and calorimetric data. *Termochimica Acta*, 302, 143-150, 1997.
2. Lencioni S., Pellerito A., Fiore T., Giuliani A.M., Pellerito L., Cambria M.T., Mansueto C. Organometallic complexes with biological molecules X: Dialkyltin (IV) and Trialkyltin (IV) orotates: spectroscopic and *in vivo* investigations. *Appl. Organometal. Chem.*, 12, 1-11, 1998.
3. Stroppolo M.E., Sette M., O'Neill P., Polizio F., Cambria M.T., Desideri A. Cu,Zn Superoxide dismutase from *Photobacterium leiognathi* Is an hyperefficient enzyme. *Biochemistry*, 37, 12287-12292, 1998.
4. Pellerito A., Fiore T., Pellerito C., Fontana A., Di Stefano R., Pellerito L., Cambria M T., Mansueto C. Organometallic complexes with biological molecules. XI. Solid state and *in vivo* investigations of some diorganotin(IV)-chloramphenicol and cycloserine derivatives. *J. Inorg. Biochem.* 72, 115-125, 1998.
5. Cambria A., Raudino A., Geronikaki A., Buemi G., Raciti G., Mazzone P., Guccione S., Ragusa S. Thiazole derivatives as inhibitors of purified bovine liver mitochondrial monoamine oxidase-B: structure-activity relationships and theoretical study. *J. Enzyme Inhibition*. 14, 307-321, 1999.
6. Cambria, M.T., Cambria A., Ragusa S., Rizzarelli E. Production purification and properties of an extracellular laccase from *Rigidoporus lignosus* . *Protein Expression and Purification*. 18, 141-147, 2000.
7. A. Pagano, D. Ruegg, S. Litschig, N. Stoehr, C. Stierlin, M. Heinrich, P. Floersheim, L. Prezeau, F. Carroll, JP. Pin, A. Cambria, I. Vranesic, PJ Flor, F. Gasparini and R. Kuhn. The non-competitive antagonist 2-

Methyl-6-(phenylethynyl)pyridine and 7-Hydroxyiminocycloporpan [b] chromen-1a-carboxylic acid ethyl Ester interact with overlapping binding pockets in the transmembrane region of group I metabotropic glutamate receptors. J.Biol.Chem. 275, 33750-33758, 2000.

8. A. Raudino, A. Cambria, M.G. Sarpietro, C. Satriano. Binding of lipid vesicles to protein-coated solid polymer surface: a model for cell adhesion to artificial biocompatible materials. J Colloid Interface Sci. Accepted, 2000.
9. A. Raudino, M. Paci, R. Purrello, T. Campagna, MT Cambria, G. Raciti, A. Cambria. Insulin monomer-glucose interaction: spectroscopic investigations and molecular modelling studies. Protein Science, Submitted 2000

M. Falconi, MT Cambria, A. Cambria, A. Desideri.

Insulin dimer investigated by molecular dynamics simulation. Protein Engineer., Submitted, 2000

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Il programma di ricerca per i prossimi tre anni, sarà concentrato sulla purificazione e caratterizzazione di enzimi al fine di una loro possibile utilizzazione nel settore biotecnologico.

Collaborazioni internazionali in atto

- 1) Laboratorio di ricerca della Novartis Pharma, Nervous System Research, Basilea, Svizzera
- 2) Molecular simulation .SARL, Parc Club Orsay University, Orsay, France

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

- Spettrofotometri per cinetiche enzimatiche
- Ultracentrifughe refrigerate
- Sistemi cromatografici a bassa ed ad alta pressione
- Ossigrafo- Work- station per modellistica molecolare
- Calorimetro differenziale a scansione

Parole Chiave

Enzimi, cinetica, inibitori enzimatici, enzimi applicazioni biotecnologiche, biosensori.

UNITA' DI RICERCA INBB
Verona

Responsabile Scientifico
Prof. Alberto Cangiano

Linea di Ricerca

Plasticità sinaptica durante lo sviluppo, interazioni trofiche nella giunzione neuromuscolare, fisiologia della membrana cellulare.

titolo

Plasticità e competizione sinaptica attività dipendente nella giunzione neuromuscolare

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Cangiano Alberto	PO	cangia@borgoroma.univr.it
------------------	----	---------------------------

Non Aderenti INBB

Pasino Efrem	PA	pasino@borgoroma.univr.it
Buffelli Mario	RU	buffel@borgoroma.univr.it
Busetto Giuseppe	Assegnista universitario	busetto@borgoroma.univr.it
Molinari Daniele	PT	

Sede Unità di Ricerca

Università di Verona Dipartimento di Scienze Neurologiche e della Visione, Sezione di Fisiologia *Strada Le Grazie 8*, 37134 Verona

045/8027150	045/580881	cangia@borgoroma.univr.it
-------------	------------	---------------------------

Sezione INBB di appartenenza

Udine

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

L'unità ha svolto esperimenti sulla sinaptogenesi nel ratto adulto, allo scopo di comprendere il meccanismo ed i segnali che sono alla base della eliminazione delle sinapsi neuromuscolari durante il loro sviluppo. A tale scopo ha utilizzato il preparato costituito dalla formazione di nuove sinapsi nel muscolo soleo di ratto adulto da parte di un nervo estraneo, il nervo fibulare, allorché viene sezionato il nervo originale del muscolo stesso. È stata studiata elettrofisiologicamente e morfologicamente la poli-innervazione iniziale ed il successivo processo di eliminazione. La principale manovra cronica eseguita è stata la attivazione sincrona, mediante stimolazione elettrica, degli assoni fibulari durante tutto il processo di innervazione. In un'altra linea sperimentale è stata registrata l'attività elettromiografica spontanea dei muscoli di ratto fetale e neonato, allo scopo di osservare il carattere della scarica dei diversi motoneuroni innervanti uno stesso muscolo, se cioè correlato o non correlato.

Risultati ottenuti

Abbiamo osservato che l'attivazione sincrona degli assoni convergenti su ogni data fibra muscolare durante la sinaptogenesi, produce una assai marcata inibizione del processo di eliminazione sinaptica, così indicando che tale eliminazione è fisiologicamente dovuta alla scarica asincrona dei motoneuroni. L'altra linea sperimentale ha inoltre fornito dati che fortemente suggeriscono che i motoneuroni innervanti uno stesso muscolo, benché scarichino in modo non correlato, cioè asincrono, nell'adulto, hanno invece un'attività di scarica altamente correlata (sincrona) nel feto e nel neonato, così favorendo lo stabilirsi della iniziale innervazione poli-neuronale

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000

- 1) Busetto G., Buffelli M., Tognana E., Bellico F., Cangiano A., "Hebbian mechanisms revealed by electrical stimulation at developing rat neuromuscular junctions" , Journal of Neuroscience, Volume: 20 , pp.: 685-695 , (2000).
- 2) Buffelli M., Pasino E., Cangiano A., "Paralysis of innervated and reinnervated muscles equally affects contractile properties as does permanent denervation" , Journal of Muscle Research and Cell Motility, Volume: 18 , pp.: 1-13 , (1997).
- 3) Cangiano A., Buffelli M., Busetto G., Tognana E. e Pasino E. "Studies on anterograde trophic interactions based on general muscle properties". Archives Italiennes De Biologie, Volume: 157, pp.: 331-341, (1997).
- 4) Busetto G., Tognana E., Buffelli M., Pasino E. e Cangiano A. "Role of activity in ectopic synapse formation in skeletal muscle". Livre Jubilaire dedicato a G.C. Guazzi, pp.: 171-179, (1997).
- 5) Buffelli M., Busetto G., Cangiano A. "Use of dexamethasone with TTX block of nerve conduction shows that muscle membrane properties are fully controlled by evoked activity". Brain Research, Volume: 770, pp.: 242-247, (1997).

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Approfondimento dei meccanismi di competizione ed eliminazione sinaptica, particolarmente per quanto concerne la loro dipendenza dall'attività motoneuronale sincrona o asincrona.

Collaborazioni internazionali in atto

Prof. Ellis Cooper, Dept. of Physiology. McGill University, Montreal, Canada
Dr. Lorenzo Cangiano, Institute for Neurophysiology, Karolinska Institute, Stoccolma

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Due apparati elettrofisiologici completi. Microscopio a fluorescenza.

Parole Chiave

Sinapsi neuromuscolare – Neurotrofismo – Plasticità sinaptica – Competizione sinaptica - Elettromiografia

UNITA' DI RICERCA INBB
Udine

Responsabile Scientifico
Dott. Carlo Capelli

Linea di Ricerca

Fisiologia Respiratoria e Fisiologia dell'Esercizio Muscolare

titolo

Scambi gassosi alveolo – capillari: nuove prospettive metodologiche

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Capelli Carlo	RU	ccapelli@makek.dstb.uniud.it
Di Prampero Pietro Enrico	PO	pprampero@makek.dstb.uniud.it

Non Aderenti INBB

Cautero Michela	DR	mcautero@makek.dstb.uniud.it
-----------------	----	------------------------------

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche

Indirizzo

P.le Kolbe 4, 33100 Udine

+39 0432 494335

telefono

+39 0432 494335

fax

Serena.Cudicio@amm.uniud.it

e-mail

Sezione INBB di appartenenza

Udine

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni (max. 2000 caratteri)

Obiettivi

- 1) Negli ultimi tre anni l'unità si è dedicata allo sviluppo di un nuovo metodo per la determinazione degli scambi gassosi alveolo – capillari respiro per respiro partendo dall'analisi dei tracciati registrati alla bocca del soggetto di pressione parziale di ossigeno ed anidride carbonica e di flusso respiratorio
- 2) Si è continuato lo studio della bioenergetica di svariate forme di locomozione umana studiandone il costo energetico, ovvero la quantità di energia metabolica spesa per unità di distanza per muovere la massa corporea del soggetto, ed i fattori che lo determinano.

Risultati ottenuti

- 1) Il metodo sviluppato, che tiene conto delle variazioni polmonari dei gas che avvengono da un respiro al successivo, si è dimostrato più preciso dei metodi sino ad oggi utilizzati ed elimina una fonte di errore della misura. Il metodo è stato applicato allo stato stazionario e durante esercizio muscolare.
- 2) Si è sviluppato un metodo in grado di quantificare il peso dei vari fattori fisiologici che determinano le velocità record nella corsa, nuoto e ciclismo. Si è proposto un metodo per stimare il costo energetico in varie forme di locomozione alle velocità massimali e si è indagata la relazione tra alcune variabili biomeccaniche ed il costo energetico del nuoto alle velocità sovra - massimali.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000 (max 10 pubblicazioni)

2. P. Zamparo, L. Sepulcri, G. Antonutto, M. Girardis, C. Capelli e P. E. di Prampero. Effects of elastic recoil on maximal explosive power of the lower limbs. *Eur. J. Appl. Physiol.*, 75: 289 - 297, 1997.
3. C. Capelli, F. Schena, P. Zamparo, A. Dal Monte, M. Faina e P. E. di Prampero. Energetics of best performances in track cycling. *Med. Sci. Sports Exer.*, 30: 614 - 624, 1998.
4. C. Capelli, D. R. Pendergast e B. Termin. Energetics of swimming at maximal speeds. *Eur. J. Appl. Physiol.*, 78: 385 - 393, 1998.
5. G. Antonutto, C. Capelli, M. Girardis, P. Zamparo e P. E. di Prampero. Effects of microgravity on maximal power of the lower limbs during very short efforts in humans. *J. Appl. Physiol.*, 86: 85 - 92, 1999.
6. C. Capelli. Physiological determinants of best performances in human locomotion. *Eur. J. Appl. Physiol.*, 80: 298 - 307, 1999.
7. P. Zamparo, C. Capelli e G. Guerrini. Energetics of kayaking at sub-maximal and maximal speeds. *Eur. J. Appl. Physiol.*, 80: 542 - 548, 1999.
8. P.E. di Prampero e G. Ferretti. The energetics of anaerobic muscle metabolism: a reappraisal of older and recent concepts. *Respir. Physiol.* 118: 103 - 115, 1999.

9. S. Milesi, C. Capelli, M.D. Denoth, T. Hutchinson e P.E. di Prampero. Effects of 17 days bed rest on maximal voluntary isometric torque and neuromuscular activation of leg muscles. *Eur. J. Appl. Physiol*, 82: 197 – 205, 2000.
10. B. Mettauer, Q. Ming Zhao, E. Epailly, A. Charloux, E. Lampert, B. Heitz-Naeglen, F. Piquard, P.E. di Prampero e J. Lonsdorfer. VO_2 kinetics reveal a central limitation at the onset of subthreshold exercise in heart transplant recipients. *J. Appl. Physiol*. 88: 1228 – 1238, 2000.
11. C. Capelli, M. Cautero e P.E. di Prampero. New perspectives in breath – by – breath determination of alveolar transmembrane gas exchange in humans. *J. Physiol (London)* 518 P: 93 P, 1999.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Il metodo sviluppato metodo per la determinazione degli scambi gassosi alveolo – capillari respiro per respiro sarà utilizzato al fine di studiare la cinetica del consumo polmonare di ossigeno durante esercizio muscolare in soggetti sani ed in pazienti in varie condizioni sperimentali (transizioni riposo – esercizio ad onda quadra, rampa ed impulso, transizioni sovra massimali). I risultati ottenuti permetteranno di comprendere se l'integrazione dei sistemi respiratorio, cardiocircoalorio e muscolare periferico determina un comportamento lineare o non lineare della cinetica del consumo di ossigeno. Inoltre, si dovrebbe confermare che la cinetica del consumo di ossigeno è determinata prevalentemente dagli adeguamenti del metabolismo ossidativo muscolare piuttosto che dal “delivery” dell'ossigeno ad opera del sistema di trasporto convettivo cardiovascolare. Infine, la cinetica degli scambi gassosi alveolo – capillari sarà determinata anche in soggetti che soggiureranno nello spazio nel corso della missione Shuttle STS – 107 della NASA il cui lancio è previsto all'inizio del 2001. Nel corso di questi esperimenti si valuterà l'impatto della riduzione del volume ematico circolante sulla cinetica del consumo di ossigeno durante esercizio muscolare.

Collaborazioni internazionali in atto

1. Dr. Guido Ferretti, M.D., Ph.D., Département de Physiologie; C.M.U., 1 rue M. Servet, 1211 Ginevra, Svizzera;
2. Dr. D. Linnarsson, M.D., Ph.D., Section of Environmental Physiology, Dept. of Physiology and Pharmacology, Karolinska Inst. SE-171 77, Stoccolma, Svezia.
3. Dr. A. Minetti, M.D., Ph.D., Manchester Metropolitan Universit, Alsager, ST7 2H, Regno Unito.

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

- 1) Spettrometro di massa per analisi di gas respiratori Airspec 2000;
- 2) Ergodinamometro multifunzionale (MED) (prototipo);
- 3) Nastro Trasportatore Saturn;
- 4) Cicloergometro Excalibur Lode.
- 5) Unità metabolica b2 Cosmed.

Parole Chiave

Fisiologia respiratoria, Esercizio muscolare, Locomozione umana, Scambi gassosi respiratori, Fisiologia della microgravità

UNITA' DI RICERCA INBB
Sassari

Responsabile Scientifico:
Prof. Marcello A. Caria

Linea di Ricerca: effetti della somministrazione locale di l-tirosina sulla eccitabilità dei neuroni del giro dentato nel ratto

Composizione del Gruppo:

Aderenti INBB

Caria Marcello A.	PA	mcaria@ssmain.uniss.it
Melis Francesco	RU	melis@ssmain.uniss.it
Becciu Mameli C. Ombretta	PO	fisiou@ssmain.uniss.it

Non Aderenti INBB

Sanna Giancarlo	PT	fisiou@ssmain.uniss.it
Monti Andrea	PT	fisiou@ssmain.uniss.it
Tavera Candido F.	PT	fisiou@ssmain.uniss.it

Sede Unità di Ricerca:

Università degli Studi di Sassari, Facoltà di Medicina e Chirurgia; Dipartimento di Scienze Biomediche, Sezione di Fisiologia Umana; Viale San Pietro 43/B, 07100 Sassari; tel: 079.228290, fax: 079.228298
e-mail: fisiou@ssmain.uniss.it

Sezione INBB di Appartenenza:

Catania

Riassunto della attività svolta negli ultimi tre anni

La attività scientifica svolta presso la Sezione di Fisiologia Umana ha riguardato i seguenti temi di ricerca:

- a) complicanze aritmiche in corso di epilessia sperimentale;
- b) controllo plurisensoriale della attività neuronale del dodicesimo nucleo;
- c) influenza della somministrazione degli ormoni tiroidei sulla eccitabilità dei neuroni ippocampali;
- d) influenza dei metalli pesanti sulla attività delle aree cerebrali e del tronco dell'encefalo;
- e) biodisponibilità del Propofol nelle diverse frazioni ematiche e nel tessuto cerebrale.

Complicanze aritmiche in corso di epilessia sperimentale: i risultati ottenuti hanno messo in evidenza che l'induzione di focolai epilettici a livello dell'ipotalamo e del tronco dell'encefalo, sperimentalmente indotti mediante applicazione topica di Penicillina-G, sono capaci di "triggerare" risposte cardiache caratterizzate da bradiaritmie di diversa gravità. E' stato ipotizzato che il fenomeno della morte improvvisa, talvolta osservato nei pazienti epilettici, possa essere ricondotto ad un quadro aritmico particolarmente severo, verosimilmente sostenuto da complicazioni del quadro metabolico e della funzione respiratoria, che nel 20% delle osservazioni effettuate accompagnano le manifestazioni epilettiche.

Controllo plurisensoriale della attività neuronale del dodicesimo nucleo: è stato evidenziato che i neuroni ipoglossali soggiacciono ad un complesso sistema di controllo, atto ad assicurare il corretto atteggiamento posturale della lingua nella cavità orale, in risposta ad informazioni che provengono dalle retine, dai nervi periferici e dai recettori labirintici. Recentemente è stata ipotizzata una associazione vista-olfatto, capace di modulare la attività dei neuroni ipoglossali in preparazione dei muscoli linguiali alla ricezione del cibo durante la fase orale della digestione.

Influenza della somministrazione degli ormoni tiroidei sulla eccitabilità dei neuroni ippocampali: i risultati ottenuti hanno messo in evidenza che in ratti adulti, resi artificialmente ipotiroidei mediante somministrazione di propiltiouracile, la somministrazione mediante microiniezione locale di T4 induce una significativa modificazione della attività elettrica dei neuroni del giro dentato dell'ippocampo. I dati disponibili suggeriscono un possibile ruolo di neuromodulazione da parte degli ormoni tiroidei, che acquista particolare rilievo in considerazione della funzione svolta dall'ippocampo nei fenomeni cognitivi dell'apprendimento e della memoria, come è noto gravemente deficitarci in corso di disfunzioni tiroidee. Questo approccio sperimentale fornisce inoltre un ulteriore supporto alla comprensione degli effetti che gli ormoni tiroidei esercitano, non solo a livello dell'ippocampo, ma, più in generale, sulle strutture del sistema nervoso centrale.

Influenza dei metalli pesanti sulla attività delle aree cerebrali e del tronco dell'encefalo: i risultati ottenuti hanno dimostrato che la somministrazione di acetato di piombo è capace di indurre sicuri effetti neurotossici a livello del sistema nervoso centrale, come testimoniano le alterazioni del riflesso vestibolo-oculare (VOR), riscontrate anche a bassissime concentrazioni della sostanza a livello sia plasmatico che cerebrale. Queste osservazioni, che hanno consentito di individuare il tronco dell'encefalo come un possibile "target" dell'azione del piombo, rendono meno probabile una possibile influenza del metallo sulle aree del lobo frontale corticale, soprattutto in considerazione della assenza di disturbi di tipo comportamentale durante il trattamento con la sostanza intossicante. Gli esperimenti

effettuati consentono di suggerire che l'esplorazione del VOR potrebbe rappresentare un test efficace per la valutazione funzionale del sistema nervoso centrale esposto a bassi livelli di piombo ematico e tessutale.

Biodisponibilità del Propofol nelle diverse frazioni ematiche e nel tessuto cerebrale: lo scopo di questa ricerca è stato quello di studiare, mediante esperimenti acuti eseguiti su conigli, la biodisponibilità del Propofol in tutte le frazioni ematiche, nel liquido cerebro-spinale (CSF) e nel tessuto cerebrale durante i diversi livelli di anestesia indotta dalla somministrazione del farmaco per via endovenosa. Lo studio è stato intrapreso al fine di verificare l'esistenza di una correlazione tra la biodisponibilità del Propofol nei diversi compartimenti fluidi dell'organismo e nel tessuto cerebrale e l'effetto anestetico del farmaco. I risultati ottenuti hanno dimostrato una disomogenea distribuzione del farmaco nei diversi compartimenti, con massime concentrazioni all'interno dei globuli rossi e nel tessuto cerebrale e minime nel plasma e nel CSF. Queste osservazioni hanno fornito un valido contributo alla comprensione delle caratteristiche farmacologiche evidenziate dal farmaco nelle fasi di induzione e di mantenimento dell'anestesia.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000

1. De Riu P.L., Petrucci V., Caria M.A., Mameli O., Casu A.R., Nuvoli S., Spanu A., Madeddu G. - β -endorphin and cortisol levels in plasma and CSF following acute experimental spinal traumas. - *Physiol. Behav.*, 62, 1-5, 1997.
2. Caria M.A., Melis F., Corda S., Solinas A. - Long lasting changes in Deiter's neurons electrical activity. XXXIII[^] IUPS Congress, com P083.04, S. Petersburg 1997.
3. Caria M.A., Kaneko T., Kimura A., Asanuma H. - Functional organization of the projection from area " to area 4 γ . - *J. Neurophysiol.*, 77, 3107-3114, 1997.
4. Lai L., Milia M., Severino C., Solinas A., Pavlides C., Caria M.A. - Effects of thyroid hormone on hippocampal neuronal excitability. - *Suppl. n.10 to Eur. J. Neuroscience (Forum of European Neuroscience)*, com 19.27, Berlin 1998.
5. Marcello C., Crisafulli A., Melis F., Orrù V., Lener R., Caria M.A., Peretti A., Lai C., Concu A. - Pre-game hyperglycemic meal may increase power output during a game in volleyball players. - XXX Riunione Generale SINU, com P21, Milano 1998.
6. Mameli O., Melis F., Caria M.A., Solinas A., Mameli S., De Riu P.L. - Epileptic discharge of cortical, subcortical and spinal neurons in penicillin induced experimental epilepsy - *Arch. Ital. Biol.*, 137, 29-46, 1999.
7. Russo A., Monaco S., Stanzani S., Palmieri G., Acone F., Melis F., Caria M.A., Mameli O. - Preliminary observations on olfactory-hypoglossal pathway in rat. - *Atti del 2[^] Congresso Nazionale della Società Italiana dei Morfoloги Veterinari*, com 17, Parma 1999.
8. Melis F., Caria M.A., Mameli S., Mameli P., Massarelli G., Pintus A., Lai L., Milia M., Solinas A., Severino C., Mameli O. - Autonomic disfunction as a possible complication in sudden epileptic death. - *Physiol. Res.*, vol 48 (suppl. 1), S95, 1999.
9. Caria M.A., Melis F., Stanzani S., Russo A., Cataudella T., Palmieri G., Lai L., Milia M., Solinas A., Severino C., Mameli O. - Electrophysiological and neuroanatomical findings in olfactory-hypoglossal connections. - *Physiol. Res.*, vol 48 (suppl 1), S60, 1999.
10. De Riu P.L., De Riu G., Testa C., Mulas M., Caria M.A., Mameli S., Mameli O. - Disposition of propofol between red blood cells, plasma, brain, and cerebrospinal fluid in rabbits. - *Eur. J. Anaesthesiol.*, 17, 18-22, 2000.

Prospettive ed obiettivi degli ultimi tre anni

I temi di ricerca saranno ulteriormente sviluppati nei prossimi tre anni:

In particolare, per quanto attiene il fenomeno della morte improvvisa, osservato in taluni pazienti affetti da epilessia, saranno indagati ulteriori aspetti della funzionalità cardio-respiratoria e, più in generale, dell'equilibrio omeostatico dell'organismo, che potrebbero risultare profondamente alterati durante l'evoluzione clinica delle manifestazioni epilettiche, fino ad essere causa di morte nelle situazioni più drammatiche.

Relativamente al controllo plurisensoriale della attività dei neuroni ipoglossali, saranno eseguiti ulteriori esperimenti, di carattere sia neuroanatomico che neurofisiologico, con lo scopo di identificare le stazioni nucleari impegnate nella via di trasmissione olfattivo-ipoglossale; inoltre, al fine di precisare con chiarezza l'entità e la natura delle afferenze al dodicesimo nucleo, saranno contemporaneamente studiate le proiezioni provenienti dalle aree corticali motorie e dalla corteccia cerebellare, le quali sicuramente concorrono al complesso e delicato controllo della motilità linguale.

Particolarmente suggestiva appare l'ipotesi di una funzione di neuromodulazione esercitata dagli ormoni tiroidei a livello dei neuroni ipocampali, soprattutto in prospettiva di una possibile futura applicazione di questo risultato ad altre strutture del sistema nervoso centrale.

Sono inoltre in corso di svolgimento alcuni interessanti esperimenti sulla azione dell'etanolo sulla attività elettrica delle cellule di Purkinje cerebellari, che potrebbero rivelare, da un punto di vista neurofisiologico, i meccanismi che presiedono alla comparsa dei disturbi motori osservati in corso di intossicazione acuta o cronica da assunzione di sostanze alcoliche; non è trascurabile il ruolo che questo studio potrebbe svolgere nel guidare i protocolli di terapia attualmente utilizzati per contrastare l'atassia da abuso di sostanze alcoliche.

Collaborazioni internazionali in atto:

Istituto di Fisiologia Umana, Univ. Cattolica del Sacro Cuore, Roma
Dipartimento di Scienze Fisiologiche, Univ. degli Studi di Catania, Catania
Lab. Motor Physiology, The Rockefeller University, New York, USA

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca:

La attività di ricerca viene condotta in due moderne e funzionali unità di neurofisiologia, ciascuna delle quali principalmente equipaggiata dalla seguente attrezzatura:

- sistema di registrazione dalle unità neuronali (microelettrodi, microdrive ad avanzamento elettronico, preamplificatori, oscilloscopi);
- sistema di stimolazione delle strutture nervose (microelettrodi, stimolatori, isolatori di stimolo);
- sistema informatico dotato di apposito software per l'acquisizione e l'elaborazione dei segnali nervosi;
- set-up per istologia (dispositivo per la lesione elettrolitica del tessuto nervoso, macchina per la produzione del ghiaccio secco, criostato, microscopi da tavolo, materiale per istologia: coloranti, vetreria, ecc.);
- un tavolino vestibolare;
- set-up completo di registrazione da fette isolate;

Parole Chiave

Ippocampo, giro dentato, tirosina, neuromodulazione, ratto

UNITA' DI RICERCA INBB
Bologna

Responsabile Scientifico
Prof.ssa Rita Casadio

Linea di Ricerca

Biocomputing I

titolo

“IN SILICO” *Analisi di Sequenze e Predizione della Struttura Proteica*

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Compiani Mario

RU

Compiani@camserv.unicam.it

Fariselli Piero

A

Piero@biocomp.unibo.it.

Non Aderenti INBB

Martelli Pier Luigi

DR

Gigi@lipid.biocomp.unibo.it

Jacoboni Irene

DR

Irene@lipid.biocomp.unibo.it

Rossi Ivan

A

Ivan@lipid.biocomp.unibo.it

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Biologia Evoluzionistica e Sperimentale/CIRB (Centro Interdipartimentale per le Ricerche Biotecnologiche). Università di Bologna.

Via Irnerio 42, 40126 Bologna Italy

indirizzo

0512091284/0512094005

051242576

Casadio@kaiser.alma.unibo.it

telefono

fax

e-mail

Sezione INBB di appartenenza

Bologna

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Gli obiettivi principali della attività di ricerca nel settore del Biocomputing sono lo sviluppo e la implementazione di tools adatti alla analisi di sequenze di acidi nucleici e proteine. Dato l'enorme impulso che ha avuto il sequenziamento di genomi, compreso quello umano, l'analisi al calcolatore di biosequenze costituisce uno step obbligatorio in vari tipi di ricerche a carattere biologico e biomedico.

Risultati

I risultati più significativi conseguiti dal gruppo sono di seguito schematizzati:

- Analisi di sequenze di proteine ed acidi nucleici mediante metodi di machine learning, in particolare reti neurali e hidden Markov models ed implementazioni di predittori per la predizione di proteine globulari e di membrana.
- Caratterizzazione del folding di proteine mediante modelli teorici e ricerca di potenziali di interazione tra residui in banche dati di proteine cristallizzate
- Predizione della struttura terziaria di proteine mediante metodi basati sulla ricerca di identità tra sequenze proteiche
- Predizione della struttura terziaria di proteine mediante metodi “ab initio” e mediante la predizione delle mappe di contatto

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000

- 1) Compiani M, Fariselli P, Casadio R - Noise and randomlike behavior of perceptrons: theory and application to protein structure prediction- Phys Rev E 55, 7334-7343 (1997)
- 2) Vivarelli, F, Fariselli P and Casadio R - The prediction of protein secondary structure with a cascade correlation learning architecture of neural networks- Neural Comput Applic 6, 57-62 (1997)
- 3) Compiani M, Fariselli P, Martelli P, Casadio R - An entropy criterion to detect minimally frustrated intermediates in native proteins - Proc Natl Acad Sci 95, 9290-9294 (1998)
- 4) Arrigo P, Fariselli P, Casadio R - Can functional regions of proteins be predicted from their coding sequences? The case study of G-protein coupled receptors - GENE GC-221:65-110 (1998)
- 5) Compiani M, Fariselli P, Martelli P, Casadio R - Neural networks to study invariant features of protein folding- Theor Chem Acc 101:21-26 (1999)
- 6) Casadio R, Compiani M, Fariselli P, Martelli PL (1999) - A data base of minimally frustrated alpha helical segments extracted from proteins according to an entropy criterion- isbm 99 (Lengauer et al, eds) Vol 7, pp68-76, AAAI Press, California
- 7) Fariselli P, Casadio R - A neural network based predictor of residue contacts in proteins - Prot Engng 12:15-21 (1999)
- 8) Fariselli P, Riccobelli P, Casadio R - Role of evolutionary information in predicting the disulfide-bonding state of cysteine in proteins - Proteins 36:340-346 (1999)
- 9) Jacoboni I, Martelli PL, Fariselli P, Compiani M, Casadio R - Predictions of protein segments with the same amino acid sequence: a benchmark for predictive methods. Proteins (In press)(2000)
- 10) Fariselli P, Casadio R (2000) - Prediction of the Number of Residue Contacts in Proteins- ismb 2000 (Bourne et al, eds) Vol 8, pp 146-151, AAAI Press, California

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

- Sviluppo ulteriore di tools per la predizione ab initio di proteine
- Sviluppo di predittori per la predizione di proteine di membrana
- Integrazione dei risultati ottenuti con informazioni sperimentali per la generazione di data base proteomici

Collaborazioni internazionali in atto

Pierre Baldi

Department of Information and Computer Science
Office 424C, University of California, Irvine
Irvine, CA 92697-3425
(949) 824-5809; (949) 824-4056 FAX; e-mail: pfbaldi@ics.uci.edu

Anders Krogh

Center for Biological Sequence Analysis (CBS)
University of Denmark, 208-2800 Lyngby, DENMARK
e-mail: krogh@cbs.dtu.dk

Alfonso Valencia

Protein Design Group.
Centro Nacional de Biotecnologia (C.N.B. - C.S.I.C.)
Campus Universidad Autonoma. Cantoblanco. 28049 Madrid.
Tlf: +34-91-5854570. Fax: +34-91-5854506. e-mail: valencia@cnb.uam.es

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

- 4 Digital ALPHAstation 333MHz
- 1 PC Pentium II 350 MHZ biprocessore (Linux) HD da 9GB e 256 MB RAM
- 1 PC Pentium III 450 MHZ biprocessore (Linux) HD da 9GB e 384 MB
- Cluster Linux-BeoWulf composto da
 - 1 Frontand Celeron 400 MHz
 - 4 Pentium III biprocessore 500 MHz con HD da 9GB e 256 MB di RAM,
 - 2 Pentium III biprocessore 600 MHz con HD da 9GB e 512 MB di RAM

Parole Chiave

Biocomputing, Pattern recognition, Protein folding, Protein structure prediction, ab initio prediction

UNITA' DI RICERCA INBB
Bologna

Responsabile Scientifico
Prof.ssa Rita Casadio

Linea di Ricerca

Biocomputing II

titolo

“IN SILICO” Protein Modelling e Biofisica Molecolare

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Compiani Mario	RU	Compiani@camserv.unicam.it
Fariselli Piero	A	Piero@biocomp.unibo.it.

Non Aderenti INBB

Martelli Pier Luigi	DR	Gigi@lipid.biocomp.unibo.it
Jacoboni Irene	DR	Irene@lipid.biocomp.unibo.it
Rossi Ivan	A	Ivan@lipid.biocomp.unibo.it.

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Biologia Evoluzionistica e Sperimentale/CIRB (Centro Interdipartimentale per le Ricerche Biotecnologiche). Università di Bologna, Via Irnerio 42, 40126 Bologna Italy

indirizzo

0512091284/0512094005	051242576	Casadio@kaiser.alma.unibo.it
<i>telefono</i>	<i>fax</i>	<i>e-mail</i>

Sezione INBB di appartenenza

Bologna

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

La validazione sperimentale delle metodiche computazionali e' essenziale per conferire generalità alle stesse ed interpretare a livello molecolare in modo consistente risultati sperimentali. E' necessario quindi modellizzare proteine non ancora risolte a livello atomico, la loro interazione con vari tipi di ligandi, e sviluppari metodi in grado di simulare la reattività enzimatica.

Risultati

- Modelling della struttura tridimensionale di proteine
- Utilizzo della dinamica molecolare nel settore del protein modelling
- Studio del riconoscimento molecolare per la simulazione della interazione tra proteine in complessi proteici e l'interazione tra peptidi e proteine
- Disegno di peptidi a struttura predeterminata
- Parallelizzazione di codici sviluppati su architetture multi-processore per aumentare l'efficienza di esecuzione della dinamica molecolare
- Utilizzo di metodi computazionali quantomeccanici per la simulazione della reattività enzimatica

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000

- 1) Mariani P, Casadio R, Carsughi F, Ceretti M, Rustichelli F- Structural analysis of membranes from photosynthetic bacteria by SANS- Europhys Lett 37, 433-438 (1997)
- 2) Polverini E, Casadio R, Neyroz P, Masotti L - Conformational changes of Neuromedin B and Delta sleep inducing peptide induced by their interaction with lipid membranes as revealed by spectroscopic techniques and molecular dynamics simulation- Arch Biochem Biophys 349, 225-235 (1998)
- 3) Di Bernardo S, Fato R, Casadio R, Fariselli P, Lenaz G -A high diffusion coefficient for coenzyme Q10 might be related to a folded structure- FEBS Lett (1998) 426, 77-80.
- 4) Fariselli P, Casadio R - Quantum molecular biophysics: the case study of hemocyanin- in Biophysics of Electron Transfer and Molecular Bioelectronics (Nicolini C, ed) E.L.B.A. Forum Series Vol.3, pp 139-159, Plenum Pub Co, New York (1998)
- 5) Fariselli P, Bottoni, A, Bernardi F, Casadio R - Quantum mechanical analysis of oxygenated and deoxygenated states of hemocyanin: theoretical clues for a plausible allosteric model of oxygen binding- Protein Science 8:1546-1550 (1999)

- 6) Casadio R, Polverini E, Mariani P, Spinozzi F, Carsughi F, Fontana A, Polverino de Laureto P, Matteucci G, Bergamini C - The structural basis for the regulation of tissue transglutaminase by calcium ions- Eur J Biochem 262:672-679(1999)
- 7) Mariani P, Carsughi F, Spinozzi F, Romanzetti S, Meier G, Casadio R, Bergamini CM - Ligand-induced conformational changes in tissue transglutaminase: Monte Carlo analysis of small-angle scattering data. Biophys J 78:3240-51 (2000)
- 8) Sirangelo I, Tavassi S, Martelli PL, Casadio R, Irace - The effect of tryptophanyl substitution on folding and structure of myoglobin. Eur J Biochem 267:3937-3945 (2000)
- 9) Casadio R., Compiani M., Fariselli P., Jacoboni I. and Martelli P.L. *Neural Networks predict protein folding and structure: artificial intelligence faces biomolecular complexity*. SAR and QSAR in environmental research 11:149-182 (2000)
- 10) Bismuto E, Martelli PL, Casadio R, Irace G - Tryptophanyl fluorescence lifetime distribution of hyperthermophilic -glycosidase from molecular dynamics simulation: a comparison with the experimental data.. Protein Science (In press) (2000)

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

- Integrazione di dati teorici e sperimentali nell'ambito dello studio del rapporto struttura funzione in proteine e loro complessi, incluso il DNA.
- Applicazione del calcolo quantomeccanico allo studio della reattività enzimatica
- Applicazioni in ambito biotecnologico delle indagini computazionali

Collaborazioni internazionali in atto

- 1) Anders Krogh, Center for Biological Sequence Analysis (CBS), University of Denmark, 208-2800 Lyngby, DENMARK, e-mail:krogh@cbs.dtu.dk
- 2) David Jones, Department of Biological Sciences, Brunel University, Uxbridge, Middlesex UB8 3PH, United Kingdom. Tel: 01895 274000 ext. 3984 (Secretary) ext. 3942 (Direct) FAX: 01895 274348 e-mail:David.Jones@brunel.ac.uk
- 3) Alfonso Valencia, Protein Design Group, Centro Nacional de Biotecnologia (C.N.B. - C.S.I.C.) Campus Universidad Autonoma. Cantoblanco. 28049 Madrid.
Tlf: +34-91-5854570. Fax: +34-91-5854506.e-mail: valencia@cnb.uam.es

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

- 4 Digital ALPHAstation 333MHz
- 1 PC Pentium II 350 MHZ biprocessore (Linux) HD da 9GB e 256 MB RAM
- 1 PC Pentium III 450 MHZ biprocessore (Linux) HD da 9GB e 384 MB
- Cluster Linux-BeoWulf composto da
 - 1 Frontand Celeron 400 MHz
 - 4 Pentium III biprocessore 500 MHz con HD da 9GB e 256 MB di RAM,
 - 2 Pentium III biprocessore 600 MHz con HD da 9GB e 512 MB di RAM

Parole Chiave

Biocomputing, Protein modelling, Protein structure prediction, Protein-ligand interaction, Quantum mechanics computation

UNITA' DI RICERCA INBB
Napoli

Responsabile Scientifico
Prof. Cascino Antonino

Linea di Ricerca

DNA come farmaco

titolo

Oligonucleotidi antisenso: controllo dell'ipertensione arteriosa e della restenosi vascolare nel ratto.

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Cascino Antonino	PO	antonino.cascino@unina2.it
Cipollaro Marilena	PA	marilena.cipollaro@unina2.it

Non Aderenti INBB

Rossi Francesco	PO	francesco.rossi@unina2.it
-----------------	----	---------------------------

Berrino Liberato	PA	
Filippelli Amelia	PA	
Forte Amalia	DR	amalia.forte@unina2.it
Lampa Enrico	PO	enrico.lampa@unina2.it
De Masi Luigi	DR	luigi.demasi@unina2.it
Galano Giovanni	BC	giovanni.galano@unina2.it
Galderisi Umberto	BC	umberto.galderisi@unina2.it
Di Bernardo Giovanni	BC	gianni.dibernardo@unina2.it
Piegari Elena	DR	elena.piegari@unina2.it
Esposito Ferdinando	BC	
Attilio Renzulli	A	
Maurizio Cotrufo	PO	

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Medicina Sperimentale

Indirizzo:

Via Costantinopoli 16 CAP. 80138 Napoli

++39 081 5665879

telefono

++39 081 5665879/8

Fax

antonino.cascino@unina2.it

e-mail

Sezione INBB di appartenenza:

Napoli

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

La scoperta della regolazione dell'espressione genica in procarioti ed eucarioti mediata da RNA antisenso, ed il conseguente sviluppo della tecnologia degli oligonucleotidi antisenso (ODN), permettono, in linea di principio, di poter regolare l'espressione di qualsiasi funzione genica, a condizione che se ne conosca la sequenza nucleotidica. Questa metodologia se da un lato rappresenta un potente mezzo per l'identificazione funzionale dei geni, dall'altro apre prospettive farmacologiche completamente nuove: poter modulare in maniera specifica l'espressione di un singolo gene, rappresenta infatti un mezzo potentissimo per intervenire nei confronti di quelle patologie di cui sono state scoperte le basi molecolari ed il cui numero tende costantemente ad aumentare.

E' possibile tra l'altro anche arrivare a modulare l'espressione di geni che si esprimono fisiologicamente, ma che risultano coinvolti in patologie multi-fattoriali dove anche piccole differenze nel livello dell'espressione genica possono essere determinanti per generare patologie anche gravi.

Dal momento che la tecnologia degli ODN antisenso rende teoricamente possibile la regolazione dell'espressione di qualsiasi gene di sequenza nota, è conseguente l'interesse dell'applicazione nei confronti dei geni i cui prodotti risultino coinvolti nel controllo della pressione arteriosa e nel meccanismo di 'remodeling' di vasi sottoposti ad insulto chirurgico. L'alterazione del loro livello di espressione può portare a gravi patologie del sistema cardiovascolare quali ipertensione e restenosi.

Le principali applicazioni della tecnologia antisenso da un punto di vista farmacologico sono state sino ad oggi dirette essenzialmente nei confronti di geni virali, quindi geni esogeni, con lo scopo ultimo di cercare di debellare

completamente l'infezione da microorganismi, ciò richiedeva l'uso di grandi quantità di molecole trattandosi per lo più di malattie sistemiche.

L'utilizzazione degli ODN diretti contro geni endogeni, allo scopo di modularne l'espressione in distretti o localizzazioni predeterminate, richiedendo una somministrazione topica e non più sistemica e quindi quantità molto più limitate di molecole, rappresenta oggi un campo di grande interesse..

Risultati ottenuti

IPERTENSIONE: effetto di ODN antisense nel controllo dell'ipertensione del ratto.

Il sistema utilizzato è costituito da ratti SHR (Spontaneously Hypertensive Rats), nei quali gli ODN sono stati somministrati *in vivo* intracerebralmente mediante l'applicazione stereotassica di una cannula nel ventricolo laterale destro, utilizzando ODN parzialmente fosforotioati per renderli resistenti alle nucleasi, in quanto contenenti legami chimici modificati, e aumentandone la specificità rispetto a molecole completamente fosforotiate.

E' stata dimostrata una significativa riduzione della pressione arteriosa nei ratti SHR utilizzando ODN diretti contro l'mRNA del recettore AT₁ dell'angiotensina II. Solo i ratti trattati con antisense hanno presentato una riduzione della pressione arteriosa media (MAP) di 43 mmHg±10 e 30 mmHg±13, misurata rispettivamente dopo 24 e 48 ore dalla somministrazione. Tale riduzione avviene concomitantemente alla riduzione dell'mRNA del recettore AT₁, di cui si osserva una diminuzione del 40% misurata mediante RT-PCR semiquantitativa.

In ratti normotesi WKY, mentre non si osserva nessuna variazione significativa della MAP, l'espressione del recettore AT₁ risulta sempre ridotta del 40% dopo il trattamento con l'antisense. Quindi gli oligo anti-AT₁ hanno effetto antiipertensivo e non ipotensivo, pur riducendo sempre il livello endogeno di mRNA di AT₁.

Questi risultati possono essere interpretati considerando che mentre i ratti SHR hanno un'aumentata attività del sistema renina-angiotensina centrale che causa un incremento dell' "outflow" simpatico, nei ratti WKY l'outflow non è condizionato dal sistema renina-angiotensina: quindi sebbene il trattamento con l'antisense riduca i livelli di mRNA di AT₁ questa riduzione non provoca una modifica dell'outflow simpatico e non si osserva nessun cambiamento della MAP.

STENOSI E RIMODELLAMENTO VASCOLARE: prevenzione della stenosi arteriosa indotta dopo insulto chirurgico tramite ODN antisense

La seconda applicazione farmacologica degli ODN antisense riguarda la stenosi arteriosa, indotta in alta percentuale come conseguenza degli interventi di chirurgia vascolare. La stenosi consiste nel restringimento del lume di un'arteria che si verifica nelle prime settimane del decorso post-operatorio, come accade ad esempio nel 20-40% dei pazienti sottoposti a by-pass aorto-coronari e/o ad angioplastica percutanea transluminale.

Il modello sperimentale da noi messo a punto è costituito da un insulto chirurgico alla carotide comune nel ratto. Questa procedura si differenzia dagli altri modelli descritti in letteratura in cui l'insulto, limitato al solo endotelio, è ottenuto tramite angioplastica.

Il gene bersaglio degli ODN antisense da noi finora utilizzati nella prevenzione della stenosi è l'mRNA messaggero del gene c-myc, un oncogene coinvolto nel passaggio dalla fase G₁ alla fase S del ciclo cellulare, che svolge un ruolo chiave nella proliferazione cellulare.

Gli ODN utilizzati si sono rivelati efficaci nella riduzione della stenosi indotta su carotide di ratto.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000

4. M. Cipollaro, U. Galderisi, G. Galano, G. Iacomino, G. Di Bernardo, G. Lus, R. Cotrufo, A. Orsini, L. Santoro, L. Pastore, C. Sarrantonio, F. Salvatore and A. Cascino: "CTG repeat number in the non affected allele of DM patients is not critical for disease expression", *Human Biology*, (1997), 69, 887-890.
5. M.A.B. Melone, U. Galderisi, G. Iacomino, M. Cipollaro, G. Di Bernardo, R. Cotrufo, G. Peluso and A. Cascino: "Use of antisense oligonucleotides to study the myotonin gene expression in mouse", *Antisense & Nucleic Acid Drug Development* (1998), 8,(1), 25-33.
6. U. Galderisi, M. Cipollaro, G. Di Bernardo, L. De Masi, G. Iacomino, G. Galano and A. Cascino: "Molecular Typing of Italian Sweet Chestnut Cultivars by Random Amplified Polymorphic DNA Analysis", *J. of Horticultural Science & Biotechnology*, (1998), 73 (2), 259-263.
7. Umberto Galderisi, Giovanni Di Bernardo, Marilena Cipollaro, Gianfranco Peluso, Antonino Cascino, Roberto Cotrufo and Mariarosa A. B. Melone: "Differentiation and apoptosis of neuroblastoma cells: role of N-myc gene product", *J. Cellular Biochemistry* (1999), 73(1):97-105.
8. U. Galderisi, M.A.B. Melone, G. Di Bernardo, G. Galano, A. Cascino and M. Cipollaro: "Antisense inhibitory effect: a comparison between 3'-partial and full phosphorothioate antisense oligonucleotides", *J. Cellular Biochemistry*, (1999), 74, 31-37.
9. U. Galderisi, G. Di Bernardo, M. Cipollaro, F. P. Jori, E. Piegari, A. Cascino, G. Peluso and M.A.B. Melone: "Induction of apoptosis and differentiation in neuroblastoma and astrocytoma cells by the overexpression of Bin1, a novel Myc interacting protein", *J. Cellular Biochemistry* (1999), 74(3):313-322.
10. U. Galderisi, A. Cascino and A. Giordano: "Oligonucleotides as therapeutic agents" *J. Cellular Physiology*, (1999), 181, 251-257.
11. Elena Piegari, Umberto Galderisi, Liberato Berrino, Giovanni Di Bernardo, Giovanni Galano, Marilena Cipollaro, Ferdinando Esposito, Francesco Rossi and Antonino Cascino: "Hypotensive effects of partially

phosphorothioated antisense oligos targeted against AT₁ receptor mRNA in the spontaneously hypertensive rat”, (2000), Life Sciences. 66 (21), 2091-2099.

12. Forte A., Galderisi U., Di Micco G., Renzulli A., De Feo M., Guarino F. M., Bianco M. R., Angelini F., Esposito F., Berrino L., Rossi F., Cipollaro M., Cotrufo M. and Cascino A. (2000). “Molecular analysis of surgically induced arterial stenosis in rat carotids” (submitted for publication to Journal of Cellular Physiology).

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Saranno valutati gli effetti delle molecole antisense sulla pressione arteriosa e sulla frequenza cardiaca di ratti con tipi di ipertensione diversi rispetto ai ratti SHR come i ratti DOCA (Deoxy Corticosterone Acetate)-salt nei quali l'ipertensione é indotta farmacologicamente ed i ratti del ceppo Milano, geneticamente ipertesi.

Saranno valutati inoltre gli effetti sullo sviluppo della stenosi di ODN antisense diretti contro l'mRNA del recettore AT₁. L'efficacia degli ODN contro c-myc verrà valutata non solo in ratti normali, ma anche in ratti SHR.

Infine, verrà approfondita la caratterizzazione molecolare del processo stenotico indotto in carotide di ratto.

Collaborazioni internazionali in atto

Dr. Antonio Giordano Jefferson Medical College 1020 Locust St Rm 226 Philadelphia USA

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Power supplies BIO RAD (4) and gel electrophoresis systems (3)

Speedvac SAVANT Centrifuge fully equipped

Computers Macintosh PowerPC, 3 iMac, Agfa scanner

Perkin Elmer Amplifiers PCR System 9700 (2x), DNA Thermal Cycler (2x)

BIORAD GelDoc System 1000, with Macintosh PowerPC and Digital color printer

Stabulario

Parole Chiave

Oligonucleotidi antisense, ipertensione, stenosi, RT-PCR

UNITA' DI RICERCA INBB
Catania

Responsabile scientifico
Prof. Federico Cicirata

Linee di Ricerca

Organizzazione morfo-funzionale delle connessioni cerebro-cerebellari
Comunicazione diretta (gap junctio) tra cellule nervose
titolo

Organizzazione morfo-funzionale delle connessioni cerebro-cerebellari
Comunicazione diretta (gap junctio) tra cellule nervose

Composizione del Gruppo
Aderenti INBB

Cicirata Federico PO cicirata@mbox.unict.it

Non aderenti INBB

Serapide Maria Francesca RU
Pantò Maria Rosita RU
Parenti Rosalba RU
Gulisano Massimo RU
Zappalà Agata DR

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Scienze Fisiologiche - Viale Andrea Doria 6, 95125 Catania

telefono

095.333841

fax

095.330645

e-mail

cicirata@mbox.unict.it

Sezione INBB di appartenenza

Catania

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Organizzazione morfo-funzionale delle connessioni cerebro-cerebellari: ricercare le basi morfologiche che supportano la funzione del cervelletto nella programmazione dei movimenti volontari.

Comunicazione diretta (gap junctio) tra cellule nervose: identificare le basi molecolari che consentono e regolano la comunicazione diretta (mediante gap junction) tra cellule del sistema nervoso.

Risultati ottenuti

Organizzazione morfo-funzionale delle connessioni cerebro-cerebellari: lo studio ha evidenziato le caratteristiche anatomiche e funzionali della via pontocerebellare. Tali caratteristiche sono compatibili con l'ipotesi che detta sia implicata nella mediazione di comandi d'origine corticale destinati al controllo di precisi movimenti finalizzati.

Comunicazione diretta (gap junctio) tra cellule nervose: la ricerca ha prima portato alla scoperta del gene codificante la connessina36, la cui proteina oligomerizza in gap junctions tra neuroni del SNC. Successivamente di tale gene abbiamo studiato l'intera regione genomica e la sua espressione (*in situ*) nel cervello di topo adulto e a vari stadi durante la vita embrionaria. L'insieme dei risultati depone a favore di una comunicazione diretta tra neuroni del SNC assai più ampia di quanto fin'ora ipotizzato.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000

1. Metabotropic glutamate receptor mGluR5: a key regulator of neuronal selection? (A Copani, G Casabona, V Bruno, R Parenti, F Cicirata, T Knopfel, R Kuhn, F Nicoletti). In Metabotropic glutamate receptors and brain function (Eds: F Moroni, F Nicoletti, DE Pellegrini-Giampietro). pp 215-233, Portland Press Ltd, London, 1998.
2. Diverging projections of the C2 and D2 olivocorticonuclear cerebellar pathways of the rat (MR Pantò, F Cicirata, R Parenti, MF Serapide, V Albanese). Neuroscience, 86: 7-11, 1998.
3. Cloning of a new gap junction gene (Cx36) highly expressed in mammalian brain neurons (DF Condorelli, R Parenti, F Spinella, A Trovato Salinaro, N Belluardo, V Cardile, F Cicirata). Eur. J. Neurosci, 10: 1202-1208, 1998.
4. Genomic organization and chromosomal localization of the mouse connexin36 (mCx36) gene (F Cicirata, R Parenti, F Spinella, S Giglio, F Tuorto, O Zuffardi, M Gulisano). Gene, 251: 123-130, 2000.

5. Expression of connexin36 mRNA in adult rodent brain (R Parenti, M Gulisano, A Zappalà, F Cicirata). *Neuroreport*, 11: 1497-1502, 2000.
6. Cx36 is dynamically expressed during early development of mouse brain and nervous system (M Gulisano, R Parenti, F Spinella, F Cicirata). *Neuroreport*, in stampa.
7. Multiple Zonal Projections of the Basilar Pontine Nuclei to the Cerebellar Cortex of the Rat (MF Serapide, MR Pantò, R Parenti, A Zappalà, F Cicirata). *J Comp Neurol*, in stampa.
8. The corticonuclear projections of the cerebellum are arranged according to both anteroposterior and medilateral pairing pattern (M. R. Pantò, A. Zappalà, R. Parenti, M. F. Serapide and F. Cicirata). *Eur J Neurosci*, in stampa.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

La ricerca è indirizzata ai seguenti obiettivi:

- Approfondire le conoscenze della circuitistica neuronale sia intracerebellare che tra cervelletto e strutture extracerebellari a significato motorio.
- Indagare il ruolo delle gap junctions neuronali durante lo sviluppo fetale del tessuto cerebrale.
- Indagare la funzione delle gap junctions tra cellule nervose in vitro ed in vivo.
- Indagare i meccanismi intra ed extracellulari che regolano le gap junctions.

Collaborazioni internazionali in atto

1. Dr John Parnavelas, Department of Anatomy and Developmental Biology, University College London, Gran Bratagna.
2. Prof. Salvador Martinez, Departamento de Ciencias Morfológicas y Psicobiología, Facultad de Medicina, Murcia, Spagna
3. Dr Constantino Sotelo, Inserm U 106, Parigi, Francia.

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

L'Unità dispone di:

1. set-up per ricerche di neuroanatomia
2. set-up per ricerche di biologia molecolare
3. set-up per ricerche di biologia cellulare
4. set-up per ricerche di biologia dello sviluppo
5. set-up per ricerche di elettrofisiologia unitaria extracellulare

Parole Chiave

cervelletto, movimento, gap junction, comunicazione intercellulare diretta

UNITA' DI RICERCA INBB
Bari

Responsabile Scientifico
Prof. Carlo Di Benedetta

Linea di Ricerca
Neurofisiologia

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB:

Vincenzo Cuomo	PO	cuomo@farmacol.uniba.it
Carlo Di Benedetta	PO	cdbe@fisiol.uniba.it
Gianfranco Gennarini	PO	g.gennarini@tno.it
Francesco Vitiello	PO	f.vitiello@fisiol.uniba.it

Non Aderenti INBB

Maura Buttiglione		m.buttiglione@fisiol.uniba.it
Raffaele Cagiano		r.cagiano@farmacol.uniba.it
Maria Rosaria Carratù		mrc@farmacol.uniba.it
Giuseppe Cibelli		g.cibelli@fisiol.uniba.it
Patrizia Corsi		labo@fisiol.uniba.it
Maria A. De Salvia		desalvia@cimedoc.uniba.it
Arcangela Giustino		giustino@farmacol.uniba.it
Giuseppe Renna		g.renna@farmacol.uniba.it
Giovanni Siro Brigiani		g.siro@farmacol.uniba.it
Luigia Trabace		trabace@farmacol.uniba.it

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Farmacologia e Fisiologia Umana – Università degli Studi di Bari, P.zza Giulio Cesare
080/5478420 080/5478417 cdbe@fisiol.uniba.it

Sezione INBB di appartenenza

Bari

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000

Koch T., Brugger T., Bach A., Gennarini G. and Trotter J. (1997) Expression of the immunoglobulin superfamily cell adhesion molecule F3 by oligodendrocyte-lineage cells. *Glia*, 19, 199-212.

R.Cagiano, D. Ancona, T. Cassano, M. Tattoli, L. Trabace and V. Cuomo (1998) Effects of prenatal exposure to low concentrations of carbon monoxide on sexual behaviour and mesolimbic dopaminergic function in rat offspring, *Br. J. Pharmacol.*, 125(4), 909-915

Carratu' M.R., Belmadani A., Cuomo V. and Creppy E.E. (1998) Potassium channel modulation by the pseudopeptide Ochratoxin A in rat nerve fibers, *J. Neurosci. Res.*, 53, 312-317

Giustino A., Cuomo V., and Marsden C.A.(1998) Maternal cocaine exposure alters mesolimbic dopaminergic function in rat offspring, *Eur. J. Pharmacol.*, 345, 175-180

Pierre K., Rougon G., Allard M., Bonhomme R., Gennarini G., Poulain D.A., Theodosis D.T. (1998) Regulated expression of the cell adhesion glycoprotein F3 in adult hypothalamic magnocellular neurons. *J Neurosci.* 18:5333-5343.

Cibelli G., Altamura M., Diana G., Dipace C., Greco B., Jirillo E., Nuzzolese N., Pepe M., Vitiello F. e Di Benedetta C. (1999) Effects of corticotropin-releasing factor on phagocytosis by microglial cells. *Neuroscience Letters* (*suppl.* 52), S87.

Doussau F., Gasman S., Humeau Y., Vitiello F., Popoff M., Boquet P., Bader M-F. e Poulain B. (2000) A Rho-related GTPase is involved in Ca²⁺-dependent neurotransmitter exocytosis. *J. Biol. Chem.*, 275: 7764-7770.

Pierre K., Rougon G., Allard M., Bonhomme R., Gennarini G., Poulain D. and Theodosios D. (1998) Regulated expression of the cell adhesion glycoprotein F3 in adult hypothalamic magno cellular neurons.. *J. Neurosci.*, 18, 5333-5343.

Trabace L., Coluccia A., Gaetani S., Tattoli M., Cagiano R., Pietra C., Kendrick K.M., Cuomo V., In vivo neurochemical effects of the acetylcholinesterase inhibitor ENA713 in rat hippocampus *Brain Res.*, 865, 268-271, 2000.

Virgintino D., Ambrosini M., D'Errico P., Bertossi M., Papadaki C., Karagogeos D. and Gennarini G. (1999). Regional distribution and cell type-specific expression of the mouse F3 axonal glycoprotein: a developmental study. *J. Comp. Neurol.* 413, 357-372.

Piano Annuale delle Ricerche

Il Dipartimento di Farmacologia e Fisiologia Umana è costituito da n. 15 docenti con insegnamenti relativi al Corso di Laurea in Medicina e Chirurgia.

Il Dipartimento svolge ricerche su:

- a) Neurobiologia dello Sviluppo;
- b) Fisiologia della Nutrizione;
- c) Fisiologia Integrativa ed Applicata;
- d) Interazione tra sistema nervoso vegetativo e sistema immunitario in condizioni fisiopatologiche;
- e) Esposizione a xenobiotici durante lo sviluppo del sistema nervoso periferico;
- f) Esposizione a xenobiotici durante lo sviluppo del sistema nervoso centrale;
- g) Modulazione farmacologia della neurotrasmissione nel sistema nervoso centrale (SNC).

Il Dipartimento di Farmacologia e Fisiologia Umana è sede amministrativa di n. 3 Dottorati di Ricerca:

- a) Dottorato di Ricerca in Metabolismo dei Farmaci e Farmacocinetica (Coordinatore Prof. Delia Mitolo Chieppa)
- b) Dottorato di Ricerca in Farmacologia Clinica e Terapia Medica (Coordinatore Prof. Vincenzo Cuomo)
- c) Dottorato di Ricerca in Neuroscienze (Coordinatore Prof. Francesco Vitiello)

e di un Corso di Perfezionamento in Nutrizione Umana.

Attualmente sono in corso:

Progetti di Ricerca

- “Regolazione di geni delle proteine delle vescicole sinaptiche durante la sinaptogenesi e la plasticità sinaptica”.
 - “Adattamenti del controllo neurovegetativo cardiovascolare a variazioni dell’orientamento del Corpo Umana rispetto alla direzione dell’accelerazione di gravità”.
- Progetti di Ricerca/”Giovani Ricercatori”*
- Prevenzione dell’apoptosi nel danno da ischemia e riperfusione mediate FK506
 - Convenzioni
 - Effetti di farmaci anticolinesterasici sul sistema nervoso centrale;
 - Effetti comportamentali dei composti BTG 1640 e BTG 1675 A

UNITA' DI RICERCA INBB
Laboratorio Nazionale di Osilo (SS)

Responsabile Scientifico
Prof. Leonardo Gaspa

Linea di Ricerca

Tumorigenesi ed Angiogenesi Tumorale

titolo

Inibizione dell'angiogenesi tumorale e di altri meccanismi coinvolti nella tumorigenesi

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Gaspa Leonardo	PO	gaspainbb@yahoo.com
Emanuelli Costanza	Ricercatrice I.N.B.B.	emanuelli@yahoo.com
Madeddu Paolo	PA	madeddu@yahoo.com
Salis Maria Bonaria	Ricercatrice I.N.B.B.	bonarias@hotmail.com
Milia Anna Franca	BC INBB	annafm@hotmail.com

Non Aderenti INBB

Stacca Tiziana	A	tstacca@hotmail.com
Deiana Maria	A	
Pinna Alessandra	PTo	minipinna@hotmail.com
Sciola Luigi	RU	sciola@ssmain.iniss.it
Spano Alessandra	BC	sciola@ssmain.uniss.it

Sede Unità di Ricerca

Laboratorio Nazionale INBB, Via Brigata Sassari, 07033 Osilo (Sassari)

indirizzo

tel 0793441006

Fax 0793441006

gaspainbb@yahoo.com

Sezione INBB di appartenenza

Catania

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Inibizione dell'angiogenesi tumorale. Sviluppo di nuovi sistemi di trasferimento genico caratterizzati da alta efficienza di infezione e trasduzione (lentivirus). Messa a punto di strategie innovative per contrastare l'angiogenesi neoplastica. Studio su popolazione di markers di angiogenesi.

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Culture cellulari, Biologia Molecolare, Laser Doppler Lisca, Analisi isto-morfometrica assistita da software, Attrezzatura per microchirurgia sperimentale, Armadi Stabulari

Parole Chiave

Tumorigenesi, Angiogenesi Tumorale

UNITA' DI RICERCA INBB
Napoli

Responsabile Scientifico

Prof. Cimino Filiberto - Prof.ssa Esposito Franca

Linea di Ricerca

Ruolo delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) nella trasduzione dei segnali mitogenici

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Cimino Filiberto

PO

cimino@dbbm.unina.it

Esposito Franca

PA

esposito@dbbm.unina.it

Non Aderenti INBB

Ammendola Rosario

PA

ammendola@dbbm.unina.it

Chirico Giuseppa

DR

chirico@dbbm.unina.it

Russo Lucia

DR

russo@dbbm.unina.it

Russo Tommaso

RU

mailrussoto@unina.it

Zambrano Nicola

RU

mailzambrano@dbbm.unina.it

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche Università di Napoli Federico II.

Via Pansini 5 80131 Napoli

indirizzo

0817464966 081/7463650- 7464359

telefono

Sezione INBB di appartenenza

Napoli

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Da alcuni anni nel nostro laboratorio si studia il ruolo dei ROS come mediatori fisiologici di segnali extracellulari, in particolare nella regolazione dell'espressione di geni coinvolti nel ciclo cellulare, quali p53, p21^{waf1} ed altri.. Inoltre molti dati dimostrano che in seguito a stimolazione con fattori di crescita dei recettori tirosina chinasi (TKR) avviene produzione di ROS e che la fosforilazione in Tyr dei TKR dipende dalla generazione di ROS. Gli obiettivi della ricerca riguardano lo studio dei meccanismi molecolari attraverso i quali i ROS svolgono questo importante ruolo di mediatori nella trasduzione di stimoli mitogenici. A tale proposito ci proponiamo lo studio dei meccanismi di attivazione e di regolazione della NADPH ossidasi, un enzima presente in molte cellule eucariotiche e responsabile della produzione fisiologica dei ROS. In particolare i principali obiettivi riguarderanno: 1) il clonaggio del cDNA di Mox1, l' omologo della subunità catalitica dell'NADPH ossidasi dei macrofagi, e la sua espressione in E. Coli come proteina di fusione con GST, per la preparazione del rispettivo anticorpo; 2) lo studio della regolazione dell'attività tirosina fosfatasi, sia in cellule private di siero e poi restimolate con fattori di crescita, sia in cellule in cui i livelli dei ROS sono opportunamente modulati mediante esposizione ad inibitori dell'NADPH ossidasi (DPI ed AEBSF), al precursore di GSH (N-acetilcisteina) e ad oligonucleotidi antisense per Mox1. Quest'ultimo approccio appare di notevole interesse in considerazione del fatto che: i) il grado di attivazione dei TKR è finemente regolato dal rapporto tirosine chinasi/tirosine fosfatasi; ii) mentre i dati sulla regolazione dell'attività delle tirosine chinasi ricettoriali sono più numerosi, poco si sa sulla regolazione dell'attività tirosina fosfatasi dopo stimolazione con fattori di crescita e/o in seguito a variazioni dei livelli intracellulari di ROS.

Risultati ottenuti

È Recentemente abbiamo dimostrato che l'esposizione di varie linee cellulari al Dietilmaleato (DEM) provoca : 1) un accumulo dei livelli di p21^{waf1} e conseguente blocco del ciclo cellulare, attraverso un pathway p53-indipendente (Russo T. et al, 1995), MAPK-dipendente (Esposito F. et al, 1997); 2) un effetto, molto più rapido, che consiste nella precoce comparsa di una nuova isoforma di p21^{waf1} con più veloce migrazione elettroforetica, denominata FMp21 (Esposito F. et al, 1998). Tale isoforma viene prodotta per defosforilazione della proteina preesistente da parte di fosfatasi serina-treonina attivate durante il trattamento col DEM (Esposito F. et al, 1998). Allo scopo di identificare altri possibili substrati di questi enzimi, nell'ambito delle proteine coinvolte nella regolazione del ciclo cellulare, abbiamo dimostrato che anche il retinoblastoma (Rb) è defosforilato in tali condizioni sperimentali attraverso un pathway p53- e p21^{waf1}- indipendente e che la fosfatasi responsabile di tale defosforilazione è attiva in vitro e defosforila anche p21^{waf1} (Esposito F. et al, 2000).

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000

- 1) F. Cimino, F. Esposito, R. Ammendola, T. Russo (1997) Gene regulation by Reactive Oxygen Species Curr. Topics Cell. Regul., 35, 123-147. I.F. 4.75
- 2) F. Esposito, F. Cuccovillo, M. Vanoni, F. Cimino, C.W. Anderson, E. Appella and T. Russo (1997) Redox-mediated regulation of p21^{waf1/cip1} expression involves a post-transcriptional mechanism and activation of the mitogen-activated protein kinase pathway Eur. J. Biochem., 245, 730-737. I.F. 3.25
- 3) F. Esposito, F. Cuccovillo, L. Russo, F. Casella, Russo T., Cimino F. (1998) A new p21^{waf1/cip1} isoform is an early event of cell response to oxidative stress Cell Death Differ., 5, 940-945. I.F. 4.02
- 4) V. Wanke, K. Accorsi, D. Porro, F. Esposito, T. Russo and M. Vanoni (1999) In budding yeast reactive oxygen species induce both RAS-dependent and RAS-independent cell cycle-specific arrest. Mol. Microbiol., 32, 753-764. I.F. 6.1
- 5) F. Esposito, L. Russo, T. Russo and F. Cimino (2000) Retinoblastoma protein dephosphorylation is an early event of cellular response to prooxidant conditions. Febs Lett. 470, 211-215 I.F. 3.58

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

I più importanti obiettivi riguarderanno: 1) il clonaggio del cDNA di Mox1, l'omologo della subunità catalitica dell'NADPH ossidasi dei macrofagi, e delle altre subunità della NADPH ossidasi; 2) lo studio della regolazione dell'attività tirosina fosfatasi, sia in cellule private di siero e poi restimolate con fattori di crescita, sia in cellule in cui i livelli dei ROS sono opportunamente modulati mediante esposizione ad inibitori dell'NADPH ossidasi (DPI ed AEBSF), al precursore di GSH (N-acetilcisteina) e ad oligonucleotidi antisense per Mox1.

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Cappe a flusso laminare, PCR, ultracentrifughe, microscopi ottici ed a fluorescenza

Parole Chiave

Specie reattive dell'ossigeno (ROS), trasduzione del segnale, NADPH ossidasi, tirosine fosfarasi

UNITA' DI RICERCA INBB
Padova

Responsabile Scientifico
Prof. Cobelli Claudio

Linea di Ricerca
Modelli di sistemi fisiologici

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Cobelli Claudio	PO	cobelli@dei.unipd.it
Toffolo Gianna Maria	PO	toffolo@dei.unipd.it
Ruggeri Alfredo	PA	ruggeri@dei.unipd.it
Sacomani Maria Pia	RU	pia@dei.unipd.it

Non Aderenti INBB

Sparacino Giovanni	RU	gianni@dei.unipd.it
Bertoldo Alessandra	BC	bertoldo@dei.unipd.it
Nucci Gianluca	BC	nucci@dei.unipd.it
Breda Elena	DR	ebreda@dei.unipd.it
Pillonetto Gianluigi	DR	giapi@dei.unipd.it
Callegari Tiziano	DR	tam@dei.unipd.it
Foracchia Marco	DR	foracch@dei.unipd.it

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Elettronica ed Informatica - Via Gradenigo 6/A, 35131 Padova

indirizzo

+39 049 8277616

+39 049 8277699

cobelli@dei.unipd.it

Telefono

Fax

e-mail

Sezione INBB di appartenenza

Padova

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

- a) Sviluppo di modelli, metodi e algoritmi per l'analisi e la descrizione quantitativa di sistemi fisiologici;
 - b) Modelli del metabolismo del glucosio; Modelli del metabolismo di aminoacidi e proteine; Modelli della meccanica respiratoria
1. IDENTIFICABILITA' A PRIORI. Studio di nuove strategie, sia di tipo metodologico che computazionale, per l'analisi di sistemi biologici dinamici lineari e nonlineari.
 2. STIMA PARAMETRICA. Metodi di stima Bayesiana con tecniche di campionamento Markov Chain Monte Carlo. Progetto dell'esperimento di identificazione parametrica.
 3. DECONVOLUZIONE. Metodi bayesiani basati sulla stima a minima varianza e sul concetto di gradi di libertà equivalenti.
 4. MODELLI DEL METABOLISMO DEL GLUCOSIO. Studio di modelli per la comprensione e stima di parametri non accessibili del sistema di controllo del glucosio nello stato normale e patologico sia a livello whole-body che regionale.
 5. MODELLI DEL METABOLISMO DI AMINOACIDI E PROTEINE. Studio di modelli per la descrizione quantitativa della cinetica di aminoacidi a livello regionale.
 6. MODELLI DELLA MECCANICA RESPIRATORIA. Studio di modelli isomorfi del sistema respiratorio e di modelli per il monitoraggio in ventilazione artificiale.

Risultati ottenuti

1. IDENTIFICABILITA' A PRIORI. E' stato sviluppato un software per l'analisi di identificabilità a priori di modelli compartimentali lineari. E' stato avviato lo studio di un metodo per l'analisi di modelli dinamici nonlineari basato sull'algebra differenziale. E' stata studiata l'identificabilità a priori di un classico modello a parametri distribuiti dello scambio sangue-tessuto.
2. STIMA PARAMETRICA. E' stata impiegata la stima Bayesiana per risolvere problemi di identificabilità a priori. In particolare, la stima MAP ha reso possibile identificare un nuovo modello della cinetica del glucosio. Come strumento di ausilio al progetto dell'esperimento di identificazione del modello è stato sviluppato un metodo basato sulle generalizzate sensitivity functions.
3. DECONVOLUZIONE. Il classico metodo di regolarizzazione di Phillips-Tikhonov è stato reinterpretato in chiave bayesiana, ottenendo espressioni analitiche per il calcolo degli intervalli di confidenza, criteri di regolarizzazione fondati sulla Massima Verosimiglianza, e la stima di ingressi "continui" anche in presenza di

campionamento rado. Applicazioni hanno riguardato problemi di misura di secrezione/produzione di ormoni/substrati e la stima della funzione del trasporto di sostanze a livello d'organo.

4. MODELLI DEL METABOLISMO DEL GLUCOSIO. Sono stati messi a punto modelli della cinetica di glucosio, insulina e C-peptide a livello whole-body in condizioni di ingresso intravenoso nello stato sia normale che patologico (diabete) a partire da dati traccianti e non. A livello regionale è iniziato lo sviluppo di modelli per lo studio del metabolismo del glucosio nel muscolo scheletrico da immagini PET.
5. MODELLI DEL METABOLISMO DI AMINOACIDI E PROTEINE. E' iniziato lo sviluppo di modelli per lo studio del metabolismo di leucina e fenilalanina nel muscolo scheletrico a partire da esperimenti con traccianti.
6. MODELLI DELLA MECCANICA RESPIRATORIA. E' stato messo a punto un metodo di monitoraggio in tempo reale dei parametri della meccanica respiratoria in pazienti ventilati artificialmente. E' stato sviluppato, nel dominio del tempo, un modello di simulazione anatomo-funzionale del sistema respiratorio.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000

1. De Nicolao G., Sparacino G., Cobelli C.: Nonparametric input estimation in physiological systems: problems, methods, case studies. Automatica 33: 851-870, 1997.
2. Utriainen T., Nuutila P., Takala T., Vicini P., Ruotsalainen U., Rnnemaa T., Tolvanen T., Raitakari M., Haaparanta M., Kirvel O., Cobelli C., Yki-Jarvinen H.: Intact insulin stimulation of skeletal muscle blood flow, its heterogeneity and redistribution but not of glucose uptake in non-insulin dependent diabetes mellitus. J. Clin. Invest. 100: 777-785, 1997.
3. Vicini P., Caumo A., Cobelli C.: The hot IVGTT two compartment minimal model: indices of glucose effectiveness and insulin sensitivity. Am. J. Physiol. 273: E1024-E1031, 1997.
4. Audoly S., D'Angio' L., Saccomani M.P., Cobelli C.: Global identifiability of linear compartmental models. A computer algebra algorithm. IEEE Trans. Biomed. Eng. 25: 36-41, 1998
5. Bertoldo A., Vicini P., Sambuceti G.M., Lammertsma A.A., Parodi O., Cobelli C.: Evaluation of compartmental and spectral analysis models of [¹⁸F]FDG kinetics for heart and brain studies with PET. IEEE Trans. in Biomed. Eng. 45: 1429-1148, 1998.
6. Bonadonna R.C., Saccomani M.P., Del Prato S., Bonora E., DeFronzo R.A., Cobelli C.: Role of tissue-specific blood flow and tissue recruitment in insulin-mediated glucose uptake of human skeletal muscle. Circulation 98: 234-241, 1998.
7. Cobelli C., Caumo A., Omenetto M.: Minimal model S_G overestimation and S_I underestimation: improved accuracy by a Bayesian two-compartment model. Am. J. Physiol. 277: E481-E488, 1999.
8. Caumo A., Vicini P., Zachwieja J.J., Avogaro A., Yarasheski K., Bier D.M., Cobelli C.: Undermodeling affects minimal model indexes: insights from a two-compartment model. Am. J. Physiol. 276: E1171-E1193, 1999.
9. Thomaseth K., Cobelli C.: Generalized sensitivity functions in physiological system Identification. Ann. Biomed. Eng. 27: 607-616, 1999.
10. Vicini P. Cobelli C.: A priori identifiability of distributed models of blood-tissue exchange. Ann. Biomed. Eng. 27: 200-207, 1999.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

1. IDENTIFICABILITA' A PRIORI. Nuove strategie metodologiche e computazionali per estendere il dominio di validità degli algoritmi recentemente proposti per i modelli dinamici non lineari.
2. STIMA PARAMETRICA. Stima alla Bayes sfruttando tecniche Markov Chain Monte Carlo (MCMC) ed estensione al caso di popolazione.
3. DECONVOLUZIONE. Realizzazione di un software con interfaccia grafica sviluppato in Matlab ed estensione dell'approccio stocastico mediante metodiche MCMC per tenere in considerazione tutte le sorgenti di informazione.
4. MODELLI DEL METABOLISMO DEL GLUCOSIO. Sviluppo di nuovi approcci per la stima dei parametri di controllo del sistema glucosio-insulina (ad es. sensibilità all'insulina) da protocolli che prevedono un ingresso orale (pasto e OGTT). Nuovo modello di simulazione whole-body. Modelli regionali della cinetica da immagini PET.
5. MODELLI DEL SISTEMA RECETTORIALE. Messa a punto di modelli e metodi per lo studio quantitativo in vivo nell'uomo del sistema serotonergico da immagini PET.
6. MODELLI DELLA MECCANICA RESPIRATORIA. Sviluppo di modelli nonlineari per l'analisi della meccanica del respiro spontaneo. Raffinamento delle tecniche di stima in linea in ventilazione meccanica.

Collaborazioni internazionali in atto

Department of Bioengineering, University of Washington, Seattle, WA, USA.

Faculty of Endocrinology, Diabetes, and Metabolism, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA

Turku PET Center, Turku University, Finland

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Sun Sparstation (2), PC Pentium (14), Laserprinter (4)

Parole Chiave

Biosistemi, Modelli, Metabolismo, Sistemi Fisiologici, Identificazione.

UNITA' DI RICERCA INBB
Napoli

Responsabile Scientifico
Prof. Colasanti Alberto

Linea di Ricerca

Rivelazione di tessuti neoplastici

titolo

Tecniche di spettroscopia di fluorescenza e di transilluminazione per la rivelazione dei tumori.

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Colasanti Alberto	PA	colasant@cds.unina.it
Roberti Giuseppe	PA	Roberti@unina.it

Non Aderenti INBB

Fabbrocini Gabriella	RU	
Riccio Patrizia	RU	priccio@unina.it
Kisslinger Annamaria	A	
Liuzzi Raffaele	BC	
Quarto Maria	A	

Sede Unità di Ricerca

Facolta' di Medicina e Chirurgia Università degli Studi di Napoli "Federico II"

Indirizzo

Via S. Pansini 5 80131 Napoli

0817463479

telefono

0817463476

Fax

colasant@cds.unina.it

e-mail

Sezione INBB di appartenenza

Napoli

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

L'interazione tra le biomolecole e la luce può essere usata come un sensibile strumento nell'investigazione dei sistemi biologici e nella diagnosi medica. In particolare la fluorescenza è stata ampiamente investigata per discriminare tra i tessuti sani e patologici, utilizzando o la fluorescenza endogena (autofluorescenza AF) dei tessuti o la fluorescenza esogena emessa da fotosensibilizzanti accumulati negli organi in esame dopo somministrazione al paziente. Il nostro gruppo si è dedicato all'analisi per autofluorescenza proprio per le sue caratteristiche non invasive.

Negli ultimi anni è stata studiata la possibilità di eseguire imaging di tessuti biologici con radiazione elettromagnetica nella regione del visibile e infrarosso al fine di rivelare piccole inhomogeneità assorbenti o diffondenti con una risoluzione spaziale ed un contrasto sufficientemente elevati da permetterne una applicazione nella diagnosi dei tumori.

E' stato mostrato che misure di cross-correlation di seconda armonica, per rivelare selettivamente il debole impulso dei contributi del campo ottico sfasati in maniera casuale dal passaggio attraverso un mezzo scatterante, permettono la rivelazione di un oggetto opaco immerso in un mezzo altamente scatterante.

Risultati ottenuti

Abbiamo studiato la radiazione di autofluorescenza emessa da tessuti di topi, sani e tumorali (MS-2 fibrosarcoma) in vivo sotto anestesia e post mortem, nel dominio delle frequenze e in quello temporale per caratterizzare questo modello tumorale.

Le misure effettuate nel dominio spettrale mostrano che l'intensità della radiazione di autofluorescenza nei tessuti patologici è più bassa rispetto a quella dei tessuti normali nell'intervallo spettrale 400 – 500 nm. In questo stesso intervallo si è trovato che il decadimento di fluorescenza può essere rappresentato come somma di due decadimenti esponenziali, uno veloce ed uno lento. La vita media della componente veloce dei tessuti tumorali risulta significativamente più bassa rispetto a quella dei tessuti normali.

La combinazione delle due tecniche spettroscopiche permette di ottenere indicazioni circa le modificazioni biochimiche associate alla presenza di tumori e quindi di distinguere tessuti tumorali da quelli sani con una elevata affidabilità.

Il nostro gruppo ha realizzato un apparato sperimentale per misure di trasmittanza allo scopo di determinare i parametri ottici dei tessuti biologici normali e tumorali.

La sorgente utilizzata è un diodo laser cw che emette radiazione alla lunghezza d'onda di 820 nm e produce un fascio collimato con profilo gaussiano. L'intensità trasmessa dal campione è raccolto da una fibra multimodale la cui testa è

mossa in un piano perpendicolare alla direzione del fascio incidente. Il profilo spaziale unidimensionale dell'intensità trasmessa viene paragonato con la soluzione dell'equazione di diffusione e con simulazioni Monte Carlo. Il migliore accordo tra dati sperimentali e modello teorico fornisce i valori dei parametri ottici del tessuti in esame. Il buono accordo tra le curve calcolate e quelle sperimentali ottenute con misure su soluzioni di Intralipid e fantocci, con parametri ottici noti, conferma la validità del metodo.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000

- 1) A. Colasanti, G. Guida, A. Kisslinger, R. Liuzzi, M. Quarto, P. Riccio, G. Roberti, F. Villani "Transmission measurements tissue-like phantoms: a simple system for optical parameters determination" ; Optical Biopsies Europto Series SPIE (1997) 3194, 471-477
- 2) A. Colasanti, G. Guida, A. Kisslinger, R. Liuzzi, M. Quarto, G. Roberti, F. Villani "Optical parameters measurements by collimated light transmission"; Optical Biopsies Europto Series SPIE (1998) 3255, 118-121
- 3) U. Bernini, A. Colasanti, G. Guida, R. Liuzzi, M. Quarto, P. Riccio, P. Russo, G. Roberti, F. Villani; "CW transillumination of tissue equivalent scattering and absorbing samples"; Optical Biopsies Europto Series SPIE (1998), 3565, 156-164
- 4) A. Colasanti, G. Guida, A. Kisslinger, R. Liuzzi, M. Quarto, P. Riccio, G. Roberti, F. Villani; "Application of parallel computing to a Montecarlo code for photon transport in turbid media"; Optical Biopsies Europto Series SPIE (1998), 3566, 73-78
- 5) A. Colasanti, A. Kisslinger, G. Fabbrocini, R. Liuzzi, M. Quarto, P. Riccio, G. Roberti, F. Villani "MS-2 fibrosarcoma characterization by laser induced autofluorescence"; Lasers Surg. Med. (2000) 26, 441-448
- 6) A. Colasanti, G. Guida, A. Kisslinger, R. Liuzzi, M. Quarto, P. Riccio, G. Roberti, F. Villani "Multiple processor version of a Monte Carlo code for photon transport in turbid media" Computer physics communication (2000), in press

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Lo studio permette di concludere che le due tecniche spettroscopiche per l'analisi dell'autofluorescenza emessa dai tessuti tumorali, nel dominio delle frequenze e in quello temporale, possono fornire nuove possibilità per una valida diagnosi non invasiva di patologie tumorali.

Ci proponiamo di estendere questa analisi ad altri tipi di tumori, prima sugli animali e, successivamente, sull'uomo e contemporaneamente di caratterizzarne otticamente i tessuti.

Si metterà appunto il set-up per misure di cross-correlation. Successivamente verrà installato un apparato per il timing di singolo fotone e si opererà un confronto tra le distribuzioni sperimentali dei tempi di volo alla frequenza fondamentale e alla frequenza di seconda armonica.

Collaborazioni internazionali in atto

Università degli Studi dell'Insubria - Dip. Fisica - Prof.ssa Andreoni

Università degli studi di Napoli Federico II" - Clinica dermatologica - Prof.Santoianni

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Laser ad Azoto impulsato 1 mJ/.6 ns

Analizzatore e digitalizzatore Tektronix DSA 602

Fotomoltiplicatori, filtri ed ottiche

Spettrofluorimetro PERKIN-ELMER LS50

Diodi a valanga lineare

Spettrografo

Camera a CCD

Intensificatore di immagini

Parole Chiave

Fluorescenza, LIF, Laser, Transilluminazione

UNITA' DI RICERCA INBB
Bologna

Responsabile Scientifico
Prof. Antonio Contestabile

Linea di Ricerca

Biosistemi e Bioregolazioni

titolo

Sopravvivenza, morte cellulare e vie di segnalazione attivate nello sviluppo cerebrale e nelle neuropatologie.

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Antonio Contestabile	PO	acontest@alma.unibo.it
Alessandro Poli	PO	a.poli@alma.unibo.it
Luigi Villani	PO	Villanig@alma.unibo.it
Marco Virgili	R	Mvirgili@alma.unibo.it

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Biologia, Università di Bologna, Via Selmi 3, 40126 Bologna

indirizzo

051 2094134

051 251208

telefono

fax

Sezione INBB di appartenenza

Bologna

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Chiarificare il ruolo svolto dal recettore NMDA per il glutamato nello sviluppo cerebrale e nelle neuropatologie. Chiarificare il ruolo svolto dal monossido di azoto come messaggero diffusibile nello sviluppo cerebrale e nelle neuropatologie e sua interazione con il recettore NMDA per il glutamato. Meccanismi di sopravvivenza ed eliminazione apoptotica delle cellule nervose nello sviluppo e nelle neuropatologie. Vie di segnalazione attivate nella morte cellulare programmata e nella neuroprotezione. Alterazioni molecolari collegate ai processi cellulari di invecchiamento cerebrale.

Risultati ottenuti

Interazioni monossido di azoto-recettore NMDA nello sviluppo cerebellare in condizioni normali e di microencefalia sperimentalmente indotta. Effetti del blocco cronico della produzione di monossido di azoto e del recettore NMDA nello sviluppo cerebrale. Coinvolgimento di proteasi, in particolare caspasi, nella morte cellulare programmata di cellule nervose. Ruolo neuropatologico delle poliamine cerebrali e loro coinvolgimento nell'invecchiamento cerebrale. Alterazioni di sistemi di neurotrasmettitori nell'invecchiamento cerebrale.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000

- 1) Sparapani M., Buonamici L., Ciani E., Battelli M.G., Ceccarelli G., Stirpe F. and Contestabile A. (1997) Toxicity of ricin and volkensin, two ribosome-inactivating proteins to microglia, astrocyte and neuron cultures. *Glia* 20,203-209.
- 2) Sparapani M., Dall'Olio R., Gandolfi O., Ciani E. and Contestabile A. (1997) Neurotoxicity of polyamines and pharmacological neuroprotection in cultures of rat cerebellar granule cells. *Exp. Neurol.* 148, 157-166.
- 3) Tregnago M., Virgili M., Monti B., Guarnieri T. and Contestabile A. (1998) Alteration of neuronal nitric oxide synthase activity and expression in the cerebellum and the forebrain of microencephalic rats. *Brain Res.* 793, 54-60.
- 4) Sparapani M., Virgili M., Bardi G., Tregnago M., Bentivogli M. and Contestabile A. (1998) Ornithine decarboxylase activity during development of cerebellar granule neurons. *J. Neurochem.* 71, 1898-1904.
- 5) Monti B., Sparapani M. and Contestabile A. (1998) Differential toxicity of protease inhibitors in cultures of cerebellar granule neurons. *Exp. Neurol.* 153, 335-341.
- 6) Virgili M., Facchinetti F., Sparapani M., Tregnago M., Lucchi R., Dall'Olio R., Gandolfi O. and Contestabile A. (1998) Neuronal nitric oxide synthase is permanently decreased in the cerebellum of rats subjected to chronic neonatal blockade of NMDA receptors. *Neurosci. Lett.* 258, 1-4.
- 7) Virgili M., Monti B., LoRusso A., Bentivogli M. and Contestabile A. (1999) Developmental effects of in vivo and in vitro inhibition of nitric oxide synthase in neurons. *Brain Res.* 839, 164-172.
- 8) Virgili M. and Contestabile A. (2000) Partial neuroprotection of in vivo excitotoxic brain damage by chronic administration of the red wine antioxidant agent, trans-resveratrol, in rats. *Neurosci. Lett.*, 281, 123-126.

9) Contestabile A. (2000) Roles of NMDA receptor activity and nitric oxide production in brain development. Brain Res. Rev. , 32, 476-509.

10) Monti B. and Contestabile A. (2000) Blockade of the NMDA receptor increases developmental apoptotic elimination of granule neurons and activates caspases in the rat cerebellum. Eur. J. Neurosci., 12, 3117-3123.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Dissezione molecolare delle vie di segnalazione cellulare coinvolte nella sopravvivenza od eliminazione apoptotica delle cellule nervose. Espressione genica in condizioni di alterato sviluppo cerebrale, di neuropatologie e dell'invecchiamento cerebrale. Meccanismi molecolari attivati dal monossido di azoto nelle cellule nervose a diversi stadi dello sviluppo. Interazioni reciproche fra cellule nervose e cellule della microglia nella sopravvivenza o morte cellulare programmata.

Collaborazioni internazionali in atto

Cristina Alberini. Mount Sinai University, New York

Frode Fonnum. Department of neurotoxicology. Kjeller, Norvegia.

Ragnild Paulsen. Center for Biotechnology, University of Oslo. Norvegia.

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Attrezzature per colture cellulari; Gel imager; PCR; HPLC; Phospho-imager.

Parole Chiave

Sviluppo cerebrale, Morte cellulare programmata, Vie di segnalazione cellulare, Neuropatologie, Neurotossicità e neuroprotezione

UNITA' DI RICERCA INBB
Pisa

Responsabile Scientifico
Prof Danilo De Rossi

Linea di Ricerca

Smart materials, bioengineering, microfabrication

titolo

Materiali, Sensori, Trasduttori e loro microfabbricazione

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Danilo De Rossi PO derossi@piaggio.cci.unipi.it

Non Aderenti INBB

Arti Ahluwalia	RU	arti.ahluwalia@ing.unipi.it
Alberto Mazzoldi	RU	alberto@piaggio.cci.unipi.it
Claudio Domenici	A	Claudio@socrates.piaggio.unipi.it
Piero Chiarelli	A	
Federico Lo Russi	R	
Pasquale Scilingo	BC	
Giovanni Vozzi	DR	vozzi@piaggio.cci.unipi.it

Sede Unità di Ricerca

Centro Interdipartimentale di Ricerca "E.Piaggio", Facoltà di Ingegneria, Università di Pisa

indirizzo:

Via Diotallevi 2, Pisa 56126

050 553639

telefono

050 550650

fax

derossi@piaggio.cci.unipi.it

e-mail

Sezione INBB di appartenenza

Bologna

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Caratteristica di questa unità di ricerca è la spiccata interdisciplinarietà delle tematiche affrontate, che possono sembrare assai ampie e diversificate. Tuttavia esse sono ricollegabili ad un indirizzo comune associato allo studio e la preparazione di materiali intelligenti e alla loro microfabbricazione.

Una parte delle ricerche è dedicata allo sviluppo di nuovi attuatori basati su materiali innovativi quali i gel polielettrolitici, i polimeri conduttori o i nanotubi di carbone, al fine di produrre forze o spostamenti controllati per applicazioni, ad esempio, nel campo dei muscoli artificiali o nel settore dei cateteri orientabili.

Altre attività di ricerca attivate all'interno del gruppo mirano allo sviluppo sia di nuovi sensori, in particolare per l'olfatto ed il gusto, che di tessuti piezoresistivi per la misura di variabili cinematiche. Questi ultimi sono di particolare interesse in campo biomeccanico per il rilevamento dei movimenti di pazienti senza usare metodi invasivi (elettrogoniometri classici, marker e telecamere, etc.).

I sensori olfattivi e gustativi sono basati sull'uso di polimeri conduttori ed il loro utilizzo è previsto in applicazioni industriali, ambientali e biomedicale.

Una più recente attività è stata infine rivolta allo sviluppo di una tecnologia di deposizione che consenta di realizzare strutture polimeriche bioerodibili per "tissue engineering" o realizzare attuatori e sensori a livello microscopico con una risoluzione di circa 20 micron.

Risultati ottenuti

I risultati finora raggiunti hanno portato a realizzare diversi tipi di attuatori sperimentali capaci di dare alte deformazioni, come nel caso del gel polielettrolitici (decine di %), od interessanti stress, come nel caso dei polimeri conduttori (5-10 volte quello del muscolo scheletrico umano).

Nel campo dei tessuti sensibili sono stati costruiti diversi device dimostrati, come foderine, guanti e body sensorizzati che hanno fornito interessanti risultati e mostrato la potenziale applicabilità di tali tessuti non solo in ambito medico ma anche sportivo, artistico e della realtà virtuale.

Nel campo del naso e lingua elettronica siamo in grado di distinguere tre diversi oli d'oliva di provenienza diversa, mentre i sensori per la lingua, ancora in fase preliminare di ricerca, sono in grado di discriminare tra alcune soluzioni semplici.

Nell'ambito del tissue engineering, siamo ora in grado di fabbricare intelaiature di polimeri bioerodibili su cui proliferano cellule endoteliali e cellule di origine nervoso.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000

1. G. Canepa, R. Petrigliano, M. Campanella, D. De Rossi: "Detection of incipient object slippage by skin-like sensing and neural network processing", IEEE Trans. Syst. Man Cyber 28 B, pp. 348-356, 1998.
2. G. Serra, R. Stella, D. De Rossi: "Study of the influence of oxidising salt on conducting polymer sensor properties", Material Science and Engineering C 5 pp. 259-263, 1998.
3. S. Baldacci, T. Matsuno, K. Toko, R. Stella, and D. De Rossi: "Discrimination of wine using taste and smell sensors" Sensors and Materials, Vol. 10, n. 3 pp. 185-200, 1998
4. Ahluwalia, G. Basta, D. Ricci, R. Francesconi, C. Domenici, M. Grattarola, L. Palchetti, C. Preiminger, D. De Rossi: "Langmuir Blodgett films of antibodies as mediators of endothelial cell adhesion on polyurethanes", J. Biomater. Sci. Polymer Edn. N. 3, vol. 10, pp.295-304, 1999.
5. D. De Rossi, A. Della Santa, A. Mazzoldi: "Dressware: wearable hardware", Material Science and Engineering C, C7, pp. 31-35, 1999.
6. R.H. Baughman, C. Changxing, A.A. Zakhidov, Z. Iqbal, J.N. Barisci, G.N. Spinks, G.G. Wallace, A. Mazzoldi, D. De Rossi, A.G. Rinzler, O. Jashinski, S. Roth, M. Kertesz: "Carbon nanotubes artificial muscles", Science vol. 284, pp.1340-1344, 21 May 1999.
7. D. De Rossi, P. Chiarelli, A. Mazzoldi: "Colloidal synthetic biology", Les Cahiers de Rheologie, vol. XVI, n. 3, pp. 13-19, 1999.
8. D. De Rossi, A. Della Santa, A. Mazzoldi: "Dressware: wearable hardware", Material Science and Engineering C,C7. 31-35, 1999.
9. R. Stella, G. Serra, D. De Rossi, J.N. Barisci, G.G. Wallace: "Detection of olive oil aroma by an electronic nose based on conducting polymer sensors", Sensors and Actuators B 63 (1-2), pp. 1-9, 2000.
10. Bicchi, D. De Rossi, E. P. Scilingo: "Haptic discrimination of softness in teleoperation: the role of the contact area spread rate", IEEE Trans. Rob & Autom. (accepted).

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Per il prossimo periodo si attende un forte incremento del lavoro in tutti gli ambiti ora descritti, specie in relazione al coinvolgimento in una serie di progetti internazionali.

Il lavoro sarà in particolare dedicato a migliorare le prestazioni degli attuatori, specie in termini di stress, strain e ciclabilità.

Nel caso dei sensori si cercherà di portare la tecnologia di realizzazione ad un livello pseudo-industriale e contemporaneamente verranno portate ad un livello superiore le prestazioni dei dimostratori prima elencati.

Per quanto riguarda le microdeposizioni continuerà la fase di sperimentazione e la produzione di nuovi campioni.

Collaborazioni internazionali in atto

Progetto Europeo con Università di Valladolid, Spagna

Progetto DARPA con Allied Signal, USA

Progetto Europeo in fase di presentazione con l'Università di Durham, UK, e scambio studenti

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Ellisometro, rheografo, potenziostato, spettrofotometro, microposizionatore a tre assi, analizzatore ottico multicanale.

Parole Chiave

Smart fabrics, tissue engineering, microfabrication, polymeric actuators, artificial sensing

UNITA' DI RICERCA INBB
Genova

Responsabile Scientifico
Prof. Di Zitti Ermanno

Linea di Ricerca

Nanotecnologie e Dispositivi Molecolari per l'elettronica

titolo

Nanoarchitetture organiche per l'elettronica e paradigmi computazionali

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Di Zitti Ermanno PA dizitti@dibe.unige.it

Non Aderenti INBB

Cincotti Silvano	PA	cincotti@dibe.unige.it
Parodi Mauro	PO	parodi_mauro@dibe.unige.it
Storace Marco	RU	storace@dibe.unige.it
Sbrana Francesca	DR	sbrana@dibe.unige.it
Parodi Maria Teresa	PT	mtp@dibe.unige.it
Ricci Davide	PT	davide@dibe.unige.it

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Ingegneria Biofisica ed Elettronica (DIBE) – Università di Genova.

Via Opera Pia 11A, 16145 GENOVA

010/3532788

010/3532777

dizitti@dibe.unige.ite-mail

Sezione INBB di appartenenza

Genova

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

- Conseguimento di metodi di assemblamento di reticoli di nanoparticelle di oro all'interno di film ultrasottili di molecole organiche di supporto e caratterizzazione tramite microscopia a sonda di scansione
- Realizzazione di monostrati di tioli su substrato di oro con tecniche di autoassemblamento
- Caratterizzazione elettrica di sistemi molecolari

Risultati ottenuti

L'unità di Genova si è impegnata a individuare e assemblare sperimentalmente plausibili strutture molecolari potenzialmente candidate per l'elaborazione molecolare dell'informazione.

E' stata impiegata la tecnica di Langmuir-Blodgett per realizzare sperimentalmente film ultrasottili a matrice organica che contenessero nanoparticelle di oro, da ingegnerizzare in una fase successiva in modo che dette nanoparticelle risultassero organizzate in strutture bidimensionali regolari.

Si è considerato un sistema fisico nel quale le nanoparticelle di oro siano accorpate in un film ultrasottile organico sfruttando le proprietà di autoordinamento di un film di Langmuir-Blodgett (LB). Tali film sono stati realizzati a partire da soluzioni contenenti molecole lipidiche di Dipalmitoil-fosfatidil-Etanolamina (DPPE) funzionalizzate con particelle di oro aventi diametro di 1.4 nm fornite dalla ditta Nanoprobes (Stony Brook, NY). Tutti i passi di preparazione dei film sono stati studiati e revisionati allo scopo di ottenere film che mostrassero separazione di fase tra matrice lipidica e DPPE-nanogold, avvalendosi della microscopia a forza atomica (AFM) come tecnica base di caratterizzazione morfologica. I substrati scelti per la deposizione dei film sono stati la mica e la grafite.

Sulla base delle caratteristiche di riproducibilità, omogeneità e morfologia dei film sono state individuate le procedure sperimentali idonee, i cui parametri più significativi sono stati il valore di frazione molare (0.4%) delle molecole di DPPE-nanogold e il fatto di lasciare che il film di Langmuir riposasse in vasca per 48h prima di procedere alla raccolta su substrato solido.

I film realizzati sono stati caratterizzati dal punto di vista morfologico mediante varie tecniche. La microscopia AFM è stata impiegata in modo sistematico su tutti i campioni realizzati, mentre la microscopia elettronica a scansione (SEM) è stata utilizzata su alcuni campioni sia a scopo di confronto con l'AFM sia per verificare la presenza delle strutture su lunghe distanze (dell'ordine del mm). Sono stati osservati domini di tipo frattale di diversa altezza, associabili alle zone con e senza DPPE-nanogold, e la loro identificazione è stata resa possibile dagli spettri di energia ottenuti col SEM, che hanno consentito di verificare la loro presenza dai picchi corrispondenti all'oro.

La segregazione delle molecole di DPPE-nanogold e la formazione dei domini è stata poi studiata raccogliendo film di Langmuir a diversi intervalli temporali. Tale indagine ha consentito di verificare che nelle prime fasi di formazione

del film si formano aggregati spessi (tipo multistrato) di DPPE-nanogold che col tempo diffondono per formare monostrati.

Inoltre la morfologia delle strutture appare simile su tutti i substrati impiegati, anche se la qualità dei film è migliore su quelli di mica. Non è stato possibile risolvere con AFM le singole particelle di oro. A questo scopo è stata effettuata una caratterizzazione mediante microscopia a trasmissione (TEM) che ha confermato l'organizzazione superficiale del film osservata con le altre tecniche e ha consentito inoltre di verificare che all'interno dei domini di DPPE-nanogold esiste un'organizzazione delle singole nanoparticelle sebbene non a forma di schiera regolare come si vorrebbe ottenere.

E' stata anche eseguita una caratterizzazione mediante microscopia ad effetto tunnel (STM) su alcuni film depositati su substrati di oro su quarzo allo scopo di risolvere le singole nanoparticelle di DPPE-nanogold. Per ottenere un substrato di oro adatto alla deposizione si è impiegata la tecnica del flame annealing, con la quale si sono formate terrazze monoatomiche di oro su distanze dell'ordine dei 100 nm. Con un'opportuna scelta dei parametri sperimentali STM si sono potute così osservare alcune nanoparticelle.

I risultati ottenuti sono stati significativi per quanto riguarda la preparazione di un film LB misto contenente nanoparticelle metalliche di oro da poter sfruttare per la realizzazione di un dispositivo dal comportamento elettrico non convenzionale, sebbene vi sia disuniformità di organizzazione delle nanoparticelle nei domini.

Allo scopo di esplorare un'alternativa valida alla tecnica LB, è stata avviata la realizzazione di monostrati di tipo autoassemblante (SAM) su oro, a partire da molecole di tioli e ditioli. I risultati ottenuti hanno dimostrato che possono essere ottenute strutture molecolari regolari e ci si propone di utilizzare i ditioli con le DPPE-nanogold per valutare la formazione di strutture regolari su substrato di oro, che consentirebbe anche un più facile sviluppo di un dispositivo e della sua caratterizzazione di tipo elettrico.

L'attività di ricerca ha riguardato inoltre la caratterizzazione elettrica di sistemi molecolari al fine di individuare dispositivi impiegabili in circuiti per il trattamento dei segnali su scala nanoscopica. Tale attività considera quale elemento basilare per la definizione di plausibili nanocircuiti un monostrato piano di molecole dipolari. Opportuni elettrodi metallici realizzano un sistema di I/O per il circuito molecolare potendo essere impiegati sia per applicare campi elettrici che per rilevare segnali elettrici. In assenza di campi elettrici esogeni, è stata verificata la possibilità per i dipoli del monostrato di organizzarsi spontaneamente in strutture regolari, mentre l'introduzione di un campo elettrico esogeno ha evidenziato la presenza di comportamenti isteretici. Semplici circuiti molecolari 2- e 3-porte hanno consentito inoltre di studiare le fondamentali relazioni ingresso/uscita. In particolare, i sistemi 2-porte (un elettrodo di ingresso ed uno di uscita) hanno mostrato una relazione ingresso/uscita di tipo sigmoidale con isteresi, in cui la tensione di uscita risulta in relazione proporzionale alla polarizzazione dei dipoli del monostrato. Nel caso di sistemi 3-porte (due elettrodi di ingresso ed uno di uscita) i circuiti molecolari hanno esibito un comportamento logico del tipo NOR-Esclusivo.

Il modello precedentemente sviluppato è stato poi perfezionato al fine di introdurre il rumore termico nelle equazioni del sistema. È stata adottata la formulazione di Langevin e sono stati valutati i principali effetti del rumore sulle prestazioni dei circuiti molecolari. Ogni dipolo elettrico è infatti soggetto, a temperatura ambiente, a urti casuali che potrebbero alterare le caratteristiche e prestazioni dei dispositivi 2- e 3-porte studiati in precedenza. I risultati ottenuti hanno messo in luce un comportamento sufficientemente robusto del rapporto segnale/rumore per il sistema 2-porte. In particolare, è stata verificata una condizione di risonanza stocastica, ovvero la presenza di un massimo nel rapporto segnale/rumore ad un livello non nullo del rumore termico. Tale fenomeno potrebbe svolgere un ruolo di primo piano nella individuazione delle condizioni operative ottimali per i circuiti molecolari. Infine è stata studiata la possibilità di propagazione solitonica in schiere dipolari, che potrebbe essere utile per la comunicazione a lungo raggio con ridotte perdite in circuiti molecolari complessi. I risultati conseguiti hanno messo in luce condizioni di esistenza per onde del tipo "kink-soliton" note in letteratura che potrebbero permettere di individuare sistemi di connessione ad alta efficienza.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000

Bonfiglio A., Parodi M.T., Di Zitti E. and Ruggeri G.: "Langmuir-Blodgett films made by Pyrrole derivatives polymeric mixtures". *4th Eur. Conf. on Molecular Electronics ECME '97*, Cambridge, UK, September 7-10, 1997.

Di Zitti E., Parodi M.T., Bonfiglio A. and Chiabrera A.: "Langmuir-Blodgett films of pyrrole derivatives: electrical characterization by microelectronic test structures for sensor applications". *In Artificial and Natural Perception*, C. Di Natale, A. D'Amico, F. Davide Eds.; World Scientific Publ, Singapore, pp. 143-147, 1997.

Cincotti S., Chiabrera A., M. Parodi, "Reproducing Classical Logic Functions Through Elementary Molecular Processors", *Proc. ISTET'97*, pp.427-430, Palermo, 9-11 Jun. 1997.

Cincotti S., Chiabrera A., Parodi M., Storace M., "Molecular Microsystems for Molecular Processing of Information", in *Artificial and Natural Perception*, C. Di Natale, A. D'Amico, F. Davide (Eds.), pp. 104-108, World Scientific Publ., Singapore, 1997.

Bonfiglio A., Di Zitti E., Parodi M.T., Bianco B. and Ruggeri G.: "Investigation of the conductivity properties of LB films of pyrrole derivatives for sensor applications". *Materials Science & Engineering C: Biomimetic Materials, Sensors and Systems*, vol. 5, pp. 251-254, 1998.

Parodi M.T., Rocchia W., Chiabrera A., Di Zitti E., Ricci D., "Structural properties of mixed ultrathin organic films investigated by scanning probe microscopy", in *Sensors and Microsystems*, C. Di Natale, A. D'Amico, F. Davide Eds World Scientific Publ, Singapore, pp.181-185, 2000.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

- Definizione di un modello di circuito molecolare multiporta basato su monostrati piani di molecole dipolari operanti in condizioni di rumore termico;
- Messa a punto di tecniche di assemblamento controllato di punti quantici costituiti da matrici di nanoparticelle metalliche.
- Valutazione delle prestazioni di circuiti molecolari al variare del rumore termico.
- Valutazione della possibilità di propagazione solitonica in schiere molecolari di dipoli
- Conseguimento di metodi di autoassemblamento di nanoparticelle in reticoli bidimensionali tramite interazione con molecole funzionali e loro caratterizzazione tramite microscopia a sonda di scansione.
- Simulazione su macchine a elevata efficienza computazionale di schiere molecolari di grandi dimensioni
- Valutazione a confronto delle strutture a punti quantici ottenute e loro caratterizzazione da un punto di vista elettronico.

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

- laboratori di nanotecnologie ed elettronica molecolare
- strumentazione per la fabbricazione di film sottili (tra cui 1 trough Langmuir-Blodgett KSV 5000 in camera pulita)
- strumentazione per la caratterizzazione dei film molecolari:
 - Microscopio AFM Park Instruments Autoprobe CP
 - Microscopio AFM/STM Park Instruments Universal
 - Elettrometro Keithley

Parole Chiave

Elettronica molecolare, nanostrutture, superreticolo, schiera di dipoli

UNITA' DI RICERCA INBB
Milano

Responsabile Scientifico
Prof. Faelli Alide

Linea di Ricerca

Biosistemi e Bioregolazioni

titolo

Trasportatori, canali ionici e canali per l'acqua (acquaporine) in membrane di cellule non eccitabili (cellule epiteliali).

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Faelli Alide	P.O.	Alide.faelli@unimi.it
Meyer Giuliano.	P.A	Giuliano.meyer@unimi.it
Orsenigo Maria Novella	P.A	Novella.orsenigo@unimi.it
Bottà Guido	R.U.	Guido.botta@unimi.it
Porta Cristina	R.U.	Cristina.porta@unimi.it

Non Aderenti INBB

Tosco Marisa	PT *	Marisa.tosco@unimi.it
Bazzini Claudia	PT	Claudia.bazzini@unimi.it

Sede Unità di Ricerca

Laboratorio di Fisiologia dei Trasporti, sez Fisiologia Generale, Dipartimento di Fisiologia e Biochimica Generali, Università degli Studi di Milano, Via Celoria 26, Milano
02 70644706 02.70644702 Alide.faelli@unimi.it

Sezione INBB di appartenenza

Milano

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Si sono volute caratterizzare negli epitelii varie forme molecolari di trasporto degli ioni. In complesso si sono voluti studiare: 1) Trasporti elettricamente neutri quali il simporto $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ (presente sulle membrane apicali) e l'antiporto $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (presente sulle membrane apicali e/o sulle membrane basolaterali) coinvolti negli assorbimenti transepiteliali.; 2) Trasporti (canali) conduttivi per il Cl^- coinvolti nelle secrezioni transepiteliali. Lo studio di trasportatori anionici in membrane plasmatiche basolaterali digiunali e loro espressione in oociti è stato tra gli obiettivi specifici. Durante l'assorbimento intestinale, attraverso le membrane degli enterociti si verificano cospicui movimenti di acidi e di basi. Nell'enterocita digiunale di ratto, a livello basolaterale, sono stati evidenziati uno scambio Na^+/H^+ , uno scambio $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ e una conduttanza al HCO_3^- . Si è voluto valutare il ruolo dello scambio $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ digiunale che presenta caratteristiche funzionali atipiche. Dato che gli enterociti digiunali producono molto acido lattico si è cercato anche d'identificare il meccanismo con cui il lattato attraversa la membrana basolaterale. Si è voluto inoltre caratterizzare in epitelio di cistifellea di coniglio l'accoppiamento, elettricamente neutro, del trasporto di Cl^- a quello del Na^+ verificando in particolare i meccanismi dell'azione inibitoria del diuretico idroclorotiazide (HCTZ). Alcuni canali per il Cl^- sono stati studiati in relazione ad epitelii secernenti (cistifellea di cavia, epitelio respiratorio umano).

Risultati ottenuti

Sono state utilizzate varie metodologie (misure radiochimiche di flussi ionici, misure elettrofisiologiche, tecniche di biologia molecolare) applicate ad epitelii isolati in vitro, a cellule in coltura, a membrane isolate. La sensibilità dello scambiatore $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ digiunale al pH è stata valutata concludendo che il ruolo di tale scambiatore nell'omeostasi del pH è ridotto. Nelle membrane basolaterali di enterocita si è evidenziato anche un cotrasportatore protone-lattato che è stato caratterizzato per quanto riguarda la specificità, la sensibilità ad inibitori ed i parametri cinetici: esso è stato anche espresso funzionalmente in oociti. Il trasportatore ha un'elevata omologia con l'isoforma MCT1 (famiglia dei trasportatori di monocarbossilati). I due sistemi in esame si influenzano, cooperando nel mantenimento dei gradienti di pH e di $[\text{HCO}_3^-]$ attraverso la membrana. In epitelio di cistifellea di coniglio è stato dimostrato che il simporto $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ è sensibile alla tiazidi come le forme renali. Membri della famiglia dei cotrasportatori catione-cloruro sono stati identificati (mediante RT-PCR) anche in cistifellee bovine. In epitelio di cistifellea di coniglio sia l'HCTZ che altre sostanze sono in grado di inibire lo scambiatore $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ determinando anche l'attivazione di uno stesso canale anionico. Essendo tale conduttanza abolita da altri inibitori noti dello scambiatore anionico, è probabile che essa sia intrinseca a tale scambiatore. In cellule epiteliali di cistifellea di cavia è stata evidenziata la presenza di due diversi canali per il Cl^- : l'attività del primo canale (18 pS) non è incrementata dai livelli cellulari di cAMP mentre l'attività del secondo canale (3 pS) lo è fortemente indicando un suo coinvolgimento nei processi secretivi.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000

- ORSENIGO M.N., TOSCO M., LAFORENZA U., FAELLI A. (1997) Facilitated transport of lactate by rat jejunal enterocyte. *J. Membrane Biol.* 158, 257-264.
- FAELLI A., ORSENIGO M.N., VERRI A., TOSCO M. (1998) Cl/HCO₃ antiport affects H-lactate symport activity at the basolateral pole of jejunum enterocyte. *Cell. Physiol. Biochem.* 8, 151-157.
- TOSCO M., ORSENIGO M.N., GASTALDI G., FAELLI A. (1998) pH dependence of Cl/HCO₃ exchanger in the rat jejunal enterocyte. *Biochim. Biophys. Acta* 1372, 323-330.
- ORSENIGO M.N., TOSCO M., BAZZINI C., LAFORENZA U., FAELLI A. (1999) A monocarboxylate transporter MCT1 is located at the basolateral pole of rat jejunum. *Exp. Physiol.* 84, 1033-1042.
- TOSCO M., ORSENIGO M.N., GASTALDI G., FAELLI A. (2000) An endogenous monocarboxylate transport in *Xenopus laevis* oocytes. *Am. J. Physiol.* 278, R1190-R1195.
- MEYER G., DOPPIERIO S., DAFFONCHIO L., CREMASCHI D. (1997) S-Carbocysteine-lysine salt monohydrate and cAMP cause non-additive activation of the cystic fibrosis transmembrane regulator channel in human respiratory epithelium. *FEBS letters* 404, 11-14.
- MEYER G., BOTTA' G., CREMASCHI D. (1997) Stimulation by enkephalins of D-glucose absorption in rabbit ileum. *CMLS* 53, 769-765
- GSCHWENTNER M., FURST J., RITTER M., BAZZINI C., WOLL E., DIENSTL A., JAKAB M., KONIG M., SCANDELLA E., RUDZKI J., BOTTA' G., MEYER G., LANG F., DEETJEN P., PAULMICHL M. (1999) ICln, an anion channel-forming protein associated with cell volume regulation. *Exp. Physiol.* 84, 1023-1031.
- FUERST J., BAZZINI C., JAKAB M., MEYER G., KOENIG M., GSCHWENTER M., RITTER M., SCHMARDA A., BOTTA' G., BENZ R., DEETJEN P., PAULMICHL M. (2000) Functional reconstitution of ICln in lipid bilayer. *Pflügers Arch.* 440, 100-115
- CREMASCHI D., PORTA C., BOTTÀ G., BAZZINI C., GARAVAGLIA M. (2000) Apical Na⁺-Cl⁻ symport in rabbit gallbladder epithelium: a thiazide-sensitive cotransporter (TSC). *J. Membrane Biol.* 176, 53-65.
- MEYER G., PORTA C., GARAVAGLIA M., CREMASCHI D. (2000) Inhibitors of the Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger activate an anion channel with similar features in the epithelial cells of rabbit gallbladder: patch clamp analysis. *Pflügers Arch.* in press.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

In relazione al ruolo che i trasporti di ioni ed acqua nelle cellule epiteliali possono svolgere sia nell'omeostasi iono-osmotica che nei trasporti transepiteliali gli obiettivi specifici per le ricerche future sono: 1) Caratterizzazione e modulazione di trasportatori anionici importanti nel trasporto transepiteliale di bicarbonato e lattato. 2) Studio del ruolo e del rapporto struttura-funzione di proteine (canali anionici quali ICln, canali per l'acqua-acquaporine, simporti Na⁺-Cl⁻ e Na⁺-2Cl⁻-K⁺, antiporto Cl⁻/HCO₃⁻) coinvolte nella regolazione del volume cellulare.

Collaborazioni internazionali in atto

Prof. Markus Paulmichl (P.A.) , Prof. Martin Gschwentner (P.A.) :Department of Physiology, University of Innsbruck, Fritz-Pregl-Str. 3, A-6020 Innsbruck, Austria.

Prof. Brian J. Harvey (P.O.) , Wellcome Trust Cellular Physiology Research Unit, Department of Physiology, University College Cork, Ireland

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

- Attrezzature per laboratorio di radiochimica: 2 spettrometri a scintillazione.
- Attrezzature per laboratorio di biochimica: supercentrifuga, ultracentrifuga, centrifughe da banco, spettrofluorimetri, fluorimetro, HPLC.
- Attrezzature per misure elettrofisiologiche: 1 unità di patch-clamp, 2 unità di elettrofisiologia per misure con microelettrodi convenzionali e selettivi.
- Attrezzature per laboratorio di biologia e fisiologia molecolare: termocycler per RT-PCR, unità elettroforetiche, autoclave, incubatore, laboratorio per colture cellulari, microscopio confocale UV laser.

Parole Chiave

Antiporto Cl⁻/HCO₃⁻, trasportatore H⁺-lattato, canali anionici, acquaporine, simporti Na⁺-Cl⁻ e Na⁺-2Cl⁻-K⁺.

UNITA' DI RICERCA INBB
Milano

Responsabile Scientifico
Prof. Ferruccio Fazio

Linea di Ricerca

Neurologia funzionale, Neuroscienze Cognitive

titolo

Applicazioni delle neuroimmagini funzionali

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Fazio Ferruccio	PO	fazio@mednuc.hsr.it
Gilardi Maria Carla	PA	chicca@mednuc.hsr.it
Messa Cristina	RU	cmessa@mednuc.hsr.it
Lucignani Giovanni	PO	giannil@mednuc.hsr.it
Moresco Rosa Maria	PT	Rosam@mednuc.hsr.it

Non Aderenti INBB

Perani Daniela	A	danielap@mednuc.hsr.it
Siri Simona	BC	simonas@mednuc.hsr.it
Anchise Davide	BC	
Abulatebi Jubin	BC	jubina@numerica.it
Tettamanti Marco	BC	marcot@mednuc.hsr.it
Paulesu Eraldo	PA	epaulesu@zeus.hsr.it
Calautti Cinzia	BC	cinziac@mednuc.hsr.it

Sede Unità di Ricerca

Servizio di Medicina Nucleare – Istituto Scientifico H S.Raffaele, Università di Milano-Bicocca, CNR-INB.

Edificio LITA, via Fratelli Cervi 93 Segrate

02-26432716o

02-26415202x

fazio@mednuc.hsr.it/

Sezione INBB di appartenenza

Milano

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

L'attività svolta ha riguardato lo studio del funzionamento del sistema nervoso centrale con l'utilizzo dei metodi PET a riposo e di attivazione e le tecniche fMRI. In particolare le ricerche hanno riguardato:

- A) lo studio delle basi funzionali delle attività cognitive e dei sistemi sensorimotori con tecniche di "attivazione" che, valutando le modificazioni di parametri funzionali cerebrali come il flusso ematico indotte dall'esecuzione di compiti cognitivi e cognitivi-motori, sono in grado di mappare le regioni cerebrali responsabili dell'attività mentale studiata. Lo studio PET delle basi neurologiche del linguaggio è stato particolarmente indagato mediante attivazione con compiti linguistici in soggetti normali. A livello generale, gli esperimenti nei soggetti normali hanno dimostrato in modo diretto l'esistenza di circuiti di multiple aree cerebrali, associati ai differenti livelli funzionali di elaborazione linguistica. Altre ricerche erano focalizzate allo studio delle rappresentazioni cerebrali di lingue differenti in poliglotti o bilingui e in particolare allo studio degli correlati neurofunzionali dell'età di acquisizione della seconda lingua e dei livelli di padronanza.
- B) Nell'ambito della neurologia funzionale i diversi progetti di ricerca, pur articolandosi in protocolli con fini differenti, riguardavano lo studio delle correlazioni clinico/funzionali di selezionate patologie del sistema nervoso centrale. Le metodiche di neuroimaging PET e fMRI sono state applicate anche allo studio di pazienti con demenze o lesioni in cui, specifici deficit neuropsicologici clinicamente evidenti e quantificabili, sono stati utilizzati come modello per mappare la sede della funzione cognitiva compromessa. Si è evidenziato un coinvolgimento funzionale di molteplici, differenti aree cerebrali per specifiche funzioni cognitive. Altre ricerche hanno riguardato lo studio della ri-organizzazione funzionale cerebrale dopo lesione cerebrovascolare e dopo recupero della funzione cognitiva menomata con studi di attivazione PET e fMRI.

Risultati ottenuti

I risultati delle ricerche sono stati tutti oggetto di pubblicazione su riviste indicizzate. Gli obiettivi e le ricadute delle conoscenze acquisite si sono tradotti in elementi essenziali per la ricerca nell'ambito dei sistemi cognitivi e dei loro deficit in presenza di patologia neurologica e psichiatrica. La applicazione dei risultati nella pratica clinica ha riguardato protocolli diagnostici.

Lo studio delle funzioni cognitive nel soggetto normale, ha avuto come principali ricadute lo sviluppo di modelli del funzionamento cognitivo normale applicabili anche alla interpretazione delle modificazioni indotte dalla patologia e dall'invecchiamento fisiologico. Questi dati normativi hanno anche consentito l'interpretazione delle modificazioni indotte dalla patologia e la valutazione dei risultati di trattamenti riabilitativi.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000

- 3) Cappa SF, Perani D, Grassi F, Bressi S, Alberoni M, Franceschi M, Bettinardi V, Todde S, Fazio F. A PET follow-up study of recovery after stroke in acute aphasics. *Brain Lang*, 1997; 56: 55-67.
- 4) Cortelli P, Perani D, Parchi P, Grassi F, Montagna P, Demartin M, Castellani R, Tinuper P, Gambetti P, Lugaresi E, Fazio F. Regional cerebral metabolism in fatal familial insomnia: a correlation study with neuropathology. *Neurology*, 1997; 49: 126-133.
- 5) Paulesu E, Goldacre B, Scifo P, Cappa SF, Gilardi MC, Perani D, Fazio F. Functional heterogeneity of left inferior frontal cortex as revealed by fMRI. *NeuroReport*, 1997; 8: 2011-2016.
- 6) Decety J, Greize J, Perani D, Costes N, Grassi F, Jeannerod M, Fazio F. Brain activity during observation of actions. Influence of action content and subject's strategy. *Brain*, 1997; 10:1763-1778.
- 7) D Perani, E Paulesu, N Sebastian Galles, E Dupoux, S Dehaene, V Bettinardi, SF Cappa, F Fazio, J Mehler. The bilingual brain: proficiency and age of acquisition of the second language. *Brain*, 1998; 121: 1841-1852.
- 8) Pizzamiglio L, Perani D, Cappa SF, Vallar G, Paolucci S, Grassi F, Paulesu E, Fazio F. Recovery of neglect after right hemispheric damage. A H215O PET activation study. *Arch. Neurol*, 1998; 55: 561-568.
- 9) D Perani, T Schnur, M Tettamanti, M Gorno-Tempini, SF. Cappa, F Fazio. Word and picture matching: a PET study of semantic category effects. *Neuropsychologia*, 1999; 37, 293-306.
- 10) Herholz K, Nordberg A, Salmon E, Perani D, Kessler J, Mielke R, Halber M, Jelic V, Almkvist O, Collette F, Alberoni M, Kennedy A, Hasselbalch S, Fazio F, Heiss W-D Impairment of neocortical metabolism predicts progression in Alzheimer's disease. *Dementia & Geriatric Cognitive Disorders* 1999; 10, 494-504.
- 11) D. Perani, S.F Cappa, T. Schnur, M. Tettamanti, S. Collina, M. Rosa, F. Fazio. The neural correlates of verbs and nouns processing: a PET study. *Brain* 1999 Dec;122(12):2337-2344
- 12) G. Meola, V. Sansone, D. Perani, A. Colleluori, S. Cappa, M. Cotelli, F. Fazio, CA. Thornton, RT Moxley. Cognitive, brain MRI and PET studies in proximal myotonic myopathy and myotonic dystrophy. *Neurology* 1999 22;53(5):1042-50
- 13) E. Paulesu, E. McCrory, F. Fazio, L. Menoncello, N. Brunswick, S.F. Cappa, M. Cotelli, G. Cossu, F. Corte, M. Lorusso, S. Pesenti, A. Gallagher, D. Perani, C. Price, C.D. Frith, U. Frith. A cultural effect on brain function. *Nature Neuroscience*; 2000; 3 (1): 91-95

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Nell'ambito dello studio dei modelli in neurologia e psichiatria, un importante aspetto delle ricerche riguarderà ancora lo studio con metodi di neuroimmagine funzionale dei circuiti neuronali che sottendono una specifica funzione cognitiva e/o comportamentale e le sue modificazioni in caso di patologia neurologica o psichiatrica. Inoltre verranno introdotti protocollo di studio dei sistemi di neurotrasmissione cerebrale. Ciò permetterà di individuare le caratteristiche morfo- funzionali e neurochimiche (i.e. neurotrasmettitori) alla base dei correlati neurofisiologici di un determinato processo cognitivo e comportamentale. Le principali ricadute saranno lo sviluppo di modelli delle basi neurali dei processi cognitivi e comportamentali applicabili allo studio dei meccanismi di recupero e modificazione indotti da procedure riabilitative o farmacologiche.

Collaborazioni internazionali in atto

University Neurology Department and Max Planck Institute, Koln (D)

Department of Cognitive Neuroscience MIT, Boston (USA)

Laboratoire de Sciences Cognitives et Psycholinguistique-CNRS, Paris (F)

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

GE Advance PET, MRI GE Signa, SUN workstations

Parole Chiave

neuroscienze cognitive, neuroimmagini, neurologia, parametri funzionali cerebrali

UNITA' DI RICERCA INBB
Bologna

Responsabile Scientifico
Prof. Galletti Claudio

Linea di Ricerca

Meccanismi cerebrali coinvolti nel controllo visuomotorio

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Galletti Claudio	PO	galletti@alma.unibo.it
Battaglini Piero Paolo	PA	battagli@univ.trieste.it

Non Aderenti INBB

Fattori Patrizia	RU	Pfattori@biocfarm.unibo.it
------------------	----	----------------------------

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Fisiologia umana e generale - Università di Bologna - Piazza di Porta S. Donato 2, 40127 – Bologna

051-248833

051-251731

E-mail galletti@alma.unibo.it

Sezione INBB di appartenenza

Bologna

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Gli obiettivi della presente ricerca erano molteplici ma, nell'insieme, volti a scoprire il ruolo svolto dalla corteccia parieto-occipitale mediale nel processo di integrazione visuomotoria che si attua durante l'esecuzione di atti motori diretti verso oggetti presenti nel campo visivo.

Risultati ottenuti

La presente ricerca ha confermato l'esistenza, nella corteccia parieto-occipitale della scimmia, di neuroni visivi la cui attività bioelettrica è modulata dalla direzione dello sguardo. Si è dimostrata l'esistenza di neuroni attivabili da stimoli visivi solo, o prevalentemente, quando l'animale guardava in determinate direzioni; sono stati attentamente valutati tutti i gain fields dei neuroni studiati. E' stata anche riscontrata l'esistenza di neuroni con campo recettivo organizzato in coordinate spaziali anzichè retinotopiche. Infine, si è visto che anche l'attività spontanea dei neuroni non visivi della corteccia parieto-occipitale era modulata dalla direzione dello sguardo. Si è riscontrata anche la presenza, in questa regione cerebrale, di neuroni non visivi attivati dall'attività somatomotoria e/o sensibili alla stimolazione somatosensoriale. La maggior parte di questi neuroni somatomotori erano modulati in piu' fasi dell'atto motorio volto a raggiungere un oggetto.

La presenza di questi neuroni attivati selettivamente dai movimenti di raggiungimento, insieme alla co-presenza in quest'area di neuroni visivi in grado di codificare le caratteristiche di un oggetto visivo e a neuroni specializzati nella codifica spaziale dell'informazione visiva suggerisce che la regione studiata possieda l'intero sistema neuronale necessario per controllare, ed eventualmente concorrere a correggere, i movimenti compiuti dalle braccia per raggiungere un oggetto nello spazio extrapersonale.

L'analisi delle caratteristiche funzionali dei neuroni della corteccia parieto-occipitale mediale ha rivelato la presenza, in questa regione cerebrale, di 2 aree funzionalmente distinte, da noi denominate aree V6 e V6A. La costruzione di mappe bidimensionali del mantello corticale contenenti la localizzazione dei neuroni con caratteristiche funzionali diverse ci ha consentito di rilevare l'esatta localizzazione ed estensione delle aree V6 e V6A. E' stata anche descritta l'organizzazione visuotopica della corteccia visiva associativa: mentre la V6 e' organizzata retinotopicamente, la V6A pare sprovvista di ogni organizzazione topografica.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000

Battaglini P.P., Galletti C. and Fattori P. (1997) Neuronal coding of visual space in the posterior parietal cortex. *Exp. Brain Res.*, **25**: 539-553.

Galletti C., Fattori P., Kutz D.F. and Battaglini P.P. (1997) Arm movement-related neurons in the visual area V6A of the macaque superior parietal lobule. *Eur. J. Neurosci.*, **9**: 410-413.

Galletti C., Battaglini P.P. and Fattori P. (1997) The posterior parietal cortex in humans and monkeys. *News Physiol. Sci.*, **12**:166-171.

Battaglini P.P., Galletti C. and Fattori P. (1997) Coding of Space Locations in the Posterior Parietal Cortex. In: *The Association Cortex, Structure and Function*. Sakata H., Mikami A., Fuster J.M. (eds), pp 163-174. Harwood academic Publishers.

Matelli M., Govoni P., Galletti C., Kutz D.F. and Luppino G. (1998) Superior area 6 afferents from the superior parietal lobule in the macaque monkey. *J. Comp. Neurol.*, **402**: 327-352.

Galletti C., Fattori P., Gamberini M., and Kutz D.F. (1999) Brain location and visual topography of cortical area V6A in the macaque monkey. *Eur. J. Neurosci.* **11**: 575-582.

Galletti C., Fattori P., Gamberini M., and Kutz D.F. (1999) The cortical visual area V6: brain location and visual topography. *Eur. J. Neurosci.* **11**: 3922-3936.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

La presente ricerca ha come obiettivo principale la verifica dell'ipotesi che l'area corticale V6A sia coinvolta nel processo di coordinazione visuomotoria che interviene quando si vogliono raggiungere con la mano oggetti presenti nel proprio spazio visivo peripersonale. Per raggiungere tale risultato, tenuto conto delle conoscenze scientifiche su questo tema, si studieranno gli effetti sull'attività bioelettrica di cellule dell'area V6A dei movimenti degli arti superiori diretti verso oggetti posti in posizioni diverse dello spazio peripersonale. Gli esperimenti saranno condotti sia alla luce che al buio, per controllare quanta parte della modulazione della attività cellulare osservata durante i movimenti di prensione sia dovuta alla stimolazione visiva autoindotta dal movimento dell'arto nel proprio campo visivo. Verranno anche analizzati gli effetti sull'attività delle cellule V6A dell'interazione oculo-manuale e dell'attenzione visuo-spaziale durante i tests di prensione.

Collaborazioni internazionali in atto

Dept. of Anatomy, University College, Londra, UK (Prof. S. Zeki)
Institut des Sciences Cognitives, INSERM, Bron, F (Dr. S. Ben-Hamed)

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Laboratorio completo per registrazione da singole cellule nell'animale sveglio
Sistema computerizzato di analisi dati elettrofisiologici
Sistema computerizzato di dati anatomici con ricostruzioni tridimensionali del cervello

Parole Chiave

Neurofisiologia; coordinazione visuomotoria; visione; elettrofisiologia; processi corticali associativi

UNITA' DI RICERCA INBB
Milano

Responsabile Scientifico

Prof.ssa Maria Carla Gilardi

Linea di Ricerca

Fisica delle Bioimmagini

titolo

Tomografia ad emissione di positroni

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Fazio Ferruccio	PO	fazio@mednuc.hsr.it
Gilardi Maria Carla	PA	chicca@mednuc.hsr.it

Non Aderenti INBB

Bettinardi Valentino	A	vale@mednuc.hsr.it
Rizzo Giovanna	A	gio@mednuc.hsr.it
Savi Annarita	A	annas@mednuc.hsr.it
Scifo Paola	A	paolas@mednuc.hsr.it
Castiglioni Isabella	A	isabc@mednuc.hsr.it
Scandella Massimo	BC	isabc@mednuc.hsr.it

Sede Unità di Ricerca

Servizio di Medicina Nucleare – Istituto Scientifico H S.Raffaele, Università di Milano-Bicocca, CNR-INB.

Edificio LITA, via Fratelli Cervi 93 Segrate

02-26432716

02-26415202

fazio@mednuc.hsr.it

Sezione INBB di appartenenza

Milano

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Obiettivo generale della linea di ricerca è lo studio degli aspetti fisici nella formazione e quantificazione di immagini funzionali di Tomografia ad Emissione di Positroni (PET). La ricerca riguarda la tecnica PET in modalità tridimensionale (PET 3D). La ricerca si articola in diversi progetti: a) metodi di correzione per la attenuazione delle radiazioni; b) metodi statistici Monte Carlo per la simulazione di tomografi PET e sorgenti radioattive; c) metodi di ricostruzione tomografica; d) metodi di analisi delle immagini PET.

Risultati ottenuti

- metodi di correzione per la attenuazione delle radiazioni. E' stata sviluppata una tecnica automatica di 'clustering' che permette di classificare le immagini trasmissive, utilizzate per la correzione per l'attenuazione delle immagini PET, nelle principali componenti. La tecnica consente una riduzione della propagazione di rumore dai dati trasmissivi alle immagini PET, una riduzione del tempo di acquisizione dei dati trasmissivi, una riduzione della dose al paziente.
- metodi Monte Carlo. E' stato sviluppato un pacchetto software di simulazione Monte Carlo, in grado di modellare in modo parametrico tomografi PET a geometria cilindrica in assetto 3D. Il metodo Monte Carlo è stato utilizzato per valutare la accuratezza di tecniche di correzione per la radiazione e per ottimizzare le condizioni di acquisizione, in particolare rispetto alla finestra di discriminazione energetica.
- metodi di ricostruzione. In collaborazione con l'Istituto H S.Raffaele, nell'ambito del progetto EEC ESPRIT, PARAPET, sono state implementate su calcolatore a piattaforma parallela tecniche di ricostruzione tridimensionale analitiche e iterative. E' stata raccolta una libreria di dati PET 3D, rappresentativi di diverse situazioni cliniche, utilizzata per la valutazione delle prestazioni dei diversi algoritmi e per la loro ottimizzazione.
- metodi di analisi delle immagini PET. E' stata sviluppata una procedura per l'analisi automatica di immagini PET con ¹⁸F-Fluoroetilspiperone, tracciante che permette la caratterizzazione del sistema dopaminergico e serotoninergico. La procedura, basata sul metodo SPM (Statistical Parametric Map), ha permesso la creazione di un template funzionale di distribuzione del tracciante da usare come sistema di riferimento spaziale standard nell'analisi.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000

1. Paulesu E, Goldacre B, Scifo P, Cappa SF, Gilardi MC, Castiglioni I, Perani D, Fazio F. Functional heterogeneity of left inferior frontal cortex as revealed by fMRI. *Neuroreport* 1997; 8(8):2011-2016.
2. Rizzo G, Scifo P, Gilardi MC, Bettinardi V, Grassi F, Cerutti S, Fazio F. Matching a computerized brain atlas to multimodal medical images. *Neuroimage*, 1997; 6 (1): 59-69.
3. Varga J, Bettinardi V, Gilardi MC, Riddell C, Castiglioni I, Rizzo G, Fazio F. Evaluation of pre- and post-reconstruction count-dependent Metz filters for brain PET studies. *Med Phys*, 1997; 24(9): 1431-1440.
4. Gilardi MC, Rizzo G, Savi A, Landoni C, Bettinardi V, Rossetti C, Striano G, Fazio F. Correlation of SPECT and PET cardiac images by a surface matching registration technique. *Comput Med Imaging Graph* 1998; 22 (5): 391-398.
5. Bettinardi V, Pagani E, Gilardi MC, Landoni C, Riddell C, Rizzo G, Castiglioni I, Belluzzo D, Schubert S, Lucignani G, Fazio F, An automatic classification technique for attenuation correction in positron emission tomography, *Eur J Nucl Med*, 1999; 26 (5):447-458.
6. Landoni C, Lucignani G, Paolini G, Zuccari M, Galli L, Di Credico G, Rossetti C, Pelenghi S, Gilardi MC, Fazio F, Grossi A. Assessment of CABG-related risk in patients with CAD and LVD. Contribution of PET with [18F]FDG to the assessment of myocardial viability. *J Cardiovasc Surg*; 1999, 40 (3):363-72.
7. Landoni C, Gianolli L, Lucignani G, Magnani P, Savi A, Travaini L, Gilardi MC, Fazio F. Comparison of dual-head coincidence PET VS ring PET in tumor patients. *J Nucl Med*, 1999; 40 (10):1617-1622
8. Magnani P, Carretta A, Rizzo G, Fazio F, Vanzulli A, Lucignani G, Zannini P, Messa C, Landoni C, Gilardi MC, Del Maschio A. FDG/PET and spiral CT image fusion for mediastinal lymph node assessment of non-small cell lung cancer patients. *J Cardiovasc Surg* 1999; 40 (5):741-8
9. Castiglioni I, Cremonesi O, Gilardi MC, Bettinardi V, Rizzo G, Bellotti E, Fazio F. Scatter correction techniques in 3D PET: a Monte Carlo evaluation. *IEEE Trans Nucl Sci NS*, 1999,
10. Tortorella C, Viti B, Bozzali M, Sormani MP, Rizzo G, Gilardi MC, Comi G, Filippi M. A magnetization transfer histogram study of normal-appearing brain tissue in MS. *Neurology* 2000; 54:186-193

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

La linea di ricerca durante i prossimi tre anni è intesa come proseguo della attuale e si articolerà nei seguenti progetti di ricerca nell'ambito della tecnica PET 3D:

12. sviluppo di metodi di correzione per la radiazione diffusa, in particolare in studi a livello del torace e dell'addome;
13. utilizzo di metodi Monte Carlo per la determinazione delle condizioni ottimali di acquisizione per un nuovo tomografo PET a cristalli NaI(Tl);
14. sviluppo e valutazione di algoritmi di ricostruzione iterativi, come proseguo del progetto PARAPET;
15. sviluppo di metodi di analisi delle immagini, con particolare riferimento a sviluppo di modelli di cinetica dei traccianti radioattivi

Collaborazioni internazionali in atto

Hospital Physicist, Turku PET Centre, Turku University Central Hospital, Turku (Finland)

MRC Cyclotron Unit, Hammersmith Hospital, Du Cane Road, London (UK)

Hopitaux Universitaires du Genève, Division de Médecine Nucléaire, Hôpital Cantonal, Geneve (CH)

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Tomografo PET ADVANCE (General Electric)

Tomografo PET CPET (ADAC)

Laboratorio di elaborazione immagini (rete di stazioni SUN, PC e MAC)

Parole Chiave

Tomografia ad emissione di positroni (PET), Ricostruzione, Monte-Carlo, modelli, scatter, attenuazione

UNITA' DI RICERCA INBB
Napoli

Responsabile Scientifico
Prof. Alfonso Giovane

Linea di Ricerca

Il controllo delle attività enzimatiche nel metabolismo delle pectine. Applicazioni biotecnologiche.

titolo

Caratteristiche strutturali e funzionali di un inibitore dell'enzima pectina metilesterasi.

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Balestrieri Ciro PO Ciro.Balestrieri@unina2.it

Non Aderenti INBB

Coppola Mario PT
Longobardi Lara DR Laralong@tin.it
Castaldo Domenico A

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Biochimica e Biofisica Seconda Università degli studi di Napoli

Via Costantinopoli 16, 80138 Napoli

081-5665856

081-5665863

Alfonso.Giovane@unina2.it

Sezione INBB di appartenenza

Napoli

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Nei laboratori del nostro gruppo di ricerca è stato scoperto nel frutto dell'*Actinidia chinensis* (Kiwi) un potente inibitore (PMEI) di natura proteica dell'enzima pectina metilesterasi (US. Patent 5,053,232). L'obiettivo della nostra ricerca è quello di stabilire il ruolo fisiologico di questo inibitore nel processo di maturazione del frutto, nonché il suo meccanismo di azione.

Da un punto di vista biotecnologico, inoltre, l'importanza di questo enzima è notevole. Infatti, molte preparazioni alimentari di origine vegetale (succhi di frutta, concentrati etc.) richiedono trattamenti termici più spinti di quanto il processo di pastorizzazione richiederebbe al fine di inattivare l'enzima pectina metilesterasi, poiché una elevata attività enzimatica in queste preparazioni alimentari porterebbe nel tempo all'alterazione delle caratteristiche del prodotto, specialmente dal punto di vista della consistenza (texture). L'utilizzo di un inibitore dell'enzima come adiuvante tecnologico presenterebbe, quindi, indubbi vantaggi sia nella preparazione del prodotto (trattamenti termici più blandi) che nella sua conservazione (nel caso dei succhi di frutta, la possibilità di conservare i prodotti "frozen" a temperature più vicine a quella ambiente).

Risultati ottenuti

L'inibitore è stato purificato all'omogeneità mediante cromatografia di affinità, utilizzando l'enzima pectina metilesterasi legato covalentemente ad una resina di Sefaroso. Esso possiede un peso molecolare di 18.000, è costituito da una singola catena polipeptidica in quanto mostra lo stesso peso molecolare sia in gel-filtration (in condizioni native) che in gel-elettroforesi in presenza di SDS (SDS-PAGE). Il meccanismo di inibizione si espleta attraverso la formazione di un complesso 1:1 con l'enzima. E' stata inoltre determinata la sequenza amminoacidica dell'inibitore che presenta omologie con quella dell'inibitore dell'enzima invertasi. Inoltre, in PMEI sono state individuati cinque residui di cisteina, quattro dei quali sono impegnati in due ponti disolfuro. Questi quattro residui di cisteina occupano la stessa posizione anche nell'inibitore dell'enzima invertasi lasciando pensare ad una comune struttura di questi inibitori.

Esperimenti condotti su succhi di arancia non trattati termicamente hanno dimostrato che la perdita della stabilità del succo può essere efficacemente inibita dall'aggiunta dell'inibitore della pectina metilesterasi. Analoghi risultati sono stati osservati anche su altri prodotti di origine vegetale.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000

- 1) Presence of residual pectin methylesterase activity in thermally stabilized industrial fruit preparations; D. Castaldo, B. Laratta, R. Loiudice, A. Giovane, L. Quagliuolo, and L. Servillo; Food Sci. Technol. 30, 479-484, 1997
- 2) Effect on firmness of canned peeled tomatoes dipped in calcium solution at neutral pH; G. Villari, F. DeSio, R. Loiudice, D. Castaldo, A. Giovane, and L. Servillo; Acta Alimentaria 26, 235-242, 1997
- 3) Analysis of free and esterified ergosterol in tomato product; F. de Sio, B. Laratta, A. Giovane, L. Quagliuolo, D. Castaldo and L. Servillo; J. Agric. Food. Chem., 48, 780-784, 2000
- 4) Thermoresistance of pectin methylesterase in sanguinello orange juice; F. De Sio, A. Palmieri, L. Servillo, A. Giovane and D. Castaldo; J Food Biochem, 2000, in press
- 5) Kiwi protein inhibitor of pectin methylesterase. amino acid sequence and structural importance of two disulfide bridges; Camardella L., Carratore V., Ciardiello M.A., Servillo L., Balestreri C., Giovane A.; Eur. J. Biochem., 267, 4561-4565, 2000

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Chiarimento della struttura dell'inibitore proteico e delle modalità di interazione tra esso e la pectina metilesterasi.
Studio del ruolo fisiologico dell'inibitore nel processo di maturazione del frutto.
Costruzione di organismi geneticamente modificati per l'espressione dell'inibitore. Data la difficoltà di estrarre, dal frutto del kiwi, un mRNA che sia utilizzabile per la costruzione di un cDNA codificante per l'inibitore, la nostra ricerca sarà orientata verso la costruzione di un gene sintetico. L'inibitore, infatti, è costituito da 152 residui amminoacidici e dovrebbe essere abbastanza agevole costruire un gene sintetico.

Collaborazioni internazionali in atto

Thomas Rausch Botanisches Institut, Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg, Germany.

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

HPLC biocompatibile
Elettroforesi Capillare
Sistema di acquisizione di immagini in luce trasmessa, riflessa, fluorescenza e chemiluminescenza
Apparecchiatura per gel elettroforesi bidimensionale e software di riconoscimento e quantizzazione
Spettrofotofluorimetro
Microscopio a fluorescenza con sistema di acquisizione di immagini con telecamera

Parole Chiave

Inibitori enzimatici, pectina metilesterasi,

UNITA' DI RICERCA INBB
Catania

Responsabile Scientifico

Prof.ssa Anna Maria Giuffrida Stella

Linee di Ricerca

Caratterizzazione della sequenza del gene per la proteina gliale fibrillare acida (GFAP), una proteina specifica del sistema nervoso, e studio dei meccanismi che ne regolano l'espressione tessuto-specifica.

Studi genetico-molecolari di recettori per neurotrasmettitori (recettori ionotropici e metabotropici per il glutammato) e regolazione della loro espressione in vitro (colture neuronali ed astrogliali) ed in vivo.

Ruolo dei geni della risposta primaria nel processo della morte cellulare programmata neuronale

Regolazione dell'espressione genica da parte di fattori di controllo della proliferazione cellulare in colture di astrociti e neuroni e ruolo di alcuni protooncogeni rapidamente indotti dopo attivazione recettoriale.

Studio dei meccanismi molecolari alla base del processo di invecchiamento nel sistema nervoso centrale e in colture cellulari neuronali e/o astrogliali in condizioni di stress ossidativo, e in particolare:

- Individuazione e isolamento di geni la cui espressione è modificata significativamente, tramite l'applicazione della tecnica innovativa del "mRNA differential display".

Studi sulle interazioni tra stato redox e regolazione dell'espressione di geni correlati con meccanismi di protezione cellulare.

- Studio dell'espressione di singole subunità nucleari e/o mitocondriali degli enzimi della catena respiratoria mitocondriale, nonché di specifici fattori di regolazione trascrizionale e posttrascrizionale ad esse correlati.

- Studio dell'attività e dell'espressione degli enzimi che partecipano alle difese antiossidanti cellulari: Se- e non-Se-glutazione perossidasi, glutazione riduttasi, catalasi, Mn-SOD e Cu/Zn-SOD.

- Dosaggio dell'attività e dell'integrità della PARP (poli-ADP-ribosio polimerasi) e del suo ruolo nella protezione dalla morte cellulare programmata (apoptosi) o dalla necrosi.

- Studio della attivazione della via di trasduzione del segnale JAK/STAT in colture primarie astrogliali di ratto in risposta a citochine (IFN-gamma) e tossine batteriche (LPS) per l'espressione della forma inducibile della NOS (iNOS).

- Clonaggio genico ed analisi dell'espressione di proteine delle gap junctions (connessine) nel sistema nervoso dei roditori e dell'uomo.

titolo

Basi molecolari dei processi neurodegenerativi e dell'invecchiamento

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Anna Maria Giuffrida Stella	PO	amgsbioc@unict.it
Albanese Vincenzo	PO	ibfsnc@area.ct.cnr.it
Avola Roberto	PO	marlet@unict.it
Calabrese Vittorio	PO	calabres@unict.it
Catania Maria Vincenza	A	mcatania@area.ct.cnr.it
Condorelli Daniele Filippo	PA	condorda@unict.it
Dell'Albani Paola	A	dealpa@area.ct.cnr.it
Nicoletti Vincenzo Giuseppe	RU	nicovigi@unict.it
Spina-Purrello Vittoria	PT	spinavitt@unict.it

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Scienze Chimiche, Sezione di Biochimica e Biologia Molecolare

Università degli Studi di Catania

Viale Andrea Doria n° 6 95125 Catania

095/7384074

095/336990

amgsbioc@mbox.unict.it

Sezione INBB di appartenenza

Catania

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Individuazione:

- dei meccanismi di regolazione dell'espressione genica di enzimi della catena respiratoria mitocondriale in patologie neurodegenerative e durante l'invecchiamento cerebrale ed effetti dello stress ossidativo in vivo ed in vitro, in colture di cellule astrogliali e neuronali.
- del ruolo protettivo delle stress protein (hsps) nella neurotossicità da ossido nitrico: implicazioni nel trattamento dei disordini neurodegenerativi.
- del ruolo delle connesine nella patogenesi di diversi disordini neurodegenerativi.
- del ruolo dell'ossido nitrico di origine gliale nella patogenesi della morte neuronale.
- del ruolo della via di trasduzione del segnale JAK/STAT nell'espressione della iNOS.
- della relazione tra la cNOS negli astrociti reattivi e il potenziamento della tossicità da attivazione dei recettori metabotropici del gruppo I in presenza di glia.
- del ruolo delle connesine nella patogenesi di diversi disordini neurodegenerativi.

Regolazione dell'espressione genica da parte di fattori di controllo della proliferazione cellulare in colture di astrociti e neuroni e ruolo di alcuni protooncogeni rapidamente indotti dopo attivazione recettoriale.

Risultati ottenuti

Durante i processi di invecchiamento, nella corteccia cerebrale di ratto, e dopo induzione della NO sintasi in colture astrogliali con LPS ed INF α è stato osservato:

- a) un incremento dell'espressione di enzimi della catena respiratoria mitocondriale (citocromo c ossidasi, ATP sintasi) sia a carico delle subunità proteiche che degli mRNA corrispondenti.
- b) un incremento dell'espressione delle HSP70.

E' stata analizzata, tramite ibridazione in situ, la distribuzione del mRNA della connesina CX36 in aree selezionate del Sistema Nervoso Centrale umano, l'espressione più alta è stata riscontrata nell'oliva inferiore. È stato quindi dimostrato che l'espressione della CX36 persiste anche nell'adulto in una ristretta sottopopolazione di neuroni specializzati.

E' stato messo in evidenza che l'attivazione dei recettori mGlu del gruppo I potenzia la tossicità da NMDA nei granuli cerebellari solamente in presenza di glia, che rilascia quindi uno o più fattori tossici. Dai risultati ottenuti è possibile escludere che la NOS costitutiva espressa negli astrociti contribuisca ai fenomeni di eccitotossicità.

E' stata osservata, in colture primarie astrogliali trattate con IFN α la rapida attivazione della proteina STAT1 ed una correlazione temporale della fosforilazione delle proteine JAK2 e STAT1, con la trascrizione del mRNA per l'IRF1 e per la iNOS. Tale osservazione è stata confermata tramite un inibitore specifico della fosforilazione di JAK2.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000

1. Condorelli D.F., Dell'Albani P., Corsaro M., Giuffrida R., Caruso A., Trovato Salinaro A., Spinella F., Nicoletti F., Albanese V., Giuffrida-Stella A.M. (1997) Metabotropic glutamate receptor expression in cultured rat astrocytes and human gliomas. *Neurochem. Res.*, 22:1127-1133.
2. Condorelli D.F., Dell'Albani P., Conticello S., Barresi V., Nicoletti V.G., Caruso A., Kahn M., Vacanti M., Albanese V., de Vellis J., Giuffrida Stella A.M. (1997) A Neural-Specific Hypomethylated Domain in the 5' Flanking Region of the Glial Fibrillary Acidic Protein Gene. *Developmental Neuroscience* 19, 446-456.
3. Dell'Albani P., Kahn M., Cole R., Condorelli D.F., Giuffrida Stella A.M. and J. De Vellis. (1998) Oligodendroglial survival factors, PDGF-AA and CNTF, activate similar JAK/STAT signaling pathway. *J. Neurosci. Res.*, vol. 54: 191-205.
4. Nicoletti V.G., Caruso A., Tendi E.A., Privitera A., Console A., Calabrese V., Spadaro F., Ravagna A., Copani A. and Giuffrida Stella A.M. (1998) Effect of NO synthase induction in mixed cortical and astroglial cell cultures on the expression of mitochondrial respiratory chain enzyme subunits. *Biochimie* 80, 871-881.
5. Condorelli D.F., Nicoletti V.G., Barresi V., Conticello S.G., Caruso A., Tendi E.A., Giuffrida Stella A.M. (1999) Structural features of the rat GFAP gene and identification of a novel alternative transcript. *J. Neurosci. Res.*, 56: 219-228.
6. Dell'Albani P., Santangelo R., Nicoletti V.G., Giuffrida Stella A.M., de Vellis J. (1999). JAK/STAT signaling pathway is involved in NOS induction in primary astroglial cell culture. *J. Neurochem.* 73:S71D.
7. Calabrese V., Copani A., Testa D., Ravagna A., Spadaro F., Tendi E., Nicoletti V., A.M. Giuffrida Stella. (2000) Nitric oxide synthase induction in astroglial cell cultures: effect of nitric oxide on the synthesis of heat shock protein 70 and the oxidant / antioxidant balance in astroglial cell cultures. *J. Neurosci. Res.* 60: 613-622.
8. Calabrese V., Testa D., Ravagna A., Bates T.E., A.M. Giuffrida Stella. (2000) HSP70 induction in the brain following ethanol administration in the rat: regulation by glutathione redox state. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 269: 397-400.
9. Calabrese V., Bates T.E., and Giuffrida Stella A.M. (2000). NO Synthase and NO-Dependent Signal Pathways in Brain Aging and Neurodegenerative Disorders: The Role of Oxidant/Antioxidant Balance. *Neurochemical Research* 25, 9, 1315-1341.

10. Gallo F., Morale M.C., Spina-Purrello V., Tirolo C., Testa N., Farinella Z., Avola R., Beaudet A. and Marchetti B. Basic fibroblast growth factor (bFGF) acts on both neurons and glia to mediate the neurotrophic effects of astrocyte on LHRH neurons in culture. *Synapse*, 2000 issue 36, pg. 233-266.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Studio delle modificazioni dell'espressione:

- 1) dei geni nucleari e mitocondriali che codificano per proteine della catena respiratoria mitocondriale;
- 2) delle Heat-Shock Protein 70 (HSP70);
- 3) della Poli-ADP-ribosio polimerasi (PARP);
- 4) delle connessine;

durante il processo di invecchiamento e in diversi processi neurodegenerativi.

Studio della trasduzione del segnale che coinvolge le proteine Jak-Stat nell'espressione della iNOS.

Collaborazioni internazionali in atto

Prof. Jean De Vellis, UCLA Mental Retardation Res. Center.
Los Angeles, California (USA)

Prof. Anders Hamberger, Department of Anatomy and Cell Biology,
University of Goteborg, Sweden

Prof. Hannah Monyer, Center for Molecular Biology
University of Heidelberg, Germany

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Apparecchiature per colture cellulari
Apparecchiature per Southern, Northern, Western.
PCR
Spettrofotometri e spettrofluorimetri
Centrifughe e ultracentrifughe
Fotometro per piastre a micropozzetti

Parole Chiave

Neurodegenerazione, Aging, NOS, JAK/STAT, Connexine

UNITA' DI RICERCA INBB
Bologna

Responsabile Scientifico
Prof. Gottarelli Giovanni

Linea di Ricerca

Preparazione di biopolimeri e sperimentazione sul nanogravimetro, AFM

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Samori Bruno	PO	Samori@alma.unibo.it
Amorati Riccardo	BC	
Francini Luca	BC	

Non Aderenti INBB

Pedulli Gian Franco	PO	Pedulli@alma.unibo.it
---------------------	----	-----------------------

Sede Unità di Ricerca

Università degli Studi di Bologna Dipartimento di Chimica Organica "A. Mangini"

indirizzo

Via S. Donato 15 – 40127 Bologna

051.243218..

051.244064.

gottarel@alma.unibo.it

telefono

fax

e-mail

Sezione INBB di appartenenza

Bologna

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Da anni ci occupiamo della sintesi di nucleosidi modificati e del loro assemblaggio per ottenere nuovi materiali. Recentemente siamo entrati in INBB per sintetizzare il derivato NTA della lisina e agganciarlo alla superficie del nanogravimetro.

Risultati ottenuti

Avendo cominciato questo lavoro di ricerca solo da un mese, abbiamo sintetizzato il derivato NTA della lisina e stiamo agganciando un linker contenente il gruppo SH.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000

- [1] A.L.Marlow, E.Mezzina, G.P.Spada, S.Masiero, J.T.Davis, G.Gottarelli, J.Org.Chem. 1999, 64, 5116.
- [2] E.Mezzina, S.Masiero, P.Mariani, R.Itri, S.Pieraccini, G.P.Spada, F.Spinozzi, J.T.Davis, G.Gottarelli, Chem.Eur.J. 2000, in the press.
- [3] S.L.Forman, J.C.Fettinger, S.Pieraccini, G.Gottarelli, J.T.Davis, J.Am.Chem.Soc. 2000, 122, 4060.
- [4] V.Andrisano, G.Gottarelli, S.Masiero, E.H.Heijne, S.Pieraccini, G.P.Spada, Angew.Che.Int.Ed. 1999, 38, 2386.
- [5] G.Gottarelli, S.Masiero, E.Mezzina, S.Pieraccini, J.P.Rabe, P.Samori', G.P.Spada, Chem.Eur.J. 2000, in the press.
- [6] G.Gottarelli, S.Masiero, E.Mezzina, S.Pieraccini, G.P.Spada, P.Mariani, Liquid Cryst. 1999, 26, 965.
- [7] G.Gottarelli, P.Mariani, S.Masiero, S.Pieraccini, G.P.Spada, Chirality 2000, in the press

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Per il prossimo anno dovremmo avere disponibile il recettore delle code istidiniche agganciato alla superficie

Collaborazioni internazionali in atto

Prof. J.P. Rabe, Humboldt University, Berlino, Germania

Prof. J.T. Davis, University of Maryland, USA

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

ESI-MS, CD, EPR, DSC, HPLC, AFM, FT-IR

Parole Chiave

Nanogravimetro, AFM, sintesi, recettori, NTA-lisina

UNITA' DI RICERCA INBB
Genova

Responsabile Scientifico
Prof. Massimo Grattarola

Linea di Ricerca

Neuroingegneria e Neuroinformatica

titolo

Reti bioartificiali di neuroni

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Grattarola Massimo PO Gratta@dibe.unige.it

Martinoia Sergio PA Giaser@dibe.unige.it

Bove Marco RU Bove@dibe.unige.it.

Non Aderenti INBB

Giugliano Michele DR Michi@dibe.unige.it

Pisciotta Marzia DR Marzia@dibe.unige.it

Rosso Nicola DR Rosso@dibe.unige.it

Chiappalone Michela DR Michela@dibe.unige.it

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Ingegneria Biofisica ed Elettronica – Università di Genova

Via dell'Opera Pia 11a, 16145 Genova

+39 010 353 2761

+39 010 353 2133

Gratta@dibe.unige.it/

Sezione INBB di appartenenza

Genova

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Accoppiamento funzionale di popolazioni in vitro di neuroni a matrici di microelettrodi planari

Risultati ottenuti

Caratterizzazione elettrica (misure di impedenza)

Caratterizzazione di biocompatibilità

Registrazione di attività elettrofisiologica spontanea di popolazioni di neuroni

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000

Porte-Durrieu, M.C., N-Kaoua, G., Brouillaud, B., Ricci, D., Grattarola, M., Baquey, Ch.: "Elaboration of modeled surfaces with well defined microtopochemistry-localization of adsorbed proteins", Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 17, 205-218, 2000.

M.Giugliano: "Synthesis of generalized algorithms for the fast computation of synaptic conductances with markov kinetic models in large network simulations", Neural Computation, vol. 12, No. 5, 771-799, 2000.

M.Giugliano, M. Bove, M. Grattarola: "Insulin release at the molecular level: metabolic-electrophysiological modelling of the pancreatic beta-cells", IEEE Trans. Biomed. Eng., vol. 47, no. 5, 2000.

S. Martinoia, L.Lorenzelli, G. Massobrio, B. Margesin, A. Lui: "A CAD system for developing chemical sensor-based microsystems with an ISFET-CMOS compatible technology", Sensor and Materials, 11-5, 279-295, MYU Tokyo, Japan, (1999).

S.Martinoia, M.Bove, M.Tedesco, B.Margesin, M.Grattarola: "A simple microfluidic system for patterning populations of neurons on silicon micromachined substrates", Journal of Neuroscience Methods, Vol. 87, pp. 35-44, (1999).

M.Giugliano, M.Bove, M.Grattarola: "Fast calculation of short-term depressing synaptic conductances", Neural Computation, vol. 11, 1413-1426, (1999).

M.Giugliano, M.Bove, M.Grattarola: "Activity-driven Computational Strategies of a Dynamically Regulated Integrate-and-fire Model Neuron", J.Comp.Neurosci., Vol. 7, No. 3, 247-254, 1999.

R. Raiteri, G. Nelles, H.-J. Butt, W. Knoll, P. Skládal, "Sensing of biological substances based on the bending of microfabricated cantilevers", *Sensors and Actuators: B*, 61, 213-217, 1999.

R. Raiteri, H.-J. Butt, D. Beyer, S. Jonas, "Heterogeneous polymer-containing films: a comparison of macroscopic properties with microscopic properties determined by atomic force microscopy", *Chem. Phys.*, 1, 4881-4887, 1999.

M. Grattarola e G. Massobrio: "Bioelectronics Handbook: MOSFETs, Biosensor, Neurons" McGraw-Hill, pp.XIV-411 (1998).

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Registrazione e stimolazione da 2 a 8 elettrodi dell'attività elettrofisiologica di neuroni dissociati dal midollo spinale di embrioni di pollo.

Collaborazioni internazionali in atto

[Institute of Microtechnology \(IMT\)](#) Jaquet-Droz 1, 2007 Neuchatel Switzerland

[Institute for Biomedical Technology Electrical Engineering Department \(MESA\) University of Twente](#) P.O. Box 217, 7500 AE Enschede, The Netherlands.

INSERM EPI 9914 Laboratoire de Physiopathologie des Réseaux Médullaires Institut F. Magendie. 1, Rue C. St Saens, 33077 Bordeaux cedex, France.

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

2 setup per misure elettrofisiologiche basate su matrici di microelettrodi.

Parole Chiave

Microelettrodi planari; Giunzione neuro-elettronica; Simulazioni al calcolatore; Reti di neuroni; pattern di stimolazione

UNITA' DI RICERCA INBB
Napoli

Responsabile scientifico:
Prof. Gaetano Irace

Linea di Ricerca

Proprietà strutturali e dinamiche di proteine ed analisi degli effetti indotti da perturbanti fisici e chimici mediante studi di fluorescenza nel dominio delle frequenze

Composizione del gruppo

Aderenti INBB:

Irace Gaetano	PO	gaetano.irace@unina2.it
Bismuto Ettore	RU	ettore.bismuto@unina2.it
Sirangelo Ivana	RU	ivana.sirangelo@unina2.it

Non Aderenti INBB:

Tavassi Simona	DR	irace@unina2.it
----------------	----	-----------------

Sede Unità di Ricerca:

Dipartimento di Biochimica e Biofisica - Seconda Università degli Studi di Napoli
Via Costantinopoli, 16 - 80138 Napoli
081/5665862

Sezione di appartenenza:

Napoli

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi:

L'attività di ricerca si è sviluppata lungo due direttrici: a) *fold*ing dell'apomioglobina; b) identificazione di determinanti strutturali e funzionali in un enzima, la β -galattosidasi, da un microorganismo estremofilo, il *Solfobobus solfataricus*.

Per quanto riguarda il punto a) le ricerche sono state inizialmente rivolte alla caratterizzazione di intermedi parzialmente strutturati in equilibrio con la forma nativa e, successivamente, sono state orientate a comprendere il contributo di residui invarianti nell'organizzazione strutturale degli stati parzialmente strutturati. Mediante mutagenesi sito-diretta sono state prodotte mioglobine ricombinanti in cui sono stati sostituiti, alternativamente o contemporaneamente, i residui triptofanilici, che nelle mioglobine da mammifero occupano invariabilmente le posizioni 7 e 14 localizzate lungo l'elica A. Sono state, quindi, studiate le proprietà strutturali delle apomioglobine ricombinanti e sono stati caratterizzati da un punto di vista dinamico i microintorni dei residui in posizione 7 e 14 ed il sito idrofobico di legame per un *probe* estrinseco, l'ANS. Infine, mediante studi di simulazione dinamica, sono state indagate le distorsioni introdotte nell'organizzazione strutturale del sudominio, formato dall'interazione delle eliche A, G e H, da alcune sostituzioni amminoacidiche in posizione 7 e 14 che non consentono alla proteina di strutturarsi in maniera corretta.

Per quanto riguarda il punto b) le ricerche hanno avuto per oggetto il decadimento emissivo della β -galattosidasi da *Solfobobus solfataricus*, un enzima tetramerico contenente 17 residui triptofanilici per subunità, la cui struttura tridimensionale è stata recentemente risolta. Il complesso decadimento emissivo di questa proteina è stato analizzato con l'intento di ottenere informazioni sul comportamento dinamico globale della proteina e su quello di specifici distretti molecolari. Mediante studi di simulazione dinamica sono state ottenute informazioni sul comportamento dinamico dei microintorni triptofanilici, utilizzando le quali è stato ricostruito il decadimento emissivo dell'enzima.

Risultati ottenuti:

Le ricerche riguardanti la caratterizzazione di stati parzialmente strutturati presenti sul cammino di *fold*ing dell'apomioglobina sono state condotte mediante misure di decadimento emissivo, dicroismo circolare, anisotropia di fluorescenza e spettroscopia UV-visibile. Le proprietà dinamiche di questi intermedi sono state studiate a pH acido in presenza di differenti anioni oppure a pH neutro in presenza di moderate concentrazioni di guanidina. Sono stati caratterizzati tre differenti intermedi, che differiscono tra loro per il loro contenuto di struttura alfa-elicoideale. Questi, a differenza dello stato nativo, non assumono una conformazione unica ma un insieme dinamico di conformazioni in rapida interconversione tra di loro. Caratteristica comune degli stati parzialmente strutturati dell'apomioglobina è la presenza di un subdominio formato dalle eliche A, G ed H organizzato strutturalmente come nella struttura nativa dell'apoproteina. Altre differenze riguardano le proprietà emissive di una sonda fluorescente, l'ANS, in grado di legarsi a zone idrofobiche accessibili al solvente. Misure di trasferimento non radiativo di energia con meccanismo di Forster hanno dimostrato che, nelle forme parzialmente strutturate, la polarità del sito idrofobico di legame per l'ANS

aumenta all'aumentare del contenuto di struttura alfa-elicoideale. Questo risultato è stato messo in relazione con la progressiva internalizzazione dei residui idrofobici che caratterizza l'evoluzione temporale del processo di folding.

Mediante mutagenesi sito-specifica, sono state prodotte apomioglobine ricombinanti in cui i residui triptofanilici sono stati sostituiti con residui aventi differenti caratteristiche fisico-chimiche. I risultati ottenuti hanno evidenziato che la simultanea sostituzione di questi due residui non è compatibile con un corretto folding proteico. Studi di dinamica molecolare hanno evidenziato, nelle proteine ricombinanti, distorsioni nel subdominio formato dalle eliche A, G e H, lasciando ipotizzare che il corretto posizionamento di queste tre eliche è una tappa fondamentale nel processo di strutturazione.

Le ricerche riguardanti la β -galattosidasi da *Sulfolobus solfataricus* hanno consentito di caratterizzare le proprietà dinamiche del dominio funzionale e delle regioni molecolari che conferiscono alla proteina un'eccellente stabilità strutturale. In particolare, le misure di decadimento emissivo hanno evidenziato la presenza di due classi di residui triptofanilici, una delle quali è caratterizzata da microintorni dinamici ed accessibili al solvente, l'altra da microintorni strutturalmente più rigidi ed inaccessibili al solvente. La prima classe di residui è stata messa in relazione con le regioni molecolari implicate nella formazione del sito catalitico; queste regioni mostrano un significativo incremento della flessibilità strutturale all'aumentare della temperatura coerente con l'incremento dell'attività catalitica. Viceversa, le regioni molecolari che rendono la proteina stabile alle elevate temperature sono strutturalmente più rigide e la loro flessibilità conformazionale è scarsamente influenzata dall'aumento di temperatura. La correlazione tra tempi di vita dello stato eccitato dei residui triptofanilici e mobilità del microintorno in cui essi sono localizzati è stata ulteriormente corroborata ricostruendo il decadimento emissivo a partire da studi di simulazione dinamica.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000:

- 1) E. Bismuto, G. Irace, S. D'Auria, M. Rossi & R. Nucci; "Perturbation of conformational dynamics, enzymatic activity and thermostability of β -glycosidase from Archaeon *Sulfolobus solfataricus* by pH and SDS detergent"; *PROTEINS Structure, Function, Genetics* 27: 71-79 (1997)
- 2) S. D'Auria, R. Nucci, M. Rossi, G. Irace & E. Bismuto; "Multitryptophan fluorescence emission of β -glycosidase from the extremely thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*"; *Eur. J. Biochem.* 244: 53-58 (1997).
- 3) I. Sirangelo, E. Bismuto, S. Tavassi & G. Irace; "Near UV circular dichroic activity of apomyoglobin: resolution of the individual tryptophanyl contribution by site-directed mutagenesis"; *Eur. Biophys. J.* 27:27-31 (1998).
- 4) I., Sirangelo, E., Bismuto, S., Tavassi & G., Irace; "Apomyoglobin folding intermediates characterized by hydrophobic fluorescent probe 8-anilino-1-naphthalene sulfonate (ANS)"; *Biochim. Biophys. Acta* 1385:69-77 (1998).
- 5) E., Bismuto, R., Nucci, M., Rossi & G., Irace; "Structural and dynamic aspects of β -glycosidase from mesophilic and thermophilic bacteria by multi-tryptophanyl emission decay studies"; *PROTEINS Structure, Function, Genetics* 35: 163-172 (1999).
- 6) E. Bismuto & G. Irace; "Structural and dynamical properties of the folded state of apomyoglobin under denaturing conditions"; in *Current Topics in peptides proteins research*, ed. Research Trends. Press Trivandrum India (1999).
- 7) I., Sirangelo, S., Tavassi & G., Irace; "Apomyoglobin folding intermediates characterized by hydrophobic fluorescent probe 8-anilino-1-naphthalene sulfonate (ANS)"; *Biochim. Biophys. Acta* 1476: 173-180 (2000).
- 8) I., Sirangelo, S., Tavassi, P.L. Martelli, R. Casadio & G., Irace; "The effect of tryptophanyl substitution on folding and structure of myoglobin"; *Eur. J. Biochem.* 267: 3937-3945 (2000).
- 9) E. Bismuto, P.L. Martelli, R. Casadio & G. Irace "Tryptophanyl lifetime distribution of hyperthermophilic β -glycosidase from molecular dynamics simulation: a comparison with the experimental data"; *Protein Sci.* 9: in press (2000).

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

L'attività di ricerca di questa Unità sarà mirata ad esaminare le proprietà strutturali e funzionali di specifici sistemi proteici e come queste siano influenzate da variazioni di parametri fisici, quali campi elettromagnetici a frequenza variabile e gradienti di temperatura. La dinamicità della struttura proteica rappresenta il requisito fondamentale per l'espletamento dell'attività funzionale. Essa dipende fondamentalmente dalla capacità della catena polipeptidica di fluttuare tra una molteplicità di stati subconformazionali. Un approccio metodologico particolarmente idoneo ed informativo per lo studio del comportamento dinamico delle macromolecole proteiche è rappresentato dalle tecniche spettroscopiche risolte in tempo, in particolare tecniche di fluorescenza. Queste metodologie implicano l'uso di vari parametri spettroscopici, tra cui il decadimento di fluorescenza, il decadimento emissivo dell'anisotropia di fluorescenza, la dipendenza temporale dello spettro emissivo, nonché il trasferimento non radiativo di energia con meccanismo di Forster. Questi parametri consentono di ottenere informazioni strutturali sugli stati conformazionali di proteine in soluzione nonché sulla dinamica di interconversione tra questi stati. Il decadimento emissivo di fluorofori proteici intrinseci (residui triptofanilici) ed estrinseci (molecole fluorescenti covalentemente, o non, legate alla matrice proteica) è fortemente influenzato dalle fluttuazioni della matrice proteica. Queste generano una distribuzione di velocità di decadimento emissivo (tempi di vita dello stato eccitato), la cui ampiezza può essere correlata al numero degli stati conformazionali che la catena polipeptidica adotta. Inoltre, il centro della distribuzione è indicativo delle proprietà medie del microintorno del fluoroforo durante la sua permanenza nello stato eccitato. Lo studio del

decadimento dell'anisotropia di fluorescenza può evidenziare sia la dinamica di rotazione complessiva della macromolecola che la dinamica di moti interni delle regioni in cui sono localizzati i fluorofori. La dipendenza temporale dello spettro di emissione consente di evidenziare i fenomeni di rilassamento che si verificano nella fase iniziale del decadimento, dovuti a moti rapidi di riorientamento di molecole di solvente, nonché di gruppi polari presenti nel microambiente del fluoroforo. Infine, gli andamenti temporali possono riguardare la capacità di trasferimento energetico tra gruppi molecolari intramolecolari o ubicati su macromolecole differenti disposte all'interno o sulla superficie di membrane cellulari. Queste osservazioni consentono di valutare i cambiamenti indotti nel grado di flessibilità/fluidità di proteine e membrane, nonché nelle distanze che separano gruppo donatore ed accettore.

Le proteine che rappresentano utili modelli di studio per le loro caratteristiche spettroscopiche sembrano essere, sulla base delle nostre precedenti osservazioni sperimentali, la mioglobina, la beta-glicosidasi e la heat shock protein Hsc70. Particolare attenzione sarà rivolta agli effetti indotti dall'applicazione di un gradiente termico sulla conformazione proteica e sul comportamento dinamico della beta-glicosidasi in relazione alle sue eventuali potenzialità biotecnologiche.

Collaborazioni internazionali in atto:

Prof. Enrico Gratton, Laboratory for Fluorescence Dynamics, Department of Physics, University of Illinois, Urbana, IL.

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca:

1. spettrofluorimetro GREG per l'acquisizione dei tempi di vita, corredato di fibre ottiche;
2. n. 2 spettrofotometri Varian Mod Cary 219 e Perkin Elmer Mod Coleman 575;
3. spettrofluorimetro Perkin -Elmer Mod MPF-66;
4. apparecchio per elettroforesi su gel di poliacrilammide accessoriatto Bio-Rad ;
5. microcentrifuga Eppendorf 5412;
6. Phast System Pharmacia.

Parole chiave:

Fluorescenza dinamica; Dinamica conformazionale; Proteine, Struttura.

UNITA' DI RICERCA INBB
Pisa

Responsabile Scientifico

Prof. Luigi Landini

Linea di Ricerca

Modellistica e analisi di immagini funzionali

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Landini Luigi PO llandini@ifc.pi.cnr.it

Non Aderenti INBB

Santarelli Maria Filomena Ricercatore CNR santarel@ifc.pi.cnr.it

Positano Vincenzo Contrattista CNR positano@ifc.pi.cnr.it

Sede Unità di Ricerca

C.N.R. - Istituto di Fisiologia Clinica

Area S. Cataldo - Pisa

050 3152820

llandini@ifc.pi.cnr.it

Sezione INBB di appartenenza

Bologna

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

1. Sviluppo di metodi di segmentazione automatica ed analisi di immagini di risonanza magnetica per studi di perfusione miocardica.
2. Modellistica per l'estrazione di parametri di flusso da immagini di perfusione con mezzo di contrasto paramagnetico intravascolare.

Risultati ottenuti

1. E' stato sviluppato e sperimentato un metodo di segmentazione automatica di immagini di risonanza magnetica in grado di riconoscere il muscolo cardiaco anche in condizioni di basso rapporto segnale - rumore partendo da sequenze temporali di immagini di perfusione miocardica. Il metodo e' quindi in grado di analizzare diverse regioni del miocardio (sub-endo, sub-epi) e da esse estrarre curve di perfusione miocardica in modo automatico.
2. E' stato messo a punto un metodo per l'elaborazione e l'estrazione di parametri di flusso partendo da immagini di risonanza magnetica valido per mezzi di contrasto intravascolari. Il metodo e' basato su un modello di perfusione miocardica, dove l'ingresso al modello e' la curva di transito del mezzo di contrasto nella cavita' ventricolare sinistra e la cui uscita e' la curva residua misurata sulla regione miocardica d'interesse. Per rendere meno influente il rumore sulla stima dei parametri del modello, e' stata effettuata una operazione di denoising sulle curve di transito utilizzando la trasformata wavelet. Il modello e' stato messo a punto partendo da dati di perfusione miocardica misurati su animali da esperimento e validato con tecniche di medicina nucleare (microsfere marcate).

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000

- 1) M.F. Santarelli, V. Positano, L. Landini. Real time multimodal medical image processing: a dynamic volume rendering application. IEEE Transaction on Information Technology in Biomedicine. 1997; 1(3): 171-8. 1998
- 2) M.F. Santarelli, V. Positano and L. Landini. On line 3D Evaluation Of Left Ventricular Wall Motion in Magnetic Resonance Imaging. Technology and Health Care 6, pp. 151-157, 1998.
- 3) L. Landini, R. Mammoliti, V. Positano, M.F. Santarelli, A. Benassi. "Complexity measures as a way to track visual evoked potential in EEG analysis", EMBEC99, Vienna, November 4-7, 1999, Vol. 37, Suppl. 2, pp. 432-33, 1999.
- 4) M. F. Santarelli, M. Lombardi, V. Positano, L. Landini, A. Benassi. Myocardial Perfusion Analysis Starting From Wavelet Decomposition Method. ESMRMB 99. Seville, September 16 – 19, 1999, Vol. 8 Suppl. 1 September 1999, 1999, p. 176.
- 5) M.F. Santarelli, V. Positano, L. Landini. Combining High Performance Computing and Networking for Advanced 3D Cardiac Imaging. IEEE Transaction on Information Technology in Biomedicine. Vol. 4, n. 1, pp. 58-67, 2000.
- 6) L. Landini, M.F. Santarelli, V. Positano. Real time medical image processing: automated 3D segmentation, visualization and quantitative analysis. Research Advances in Biomedical Engineering 1, pp. 15-28, 2000.
- 7) V. Positano, R. Mammoliti, M.F. Santarelli, L. Landini, A. Benassi. Nonlinear analysis of carotid artery echographic images. MEDSIP 2000, Bristol (UK), 4-6 September 2000. In press.
- 8) M.F. Santarelli, L. Landini, M. Lombardi, V. Positano, A. L'Abbate, A. Benassi. Mri assessment of myocardial perfusion: does wavelet decomposition method improve reliability and reproducibility?. ESMRMB'00. Paris (FR) September 14-17 2000. In press.
- 9) V. Positano, R. Mammoliti, M.F. Santarelli, L. Landini, A. Benassi. Nonlinear analysis of carotid artery echographic images. IEE proceedings- Science, Measurements and Technology: Advances in medical signal processing. In press.
- 10) M.F. Santarelli, L. Landini, M. Lombardi, V. Positano, A. L'Abbate, A. Benassi a model based method for myocardium flow estimation. Int. Symp. Of research in Cardiovascular MR. 7-8th September 2000 Marseille (France). In press on MAGMA, October 2000.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

L'esperienza maturata nei settori della modellistica ed elaborazione di immagini di risonanza magnetica servirà per estendere gli studi intrapresi anche all'imaging funzionale del cervello. Cio' anche in considerazione della disponibilità presso l'unità di ricerca di un tomografo per risonanza magnetica e di un tomografo a emissione di positroni, sul quale sono già in corso studi in collaborazione con il gruppo di psichiatria dell'Università di Pisa.

Collaborazioni internazionali in atto

General Electrics Medical System di Milwaukee: settore risonanza magnetica.

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Tomografo per risonanza magnetica
Tomografo a emissione di positroni
Calcolatore parallelo a quattro processori (modello SUN)

Parole Chiave

Imaging funzionale, segmentazione di immagini, modellistica dei traccianti, registrazione di immagini, perfusione miocardica.

UNITA' DI RICERCA INBB
Milano

Responsabile Scientifico
Dott. Claudio Landoni

Linea di Ricerca

Oncologia PET

titolo

Studio in vivo delle patologie oncologiche mediante PET

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Fazio Ferruccio	PO	fazio@mednuc.hsr.it
Landoni Claudio	A	claudiol@mednuc.hsr.it
Moresco Rosa Maria	A	rosam@mednuc.hsr.it
Messa Cristina	RU	cmessa@mednuc.hsr.it
Gilardi Maria Carla	PA	chicca@mednuc.hsr.it
Todde Sergio	A	Sergiot@mednuc.hsr.it

Non Aderenti INBB

Picchio Maria	A	mariap@mednuc.hsr.it
Gianolli Luigi	A	Gianolli@mednuc.hsr.it
Magnani Patrizia	A	pattym@mednuc.hsr.it
Vanoli Giovanna	A	gvanoli@mednuc.hsr.it
Matarrese Mario	A	mariom@mednuc.hsr.it

Sede Unità di Ricerca

Servizio di Medicina Nucleare – Istituto Scientifico H S.Raffaele, Università di Milano-Bicocca, CNR-INB.

Edificio LITA, via Fratelli Cervi 93 Segrate

02-26432716

02-26415202

fazio@mednuc.hsr.it/

Sezione INBB di appartenenza

Milano

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Nell'ambito dello studio della patologia tumorale, l'obiettivo della attività di ricerca svolta negli ultimi anni è stato la valutazione dell'impiego della tomografia ad emissione di positroni (PET) per l'inquadramento diagnostico e prognostico del paziente neoplastico. Tale metodica consente di valutare in vivo il grado di aggressività del tumore, la presenza e distribuzione delle metastasi a distanza, l'effetto di trattamenti chemio e/o radioterapici sulla vitalità del tumore e la diagnosi differenziale tra recidiva tumorale e necrosi da terapia radiante mediante l'utilizzo di un tracciante analogo del glucosio, il fluoro-desossi-glucosio marcato con fluoro 18 (^{18}F FDG).

A tal scopo sono stati condotti studi PET con FDG in pazienti con neoplasia polmonare per una valutazione dello stadio della malattia in confronto con le metodiche di staging tradizionali con particolare riferimento alla TC. Ulteriori studi sono stati condotti al fine di valutare la risposta al trattamento terapeutico instaurato in pazienti affetti da diverse forme neoplastiche tra le quali il tumore pancreatico, il mesotelioma ed il linfoma. E' stato inoltre condotto uno studio comparativo tra PET e metodiche medico-nucleari convenzionali per la identificazione di lesioni ossee metastatiche. E' stato anche condotto uno studio di confronto tra tomografi PET con caratteristiche costruttive differenti con l'obiettivo di valutare i limiti in termini di accuratezza diagnostica di un tomografo PET a doppia testa.

Risultati ottenuti

L'impiego della PET con FDG in pazienti affetti da mesotelioma, ha consentito di ottenere significativi risultati nella valutazione della risposta al trattamento chemioterapico dopo l'accertamento diagnostico. In particolare, nello studio dei pazienti affetti da mesotelioma e nel gruppo di pazienti affetti da tumore pancreatico localmente avanzato, la PET con FDG è stata in grado di predirre, precocemente rispetto alle metodiche morfologiche inclusa la TC, la positiva risposta al trattamento instaurato mediante il riscontro di una riduzione del metabolismo della massa tumorale rispetto allo studio basale pre-trattamento. Analoghi risultati sono stati ottenuti in un gruppo di pazienti affetti da linfoma sottoposti a trattamento chemio e/o radioterapico. Nei pazienti in remissione clinica di malattia, la PET con FDG è stata predittiva della positiva risposta al trattamento più precocemente rispetto alla valutazione con TC.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000

1. Fridrich L, Messa C, Landoni C, Lucignani G, Moncayo R, Kendler D, Riccabona G and Fazio F. Whole-body scintigraphy with ^{99m}Tc -MIBI, ^{18}F -FDG and ^{131}I in patients with metastatic thyroid carcinoma. Nucl Med Commun, 1997; 18: 3-9.
2. Landoni C, Gianolli L, Lucignani G, Magnani P, Savi A, Travaini L, Gilardi MC, Fazio F. Comparison of dual-head coincidence PET versus ring PET in tumor patients. J Nucl Med, 1999; 40: 1617-1622.
3. Gugiatti A, Rossetti C, Grimaldi A, Fazio F. Due esercizi di analisi decisionale sull'introduzione della PET nella valutazione dei noduli polmonari solitari e nello staging di pazienti con non-small-cell-lung cancer. Mecosan, 1999; 31 (Sez.1): 37-48.
4. Magnani P, Carretta A, Rizzo G, Fazio F, Vanzulli A, Lucignani G, Zannini P, Messa C, Landoni C, Gilardi MC, Del Maschio A. FDG/PET and spiral CT image fusion for mediastinal lymph node assessment of non-small cell lung cancer patients. J Cardiovasc Surg, 1999; 40: 741-748.
5. Reni M, Ferreri AM, Landoni C, Villa E. Salvage therapy with Temozolomide in an immunocompetent with primary brain lymphoma. J Natl Cancer I, 2000; 92: 575-576.
6. Carretta A, Landoni C, Melloni G, Ceresoli GL, Compierchio A, Fazio F, Zannini P. 18-FDG positron emission tomography (PET) in the evaluation of malignant pleural disease. A pilot study. Eur J Cardio-Thorac, 2000; 17: 377-383.
7. Stella P, Bignotti G, Zerbi S, Ciurlino D, Landoni C, Fazio F and Bianchi G. Concurrent pheochromocytoma, diabetes insipidus and cerebral venous thrombosis-a possible unique pathophysiological mechanism. Nephrol Dial Transplant, 2000 ; 15: 717-718.
8. Messa C, Landoni C, Pozzato C, Fazio F. Is there a role for PET-FDG in the diagnosis of musculoskeletal neoplasm?. Accepted J Nucl Med.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Valutare l'utilità clinica della PET con FDG nel modificare l'atteggiamento terapeutico in pazienti con tumore polmonare, valutazione del comportamento metabolico di particolari tipi istologici di tumore polmonare e valutazione di una possibile correlazione tra neoangiogenesi neoplastica ed attività metabolica del tumore. Valutazione di altri traccianti per lo studio di specifici processi neoplastici come ad esempio la colina marcata con carbonio 11 per lo studio del paziente prostatectomizzato con innalzamento del PSA ed impiego della colina anche in altre forme neoplastiche della pelvi quali il tumore del retto, utero, ovaio.

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

PET – SUN workstation - Ciclotrone

Parole Chiave)

Tomografia ad emissione di Positroni – Neoplasia – Traccianti positroni emettitori – Stadiazione.

UNITA' DI RICERCA INBB
Bologna

Responsabile Scientifico:
Prof. Lenaz Giorgio

Linea di Ricerca

Bioenergetica mitocondriale I

Titolo

Complessi enzimatici della catena respiratoria mitocondriale

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Lenaz Giorgio RU

Non Aderenti INBB

Baracca Alessandra RU

Bovina Carla PA

D'Aurelio Marilena DR

Fato Romana PA

Genova Maria Luisa BC

Mattiazzi Marina DR

Parenti Castelli Giovanna PA

Ventura Barbara DR

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Biochimica "G. Moruzzi" - Università di Bologna

Indirizzo

Via Irnerio 48 - 40126 Bologna

051-2091201/204/229

051-2091217/224

telefono

fax

e-mail

Sezione INBB di appartenenza

Bologna

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi:

- Struttura e funzione del Complesso I della catena respiratoria mitocondriale, (NADH Coenzima Q ossido-reduccasi) con particolare riguardo alla natura del sito accettore e alla sua specificità per vari chinoni, omologhi e analoghi del Coenzima Q fisiologico.
- Funzione "pool" del Coenzima Q nella membrana interna mitocondriale, ruolo della diffusione laterale e cinetica di saturazione per il Coenzima Q delle attività integrate della catena respiratoria.

Risultati ottenuti

- In seguito alla caratterizzazione cinetica da noi effettuata del sito accettore del Complesso I (Fato et al., Biochemistry 35, 2705-16, 1996) abbiamo compiuto ulteriori studi utilizzando 6-tienil- e 6-imidazotiazoli e loro derivati aventi un gruppo benzochinonico polare, allo scopo di definire il rapporto tra i siti di inibizione (tre siti noti nel Complesso) e il sito accettore: mentre i primi composti si sono rivelati buoni inibitori del Complesso, i derivati chinonici sono inibitori ma nel contempo accettori di elettroni sia dal sito fisiologico che da un sito a monte del sito di inibizione del rotenone.
- Il Coenzima Q costituisce un "pool" mobile tra Complessi flavoproteici e Complesso III della catena respiratoria. La diffusione laterale nel doppio strato lipidico non sembra limitante per il trasporto di elettroni, come da noi dimostrato da esperimenti di quenching di fluorescenza di sonde idrofobiche di membrana, da cui è possibile calcolare elevati coefficienti di diffusione laterale e dalla caratterizzazione cinetica delle tappe limitanti per gli enzimi che usano il CoQ come substrato. Al contrario la concentrazione del CoQ nelle membrane mitocondriali (cuore bovino) non è saturante per il massimo trasporto elettronico da NADH a ossigeno, come rivelato dalla cinetica di saturazione in esperimenti di ricostituzione. Esperimenti di simulazione al computer tramite dinamica molecolare rivelano che per gli omologhi a lunga catena una struttura ripiegata è quella termodinamicamente più stabile: questa struttura è in grado di spiegare gli alti coefficienti diffusionali da noi calcolati.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000

1. Steady-state kinetics of reduction of Coenzyme Q analogs by glycerol-3-phosphate dehydrogenase in brown adipose tissue mitochondria. H. Rauchova, R. Fato, Z. Drahotova, G. Lenaz, Arch. Biochem. Biophys., 343, 1-7 (1997).

2. Protonophoric activity of NADH coenzyme Q reductase and ATP synthase in coupled submitochondrial particles from horse platelets. A. Baracca, L. Bucchi, A. Ghelli, G. Lenaz; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 235, 469-473 (1997).
3. The role of DT-Diaphorase in the generation and maintenance of the reduced antioxidant form of coenzyme Q in artificial and natural membrane systems. R.E. Beyer, J. Segura-Aguilar, S. Di Bernardo, M. Cavazzoni, R. Fato, D. Fiorentini, M.C. Galli, M. Setti, L. Landi, G. Lenaz; *Molec. Aspects Med.*, 18, s15-s23 (1997).
4. Coenzyme Q deficiency in mitochondria: kinetic saturation versus physical saturation. G. Lenaz, G. Parenti Castelli, R. Fato, C. Bovina, G. Formigini, E. Estornell, H. Rauchova; *Molec. Aspects Med.*, 18, s25-s31 (1997).
5. Quinone specificity of Complex I (review). G. Lenaz; *Biochim. Biophys. Acta*, 1364, 207-221 (1998).
6. A high diffusion coefficient for Coenzyme Q10 may be related to a folded structure. S. Di Bernardo, R. Fato, G. Fariselli, R. Casadio, G. Lenaz; *FEBS Lett.* 426, 77-80 (1998).
7. Localization and mobility of Coenzyme Q in membranes. G. Lenaz, R. Fato, S. Di Bernardo, D. Jarreta, A. Costa, M.L. Genova, G. Parenti Castelli; *BioFactors*, 9, 87-94 (1999).
8. 6-Thienyl and 6-phenylimidazo[2,1-b] thiazoles as inhibitors of mitochondrial NADH dehydrogenase. Andreani, M. Rambaldi, A. Leoni, R. Morigi, A. Locatelli, G. Giorgi, G. Lenaz, A. Ghelli, M. Degli Esposti; *Eur. J. Med. Chem.* 34, 883-889 (1999)

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

La caratterizzazione del Complesso I proseguirà con l'uso di una serie di omologhi ed analoghi del Coenzima Q utilizzati come accettori di elettroni e sintetizzati ad hoc per la caratterizzazione del sito. In particolare si cercherà di comprendere le ragioni molecolari per cui gli omologhi a corta catena isoprenoide sono inibitori del Complesso mentre analoghi saturi a corta catena non lo sono. Si caratterizzerà la forma inibitoria di questi chinoni (ossidata, ridotta o semichinonica). Infine, in considerazione dell'importanza della catena respiratoria nella produzione di specie reattive dell'ossigeno tossiche per la cellula, è agli inizi un progetto di ricerca atto a valutare la produzione di radicali dell'ossigeno da parte del Complesso I e le condizioni in cui la produzione di radicali viene incrementata (natura degli accettori, stato della membrana, presenza di inibitori del Complesso, presenza di pro- e anti-ossidanti). In particolare si valuterà il ruolo del CoQ₁₀ endogeno nella produzione e nella eliminazione dei radicali stessi.

Collaborazioni internazionali in atto

Prof. Graham Palmer, Dept. of Biophysics, Rice University, Houston, Texas (USA)

Prof. Hana Rauchova, Istituto di Fisiologia, Accademia Ceca delle Scienze, Praga, Repubblica Ceca

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Spettrofotometro a doppio raggio Jasco

Spettrofluorimetro Jasco

Spettrofotometro a doppia lunghezza d'onda Sigma-Biochem ZWS2

Miniossigrafo Oroboros

Ultracentrifughe varie

Parole chiave

Mitocondri; Coenzima Q (ubichinone); Complesso I; diffusione laterale; cinetica enzimatica

UNITA' DI RICERCA INBB
Bologna

Responsabile Scientifico
Prof. Lenaz Giorgio

Linea di Ricerca

Bioenergetica mitocondriale II

Titolo

Alterazioni patologiche della bioenergetica mitocondriale

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Lenaz Giorgio RU

Non Aderenti INBB

Baracca Alessandra RU

Bernacchia Andrea DR

Bovina Carla PA

D'Aurelio Marilena DR

Fato Romana PA

Formiggini Gabriella RU

Gamberini Chiara BC

Genova Maria Luisa BC

Merlo Pich Milena BC

Parenti Castelli Giovanna PA

Ventura Barbara DR

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Biochimica "G. Moruzzi" - Università di Bologna

Via Irnerio 48 - 40126 Bologna

051-2091201/204/229

051-2091217/224

Sezione INBB di appartenenza

Bologna

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

- Alterazioni molecolari in malattie mitocondriali ereditarie con mutazioni del DNA mitocondriale, in particolare la Neuropatia Ottica di Leber (Complesso I) e la NARP (Neurologic muscle weakness, Ataxia and Retinitis Pigmentosa, Complesso della ATP Sintasi).
- Alterazioni molecolari della catena respiratoria, in particolare del Complesso I, nell'invecchiamento.
- Sviluppo di "biomarkers" di funzione mitocondriale in piastrine umane come fattori diagnostici e prognostici di patologie sistemiche e dell'invecchiamento.

Risultati ottenuti

- Esistono tre mutazioni su tre diverse subunità del Complesso I che portano alla Neuropatia Ottica di Leber: le lesioni biochimiche, studiate nelle piastrine di soggetti anche omoplasmici, sono sorprendentemente scarse, e in due forme che influenzano le subunità ND4 e ND6 non vi è alcuna diminuzione di attività del Complesso I. Tuttavia in tutte le mutazioni abbiamo evidenziato una modificata sensibilità al rotenone e ad altri inibitori, indice di alterazione strutturale del Complesso. Nella NARP la mutazione è a carico della subunità ATPasi-6 del Complesso ATP-sintasi: abbiamo dimostrato in piastrine di pazienti una sintesi di ATP fortemente diminuita, ma senza modificazioni né dell'attività ATP idrolitica né del trasporto protonico. Questi risultati dimostrano che l'attività del canale protonico nelle due opposte direzioni può venire alterata in maniera diversa.
- La teoria mitocondriale dell'invecchiamento si basa sull'effetto di mutazioni e delezioni del DNA mitocondriale accumulate in cellule postmitotiche, che portano ad alterazioni dei complessi enzimatici mitocondriali e a un progressivo declino energetico. Poiché 7 subunità su 13 codificate dal DNA mitocondriale appartengono al Complesso I, abbiamo indagato le caratteristiche funzionali di questo enzima nell'invecchiamento in vari tessuti di ratti invecchiati e in piastrine umane. Oltre a una diminuzione dell'attività del Complesso, abbiamo osservato una diminuita sensibilità al rotenone, indice di un'alterazione strutturale delle subunità idrofobiche del Complesso. Lo studio del controllo del flusso metabolico attraverso

la catena respiratoria ha rivelato che il Complesso I diviene fortemente limitante durante la senescenza sia in mitocondri non sinaptici di corteccia cerebrale che in mitocondri di fegato di ratto.

- Lo sviluppo di marcatori di funzionalità mitocondriale in cellule umane di facile reperibilità, come piastrine e linfociti, riveste grande importanza per evidenziare lo stato energetico cellulare in condizioni patologiche. Abbiamo messo a punto diversi biomarkers di funzione mitocondriale: (1) effetto Pasteur, cioè entità della stimolazione della produzione di lattato in cellule trattate con un inibitore della catena respiratoria (antimicina A): la diminuzione del delta-lattato (produzione stimolata meno produzione basale) è indice della funzionalità dei mitocondri. Tale sistema è stato convalidato in piastrine (in cui è oggetto di un brevetto internazionale), linfociti, cellule in vitro e nel cuore isolato e perfuso. (2) Sensibilità del potenziale di membrana mitocondriale in situ, studiato in citometria di flusso, ai disaccoppianti. (3) Stimolazione della NADH ossidasi della membrana plasmatica (in linfociti), come compensazione alla diminuita ossidazione del NADH glicolitico quando i mitocondri sono danneggiati.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000

1. Decrease of rotenone inhibition is a sensitive parameter of Complex I damage in brain nonsynaptic mitochondria of aged rats. M.L. Genova, C. Bovina, M. Marchetti, F. Pallotti, C. Tietz, G. Biagini, A. Pugnali, C. Viticchi, A. Gorini, R.F. Villa, G. Lenaz, FEBS Lett., 410, 467-469 (1997).
2. Modification of the mitochondrial F₁-ATPase subunit, enhancement of the ATPase activity of the IF₁-F₁ complex and IF₁ binding dependence of the conformation of the α -subunit; G. Solaini, A. Baracca, E. Gabellieri, G. Lenaz; Biochem. J., 327, 443-448 (1998).
3. Role of mitochondria in oxidative stress and ageing (review); G. Lenaz; Biochim. Biophys. Acta, 1366, 53-67 (1998).
4. Mitochondrial DNA in platelets from aged subjects; G. Biagini, F. Pallotti, S. Carraro, G. Sgarbi, M. Merlo Pich, G. Lenaz, F. Anzivino, G. Gualandi, X. Deng; Mech. Ageing Dev. 101(3), 269-275 (1998).
5. Biochemical features of mtDNA 14484 (ND6/M64V) point mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy (LHON); V. Carelli, A. Ghelli, L. Bucchi, P. Montagna, A. De Negri, V. Leuzzi, C. Carducci, G. Lenaz, E. Lugaresi, M. Degli Esposti; Ann. Neurol., 45, 320-328 (1999).
6. Effect of aging and of an oxidation stress on peroxide levels and mitochondrial membrane potential in isolated rat hepatocytes; M. Cavazzoni, S. Barogi, A. Baracca, G. Parenti Castelli, G. Lenaz; FEBS Lett., 440, 53-56 (1999)
7. Effect of the oxidative stress induced by adriamycin on rat hepatocyte bioenergetics during ageing; S. Barogi, A. Baracca, M. Cavazzoni, G. Parenti Castelli, G. Lenaz; Mech. Ageing Dev., 113, 1-21 (2000)
8. Catalytic activities of the mitochondrial ATP synthase in patients with the mtDNA T8993G mutation in the ATPase 6 gene encoding subunit a; Baracca, S. Barogi, V. Carelli, G. Lenaz, G. Solaini; J. Biol. Chem. 275, 4177-4182 (2000)
9. Effect of micronutrient status on natural killer cell immune function in healthy free-living subjects aged ≥ 90 y(1); G. Ravaglia, P. Forti, F. Maioli, L. Bastagli, A. Facchini, E. Mariani, L. Savarino, S. Sassi, D. Cucinotta, G. Lenaz; Am. J. Clin. Nutr. 71, 590-598 (2000)
10. Surface oxidase and oxidative stress propagation in aging. D.M. Morre', G. Lenaz, D.J. Morre'; J. Exp. Biol. 203, 1513-1521 (2000)

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Proseguiranno le ricerche su tutti gli obiettivi considerati e inoltre saranno affrontati altri temi collegati, in particolare il ruolo dello stress ossidativo nella morte cellulare per apoptosi nonché il ruolo dei mitocondri in tale fenomeno. Per quanto riguarda le malattie mitocondriali, continueremo gli studi sulla malattia di Leber, soprattutto valutando tre possibilità atte a spiegare il meccanismo molecolare della malattia: se vi sia un'alterata sintesi di ATP, se un'augmentata produzione di radicali dell'ossigeno, o se sia presente una componente autoimmunitaria. Per la NARP si proseguirà nel tentativo di caratterizzare il motivo della diminuita sintesi di ATP, valutando il rientro di protoni attraverso il canale protonico di Fo. Gli studi sulla senescenza saranno soprattutto rivolti all'impiego dei marcatori mitocondriali sviluppati (punto c) in piastrine e altre cellule umane, allo scopo di dimostrare se effettivamente vi sia un declino energetico mitocondriale misurabile anche in cellule a rapido rinnovamento come le piastrine. Inoltre valuteremo se nella senescenza sono presenti alterazioni della trascrizione del DNA mitocondriale, studiata con Northern blotting. Gli studi sull'apoptosi riguarderanno cellule coltivate in vitro (cellule neuronali o cheratinociti) trattate con un iniziatore radicalico per indurre uno stress ossidativo: si valuterà il decorso temporale di vari eventi di cui è ancora incerta la sequenza: traslocazione di proteine pro-apoptotiche ai mitocondri, rilascio di citocromo c e altre proteine mitocondriali, apertura del poro di transizione di permeabilità.

Collaborazioni internazionali in atto

Prof. Harold Baum, Division of Biological Sciences, King's College London (U.K.)

Dr. Francesco Pallotti, Dept. of Neurology, Columbia University, New York, USA

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Apparecchiatura completa per le colture cellulari

Accessibilità a citofluorimetro Epics e a microscopia confocale (Centro interdipartimentale di ricerche biotecnologiche).

Spettrofotometri a doppio raggio e doppia lunghezza d'onda

Parole chiave

Mitocondri; invecchiamento; DNA mitocondriale; apoptosi; piastrine

UNITA' DI RICERCA INBB
Laboratorio Nazionale Sezione Terapia Genica

Responsabile Scientifico
Dott. Paolo Madeddu

Linea di Ricerca

Terapia Genica

titolo

Terapia Genica in Angiogenesi

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Madeddu Paolo	PA	madeddu@yahoo.com
Emanuelli Costanza	Ricercatrice I.N.B.B.	emanuelli@yahoo.com
Salis Maria Bonaria	Ricercatrice I.N.B.B.	bonarias@hotmail.com
Milia Anna Franca	BC INBB	annaafm@hotmail.com
Gaspa Leonardo	PO	ggaspainbb@yahoo.com

Non Aderenti INBB

Stacca Tiziana	A	tstacca@hotmail.com
Deiana Maria	A	
Pinna Alessandra	PT	minipinna@hotmail.com

Sede Unità di Ricerca

Laboratorio Nazionale INBB, Via Brigata Sassari, 07033 Osilo (Sassari)
0793441006 0793441006

madeddu@yahoo.com

Sezione INBB di appartenenza

Catania

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Caratterizzazione fenotipo cardiovascolare di animali transgenici e knockout per i geni codificanti i recettori delle chinine

Terapia genica dell'ischemia periferica

Terapia genica della microangiopatia diabetica

Caratterizzazione degli effetti cardiovascolari della nocicettina

Risultati ottenuti

La deficienza genetica del recettore B2 delle chinine porta con l'invecchiamento allo sviluppo di ipertensione e miocardiopatia dilatativa.

La terapia genica con callicreina promuove il ripristino dell'integrità vascolare dopo danno meccanico e la ristenosì.

La terapia genica con callicreina umana per via locale accelera il recupero emodinamico dopo danno ischemico

Gli effetti cardiovascolari della nocicettina consistono in ipotensione e bradicardia. Le proprietà di nuovi antagonisti recettoriali del recettore della nocicettina sono state caratterizzate in vivo

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000

1. Madeddu P, Emanuelli C: Lesson from knockout mice: Evidence and confounding factors. *Hypertension*. (1999) 34:e14-15.

2. Madeddu P, Emanuelli C, Maestri R, Salis MB, Minasi A, Capogrossi MC, Olivetti G: Angiotensin Type 1 receptor blockade prevents cardiac remodeling in bradykinin B₂ receptor knockout mice. *Hypertension*. (2000) 100:391-396.

3. Emanuelli C, Salis MB, Chao J, Chao L, Agata J, Munaò A, Straino S, Minasi A, Capogrossi MC, Madeddu P: Adenovirus-mediated human tissue kallikrein gene delivery inhibits neointima formation induced by interruption of blood flow in the mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. (2000), in press.

4. Emanuelli C, Salis MB, Figueroa C, Chao J, Chao L, Gaspa L, Capogrossi MC, Madeddu P: Captopril prevents neointima formation in the mouse: participation of kinin B₁ and B₂ receptors. *Br J Pharmacol*. (2000), in press.

5. Emanuelli C, Minasi A, Zacheo A, Chao J, Chao L, Salis MB, Straino S, Tozzi MG, Gaspa L, Bianchini G, Stillo F, Capogrossi MC, Madeddu P: Local delivery of human tissue kallikrein gene accelerates spontaneous angiogenesis in a mouse model of hindlimb ischemia. *Circulation*. (2000). in press.

6. Salis MB, Emanuelli C, Milia AF, Remo G, Madeddu P: Studies of the cardiovascular effects of nociceptin and related peptides. *Peptides*. (2000) In press.

7. Madeddu P, Emanuelli C: "Bradykinin receptors in the development of hypertension" in "Development of the Hypertensive Phenotype: Basic and Clinical Studies" of the series of "Handbook of Hypertension", Elsevier Science Publishers, WH. Birkenhager and JL. Reid editors, in press.

8. Emanuelli C, Zacheo A, Minasi A, Chao J, Chao L, Salis MB, Stacca T, Straino S, Capogrossi MC, Madeddu P: Adenovirus-mediated human tissue kallikrein gene delivery induces angiogenesis in normoperfused skeletal muscle". *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. In press.

9. Gowdak LHW., Poliakova L, Wang X, Kowesdy I, Fisherbein KW, Zacheo A, Emanuelli C, Marrocco Trischitta M, Lakatta E, Anversa P, Spencer RGS, Talan M, Capogrossi MC: "Adenovirus-mediated VEGF₁₂₁ gene transfer stimulates angiogenesis in normoperfused skeletal muscle and preserved tissue perfusion after induction of ischemia". *Circulation*. (2000), 102:565-71

10. Emanuelli C, Salis MB, Stacca T, Gaspa L, Chao J, Chao L, Madeddu P: Rescue of impaired angiogenesis in spontaneously hypertensive rats by intramuscular human tissue kallikrein gene transfer. Submitted to *Hypertension*.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Ricerche di angiogenesi terapeutica a condizioni caratterizzate da disfunzione endoteliale ed alta probabilità di incidenti vascolari acuti e basso potenziale angiogenico spontaneo (Diabete, Ipertensione, Aterosclerosi).

Sviluppo di nuovi sistemi di trasferimento genico caratterizzati da alta efficienza di infezione e trasduzione (lentivirus). Infezione di cellule del midollo osseo per il potenziamento della angiogenesi terapeutica.

Angiogenesi terapeutica nell'ischemia miocardica.

Messa a punto di strategie innovative per contrastare l'angiogenesi neoplastica. Studio su popolazione di markers di angiogenesi.

Collaborazioni internazionali in atto

Michael Bader, Max Delbruck Center for Molecular Medicine, Berlino, Germania

Julie Chao, Medical University of South Carolina, Charleston, USA

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Laser Doppler Lisca, Analisi isto-morfometrica assistita da software, Attrezzatura per microchirurgia sperimentale, Armadi Stabulari, Biologia Molecolare, Culture cellulari

Parole Chiave

Terapia Genica, Modelli Trasgenici e Knockout, Ischemia, Callicreina, Angiogenesi

UNITA' DI RICERCA INBB
Modena

Responsabile Scientifico
Prof. Pier Cosimo Magherini

Linea di Ricerca

Elaborazione dell'informazione nocicettiva nel midollo spinale

titolo

Meccanismi di modulazione e trasmissione sinaptica nelle corna dorsali del midollo spinale di ratto

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Magherini Pier Cosimo

PO

maghe@unimo.it

Bardoni Rita

RU

bardoni@unimo.it

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Scienze Biomediche - Sezione di Fisiologia - Università di Modena e Reggio Emilia

Via Campi, 287 - 41100 Modena

059 205 5338

059 205 5363

maghe@unimo.it

Sezione INBB di appartenenza

Bologna

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Ci si è proposti di studiare le proprietà dei recettori per il glutammato di tipo NMDA e il loro ruolo nel mediare la trasmissione sinaptica nelle corna dorsali del midollo spinale di ratto neonato, con particolare riferimento alle aree più superficiali, coinvolte nell'elaborazione dell'informazione nocicettiva. A tal scopo si è previsto di utilizzare la tecnica elettrofisiologica del patch-clamp, registrando da neuroni della lamina II in fettina. Le registrazioni dovevano essere compiute da neuroni di animali nelle prime due settimane postnatali, un periodo di intensa maturazione e sinaptogenesi nelle corna dorsali del midollo spinale di ratto. In particolare, si voleva determinare se le proprietà funzionali dei recettori NMDA, generalmente fortemente coinvolti in processi di plasticità e maturazione, variavano durante lo sviluppo postnatale. Inoltre ci si proponeva di stabilire se tali recettori avessero un ruolo importante nel generare scariche di potenziali d'azione e nel determinare lo stato di eccitabilità nei neuroni della lamina II.

Risultati ottenuti

Registrazioni elettrofisiologiche da neuroni della lamina II di midollo spinale di ratto neonato hanno mostrato che i recettori NMDA sono fortemente sensibili agli ioni magnesio fin dai primi giorni dopo la nascita e che le correnti sinaptiche mediate da tali recettori hanno una cinetica piuttosto rapida, riconducibile a quella propria di correnti mediate da recettori NMDA in sistemi maturi. Ciò suggerisce che, fin dall'inizio dello sviluppo postnatale, i recettori NMDA abbiano una composizione in subunità e proprietà funzionali simili a recettori espressi in un sistema maturo. Sebbene la maggior parte di sinapsi glutamatergiche nella lamina II siano mediate sia da recettori NMDA che AMPA, è stato osservato che una significativa percentuale di queste sinapsi è mediata solo da recettori NMDA, mostrando che questo tipo di sinapsi, oltre che in altre aree del sistema nervoso centrale, è presente anche nel midollo spinale.

E' stato inoltre accertato che i recettori NMDA sono fortemente coinvolti nella genesi di potenziali d'azione nei neuroni della lamina II: in certi casi, il blocco di tali recettori con un antagonista specifico abolisce completamente la scarica di potenziali d'azione.

I nostri studi hanno quindi mostrato che i recettori NMDA sono funzionali nelle corna dorsali di ratto fin dai primi giorni dopo la nascita e che svolgono un ruolo importante nel determinare lo stato di eccitabilità neuronale.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000

BARDONI R., MAGHERINI P.C. & MACDERMOTT A.B.: (2000) Activation of NMDA receptors drives action potentials in superficial dorsal horn from neonatal rats. Neuroreport, 11(8):1721-7.

GU J., BARDONI R., MAGHERINI P.C. & MACDERMOTT A.B. (1998) "Effects of the P2-purinoceptor antagonists suramin and pyridoxal-phosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonic acid on glutamatergic synaptic transmission in rat dorsal horn neurons of the spinal cord". Neurosci. Lett. 253(3):167-70.

BARDONI R., MAGHERINI P.C. & MACDERMOTT A.B.: (1998) "NMDA EPSCs at glutamatergic synapses in the spinal cord dorsal horn of the postnatal rat.". J. of Neuroscience , 18: 6558-6567.

MAGHERINI, P.C., BARDONI, R. & BELLUZZI, O. (1997) Electrical properties of periglomerular cells in the frog olfactory bulb. Archives Italiennes de Biologie 135: 195-203.

BARDONI, R., GOLDSTEIN, P.A., LEE, C.J., GU, J. & MACDERMOTT A.B. (1997) P_{2x} ATP receptors mediate fast synaptic transmission in the dorsal horn of the rat spinal cord. J. of Neuroscience. 17: 5297-5304

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Nei prossimi anni ci si propone di approfondire lo studio dei recettori NMDA nelle corna dorsali del midollo spinale di ratto, con particolare riferimento all'identificazione di recettori NMDA espressi a livello presinaptico e alla comprensione del loro ruolo nel modulare la trasmissione sinaptica. Lo studio dell'azione modulatrice di recettori presinaptici nelle corna dorsali comprenderà anche altri recettori glutammatergici, quali gli AMPA e quelli per il kainato. Si determinerà inoltre l'eventuale interazione di questi recettori con sistemi che coinvolgono altri neurotrasmettitori, quali il GABA, i peptidi e gli oppioidi.

Collaborazioni internazionali in atto

Dal 1995 è in atto una collaborazione con il laboratorio della Prof.ssa Amy MacDermott, presso il Department of Physiology, Columbia University, New York (USA)

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Microscopio ottico da elettrofisiologia

Amplificatore per patch-clamp

Stimolatore

Amplificatore per registrazioni extracellulari

Parole Chiave

Trasmissione sinaptica, Glutammato, Dolore, Patch-clamp. Sviluppo

UNITA' DI RICERCA INBB
Ancona

Responsabile Scientifico
Prof. Giulio Magni

Linea di Ricerca

Metabolismo dei nucleotidi piridinici e pirimidinici

titolo

Pirimidina 5'-nucleotidasi e NMN adeniltrasferasi, enzimi chiave delle vie biosintetiche dei nucleotidi pirimidinici e piridinici

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Magni Giulio.	PO	magnig@popcsi.unian.it
Emanuelli Monica	PA	m.emanuelli@popcsi.unian.it
Amici Adolfo	RU	amicia@popcsi.unian.it
Raffaelli Nadia	PT	n.raffaelli@popcsi.unian.it
Lorenzi Teresa	DR	lt400195@ascu.unian.it

Non Aderenti INBB

Carnevali Francesco	DR	fcarn@libero.it
Mazzola Francesca	DR	

Sede Unità di Ricerca

Istituto di Biochimica - Università degli Studi di Ancona

Via Ranieri 65 - 60131 ANCONA

071 2204677

071 2802117

magnig@popcsi.unian.it

Sezione INBB di appartenenza

Roma "Tor Vergata"

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

L'obiettivo di questa unità di ricerca è lo studio di enzimi coinvolti nelle vie biosintetiche e di recupero dei nucleotidi pirimidinici e piridinici. In particolare, oggetto della ricerca è la caratterizzazione delle pirimidina 5'-nucleotidasi (PN-I and PN-II) da eritrociti umani, che sono coinvolte nella regolazione della citotossicità degli analoghi dei nucleotidi utilizzati in terapie antitumorali ed antivirali. Inoltre l'interesse è rivolto anche allo studio dell'enzima NMN adeniltrasferasi, che catalizza una reazione comune sia alle vie di recupero sia alla sintesi de novo del NAD.

Risultati ottenuti

Gli enzimi pirimidina 5'-nucleotidasi (PN-I e PN-II) sono stati purificati nel nostro laboratorio partendo da globuli rossi umani. La proteina ottenuta è stata caratterizzata sia da un punto di vista molecolare sia cinetico. Le due proteine sono state inoltre digerite con tripsina e bromuro di cianogeno ottenendo numerosi peptidi che, dopo purificazione, sono stati sequenziati. Le informazioni di struttura primaria così ottenute hanno consentito, attraverso tecniche di PCR, di isolare e sequenziare i cDNA codificanti i due enzimi. Tali cDNA, clonati in opportuni vettori, sono stati espressi in cellule di *E. coli* ingegnerizzate.

L'enzima NMN adeniltrasferasi è stato purificato ad omogeneità e caratterizzato dall'archaeon termofilo *Sulfolobus solfataricus*. La determinazione della sequenza aminoacidica all'N terminale ha permesso l'identificazione del gene codificante lo stesso enzima dall'archaeon *Methanococcus jannaschii*. Ricerche in banche-dati hanno rivelato la presenza di proteine significativamente omologhe all'enzima da archaea. Tali proteine includono un enzima bifunzionale da *Synechocystis sp.* dotato sia di attività NMN adeniltrasferasica sia ADP-ribosio pirofosfatase, e il fattore di trascrizione della sintesi del NAD negli eubatteri (NadR). Questi enzimi sono stati espressi in *E. coli*, purificati ad omogeneità e caratterizzati da un punto di vista cinetico. L'NMN adeniltrasferasi è stata inoltre studiata in organismi eucariotici; è stato infatti identificato, clonato ed espresso il gene, che codifica per tale enzima nel lievito e, più recentemente, è stato isolato e sequenziato il cDNA relativo all' NMN adeniltrasferasi umana. Il clonaggio e l'espressione di tale cDNA hanno portato all'ottenimento della proteina umana ricombinante e hanno consentito di intraprendere approfonditi studi strutturali e funzionali di tale enzima.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000

- 1) Purification of human nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase. Magni G., Emanuelli M., Amici A., Raffaelli N., and Ruggieri S.; *Methods in Enzymology* 280, 241-247, 1997.
- 2) NMN adenylyltransferase from yeast and other microorganisms. Magni G., Raffaelli N., Emanuelli M., Amici A., Natalini P. and Ruggieri S.; *Methods in Enzymology* 280, 248-255, 1997.
- 3) Pyrimidine nucleotidases from human erythrocyte possess phosphotransferase activities specific for pyrimidine nucleotides. Amici A., Emanuelli M., Magni G., Raffaelli N., Ruggieri S.; *FEBS Letters*, 419, 263-267, 1997
- 4) Characterization of nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase from thermophilic archaea. Raffaelli N., Pisani F.M., Lorenzi T., Emanuelli M., Amici A., Ruggieri S., Magni G.; *J. Bacteriol.*, 179, 7718-7723, 1997
- 5) Identification of the archaeal NMN adenylyltransferase gene. Raffaelli N., Emanuelli M., Pisani F.M., Amici A., Lorenzi T., Ruggieri S., Magni G.; *Mol. Cell. Biochem.*, 193, 99-102, 1999
- 6) Enzymology of NAD synthesis. Magni G., Amici A., Emanuelli M., Raffaelli N., Ruggieri S. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology, Part A-73*, D.L. Purich (ed.), John Wiley and Sons, New York, 135-182, 1999
- 7) *Synechocystis* sp. slr0787 protein is a novel bifunctional enzyme endowed both with nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase and Nudix hydrolase activities. Raffaelli N., Lorenzi T., Amici A., Emanuelli M., Ruggieri S. and Magni G.; *FEBS Letters*, 444(2), 222-226, 1999.
- 8) Identification and characterization of YLR328W, the *Saccharomyces cerevisiae* structural gene coding for NMN adenylyltransferase. Expression and characterization of the recombinant enzyme. Emanuelli M., Carnevali F., Lorenzi M., Raffaelli N., Amici A., Ruggieri S., and Magni G.; *FEBS Letters*, 455(1-2), 13-17, 1999.
- 9) *Escherichia coli* NadR regulator is endowed with nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase activity.; Raffaelli N., Lorenzi T., Mariani P.L., Emanuelli M., Amici A., Ruggieri S. and Magni G.; *J. Bacteriol.* 181, 5509-5511, 1999.
- 10) Human erythrocyte pyrimidine 5'-nucleotidase, PN-I, is identical to p36, a protein associated to lupus inclusion formation in response to interferon. Amici A., Emanuelli M., Raffaelli N., Ruggieri S., Saccucci F., and Magni G.; *Blood*, 96, 1480-1482, 2000.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

La ricerca dell'Unità proseguirà con la caratterizzazione delle proteine umani ricombinanti e con lo studio della loro espressione in vari tessuti in condizioni normali e patologiche, in modo da approfondire il ruolo svolto nella regolazione dei flussi metabolici dei rispettivi nucleotidi. E' altresì interesse dell'Unità procedere con lo studio della localizzazione dei suddetti enzimi nei vari distretti cellulari e tissutali. Pertanto verranno prodotti anticorpi specifici contro epitopi opportunamente prescelti. Infine, sia gli enzimi umani, sia l'NMN adeniltrasferasi da archaea, verranno sottoposti ad analisi di struttura tridimensionale.

Collaborazioni internazionali in atto

Purich DL, PhD, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Florida, Gainesville, USA,

Duley JA, Department of Chemical Pathology, Guy's Hospital, London, UK

Maury G, Laboratoire de Chimie Bioorganique, Université Montpellier II, Montpellier, France.

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Sequenziatore di proteine, spettrometro di massa LC/MS, HPLC, analizzatore di aminoacidi, PCR, spettrofotometri

Parole Chiave

nucleotidi, pirimidine, piridine, analoghi, NAD

UNITA' DI RICERCA INBB
Firenze

Responsabile Scientifico
Prof. Marco Mascini

Linea di Ricerca

Realizzazione di Biosensori per Applicazioni in campo Medico, Ambientale ed Agroalimentare

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Mascini Marco PO Mascini@unifi.it

Non Aderenti INBB

Minunni Maria RU Minunni@dsp.igiene.unifi.it
Marrazza Giovanna RU Gmarrazza@dsp.igiene.unifi.it
Palchetti Ilaria BC Ilaria.palchetti@unifi.it
Tombelli Sara BC Sara.tombelli@unifi.it

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Chimica – Università di Firenze

Via Gino Capponi 9, 50121 Firenze

+39-055-2757274

+39-055-2476972

Mascini@unifi.it

Sezione INBB di appartenenza

Bologna

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Biosensori per tossicità ambientale

Biosensori a base DNA per reazioni di ibridazione

Accoppiamento Biosensori con PCR

Elettrodi Stampati per applicazioni in campo

Biosensori per misure di pesticidi in situ

Biosensori ottici e piezoelettrici per individuazione di OGM (organismi geneticamentemodificati)

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000

S. Tombelli, M. Mascini, L. Braccini, M. Anichini, A.P.F. Turner. Coupling of a DNA piezoelectric biosensor and polymerase chain reaction to detect apolipoprotein E Polymorphisms. *Bios.&Bioel.* 15, (2000), 363-370

J. Labuda, M. Buckova, S. Jantova, I. Stepanek, I. Surugiu, B. Danielsson, M. Mascini, Modified screen-printed electrodes for the investigation of the interaction of non-electroactive quinazoline derivatives with DNA. *Fresenius J. Anal. Chem.* (2000) 367: 364-368

S. Tombelli, M. Mascini. Piezoelectric Quartz Crystal Biosensor: Recent Immobilisation Schemes. *Anal. Lett.* 33(11), 2000, pp. 2129-2151

S. Tombelli, M. Mascini, C. Sacco, A.P.F. Turner. A DNA piezoelectric biosensor assay coupled with a polymerase chain reaction for bacterial toxicity determination in environmental samples. *Anal. Chim. Acta*, 2000, 418(1), 1-9

Palchetti, C. Upjohn, A.P.F. Turner, M. Mascini. Disposable Screen-Printed Electrodes Mercury-free for Lead Detection. *Anal. Lett.*, 33(7), 1231-1246, 2000

G. Marrazza, G. Chiti, M. Mascini, M. Anichini. Detection of Human Apolipoprotein E Genotypes by DNA Electrochemical Biosensor Coupled with PCR. *Clin. Chem.* 46(1) 31-37, 2000

G. Marrazza, I. Chianella, M. Mascini. Disposable DNA electrochemical biosensors for environmental monitoring *Anal. Chim. Acta*, 387(1999) 297-307

E. Malavolti, A. Cagnini, C. Caputo, L. Della Ciana, M. Mascini. An optimized optrode for continuous potassium monitoring in whole blood. *Analytica Chimica Acta* 401(1999) 129-136

M.-A. Carsol, M. Mascini. Diamine oxidase and putrescine oxidase immobilized reactors in flow injection analysis: a comparison in substrate specificity. *Talanta*, 50 (1999), 141-148

Palchetti, A. Cagnini, M. Mascini, A.P.F. Turner. Characterisation of Screen-Printed Electrodes for Detection of Heavy Metals. *Mikrochim. Acta*, 1999, 131, 65-73

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Realizzazione di prototipi con Biosensori per misure rapide in situ di interesse Ambientale (pesticidi, tossicità genotossicità), chimico clinico (marker tumorali, immunochimica) e di interesse agroalimentare (OGM, aflatoxine, freschezza e qualità di alimenti)

Collaborazioni internazionali in atto

- 1) Progetto EU per una lingua elettronica (MICS) (10 Unità Operative)
- 2) Senspol (Sensors for Monitoring Water Pollution from Contaminated Landfills and Sediment) (Concerted Action nel Programma Environment)
- 3) Concerted Action on "Validation of Biosensors". Evaluation/Validation of Novel Biosensors in Real Environmental and Food Samples (20 participants)

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Biacore (Pharmacia)

Apparecchi per misure piezoelettriche

Apparecchiature per misure elettrochimiche

Parole Chiave

Biosensori, DNA, Ibridazione

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000

1. Lippe G., Di Pancrazio F., Bortolotti N., Bauerlein E., Mavelli I. and Dabbeni Sala F. *Redox properties of iron in the binding site(s) of F₁ATPase from mammalian mitochondria and Thermophilic Bacterium PS3: a comparative study*. Free. Rad. Res., 28, 229-239, 1998.
2. Lippe G., Tanfani F., Di Pancrazio F., Contessi S., Bertoli E. and Dabbeni-Sala F. *Effect of inhibitor binding to α subunits of F₁ATPase on enzyme thermostability: a kinetic and FT-IR spectroscopic analysis*. FEBS Lett. 432, 128-132, 1998.
3. Comelli M., Londero D. and Mavelli I. *Severe energy impairment consequent to inactivation of mitochondrial ATPsynthase as early event of cell death. A mechanism for the selective sensitivity to H₂O₂ of differentiating erythroleukemia cells*. Free Rad. Biol. Med., 24, 924-932, 1998.
4. Rapozzi V., Perissin L., Zorzet S., Comelli M., Mavelli I., Sentjunc M., Schara M. and Giraldi T. *Bonemarrow toxicity and antitumor action of adriamycin in relation to the antioxidant effects of melatonin*. Radiol. Oncol., 32, 95-102, 1998.
5. Rapozzi V., Zorzet S., Comelli M., Mavelli I., Peressin L. and Giraldi T. *Melatonin decreases bone marrow and lymphatic toxicity but not the antitumor action of Adriamycin in mice bearing TLX5 lymphoma*. Life Sci., 63, 1701-1713, 1998.
6. Rossi L., Lippe G., Marchese E., De Martino A., Mavelli I., Rotilio G. and Ciriolo M. *Decrease of cytochrome c oxidase protein in heart mitochondria of copper-deficient rats*. Biometals, 11, 207-212, 1998.
7. Rapozzi V., Comelli M., Mavelli I., Sentjunc M., Schara M., Peressin L. and Giraldi, T. *Melatonin and oxidative damage in mice liver induced by the prooxidant antitumor drug, Adriamycin*. In vivo, 13, 45-50, 1999.
8. Polizio F., Lippe G., Di Pancrazio F., Desideri A. and Mavelli I. *EPR detection of protein-derived radicals in the reaction of H₂O₂ with Fe bound in mitochondrial F₁ATPase*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 263, 281-285, 1999.
9. Comelli M. and Mavelli I. *Oxidative damage to differentiating Friend's erythroleukemia cells targets mitochondrial ATP synthase and energy supply resulting in cell death*. In: Mitochondrial Ubiquinone (Coenzyme Q10): Biochemical, Functional, Medical and Therapeutic Aspects in Human Health and Diseases. Ebadi M., Marwah J. and Chopra R. K. eds. Prominent Press, Scottsdale, 2000 in press.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

A livello cellulare: 1) analisi di ATPsintasi in tessuti in condizioni di aumentato flusso di radicali dell'ossigeno, in particolare nel miocardio sottoposto a ischemia/riperfusion. Valutazione dell'implicazione di ATPsintasi nei meccanismi di cardioprotezione da preconditionamento ischemico. 2) Valutazione in cellule integre dell'implicazione del danno ossidativo ad ATPsintasi nei meccanismi dell'apoptosi.

A livello molecolare: 1) Definizione della localizzazione dei siti per il Fe di F₁ mitocondriale e batterico. 2) Caratterizzazione strutturale dei suddetti siti come fattori di stabilità, in particolare in condizioni estreme.

Collaborazioni internazionali in atto

- John Walker, Dunn Human Nutrition Unit, MRC Building, Hills Road, Cambridge CB2 2XY. U.K.
- Dirk Bald, Research Lab. of Resources Utilization, Tokyo Institute of Technology, Japan.
- Bauerlein Edmund, Max Planck Institut fur Biochemie, Martinsried bei Munchen, Germany

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Spectropolarimetro J600 (Jasco)
Spectrofotometro Lambda 14 (Perkin Elmer)
Ultracentrifuga Centrikon T-1055 (Kontron)
FACScan (Becton Dickinson)
Densitometro laser Ultrascan XL (LKB)
HPLC 125 NM (Beckman)

Parole Chiave

F₀F₁ATPsynthase; F₁ATPase; Iron-binding sites; Protein stability; Oxidative stress

UNITA' DI RICERCA INBB
Sassari

Responsabile Scientifico:
Dott. Francesco Melis

Linea di Ricerca:

Possibili risultanze elettrofisiologiche in corso di atassia alcolica: ruolo dell'output cerebellare

Composizione del Gruppo:

Aderenti INBB

Melis Francesco	RU	melis@ssmain.uniss.it
Caria Marcello A.	PA	mcaria@ssmain.uniss.it
Becciu Mameli C. Ombretta	PO	fisiou@ssmain.uniss.it

Non Aderenti INBB

Sanna Giancarlo	PT	fisiou@ssmain.uniss.it
Monti Andrea	PT	fisiou@ssmain.uniss.it
Tavera Candido F.	PT	fisiou@ssmain.uniss.it

Sede Unità di Ricerca:

Università degli Studi di Sassari, Facoltà di Medicina e Chirurgia; Dipartimento di Scienze Biomediche, Sezione di Fisiologia Umana; Viale San Pietro 43/B, 07100 Sassari,
079.228286 079.228298 fisiou@ssmain.uniss.it

Sezione INBB di Appartenenza:

Catania

Riassunto della attività svolta negli ultimi tre anni

La attività scientifica svolta presso la Sezione di Fisiologia Umana ha riguardato i seguenti temi di ricerca:

- complicanze aritmiche in corso di epilessia sperimentale;
- controllo plurisensoriale della attività neuronale del dodicesimo nucleo;
- influenza della somministrazione degli ormoni tiroidei sulla eccitabilità dei neuroni ippocampali;
- influenza dei metalli pesanti sulla attività delle aree cerebrali e del tronco dell'encefalo;
- biodisponibilità del Propofol nelle diverse frazioni ematiche e nel tessuto cerebrale.

Complicanze aritmiche in corso di epilessia sperimentale: i risultati ottenuti hanno messo in evidenza che l'induzione di focolai epilettici a livello dell'ipotalamo e del tronco dell'encefalo, sperimentalmente indotti mediante applicazione topica di Penicillina-G, sono capaci di "triggerare" risposte cardiache caratterizzate da bradiaritmie di diversa gravità. E' stato ipotizzato che il fenomeno della morte improvvisa, talvolta osservato nei pazienti epilettici, possa essere ricondotto ad un quadro aritmico particolarmente severo, verosimilmente sostenuto da complicazioni del quadro metabolico e della funzione respiratoria, che nel 20% delle osservazioni effettuate accompagnano le manifestazioni epilettiche.

Controllo plurisensoriale della attività neuronale del dodicesimo nucleo: è stato evidenziato che i neuroni ipoglossali soggiacciono ad un complesso sistema di controllo, atto ad assicurare il corretto atteggiamento posturale della lingua nella cavità orale, in risposta ad informazioni che provengono dalle retine, dai nervi periferici e dai recettori labirintici. Recentemente è stata ipotizzata una associazione vista-olfatto, capace di modulare la attività dei neuroni ipoglossali in preparazione dei muscoli linguiali alla ricezione del cibo durante la fase orale della digestione.

Influenza della somministrazione degli ormoni tiroidei sulla eccitabilità dei neuroni ippocampali: i risultati ottenuti hanno messo in evidenza che in ratti adulti, resi artificialmente ipotiroidei mediante somministrazione di propiltiouracile, la somministrazione mediante microiniezione locale di T4 induce una significativa modificazione della attività elettrica dei neuroni del giro dentato dell'ippocampo. I dati disponibili suggeriscono un possibile ruolo di neuromodulazione da parte degli ormoni tiroidei, che acquista particolare rilievo in considerazione della funzione svolta dall'ippocampo nei fenomeni cognitivi dell'apprendimento e della memoria, come è noto gravemente deficitari in corso di disfunzioni tiroidee. Questo approccio sperimentale fornisce inoltre un ulteriore supporto alla comprensione degli effetti che gli ormoni tiroidei esercitano, non solo a livello dell'ippocampo, ma, più in generale, sulle strutture del sistema nervoso centrale.

Influenza dei metalli pesanti sulla attività delle aree cerebrali e del tronco dell'encefalo: i risultati ottenuti hanno dimostrato che la somministrazione di acetato di piombo è capace di indurre sicuri effetti neurotossici a livello del sistema nervoso centrale, come testimoniano le alterazioni del riflesso vestibolo-oculare (VOR), riscontrate anche a bassissime concentrazioni della sostanza a livello sia plasmatico che cerebrale. Queste osservazioni, che hanno consentito di individuare il tronco dell'encefalo come un possibile "target" dell'azione del piombo, rendono meno probabile una possibile influenza del metallo sulle aree del lobo frontale corticale, soprattutto in considerazione della

assenza di disturbi di tipo comportamentale durante il trattamento con la sostanza intossicante. Gli esperimenti effettuati consentono di suggerire che l'esplorazione del VOR potrebbe rappresentare un test efficace per la valutazione funzionale del sistema nervoso centrale esposto a bassi livelli di piombo ematico e tessutale.

Biodisponibilità del Propofol nelle diverse frazioni ematiche e nel tessuto cerebrale: lo scopo di questa ricerca è stato quello di studiare, mediante esperimenti acuti eseguiti su conigli, la biodisponibilità del Propofol in tutte le frazioni ematiche, nel liquido cerebro-spinale (CSF) e nel tessuto cerebrale durante i diversi livelli di anestesia indotta dalla somministrazione del farmaco per via endovenosa. Lo studio è stato intrapreso al fine di verificare l'esistenza di una correlazione tra la biodisponibilità del Propofol nei diversi compartimenti fluidi dell'organismo e nel tessuto cerebrale e l'effetto anestetico del farmaco. I risultati ottenuti hanno dimostrato una disomogenea distribuzione del farmaco nei diversi compartimenti, con massime concentrazioni all'interno dei globuli rossi e nel tessuto cerebrale e minime nel plasma e nel CSF. Queste osservazioni hanno fornito un valido contributo alla comprensione delle caratteristiche farmacologiche evidenziate dal farmaco nelle fasi di induzione e di mantenimento dell'anestesia.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000

1. Caria M.A., Melis F., Corda S., Solinas A. - Long lasting changes in Deiters' neurons electrical activity. - Abstracts of the XXXIII Intern. Congress of Physiological Sciences (I.U.P.S.), P083.04, St. Petersburg 1997.
2. Mameli O., Caria M.A., Melis F., Severino C., Solinas A., Mameli P., Mameli S., Padua G., Massarelli G., Pintus A. - Autonomic derangement may complicate cardiac neurogenic arrhythmias in experimental epilepsy. - Suppl. n.10 (vol. 10) to Eur. J. Neurosc. (Forum of European Neuroscience), 49 (com. 20.45), Berlin 1998.
3. Mameli O., Melis F., Caria M.A., Solinas A., Mameli S., De Riu P.L. - Epileptic discharge of cortical, subcortical and spinal neurons in penicillin induced experimental epilepsy. - Arch. Ital. Biol., 137, 29-46, 1999.
4. Mameli O., Caria M.A., Melis F., Severino C., Solinas A., Mameli P., Mameli S., Padua G., Massarelli G., Pintus A. - Pathological changes in cardio-pulmonary system during experimental epilepsy. - Pflugers Archiv Eur. J. Physiol., 437, R35 (com. 70), 1999.
5. Melis F., Caria M.A., Mameli S., Mameli P., Massarelli G., Pintus A., Lai L., Milia M., Solinas A., Severino C., Mameli O. - Autonomic dysfunction as a possible complication in sudden epileptic death. - Physiol. Res., vol. 48 (suppl. 1), S95, 1999.
6. Melis F., Caria M.A., Stanzani S., Russo A., Cataudella T., Palmieri G., Lai L., Milia M., Solinas A., Severino C., Mameli O. - The interpeduncular nucleus as a putative link of olfactory inputs to the hypoglossal nucleus. - Pflugers Archiv Eur. J. Physiol., 438, R20 (com. 70), 1999.
7. Caria M.A., Melis F., Stanzani S., Russo A., Cataudella T., Palmieri G., Lai L., Milia M., Solinas A., Severino C., Mameli O. - Electrophysiological and neuroanatomical findings in olfactory-hypoglossal connections. - Physiol. Res., vol. 48 (suppl. 1), S60, 1999.
8. Mameli O., Melis F., Caria M.A., Solinas A., Milia M., De Riu P.L., Tocco M.G., Ibba A. - A test for early detection of heavy metal neurotoxicity. - 20th Journées Internationales Méditerranéennes (Medicine du Travail), 135, Il Cairo (Egitto) 1999.
9. Caria M.A., Melis F., Solinas A., Severino C., Carai A., Mameli O. - Influence of metadoxine administration on the ethanol-induced electrophysiological effects at cerebellar level. - "Millennium Meeting" of Federation of European Neuroscience Societies (FENS), p. 321 (com. 169.14), Brighton, UK, 2000.
10. Melis F., Caria M.A., Solinas A., Carai A., Cataudella T., Pellitteri R., Russo A., Stanzani S., Mameli O. - Cortical projection to the hypoglossal neurons in the rat. - "Millennium Meeting" of Federation of European Neuroscience Societies (FENS), p.237 (com. 73.05), Brighton, UK, 2000.

Prospettive ed obiettivi degli ultimi tre anni

I temi di ricerca saranno ulteriormente sviluppati nei prossimi tre anni:

In particolare, per quanto attiene il fenomeno della morte improvvisa, osservato in taluni pazienti affetti da epilessia, saranno indagati ulteriori aspetti della funzionalità cardio-respiratoria e, più in generale, dell'equilibrio omeostatico dell'organismo, che potrebbero risultare profondamente alterati durante l'evoluzione clinica delle manifestazioni epilettiche, fino ad essere causa di morte nelle situazioni più drammatiche.

Relativamente al controllo plurisensoriale della attività dei neuroni ipoglossali, saranno eseguiti ulteriori esperimenti, di carattere sia neuroanatomico che neurofisiologico, con lo scopo di identificare le stazioni nucleari impegnate nella via di trasmissione olfattivo-ipoglossale; inoltre, al fine di precisare con chiarezza l'entità e la natura delle afferenze al dodicesimo nucleo, saranno contemporaneamente studiate le proiezioni provenienti dalle aree corticali motorie e dalla corteccia cerebellare, le quali sicuramente concorrono al complesso e delicato controllo della motilità linguale.

Particolarmente suggestiva appare l'ipotesi di una funzione di neuromodulazione esercitata dagli ormoni tiroidei a livello dei neuroni ipocampali, soprattutto in prospettiva di una possibile futura applicazione di questo risultato ad altre strutture del sistema nervoso centrale.

Sono inoltre in corso di svolgimento alcuni interessanti esperimenti sulla azione dell'etanolo sulla attività elettrica delle cellule di Purkinje cerebellari, che potrebbero rivelare, da un punto di vista neurofisiologico, i meccanismi che presiedono alla comparsa dei disturbi motori osservati in corso di intossicazione acuta o cronica da assunzione di sostanze alcoliche; non è trascurabile il ruolo che questo studio potrebbe svolgere nel guidare i protocolli di terapia attualmente utilizzati per contrastare l'atassia da abuso di sostanze alcoliche.

Collaborazioni internazionali in atto:

Istituto di Fisiologia Umana, Univ. Cattolica del Sacro Cuore, Roma

Dipartimento di Scienze Fisiologiche, Univ. degli Studi di Catania, Catania

Lab. Motor Physiology, The Rockefeller University, New York, USA

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca:

La attività di ricerca viene condotta in due moderne e funzionali unità di neurofisiologia, ciascuna delle quali principalmente equipaggiata dalla seguente attrezzatura:

sistema di registrazione dalle unità neuronali (microelettrodi, microdrive ad avanzamento elettronico, preamplificatori, oscilloscopi);

sistema di stimolazione delle strutture nervose (microelettrodi, stimolatori, isolatori di stimolo);

sistema informatico dotato di apposito software per l'acquisizione e l'elaborazione dei segnali nervosi;

set-up per istologia (dispositivo per la lesione elettrolitica del tessuto nervoso, macchina per la produzione del ghiaccio secco, criostato, microscopi da tavolo, materiale per istologia: coloranti, vetreria, ecc.);

un tavolino vestibolare;

set-up completo di registrazione da fette isolate;

Parole Chiave:

cellule di Purkinje, eccitabilità neuronale, etanolo, atassia alcolica, ratto

UNITA' DI RICERCA INBB
Genova

Responsabile Scientifico
Prof. Melloni Edon

Linea di Ricerca

Regolazione del sistema proteolitico calpaina/calpastatina

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Salamino Franca	PO
De Tullio Roberta	RU
Pontremoli Sandro	PO

Salamino@csita.unige.it

Non Aderenti INBB

Averna Monica	RU
Minafra Roberto	PT

Sede Unità di Ricerca

Università degli Studi di Genova, Dipartimento di Medicina Sperimentale (DIMES), Sezione di Biochimica - Viale Benedetto, XV, 1 - 16132 Genova

010- 353 8151

010 518343

melloni@csita.unige.it

Sezione INBB di appartenenza

Genova

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

La nostra ricerca si prefiggeva di identificare i meccanismi di regolazione del sistema proteolitico calpaina/calpastatina. Anche se la calpastatina rappresenta di per se un modulatore essendo l'inibitore naturale della proteasi calpaina, molti restano da chiarire aspetti di questo meccanismo, in quanto proteasi ed inibitore convivono nello stesso compartimento cellulare. I quesiti a cui si riteneva di dover rispondere erano: (1) come può attivarsi la proteasi se è sempre circondata dal suo inibitore naturale; (2) poiché la calpaina può essere presente in forme diverse nella stessa cellula, è sufficiente una sola forma di inibitore; (3) esistono meccanismi per modulare l'efficienza e la selettività della calpastatina. Un ulteriore aspetto che abbiamo analizzato è il possibile "ruolo patologico" del sistema proteolitico, cercando di identificare le condizioni che lo determinano.

Risultati ottenuti

Abbiamo stabilito che la calpaina e la calpastatina non sono nelle cellule in condizioni basali in effetti mescolati nello stesso compartimento. Mentre la calpaina è dispersa nel citosol, la calpastatina è aggregata in punti specifici vicino al nucleo. Solo quando vi è un aumento di calcio intracellulare, la calpastatina si disperde, mescolandosi con la calpaina, una frazione della quale si è trasferita sulla membrana plasmatica. Questa diversa distribuzione consente alla calpaina di attivarsi e l'inibitore viene reso disponibile solo quando è necessario. Abbiamo inoltre stabilito che l'attività inibitoria e la selettività della calpastatina possono essere modulate. La molecola della calpastatina va incontro a modificazioni sia post-trascrizionali, sia post-traduzionali. Nel cervello di ratto la calpastatina è presente in forme multiple, che differenziano sia per il tipo di esoni espressi, sia per il grado di fosforilazione. Le quattro forme di calpastatina identificate variavano a livello della regione N-terminale e a livello del numero di unità inibitorie ripetitive. L'inserzione di esoni diversi nel dominio N-terminale corrisponde all'inserimento o rimozione di tratti contenuti siti di modificazione covalente della proteina, cioè siti di fosforilazione. Il numero di unità ripetitive conferisce alla molecola un ruolo diverso.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000

1. Calcium binding properties of human erythrocyte calpain. Michetti, M., Salamino, F., Minafra, R., Melloni, E. and Pontremoli, S. *Biochem J.* (1997) 325, 721-725
2. Modulation of rat brain calpastatin efficiency by post-translational modifications. Salamino, F., Averna, M., Tedesco, I., De Tullio, R., Melloni, E. *FEBS Letters* (1997), 412, 433-438
3. Rat brain contain multiple mRNAs for calpastatin. De Tullio, R., Sparatore, B., Salamino, F., Melloni, E. and Pontremoli, S. *FEBS Lett.* (1998) 422, 113-117
4. Molecular and functional properties of a calpain activator protein specific for μ -isoforms. Melloni, E., Michetti, M., Salamino, F. and Pontremoli, S. *J. Biol. Chem* (1998) 273, 12827-12831
5. Properties of calpastatin forms in rat brain. Melloni, E., De Tullio, R., Averna, M., Tedesco, I., Salamino, F., Sparatore, B., Pontremoli, S. *FEBS Lett.* (1998) 431, 55-58
6. Mechanism of action of a new component of the Ca^{2+} -dependent proteolytic system in rat brain: the calpain activator. Melloni, E., Michetti, M., Salamino, F., Sparatore, B., and Pontremoli, S. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* (1998) 249, 585-588
7. Phosphorylation of rat brain calpastatins by PKC. Averna, M., De Tullio, R., Salamino, F., Melloni, E. and Pontremoli, S. *FEBS Lett.* (1999) 450, 13-16
8. Changes in intracellular localization of calpastatin during calpain activation. De Tullio, R., Passalacqua, M., Averna, M., Salamino, F., Melloni, E., and Pontremoli, S. *Biochem. J.* (1999) 343, 467-472.
9. Calpain: from structure to Biological Function. Pontremoli, S., Melloni, E., Salamino, F. in "Calcium as a cellular regulator (Carafoli E. ed.) New York, Oxford press (1999) cap 15, pp.371-388

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Intendiamo continuare la ricerca in oggetto, continuando la caratterizzazione delle forme di calpastatina nei diversi tessuti, per meglio definire le linee generali del suo meccanismo di modulazione. Cercheremo anche di stabilire quali siano i segnali che controllano la localizzazione intracellulare di questa molecola. Sarà analizzato anche il coinvolgimento del sistema in patologie umane, cercando di stabilire quali sono i bersagli dell'azione patologica della calpaina e come sia possibile controllarla.

Collaborazioni internazionali in atto

Dr. P.A. Marks e Dr. R.A. Rifkind. Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York.
Dr. P. Friedric e Dr. P. Tompa, Institute of Enzymology, Hungarian Academy of Science.

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Microscopio laser confocale
Sequenziatore di peptidi
Sequenziatore di DNA

Parole Chiave

Proteolisi, Calcio, Calpaina, Calpastatina, Regolazione enzimatica

UNITA' DI RICERCA INBB
Napoli

Responsabile Scientifico

Prof. Mita Damiano Gustavo

Linea di Ricerca

Biocatalisi in condizioni non-isoterme

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Mita Damiano Gustavo	PO	Mita@unina2.it
Portaccio Marianna	RU	Marianna.Portaccio@unina2.it
Santucci Massimo	BC	Santucci@iigb.na.cnr.it
Peluso Fabio	A	Peluso@marscenter.it

Non Aderenti INBB

Gaeta Francesco Saverio	PO	fsgaeta@marscenter.it
Canciglia Paolo	PA	Canciglia@unime.it
Bencivenga Umberto	PT	Benciven@iigb.na.cnr.it
Rossi Sergio	PT	Rossi@iigb.na.cnr.it
De Maio Anna	BC	
Di Martino Silvana	BC	
Diano Nadia	BC	Diano@iigb.na.cnr.it
Grano Valentina	BC	
Durante Daniela	BC	
De Luca Paola	BC	
Bartolini Teresa	BC	
Travascio Paola	BC	
El-Masry Mansour	BC	
El-Sherif Hazim	BC	

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Medicina Sperimentale
Via S. Maria di Costantinopoli, 16 – 80138 – Napoli
Tel. 081-2395857 Fax 081-2395857

mita@unina2.it

Sezione INBB di appartenenza

Napoli

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

L'attività di ricerca negli ultimi tre anni è stata indirizzata: 1) alla costruzione di membrane catalitiche ed idrofobiche da impiegare utilmente in bioreattori non-isotermi; 2) alla comprensione dei meccanismi molecolari alla base dell'aumento di attività catalitica di enzimi immobilizzati in presenza di un gradiente di temperatura.

Risultati ottenuti

Tra i risultati ottenuti c'è da segnalare la realizzazione di membrane di Teflon o Nylon caricate con enzimi differenti quali la beta-galattosidasi, la penicillina G acilasi e l'ureasi. L'attivazione delle membrane di Teflon o Nylon è stata ottenuta mediante grafting di opportuni monomeri sulla struttura di questi polimeri inerti, tale grafting essendo perseguito chimicamente o mediante radiazioni gamma.

Le membrane così ottenute sono state caratterizzate fisicamente (permeabilità idraulica e termoosmotica), biochimicamente (dipendenza dell'attività catalitica dal pH, dalla temperatura e dalla concentrazione di substrato) e biofisicamente (dipendenza dell'attività catalitica dall'entità del gradiente di temperatura applicato).

I risultati hanno dimostrato: 1) che l'attività catalitica in condizioni non-isoterme aumenta linearmente con l'entità del gradiente di temperatura applicato; 2) che gli incrementi percentuali di attività catalitica diminuiscono al crescere della concentrazione di substrato e della temperatura media; 3) che esiste una relazione diretta fra incremento di attività catalitica e l'idrofobicità delle membrane.

Tutti questi risultati sono stati interpretati in termini di trasporto di substrato attraverso la membrana catalitica ad opera del processo di termodialisi. Utilizzando equazioni di bilancio di massa sono stati dedotti i profili di concentrazione di substrato (in condizioni isoterme e non-isoterme, ed in presenza ed in assenza di catalisi) nella membrana. Da questi profili si sono ottenuti incrementi percentuali teorici di attività catalitica simili a quelli trovati sperimentalmente.

Publicazioni più significative nel periodo 1997-2000.

- 1) S. Stellato, M. Portaccio, S. Rossi, U. Bencivenga, G. La Sala, G. Mazza, F. S. Gaeta and D.G.Mita ."A novel bioreactor operating under non-isothermal conditions". Journal of Membrane Science, 129, 175-184 (1997)
- 2) M. Portaccio, S. Stellato, S. Rossi, U. Bencivenga, M.S. Mohy Eldin, F. S. Gaeta, and Mita D.G. "Galactose competitive inhibition of β -galactosidase (*Aspergillus oryzae*) immobilized on chitosan and nylon supports", Enzy. Microb. Technol., 23, 101-106, (1998).
- 3) M.S. Mohy Eldin, U. Bencivenga, M. Portaccio, S. Stellato, S. Rossi, M. Santucci, P. Canciglia, D. Castagnolo, F. S. Gaeta, and D. G. Mita ."Characterization of the activity of β -galactosidase immobilized on Teflon membranes pre-activated with different monomers by γ -irradiation. J. App. Polym. Sci. 68, 625-636 (1998).
- 4) F. Febbraio, M. Portaccio, S. Stellato, S. Rossi, U. Bencivenga, R. Nucci, M. Rossi, F. S. Gaeta and D.G. Mita ."Advantages in using immobilized thermophilic β -glycosidase in non-isothermal bioreactors" Biotechnology and Bioengineering, 59, 108-115 (1998).
- 5) M.S. Mohy Eldin, A. De Maio , S. Di Martino, M. Portaccio, S. Stellato, U. Bencivenga, S. Rossi, M. Santucci, P Canciglia, F. S. Gaeta, and Mita D.G. ."Non-isothermal bioreactors utilizing catalytic Teflon membranes grafted by γ -radiations". Journal Membrane Science 146, 237-248 (1998).
- 6) Mohy Eldin M.S., De Maio A., Di Martino S., Diano N., Grano V., Pagliuca N., Rossi S., Bencivenga U., Gaeta F.S. and Mita D.G., Isothermal and non-isothermal lactose hydrolysis of galactosidase immobilized on a single double grafted teflon membrane. J. Membrane Sci., 47, 1-16 (1999).
- 7) Mohy Eldin M.S., Santucci M., Rossi S., Bencivenga U., Canciglia P., Gaeta F. S., Tramper J., Janssen A.E.M., Schroen C.G.P.H. and Mita D. G. ."Non-isothermal cephalaxin hydrolysis by penicillin G acylase immobilized on grafted nylon membranes", J. Mol. Catal. B: Enzymatic, 8, 221-232 (2000) .
- 8) Mohy Eldin M.S., Bencivenga U., Rossi S., Canciglia P., Gaeta F. S., Tramper J. and Mita D. G., "Characterization of the activity of penicillin G acylase immobilized onto nylon membranes grafted with different acrylic monomers by means of γ -radiation". , J. Mol. Catal. B: Enzymatic, 8, 233-234 (2000).
- 9) Diano N., El-Masry M.M., Portaccio M., Santucci M., De Maio A., Grano V., Bencivenga U., Gaeta F.S. and Mita D.G., "The process of thermodialysis and efficiency increase of bioreactors operating under non-isothermal conditions". J. Mol. Catal. B: Enzymatic , 11 ,97-111 (2000)
- 10) El-Masry M.M., De Maio A., Di Martino S., Grano V., Rossi S., Pagliuca N., Gaeta F.S. and Mita D.G., "Influence of the non isothermal conditions on the activity of enzymes immobilized on nylon grafted membranes". J. Mol. Catal. B: Enzymatic , 11 , 113-126 (2000)

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni.

Le prospettive per i prossimi tre anni riguardano l'applicazione della tecnica dei bioreattori non isoterme a processi di interesse industriale nel settore agroalimentare ed ecologico. Nel settore agroalimentare sarà perseguita la costruzione di un prototipo di bioreattore per la produzione di latte delattosato mediante idrolisi enzimatica del lattosio contenuto nel latte, nel settore ecologico sarà realizzata l'idrolisi di fenoli e polifenoli nei reflui ad opera di laccasi immobilizzate.

Un altro obiettivo dell'attività di ricerca sarà la costruzione di bioreattori a fibre cave catalitiche ed idrofobiche, in grado di funzionare in condizioni non-isoterme.

Collaborazioni internazionali in atto.

M.S. Mohy Eldin, M.M. El-Masry, H. El-Sherif: Department of Polymers and Pigments, National Research Center, Dokki, Cairo - Egypt.

Prof. B. Danielson: Pure and Applied Biochemistry Chemical Center- Lund-Sweden

Prof. J.H. Tramper: Department of Food Technology and Nutritional Sciences- Wageningen Agricultural University- Wageningen-Netherlands.

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca. □-cell; spettrofotometri; bioreattori a membrane planari; termocriotermostati; spettrofotometro ad assorbimento atomico; gas-cromatografo.

Parole Chiave

Bioreattori; Membrane catalitiche; Penicillina G acilasi; Ureasi; β -galattosidasi.

UNITA' DI RICERCA INBB
Milano

Responsabile Scientifico
Prof.ssa Rosa Maria Moresco

Linea di Ricerca

Neuropsicofarmacologia PET

titolo

Studio in vivo del sistema dopaminergico e serotoninergico mediante PET

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Fazio Ferruccio	PO	faziof@mednuc.hsr.it
Moresco Rosa Maria	PT	rosam@mednuc.hsr.it
Messa Cristina	RU	cmessa@mednuc.hsr.it
Gilardi Maria Carla	PA	chicca@mednuc.hsr.it
Lucignani Giovanni	PO	giannil@mednuc.hsr.it
Todde Sergio	RU	sergiot@mednuc.hsr.it

Non Aderenti INBB

Gobbo Clara	A	clarag@mednuc.hsr.it
Panzacchi Andrea	BC	andreap@mednuc.hsr.it
Simonelli Pasquale	PT	psim@mednuc.hsr.it
Rizzo Giovanna	A	gio@mednuc.hsr.it
Matarrese Mario	A	mariom@mednuc.hsr.it
Carpinelli Assunta	A	assuntac@mednuc.hsr.it

Sede Unità di Ricerca

Servizio di Medicina Nucleare – Istituto Scientifico H S.Raffaele, Università di Milano-Bicocca, CNR-INB.

Edificio LITA, via Fratelli Cervi 93 Segrate

02-26432716

02-26415202

fazio@mednuc.hsr.it

Sezione INBB di appartenenza

Milano

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Nel corso degli ultimi tre anni le attività di ricerca sono state finalizzate allo studio in vivo mediante tomografia da emissione di positroni (PET) della funzionalità del sistema dopaminergico e serotoninergico nella depressione maggiore e nella schizofrenia. In particolare è stato studiato il coinvolgimento dei recettori serotoninergici 5HT_{2a} e dopaminergici D₂ nella depressione maggiore e nella schizofrenia utilizzando come tracciante il [F-18]FESP.

Nella depressione maggiore abbiamo valutato: a) l'effetto della somministrazione ripetuta di antidepressivi selettivi sul sito di ricaptazione della serotonina (SSRI) sull'espressione dei recettori 5HT_{2a} e D₂ in pazienti affetti da depressione maggiore unipolare mai sottoposti a terapia con antidepressivi; b) le correlazioni esistenti tra espressione recettoriale e risposta alla terapia farmacologica; confronto dei livelli recettoriali presenti nei pazienti rispetto all'espressione recettoriale misurata in un gruppo di volontari sani.

Nella schizofrenia abbiamo confrontato l'espressione dei recettori 5HT_{2a} e D₂ rispetto ai soggetti normali e in relazione alla specifica sintomatologia clinica presentata dai pazienti (prevalenza di sintomi negativi verso prevalenza di sintomi positivi)

Risultati ottenuti

I risultati dello studio sui pazienti affetti da depressione maggiore indicano che gli SSRI aumentano il legame del [F-18]FESP in diverse aree corticali dei pazienti che rispondono alla terapia ma non di quelli che non rispondono. Mentre il confronto con il gruppo di volontari sani ha permesso di verificare che gli SSRI determinano una normalizzazione del legame in vivo del [¹⁸F]FESP a livello di diverse aree corticali ma non dei gangli della base. L'aumento di legame osservato nei pazienti che rispondono a terapia con SSRI, può essere correlato ad una variazione della capacità di legame dei recettori 5HT₂ secondaria al ripristino dell'attività dei neuroni serotoninergici.

I risultati dello studio condotto sui pazienti schizofrenici, hanno permesso di identificare una riduzione del legame in vivo del [F-18]FESP in diverse aree corticali. Inoltre le modificazioni osservate differiscono per entità e per localizzazione anatomica a seconda che si valutino pazienti con prevalenza di sintomi negativi o positivi. Questi dati suggeriscono come le differenze sintomatologiche presenti nella schizofrenia possono essere correlate alla presenza di specifici deficit neurochimici e sottolineano l'importanza di una attenta valutazione sintomatologica del paziente.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000

- 1 Moresco RM, Scheithauer BW, Lucignani G, Lomardi D, Rocca A, Losa M, Casati R, Giovanelli M, Fazio F. Estrogen receptors in meningiomas: a correlative PET and immunohistochemical study. *Nucl Med Commun*, 1997; 18: 606-615.
- 2 Lucignani G, Losa M, Moresco RM, Del Sole A, Matarrese M, Bettinardi V, Mortini P, Giovanelli M, Fazio F. Differentiation of clinically non-functioning pituitary adenomas from meningiomas and craniopharyngiomas by positron emission tomography [¹⁸F]Fluoro-ethyl-spiperone. *Eur J Nucl Med*, 1997; 24: 1149-1155.
- 3 Messa C, Volontè MA, Fazio F, Zito F, Carpinelli A, d'Amico A, Rizzo G, Moresco RM, Paulesu E, Franceschi M, Lucignani G. Differential distribution of striatal [¹²³I]□-Cit in Parkinson's disease and progressive supranuclear palsy, evaluated with single-photon emission tomography. *Eur J Nucl Med*, 1998; 9: 1270-1276.
- 4 Matarrese M, Soloviev DV, Moresco RM, Ferri V, Simonelli P, Magni F, Colombo D, Todde S, Carpinelli A, Fazio F, Galli Kienle M. Synthesis and biodistributopn od (R,S)-O-methyl, [¹¹C]-1-[3-(5-methpxy-1,2,3,4-tetrahydro-1-naphtalenyl)propyl]-4-phenylpiperazinr (PNU-157760), a putative radioligand for 5-HT_{1A} receptors. *Bioorg Chemistry*, 1998; 26: 91-102.
- 5 Moresco RM, Loch C, Ottaviani M, Guibert B, Levie V, Maziere M, Fazio F, Maziere B. Effects of Dopamine on the *in vivo* binding of Dopamine D2 receptors radioligands in rat striatum. *Nucl Med Biol*, 1999; 26: 91-98.
- 6 Wollmer P, Moresco RM, Simonelli P, Matarrese M, Rigamonti M, Ortu G, LaGaetana R, Soloviev D, Galli M, Fazio F, Evaluation of [O-Methyl-¹¹C]fluvoxamine as a tracer for serotonin re-uptake sites. *J Nucl Med Biol*. 2000 27:177-81.
- 7 Matarrese M, Soloviev D, Moresco R.M.,Todde S, Simonelli P, Colombo D, Magni F, Carpinelli A, Fazio F, Galli Kienle M, Synthesis and *in vivo* evaluation of 3-[¹¹C]methyl-(3-methoxy-naphtalen)-2-yl-(1-benzyl-piperidin)-4-yl-acetate(SB235753) as a putative Dopamine D4 receptors antagonist for PET. Accepted J Labelled Compd Radiopharm.
- 8 Zanardi R, Artigas F, Moresco RM, Colombo C, Messa C, Gobbo C, Smeraldi E, Fazio F. Increased 5-HT₂ receptor binding in frontal cortex of depressed patients responding to paroxetine treatment: a PET scan study. Accepted J Clin Psychopharmacology
- 9 Soloviev DV, Matarrese M, Moresco RM, Todde S, Bonasera TA, Sudati F, Simonelli P, Magni F, Colombo D, Carpinelli A, Galli Kienle M, Fazio F. Asymmetric synthesis and preliminary evaluation of (R)- and (S)- [¹¹C]bisoprolol, a putative □₁-selective adrenoceptor radioligand. Accepted *Neurochem Int*.
- 10 Moresco RM, Colombo C, Fazio F, Bonfanti A, Lucignani G, Messa C, Gobbo C, Galli L, Del Sole A, Lucca A, Smeraldi E. Effect of Fluvoxamine treatment on the *in vivo* binding of [F-18]FESP in drug naive depressed patients: a PET study. Accepted *NeuroImage*.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

- a) Caratterizzazione cinetica di traccianti per lo studio *in vivo* nell'uomo mediante PET del sistema serotoninergico e dopaminergico nei disturbi psichiatrici. In particolare verranno valutate in gruppo di volontari sani, le caratteristiche cinetiche di un tracciante specifico per i recettori serotoninergici di tipo 5HT₂ e di un tracciante specifico per i siti di ricaptazione della dopamina, ottimizzate le procedure di acquisizione ed elaborazione dati inclusa la valutazione dei metabolici marcati circolanti. I dati normativi relativi al target molecolare campionato verranno correlati con il sesso e le età dei soggetti reclutati
- b) Valutazione dell'espressione dei recettori 5HT_{2A} e dei siti di ricaptazione della dopamina utilizzando i traccianti sviluppati in precedenza in pazienti affetti da disturbi affettivi o disturbi d'ansia.

Collaborazioni internazionali in atto

MRC Cyclotron Unit, London, UK.

Service Hopitalier Frederic Joliot, Orsay, France.

Laboratory of Cerebral Metabolism, NIMH, Bethesda USA

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Tomografo ad emissione di positroni (Advance GE)

Ciclotrone RDS 112 (CTI, Siemens CPS, Knoxville, TN)

Linea HPLC Gilson, Milan, Italy.

Contatore gamma (Pharmacia, Italy).

Calcolatore per elaborazione dati: Sun Spark.

Parole Chiave

Serotonina, depressione maggiore, schizofrenia, dopamina, tomografia ad emissione.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000

1. M. Scarselli, A. Vasco, A. Bonci, M. Rustici and N. Niccolai: NMR Structural Investigation of the Biotin-Avidin Complex. SPECTROSCOPY LETTERS 30,1201-1209 (1997)
2. H. Molinari, G. Esposito, M. Pegna, L. Ragona, N. Niccolai, R. M. Brunne, A. M. Lesk and L. Zetta: Probing Protein Structure by Solvent Perturbation of NMR Spectra: the Surface Accessibility of BPTI. BIOPHYSICAL JOURNAL 73, 382-396 (1997)
- 3.F. Cardona, A. Goti, A. Brandi, M. Scarselli, N. Niccolai and S. Mangani: Molecular Dynamics Simulation of the complexes of Glucoamylase II (471) from aspergillus awamori var. X100 with Deoxynojirromycin and Lentiginosine. JOURNAL OF MOLECULAR MODELING 3, 1-5 (1997).
- 4.M. Scarselli, A. Facchiano, G. Russo, H. Molinari, L. Ragona, L. Zetta and N. Niccolai: The design of a specific ligand of hiv gp120. JOURNAL OF PEPTIDE SCIENCE 3, 383-390 (1997).
- 5.M. Scarselli, G. Esposito, M.T. De Magistris, M. Domenighini, R. Rappuoli, G. Burrioni, A. Bernini and N. Niccolai: NMR Studies on the Structure-Function Correlations of T-Cell Epitope Analogs from Pertussis Toxin. EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY 254,313-317 (1998).
- 6.A. Di Stefano, L. Paulesu, N. Niccolai, M. Scarselli, P. Soldani and P. Neri: Identification of critical residue of staphylococcal enterotoxin B for lymphomonocyte proliferation and cytokine production. JOURNAL OF PEPTIDE RESEARCH 52, 130-136 (1998).
- 7.D. Di Maro, M. Scarselli, A. Bernini, S. Cresti, G.M. Rossolini, L. Lozzi, P. Neri and N. Niccolai: On the Structural Stability of a Small Bioactive Peptide of Potential Use in Biotechnology. JOURNAL OF BIOMOLECULAR STRUCTURE AND DYNAMICS 16, 1053-1059 (1999).
- 8.M. Scarselli, A. Bernini, C. Segoni, H. Molinari, G. Esposito, A.M. Lesk, F. Laschi, P. Temussi and N. Niccolai: Tendamistat surface accessibility to the TEMPOL paramagnetic probe. JOURNAL OF BIOMOLECULAR NMR, 15, 125-133 (1999).

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

The above mentioned research projects are still very original and on the frontier of Structural Biology. Thus, they will be carried out at least during the next three years.

A better understanding of protein folding and molecular recognition processes is expected.

Collaborazioni internazionali in atto

Dr. Arthur M. Lesk, University of Cambridge, Gran Bretagna;

Prof. William A. Gibbons, School of Pharmacy, University of London, Gran Bretagna;

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Spettrometro NMR 600 MHz Bruker Avance;

Silicon Graphics Indy;

Sintetizzatori di peptidi in fase solida;

HPLC;

sequenziatore di proteine;

numerosi personal computer.

Parole Chiave

NMR, struttura di peptidi e proteine, riconoscimento molecolare, modellistica molecolare.

UNITA' DI RICERCA INBB
Genova

Responsabile Scientifico
Prof. Claudio Nicolini

Linea di Ricerca

Nanotecnologie

titolo

Nanobiocatalisi

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Pastorino Laura DR

Berzina Tatiana BC

Troitsky Vladimir BC

Narizzano Riccardo DR

laurap@ibf.unige.it

berzina@ibf.unige.it

troitski@ibf.unige.it

narizzan@ibf.unige.it

Non Aderenti INBB

Pechkova Eugenia DR

eugenia@ibf.unige.it

Sede Unità di Ricerca

Università di Genova – DISTBIMO Corso Europa 30, 16132 GE

010 3538381

010 3538346

distbimo@ibf.unige.it/

Sezione INBB di appartenenza

Genova

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Limite ad una più ampia diffusione della biocatalisi nei processi industriali è la scarsa stabilità nel tempo e nelle condizioni operative degli enzimi e più in generale dei sistemi biocatalitici oggi disponibili. Esiste pertanto a livello internazionale una stringente domanda di ricerca per ottenere biocatalizzatori stabili, che consentano applicazioni industriali su larga scala.

Su questa tematica si è concentrato il lavoro dell'unità di Genova, lavoro che è stato, in particolare, indirizzato allo sviluppo di nuovi approcci al problema dell'immobilizzazione dell'enzima penicillina G acilase (PGA) con lo scopo di aumentare l'efficienza del biocatalizzatore prodotto.

In questa fase, quindi l'unità si è posta come obiettivo una sperimentazione tale da portare alla realizzazione di biomatrici composite, formate da film sottili di enzima ed un supporto di natura organica od inorganica, biomatrici con caratteristiche non convenzionali, opportunamente individuate nell'ambito dei fattori d'interesse industriale.

Risultati ottenuti

Durante la fase sperimentale, una delle strade innovative e più promettenti si è dimostrata essere l'applicazione dei metodi che vanno sotto il nome di "ingegneria dei monostrati", ovvero una combinazione delle tecniche Langmuir-Blodgett e Langmuir-Schaefer con self assembly ed adsorbimento di strati.

Ciò ha dato la possibilità di creare mezzi biocatalitici non convenzionali, la cui struttura è costituita da monostrati di composti differenti includenti l'enzima. Inoltre, grazie all'apparecchio sviluppato presso i nostri laboratori, è stato possibile inserire l'enzima eliminando il contatto con l'interfaccia aria-acqua., evitandone così una possibile denaturazione dovuta all'azione della tensione superficiale.

L'applicazione di questa metodologia ha portato allo sviluppo di mezzi biocatalitici, sulla base della PGA, con aumentata efficienza in termini di resa, di stabilità e di riciclabilità.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000

- Nicolini C., *Protein monolayer engineering: principles and application to biocatalysis*, **Trends in Biotechnology** 15, 395-401, 1997.
- Bramanti E., Benedetti E., Nicolini C., Berzina T.S., Erokhin V., D'Alessio A., Benedetti E., *Qualitative and Quantitative analysis of the secondary structure of cytochrome C Langmuir-Blodgett films* *Biopolymers* 42, 227-237, 1997.
- Nicolini C., *Engineering of enzyme monolayer for industrial biocatalysis*, *Annals of the New York Academy of Sciences* 864, 435-441, 1998.
- Berzina T S, Piras L and Troitsky V I *Study of horseradish peroxidase activity in alternate-layer Langmuir-Blodgett films*, *Thin Solid Films*, 327-329, 621-626, 1998.
- Troitsky V I and Matveeva N K, *Thin Solid Films* , 327-329, 659-62, 1998.
- M.K. Ram, M. Adami, S. Paddeu, C. Nicolini, *Nanoassembly of glucose oxidase on the in situ self-assembled electrochemical characterizations*, *Nanotechnology* 11, 112-119, 2000.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Il futuro lavoro dell'Unità di Genova sarà volto alla trasposizione su scala industriale della metodologia messa a punto per la deposizione in continuo di PGA su supporti polimerici di area estesa.

In quest'ottica, in conclusione, è stato progettato e costruito un modello, su scala da laboratorio, di reattore rotante per verificare l'efficienza di tali biocatalizzatori in condizioni operative simili a quelle utilizzate a livello industriale. Le caratteristiche e le prestazioni del reattore verranno studiate in differenti condizioni operative al fine di definire le specifiche per un reattore su scala prototipale e quindi preindustriale.

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Trough Langmuir – Blodgett, spettrofotometro UV/VIS, spettrofotometro IR, Difrattometro a raggi – X, HPLC, microscopio ad Angolo di Brewster.

Parole Chiave

Enzimi, mezzo biocatalitico, penicillina G acilasi, ingegneria dei monostrati.

UNITA' DI RICERCA INBB
Bari

Responsabile Scientifico
Prof. Palmieri Ferdinando

Linea di Ricerca

proteine di trasporto della membrana dei mitocondri: biochimica, biologia molecolare e malattie

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Stipani Italo.	PO	Stipani@farmbiol.uniba.it
Iacobazzi Vito.	PA	Viacob@farmbiol.uniba.it
Capobianco Loredana.	RU	lcapob@farmbiol.uniba.it
Dolce Vincenza.	RU	Vdolce@farmbiol.uniba.it

Non Aderenti INBB

Prezioso Girolamo.	PA	Gprezioso@farmbiol.uniba.it
De Palma Annalisa.	RU	
Palmieri Luigi	RU	Lpalm@farmbiol.uniba.it
Fiermonte Giuseppe.	PT	Gfierm@farmbiol.uniba.it

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento Farmaco-Biologico, Università di Bari - Via Orabona 4, 70125 Bari

080-5443374

080-5442770

Fpalm@farmbiol.uniba.it

Sezione INBB di appartenenza

Bari

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Conoscenza della struttura delle proteine di trasporto dei mitocondri mediante combinazione di studi di mutagenesi sito-diretta e di indagini biofisiche (fluorescenza, sonde fluorescenti e spin labels) e identificazione della struttura primaria e della funzione di altre proteine di trasporto mitocondriali non ancora note.

Risultati ottenuti

Isolamento all'omogeneità di 8 proteine di trasporto dai mitocondri di mammiferi, loro caratterizzazione funzionale dopo incorporazione nei liposomi, determinazione della struttura primaria di 3 di queste proteine mediante sequenziamento dei corrispondenti cDNA, determinazione dell'intera sequenza dei geni umani e bovini di 3 di queste proteine, localizzazione sui cromosomi umani dei geni del carrier del fosfato, del chetoglutarato, degli acidi dicarbossilici e della carnitina/acilcarnitine, determinazione della topografia di 3 di queste proteine nella membrana dei mitocondri, identificazione della funzione (substrati trasportati) di 5 geni di lievito codificanti proteine aventi le caratteristiche generali di sequenza della famiglia dei carriers mitocondriali, espressione di numerosi carriers in *E. coli* e/o *S. cerevisiae*, mutazione sito-diretta di vari aminoacidi di alcuni carriers, identificazione del difetto genico in pazienti affetti da deficienza del trasportatore della carnitina/acilcarnitine.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000

1. C. Indiveri, V. Iacobazzi, N. Giangregorio and F. Palmieri (1997). The mitochondrial carnitine carrier protein: cDNA cloning, primary structure, and comparison with other mitochondrial transport proteins. *Biochem. J.* 321, 713-719
2. L. Palmieri, V. De Marco, V. Iacobazzi, F. Palmieri, M.J. Runswick and J.E. Walker (1997). Identification of the yeast ARG-11 gene as a mitochondrial ornithine carrier involved in arginine biosynthesis. *FEBS Lett.*, 410, 447-451
3. C. Indiveri, A. Tonazzi, I. Stipani and F. Palmieri (1997). The purified and reconstituted ornithine/citrulline carrier from rat liver mitochondria: electrical nature and coupling of the exchange reaction with H⁺ translocation. *Biochem. J.* 327, 349-356
4. G. Fiermonte, V. Dolce and F. Palmieri (1998). Expression in *Escherichia coli*, functional characterization and tissue distribution of isoforms A and B of the phosphate carrier from bovine mitochondria. *J. Biol. Chem.* 273, 22782-22787
5. G. Fiermonte, L. Palmieri, V. Dolce, F.M. Lasorsa, F. Palmieri, M.J. Runswick and J.E. Walker (1998). The sequence, bacterial expression and functional reconstitution of the rat mitochondrial dicarboxylate transporter cloned via distant homologs in yeast and *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* 273, 24754-24759
6. E. Pannone, G. Fiermonte, V. Dolce, M. Rocchi and F. Palmieri (1998). Assignment of the human

- dicarboxylate carrier gene (DIC) to chromosome 17 band 17q25.3. Cytogenet. Cell Genet. 83, 238-239
7. L. Palmieri, A. Voza, A. Hönliger, K. Dietmeier, A. Palmisano, V. Zara and F. Palmieri (1999). The mitochondrial dicarboxylate carrier is essential for the growth of *Saccharomyces cerevisiae* on ethanol or acetate as the sole carbon source. Molecular Microbiology 31, 569-577
 8. L. Palmieri, A. Voza, G. Agrimi, V. De Marco, M.J. Runswick, F. Palmieri and J.E. Walker (1999). Identification of the yeast mitochondrial transporter for oxaloacetate and sulfate. J. Biol. Chem. 274, 22184-22190
 9. G. Fiermonte, V. Dolce, R. Arrigoni, M.J. Runswick, J.E. Walker and F. Palmieri (1999). Organization and sequence of the gene for the human mitochondrial dicarboxylate carrier: evolution of the carrier family. Biochem. J. 344, 953-960
 10. L. Palmieri, M.J. Runswick, G. Fiermonte, J.E. Walker and F. Palmieri (2000). Yeast Mitochondrial carriers: bacterial expression, biochemical identification and metabolic significance. J. Bioenerg. Biomembr. 32, 67-77

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Il principale obiettivo è identificare la struttura e la funzione di nuovi sistemi di trasporto mitocondriali per metaboliti. In base alle caratteristiche di sequenza della famiglia dei carrier mitocondriali abbiamo identificato nel genoma di *S. cerevisiae* 35 carrier. Identificata la funzione di specifici trasportatori mitocondriali di *S. cerevisiae*, procederemo all'identificazione dei loro omologhi nei mammiferi. Poiché il lievito ed i mammiferi sono troppo distanti per clonare le sequenze dei carrier dei mammiferi sulla base delle sequenze di lievito, cercheremo nelle banche dati cloni di mammifero (anche parziali) omologhi ai trasportatori identificati nel lievito, utilizzando cloni omologhi di organismi filogeneticamente intermedi come il *C. elegans*. Altri obiettivi sono l'identificazione dei difetti genici di malattie causate dalla deficienza di uno dei carrier mitocondriali, la produzione di sonde di cDNA e di anticorpi per la diagnosi delle malattie di deficienza di carriers mitocondriali.

Collaborazioni internazionali in atto

Prof. J.E. Walker, Medical research Council, Dunn Human Nutrition Unit, Cambridge, England

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Thermal Cycler 9600 per PCR

Ultracentrifuga LB-70 Beckman

Spettrofotofluorimetro LS-50B Perkin Elmer

Spettrometro a scintillazione liquida LS-7500 Beckman

Parole Chiave

Trasporto, Biomembrane, Clonaggio, Geni, Espressione di proteine, Malattie mitocondriali

UNITA' DI RICERCA INBB
Genova

Responsabile Scientifico
Prof. Isidoro Mario Pepe

Linea di Ricerca

Energetica della fototrasduzione visiva

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Pepe Isidoro Mario	PA	pepe@ibf.unige.it
Non Aderenti INBB		
Morelli Alessandro	PO	
Panfoli Isabella	RU	
Notari Luigi	DR	
Cugnoli Carlo	R - CNR	

Sede Unità di Ricerca

DISTBIMO- Università di Genova Corso Europa 30 Genova 16132, Italy

indirizzo

010- 3538349	010- 3538346	pepe@ibf.unige.it
--------------	--------------	-------------------

Sezione INBB di appartenenza

Genova

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Il segmento esterno del bastoncello della retina e' la sede degli eventi molecolari che costituiscono la fototrasduzione visiva. Il fabbisogno energetico della cellula al buio e' di circa 40 μ M di ATP al secondo ed aumenta di circa 3 volte durante l'illuminazione. Allo stato attuale delle conoscenze si pensa che le molecole di ATP necessarie nel segmento esterno provengano dai mitocondri, che sono localizzati nel segmento interno del bastoncello. Il passaggio dal segmento interno a quello esterno sarebbe estremamente lento rispetto ai tempi della fototrasduzione che si svolge sulle membrane dei dischi. Anche se sono presenti nel citoplasma gli enzimi della glicolisi, occorre che l'ATP venga rigenerata da ADP in situ, cioe' sui dischi, dove come e' noto si trovano la rodopsina e gli altri enzimi della cascata del GMP ciclico. Si sa anche che i dischi sono dei serbatoi di calcio con una concentrazione interna dell'ordine del millimolare mentre la concentrazione di calcio interna alla cellula e' di circa $0,5 \times 10^{-6}$ M. Una pompa al calcio che idrolizza ATP nei dischi e' stata isolata e caratterizzata dal nostro gruppo. Si tratta di una ATPasi del tipo SERCA con un intermedio fosforilato di 100 kDa. La presenza di una Ca - ATPasi nei dischi pone interessanti interrogativi. La bassa affinita' della pompa per il calcio (13mM) e' consistente con il meccanismo di tamponamento osservato al di sopra di 5mM nei bastoncelli della retina di vertebrati. Pertanto la concentrazione di calcio verrebbe mantenuta bassa non solo mediante l'attivita' dello scambiatore sodio-calcio ma anche per l'attivazione della pompa, quando la concentrazione di calcio interna superasse la micromolarita'. Ma a concentrazioni di calcio fisiologiche la Ca-ATPasi potrebbe rovesciare la sua funzione e sintetizzare ATP utilizzando il gradiente di calcio tra i dischi ed il citoplasma.

Risultati ottenuti

I risultati ottenuti con una popolazione di dischi purificati sono molto incoraggianti. A concentrazioni esterne di calcio tra 0,1 e 1 μ M ed in presenza di ADP si misura una netta sintesi di ATP. L'attivita' ATP sintasi risulta avere una affinita' per il calcio di circa 10 μ M suggerendo che tale attivita' sia dovuta all'inversione della Ca ATPasi. Sono in corso misure di efflusso di ioni calcio dai dischi isolati in presenza di ADP e fosfato per stabilire il rapporto stechiometrico tra le molecole di calcio che escono dai dischi e le molecole di ATP che vengono sintetizzate. Inoltre e' stata trovata sui dischi anche una attivita' miocinasica che rigenera ATP da ADP e AMP.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000

- I.M.Pepe and C.Cugnoli. Invited review: Photoisomerization of retinal in visual pigments. Trends in Photochem. Photobiol. vol.44, 167-182 (1997).
- I.M.Pepe, M.K.Ram, S.Paddeu and C.Nicolini. Langmuir-Blodgett films of rhodopsin: an infrared spectroscopic study. Thin Solid Films, vol.327, 118-122 (1998).
- I.M.Pepe and C. Cugnoli. Studies on the mechanism of the enzymatic photoisomerization of retinal. Photochem. Photobiol. vol. 68, 257-259 (1998).
- I.M.Pepe. Invited review: Rhodopsin and phototransduction. J. Photochem. Photobiol. vol. 48, 1-10 (1999).
- A.Palmeri, I.M.Pepe, R.Rolandi, S.Pagani and A.Morelli. Ion permeability induced by bacteriocins of Lactobacillus Acidophilus M247 on artificial lipid membrane. Material Science & Engineering C, vol. 8-9, 539-542 (1999).
- I.M.Pepe and C. Cugnoli. The homeostasis of calcium in vertebrate photoreceptor cell. Trends in Photochem. Photobiol. vol. 6, 63-74 (1999).
- I.M.Pepe, I.Panfoli, L.Notari and A.Morelli. ATP synthesis in rod outer segments of bovine retina by the reversal of the disk calcium pump. Biochem. Biophys. Res. Comm. vol. 268, 625-627 (2000).

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Gli obiettivi futuri sono quelli di una maggiore comprensione del ruolo del calcio nella fototrasduzione con l'approfondimento dello studio del trasporto ionico attraverso le membrane dei dischi dei bastoncelli della retina di bue. Verrà inoltre studiata la struttura della pompa del calcio in collaborazione col Prof. Sergio Papa dell'Università di Bari.

Collaborazioni internazionali in atto

Istituto di Fisiologia.....Università della Ruhr – Bochum . Germany
Istituto di Biochimica.....Università di Leeds- UK
Dipartimento di Fisiologia Università di Ginevra. Svizzera

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Centrifughe; spettrofotometri; contatore a scintillazione; HPLC

Parole Chiave

Retina; fototrasduzione visiva; Ca-ATPasi; fotorecettori

UNITA' DI RICERCA INBB
Napoli

Responsabile Scientifico
Prof. Riccardo Pierantoni

Linea di Ricerca

Endocrinologia Comparata

titolo

Meccanismi di regolazione dell'attività testicolare

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Fasano Silvia

PA

silvia.fasano@unina2.it

Minucci Sergio

PA

sergio.minucci@unina2.it

Non Aderenti INBB

Cobellis Gilda

DR

Meccariello Rosaria

DR

Fienga Giulia

A

Carmela Palmiero

A

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Fisiologia Umana e Funzioni Biologiche Integrate "F.Bottazzi". Secondo Ateneo di Napoli

Via Costantinopoli 16 80138 Napoli

0815665802

0815665820-18

riccardo.pierantoni@unina2.it

Sezione INBB di appartenenza

Napoli

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Ruolo di bioregolatori locali e proto-oncogeni nell'attività testicolare

Risultati ottenuti

Si è individuata una localizzazione citoplasmatica di Fos, Myc e Jun in spermatogoni. Anche Mos appare in stadi pre-meiotici. L'estradiolo promuove l'espressione di fos e la localizzazione nucleare dell'oncoproteina

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000

- 1.G. Cobellis ,R. Pierantoni and S. Fasano(1997). c-fos and c-jun-like mRNA expression in frog (Rana esculenta) testis during the annual reproductive cycle. Gen. Comp. Endocrinol.106: 23-29. IF 1.810
- 2.S. Minucci, L. Di Matteo, P. Chieffi P., R. Pierantoni and S. Fasano (1997). 17-estradiol effects on mast cell number and spermatogonial mitotic index in the testis of the frog, Rana esculenta. J.Exp.Zool. 278:93-100. IF 1.077
3. A.Battisti, R.Pierantoni, M.Vallarino, M.Trabucchi, O.Carnevali, AM Polzonetti-Magni and S.Fasano (1997). Detection of GnRH molecular forms in brains and gonads of the crested newt, Triturus carnifex. Peptides 18:1029-1037 IF 2.038
4. P.Chieffi, F.Angelini and R. Pierantoni (1997). Proto-oncogene activity in the testis of the lizard, Podarcis s. sicula, during the annual reproductive cycle. Gen. Comp. Endocrinol. 108:173-181. IF 1.810
5. R.Pierantoni, S.Minucci, G.Cobellis, P.Chieffi and S.Fasano (1997). Local control of testicular activity: evolutionary and comparative aspects. Eds S.Kawashima and S.Kikuyama. In "Advances in comparative endocrinology". Monduzzi, Bologna, pp.335-342.
6. S.Fasano, G.Cobellis, S.Minucci, R.Meccariello, A.Pinto, A.Scognamiglio and R.Pierantoni (1997). Estradiol induces c-fos-like activity in the frog, Rana esculenta Eds S.Kawashima and S.Kikuyama. In "Advances in comparative endocrinology". Monduzzi, Bologna, pp.335-342.
7. P.Chieffi, F.Angelini and R.Pierantoni (1998). Detection of c-myc, c-fos and c-jun-like products in the lizard (Podarcis s. sicula) testis. Ann. N.Y. Acad. Sci. USA 839:561-563.IF 0.959
8. R. Pierantoni (1999). Male reproductive system, amphibians. Eds E. Knobil and J. D. Neil. In: "Encyclopedia of Reproduction". Academic Press, San Diego, 3: 10 - 15.
9. G.Cobellis, R.Pierantoni, S.Minucci, R.Pernas-Alonso, R.Meccariello and S.Fasano (1999). c-fos Activity in Rana esculenta testis: seasonal and estradiol-induced changes. Endocrinology, 140: 3238-3244. IF 4.633
10. G.Cobellis, M.Vallarino, R.Meccariello, R.Pierantoni, M.A. Masini, M.Mathieu, R.Pernas-Alonso, P.Chieffi and S.Fasano (1999). Fos localization in cytosolic and nuclear compartments in neurones of frog,

Rana esculenta, brain: an analysis carried out in parallel with GnRH molecular forms. J.Neuroendocrinology 11: 725 - 735. IF 2.832

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Individuare i fattori coinvolti nei meccanismi di progressione degli stadi della spermatogenesi

Collaborazioni internazionali in atto

M.P. Junier Unité INSERM 421 CRETEIL, France

D. Lovejoy, University of Toronto, Canada

I. Morris, University of Manchester, UK

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Ultracentrifuga, Contatori beta e gamma, attrezzature per elettroforesi, attrezzature per istologia e studi di ultrastruttura, zona calda.

UNITA' DI RICERCA INBB
Padova

Responsabile Scientifico:
Prof. Lorenzo A. Pinna

Linea di Ricerca

Enzimologia molecolare di protein chinasi

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Meggio Flavio	PO	meggio@civ.bio.unipd.it
Donella-Deana Arianna	PA	arianna@ck2.bio.unipd.it

Non Aderenti INBB

Brunati Anna-Maria	RU	brunati@civ.bio.unipd.it
Ruzzene Maria	RU	maria@ck2.bio.unipd.it
Marin Oriano	RU	labmarin@civ.bio.unipd.it
Sarno Stefania	A	stefi@ck2.civ.unipd.it

Sede Unità di Ricerca

Dipartimentodi Chimica Biologica, Viale G. Colombo 3, 35121 Padova

049-8276108

049-8073310

pinna@civ.bio.unipd.it

Sezione INBB di appartenenza

Padova

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Comprensione a livello molecolare deirapporti struttura-funzione di alcune protein chinasi coinvolte nellatrasduzione del segnale e la cui alterata espressione e/oattività si associa a condizioni patologiche, con particolare riguardo alle neoplasie. Gli enzimi presiin considerazione sono stati: tre protein chinasi Ser/Thr specificheubiquitarie ed acidofile (CK1, CK2 e "caseinchinasi dell'apparato del Golgi") edalcune chinasi tirosiniche appartenenti alla famiglia Src (Lyn e c-Fgr) o ad essa funzionalmentecorrelate (CSK e Syk). In particolare ci si riproponeva di comprendere imeccanismi di regolazione di queste chinasi ed i fattori strutturali che nedeterminano la specificità e lacapacità di associarsi con altri ligandi, anche allo scopo di sviluppare inibitorispecifici.

Risultati ottenuti

E' stata risolta la struttura cristallina dellasubunità catalitica di CK2, da sola ed associata condue frammenti sintetici della subunitàregolatoria. Ciò ha permesso di ipotizzare un meccanismo di attivazione basato suinterazioni tra il segmento N-terminale ed il "loop di attivazione", meccanismo cheè statoconfermato mediante studi di mutagenesi sito specifica.E' stata inoltre risolta la struttura di un complesso di CK2 catalitica con uninibitore ATP-competitivo, l'emodina, il cui legame altera profondamente la conformazione del lobosuperiore della chinasi. Si è dimostrato che CK2 è in grado di fosforilare la protein prionica (PrP) e di essereda questa attivata. Si è anchedimostrato che in particolari contesti CK2 è capace di fosforilare residuitirosinici benchè si tratti di una tipica Ser/Thr chinsi. Lasito-specificità di CK1è stata riesaminata usando una serie di peptidisintetici. Si è visto che G-CKsi associa e fosforila GRP94 ed è in grado di fosforilare un sito della proteinsalivare PRP-1 che non presenta il motivo diconsenso S-x-E. Studiando il meccanismo di attivazione della chinasi tirosinica c-Fgr si è visto cheessa è attivata in modospecifico da fosfopeptidi capaci di legarsi al suo dominio SH2, mentre nelcaso di un'altra chinasi della famiglia Src, Lyn, una duplice autofosforilazione insiti distinti genera una forma di chinasi che è iperattiva nei confronti di substrati peptidici, mentre previene il targeting di alcuni substrati proteici. Sia Lyn chec-Fgr sono coinvolti nella fosforilazione sequenziale della proteinaematopoietica pro-apoptotica HS1 e della banda-3 eritrocitariasinergisticamente con Syk. Quest'ultima funge dachinasi primaria generando sitiTyr-fosforilati a cui poi si legano le chinasi Src mediante i loro domini SH2.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000

- 1- O. Marin, F. Meggio, S. Sarno and L.A. Pinna "Physical dissection of the structural elements responsible for regulatory properties and intersubunit interactions of protein kinase CK2 α -subunit" (1997) *Biochemistry*, 36, 7192-7198.
- 2- S. Sarno, P. Vaglio, O. Marin, O-G. Issinger, K. Ruffato and L.A. Pinna "Mutational analysis of residues implicated in the interaction between protein kinase CK2 and peptide substrates" (1997) *Biochemistry*, 36, 11717-11723
- 3- A. Donella-Deana, L. Cesaro, M. Ruzzene, A-M. Brunati, O. Marin and L.A. Pinna "Spontaneous autophosphorylation of Lyn tyrosine kinase at both its activation segment and C-terminal tail confers altered substrate specificity" (1998) *Biochemistry*, 37, 1438-1446
- 4- K. Niefind, B. Guerra, L.A. Pinna, O-G. Issinger and D. Schomburg "Crystal structure of the catalytic subunit of protein kinase CK2 from *Zea mays* at 2.1 Å resolution" (1998) *EMBO J.* 17, 2451-2462.
- 5- M. Orlandini, F. Semplici, R. Ferruzzi, F. Meggio, L.A. Pinna and S. Oliviero "Protein kinase CK2 α ' is induced by serum as a delayed early gene and cooperates with Ha-ras in cell transformation of primary embryo fibroblasts" (1998) *J. Biol. Chem.*, 273, 21291-21297
- 6 - A-M. Brunati, A. Donella-Deana, P. James, M. Quadroni, A. Contri, O. Marin and L.A. Pinna: "Molecular features underlying the sequential phosphorylation of HS1 protein and its association with c-Fgr protein tyrosine kinase" (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 7557-7564
- 7- O. Marin, F. Meggio, S. Sarno, L. Cesaro, M.A. Pagano and L.A. Pinna: "Tyrosine vs. serine/threonine phosphorylation by protein kinase CK2. A study with peptide substrates derived from immunophilin Fpr3" (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 29260-29265.
- 8 - A-M. Brunati, L. Bordin, G. Clari, P. James, M. Quadroni, E. Baritono, L.A. Pinna and A. Donella-Deana "Sequential phosphorylation of protein band 3 by Syk and Lyn tyrosine kinases in intact human erythrocytes. Identification of primary and secondary phosphorylation sites" (2000) *Blood*, 96, 1550-1557.
- 9 - R. Battistutta, S. Sarno, E. De Moliner, O. Marin, O.G. Issinger, G. Zanotti and L.A. Pinna "The crystal structure of the complex of *Zea mays* α subunit with a fragment of human β subunit provides the clue to the architecture of protein kinase CK2 holoenzyme" (2000) *Eur. J. Biochem.* 267, 5184-5190.
- 10- R. Battistutta, S. Sarno, E. De Moliner, E. Papinutto, G. Zanotti and L.A. Pinna "The replacement of ATP by the competitive inhibitor emodin induces conformational modifications in the catalytic site of protein kinase CK2" (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 29618-29622.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Prosecuzione ed sviluppo del progetto di biologia strutturale (in collaborazione con l'Unità INBB coordinata da Giuseppe Zanotti, Padova) mediante risoluzione di nuovi complessi di CK2 con inibitori e substrati peptidici/proteici e tentativi di cristallizzazione di altre protein chinasi essenziali, in particolare pD261. Analisi sequenziale di G-CK e suo clonaggio. Indagine mutazionale sistematica di CK2 e di pD261 allo scopo di individuare tutti gli elementi strutturali responsabili delle insolite proprietà funzionali di queste chinasi; studio in linee cellulari della loro collocazione in determinate vie di trasduzione del segnale e del loro coinvolgimento in processi apoptotici, oncogenici ed in patologie infettive e degenerative. Comprensione del significato dei processi di fosforilazione sequenziale catalizzati sinergicamente dalle chinasi tirosiniche Syk e Src. Esame dell'importanza funzionale della fosforilazione di proteine virali (per es Rev di HIV-1) e responsabili di processi degenerativi (per es PrP e sinucleina), con particolare riguardo all'ipotesi che la fosforilazione di sinucleina possa interferire con la sua tendenza a polimerizzare.

Collaborazioni internazionali in atto

NOVARTIS Pharma AG, Basilea CH
Biokemisk Institut, Syddansk Universitet, Odense DK
Department of Biochemistry, University of Dundee, Dundee, UK

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Sintetizzatore automatico di peptidi
BIAcore X
Sequenziatore di proteine

Parole Chiave

Protein phosphorylation
Protein kinase
Casein kinase
Signal transduction
Enzyme regulation

UNITA' DI RICERCA INBB
Napoli

Responsabile Scientifico
Prof.ssa Portaccio Marianna

Linea di Ricerca

Realizzazione di un biosensore per la misura di concentrazioni di glucosio

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Mita Damiano Gustavo	PO	Mita@iigbna.iigb.na.cnr.it
Santucci Massimo	B.C.	Santucci@iigbna.iigb.na.cnr.it
Portaccio Marianna	R.U.	Marianna.Portaccio@unina2.it

Non Aderenti INBB

De Maio Anna	B.C.	
Diano Nadia.	B.C.	Diano@iigbna.iigb.na.cnr.it
Bencivenga Umberto	P.T.	Benciven@iigbna.iigb.na.cnr.it
Rossi Sergio	P.T.	Rossi@iigbna.iigb.na.cnr.it

Sede Unità di Ricerca

II Università degli Studi di Napoli –Facoltà di Medicina e Chirurgia-Dipartimento di Fisiologia Umana e Funzioni Biologiche Integrate ‘F.Bottazzi’ via S.M. di Costantinopoli 16-80138 Napoli;
081-7257292 081-2395887 Marianna.Portaccio@unina2.it

Sezione INBB di appartenenza:

Napoli

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Scopo della ricerca è stato la realizzazione di un biosensore in grado di operare in condizioni isoterme e non-isoterme per la rilevazione di glucosio in soluzioni acquose. L'elemento biologico è costituito dall'enzima Glucosio Ossidasi (GOD) immobilizzato su un opportuno supporto. Nella reazione catalizzata dall'enzima si produce perossido di idrogeno in maniera proporzionale alla concentrazione di glucosio presente in soluzione.

Il biosensore è di tipo amperometrico. L'anodo è costituito da un elettrodo di platino su cui è posta la membrana catalitica; l'elettrodo di riferimento è di Ag/AgCl; I due elettrodi sono mantenuti ad una differenza di potenziale di 700mV. In queste condizioni il perossido di idrogeno prodotto dalla reazione enzimatica si ossida e si produce una corrente elettrica proporzionale alla concentrazione di H₂O₂ e quindi alla concentrazione di glucosio da misurare.

Risultati ottenuti

Si è realizzato un biosensore amperometrico operante sia in condizioni isoterme che non-isoterme. Il sistema è stato caratterizzato misurando la rapidità iniziale di incremento della corrente (la risposta dinamica), il tempo in cui il valore della corrente va dal 10 al 90% del suo valore finale (tempo di risposta del biosensore); il range di concentrazione di glucosio in cui si ha un andamento lineare tra la risposta dinamica e la concentrazione di glucosio da misurare (range di linearità del segnale). I risultati hanno evidenziato che:

Il biosensore non-isoterma presenta un range lineare più ampio ed un limite di rilevabilità più basso rispetto a quello isoterma;

La sensibilità del biosensore non-isoterma è circa il doppio di quella del biosensore isoterma;

Il tempo di risposta del biosensore non-isoterma è più breve di quello del biosensore isoterma.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000

- 1- M.S.Mohy Eldin, M.Portaccio, N. Diano, S. Rossi, U. Bencivenga, A. D'Uva, P.Canciglia, F.S. Gaeta and D.G. Mita " Influence of the microenvironment on the activity of enzyme immobilized on Teflon membranes grafted by
- 2-M.Santucci, M.Portaccio, M.S. Mohy Eldin, N. Pagliuca, S. Rossi, U. Bencivenga, F.S. Gaeta and D.G. Mita "Glucose determination by means of a new reactor/sensor system operating under non isothermal conditions" *Enzyme and Microbial Technology*, 26, 593-601, 2000.
- 3-M.M. El-Masry, A. DeMaio, S. Di Martino, N.Diano, U.Bencivenga, S. Rossi, V. Grano, P. Canciglia, M. Portaccio, F.S. Gaeta and D.G. Mita "Modulation of immobilized enzyme activity by altering the hydrophobicity of nylon-grafted membranes Part1. Isothermal conditions". *J. Molecular catalysis B: Enzymatic* , 9, 219--230, 2000.
- 4-M.M. El-Masry, A. DeMaio, S. Di Martino, U.Bencivenga, S. Rossi, B.A. Manzo, N. Pagliuca, P.Canciglia, M. Portaccio, F.S. Gaeta and D.G. Mita "Modulation of immobilized enzyme activity by altering the hydrophobicity of nylon-grafted membranes Part2. Non-isothermal conditions". *J. Molecular catalysis B: Enzymatic* , 9, 231--244, 2000.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Continuare gli studi per individuare nuove membrane catalitiche e diverse tecniche di immobilizzazione.

Collaborazioni internazionali in atto

Prof. B. Danielson Pure and Applied Biochemistry Chemical Center- Lund-Sweden

Prof. L.J. Blum Laboratoire de Génie Enzymatique- Université Lyon 1- Villeurbanne Cedex -France

Prof. J.H. Tramper Department of Food Technology and Nutritional Sciences- Wageningen Agricultural University- Wageningen-Netherlands.

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca:

Spettrofotometro, bagni termostatici, amperometri, alimentatori,

UNITA' DI RICERCA INBB
Napoli

Responsabile Scientifico
Prof. Ragone Raffaele

Linea di Ricerca

Dai Mesofili ai Termofili: un approccio globale alla stabilità delle proteine globulari

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Colonna Giovanni	PO	colonna@unina2.it
Carteni Maria	PO	maria.carteni@unina2.it

Non Aderenti INBB

Ambrosone Luigi	RU	ambrosone@unibas.it
Facchiano Angelo	BC	angelo.facchiano@unina2.it

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Biochimica e Biofisica - Seconda Università di Napoli
via Costantinopoli 16, 80138 Napoli
0815665869

0815665869

ragone@unina2.it

Sezione INBB di appartenenza

Napoli

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Studiare tutti gli elementi utili ad approfondire la conoscenza degli equilibri di denaturazione in sistemi monomerici ed oligomerici, anche analizzando casi specifici, in presenza di altre molecole e di agenti caotropici, con eventuale chiarimento della relazione struttura-funzione. Utilizzare il modello della stabilità delle proteine globulari da noi recentemente proposto, basato sulla dissoluzione delle *N*-alchil-ammidi, per chiarire come la ripartizione degli amminoacidi tra superficie e matrice proteica determina la dipendenza dalla temperatura dell'equilibrio di denaturazione. Identificare gli elementi strutturali che determinano la stabilità termica. Estensione del modello delle *N*-alchil-ammidi a temperature superiori a 100 °C, includendo informazioni sulle proprietà termodinamiche degli amminoacidi.

Risultati ottenuti

Utilizzando svariati sistemi mesofili, si è evidenziato che l'associazione produce strutture quaternarie in grado di resistere a temperature molto elevate. Si è sviluppato un quadro d'insieme sulla stabilità termica delle proteine globulari da mesofili e termofili. Nel contempo, è stata caratterizzata la dipendenza dalla concentrazione proteica delle curve di denaturazione di sistemi oligomerici in condizioni isoterme. Operando su un sistema complesso di equilibri di auto-associazione (frazione proteica IV da vescicola seminale di ratto) e su un sistema funzionante in presenza di un agente disaggregante (transglutaminasi), sono stati definiti alcuni possibili meccanismi molecolari deputati al controllo della funzione biologica. Si sono sviluppati anche temi di carattere teorico, con implicazioni per l'interpretazione dei dati sperimentali. Sono stati analizzati elementi strutturali ritenuti determinanti della stabilità termica.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000

- 1) R. Ragone "Protein association and stability of thermophilic enzymes" *Protein and Peptide Letters* 4, 277-279 (1997).
- 2) L. Ambrosone, R. Ragone "The interaction of micelles with added species and its similarity to the denaturant binding model of proteins" *Journal of Colloid and Interface Science* 205, 454-458 (1998).
- 3) A. M. Facchiano, G. Colonna, R. Ragone "Helix stabilizing factors and stabilization of thermophilic proteins: an X-ray based study" *Protein Engineering* 11, 753-760 (1998).
- 4) P. Gallo, F. Rossi, M. Saviano, C. Pedone, G. Colonna, R. Ragone "Specific interaction between bovine Cyclophilin A and synthetic analogues of Cyclolinopeptide A" *The Journal of Biochemistry (Tokyo)* 124, 880-885 (1998).
- 5) C. Esposito, C. Esposito, P. Colicchio, I. Caputo, R. Porta, R. Ragone "Overlapping between fluorescence modifications and activation of prostate transglutaminase induced by sodium dodecyl sulfate" *Archives of Biochemistry and Biophysics* 366, 47-54 (1999).
- 6) A. M. Facchiano, G. Colonna, R. Ragone "Reply to comment" *Protein Engineering* 12, 438 (1999).
- 7) P. Stiuso, S. Metafora, A. M. Facchiano, G. Colonna, R. Ragone "The self-association of protein SV-IV and its possible functional implications" *European Journal of Biochemistry* 266, 1029-1035 (1999).

- 8) A. M. Facchiano, G. Colonna, R. Ragone "An analysis of calorimetric data on mesophilic proteins and its implications for stability to elevated temperatures" *Current Topics in Peptide & Protein Research* 3, 101-109 (1999).
- 9) R. Ragone "How the protein concentration affects unfolding curves of oligomers" *Biopolymers* 53, 221-225 (2000).
- 10) L. Ambrosone, R. Ragone "Electrochemical methods of evaluating the van't Hoff enthalpy in reactions involving biological macromolecules" *International Journal of Biological Macromolecules* 27, 241-244 (2000).

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

- 1) Estensione del modello del modello delle *N*-alchil-ammidati ad un intervallo di temperature più ampio (>100 Celsius), introducendo informazioni specifiche sul tipo di amminoacidi costituenti le singole proteine;
- 2) Analisi del ruolo svolto dai ponti di idrogeno e da altre interazioni nel determinare la stabilità termica;
- 3) Studio di modifiche naturali della struttura primaria coinvolte nei meccanismi di stabilizzazione termica;
- 4) Determinare il numero ed il tipo di amminoacidi che controllano l'equilibrio di denaturazione e la sua dipendenza dalla temperatura;
- 5) Individuare linee-guida termodinamiche per la programmazione ed il controllo di esperimenti di ingegneria proteica.

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Spettrofotometro; Spettrofluorimetro; Supporto hardware e software per la grafica molecolare.

Parole Chiave

Biotermodinamica; Termofilia; Stabilità delle Proteine.

UNITA' DI RICERCA INBB
Padova

Responsabile Scientifico

Prof. Rigo Adelio

Linea di Ricerca

Bioelettronica

titolo

Sviluppo ed impiego di sensori per lo studio e la caratterizzazione di biomolecole e biosistemi

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Rigo Adelio	PO	rigo@civ.bio.unipd.it
Vianello Fabio	PT	fili@civ.bio.unipd.it
Zennaro Lucio	PT	
Bortoluzzi Silvia	DR	

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Chimica Biologica - Università di Padova - Viale G. Colombo 3 Padova 35121
0498276107 0498073310 rigo@civ.bio.unipd.it

Sezione INBB di appartenenza

Padova

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Esplorare le possibilità di impiego di materiali ed architetture biologiche e non, in sistemi di trasduzione, amplificazione, immagazzinamento ed elaborazione dell'informazione per la creazione di nuovi dispositivi e/o sistemi per la caratterizzazione di biomolecole e biosistemi.

Risultati ottenuti

Le ricerche in questo settore hanno avuto per oggetto la costruzione e messa a punto di dispositivi bioelettronici e di sonde per il riconoscimento e la quantificazione di molecole di interesse nel campo della biomedicina e nel campo ambientale e l'amplificazione di segnali mediante biosistemi. Per ottenere questi risultati, da un lato sono stati messi a punto procedimenti di purificazione originali di enzimi con capacità di trasferimento elettronico, il loro assemblaggio in films monomolecolari, dall'altro lato sono state sviluppate procedure per il loro ancoraggio su superfici trasduttrici di varia natura ed in particolare sul silicio. Inoltre sono stati sviluppati sistemi di amplificazione mediante l'impiego di enzimi caratterizzati da una elevata attività per la misura di molecole a concentrazioni inferiori a nM. Inoltre è stata studiata la possibilità di impiegare sonde nucleari per impieghi nel campo della biomedicina.

Queste attività di ricerca si sono concretizzate nello sviluppo di dispositivi, bioelettronici e non, da impiegare nel campo ambientale (atrazina, aldeide formica) e della biomedicina (attività amilasica, trapianto d'organi etc.).

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000

Vianello, F., Stefani, A., Di Paolo, M. L., Rigo, A., Lui, A., Margesin, B., Zen, M., Scarpa, M., & Soncini, G. (1997) Potentiometric detection of formaldehyde in air by an aldehyde dehydrogenase FET. *Sensor Actuat.B* 37, 49-54.

Hock, B. & Rigo, A. (1997) On-line analysis with immunosensing devices. *GIT Laboratory J. 1*, 22-24.

Cadrobbi, R., Rigotti, P., Baldan, N., Toffano, M., Corazza, A., Scarpa, M., Rigo, A. & Ancona, E. (1997) Assessment of pre-transplantation warm ischemia time by phosphorous-31 magnetic resonance spectroscopy in pig kidneys. *Transpl. Proc.* 29, 3415-3416.

Canteri, R., Malacarne, C., Vianello, F., Zennaro, L., Rigo, A., M., Scarpa, M. Anderle. (1997) Characterization of functional films on solid substrates by TOF-SIMS. In: *"Secondary ion mass spectroscopy"* (Gillen, G., Lareau, R., Bennett, J., Stevie, F. eds.) pp. 497-500, J. Wiley Ltd.

Rigo, A., Pizzariello, A., Scarpa, M., Signor Luca e Vianello Fabio (1997) Procedimento per la determinazione in flusso di un analita mediante biomolecole aventi elevata affinità per l'analita stesso" *Italian Patent Application Nr. PD97 A 000009*.

Vianello, F., Signor, L., Pizzariello, A., Di Paolo, M. L., Scarpa, M., Hock, B., Giersch, T. & Rigo, A. (1998) Continuous flow immunosensor for atrazine detection. *Biosensor & Bioelectronic* 13, 45-53 (1998).

Marcazzan, M., Vianello, F., Scarpa, M., & Rigo, A. (1999) An ESR method for α -amylase activity on succinylated starch; amylose and amylopectin. *J. Biochem. Biophys. Methods* 38, 191-202.

Vianello, F., Malek-Mirzayans, A., Di Paolo, M.L., Stevanato, R., & Rigo, A. (1999). Purification and characterisation of amine oxidase from pea seedlings. *Prot. Expr. Purif.* 15, 196-201 (1999)

Vianello, F., Zennaro, L., Di Paolo, M.L., Rigo, A., Malacarne, C. & Scarpa, M. (2000) Preparation, morphological characterization and activity of thin films of horseradish peroxidase. *Biotechnology and Bioengineering*, 68, 489-495.

Scarpa, S., Corazza, A., Vianello, F., Rigo, A., Furian, L., Baldan, N., & Rigotti, P. (2001) Deuterium nuclear magnetic resonance for evaluating the metabolic status of livers subjected to warm ischemia. *Transplantation*, in corso di stampa

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Verranno sviluppati nuovi sistemi che permettano da un lato il trasferimento controllato degli elettroni da biomolecole al trasduttore e viceversa e dall'altro la possibilità di rivelare singole biomolecole

Collaborazioni internazionali in atto

Prof. B. Hock University of Munchen (Germany)

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

NMR300 MHz (Bruker), NMR a campo variabile, Microscopio STM AFM (Park), EPR ED 200 Bruker, Stazione elettrochimica

Parole Chiave

Biosensors, Monomolecular films, Electron transfer, Metallo proteins, Nuclear probes

UNITA' DI RICERCA INBB
Padova

Responsabile Scientifico
Prof. Rigo Adelio

Linea di Ricerca

Biomolecole

titolo

Struttura-funzione di biomolecole coinvolte nel trasferimento di elettroni

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Rigo Adelio

PO

rigo@civ.bio.unipd.it

Di Paolo Maria Luisa

RU

mdipaolo@civ.bio.unipd.it

Rossetto Monica

DR

moniros@civ.bio.unipd.it

Non Aderenti INBB

Iudici Angela

A

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Chimica Biologica - Via G. Colombo 3, Padova

049.8276107

049.8073310

rigo@civ.bio.unipd.it

Sezione INBB di appartenenza

Padova

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

La comprensione della relazione fra attività di biomolecole e la loro struttura e organizzazione tridimensionale è di primaria importanza in campo scientifico e tecnologico.

Gli obiettivi che ci proponiamo, in primo luogo, lo studio delle correlazioni fra attività catalitica e struttura del sito attivo di metallo-enzimi con particolare riguardo alla capacità di trasferire elettroni. In secondo luogo, sulla base delle esperienze acquisite in questo settore, ci poniamo come obiettivi la progettazione, sintesi e caratterizzazione di polipeptidi in grado di coordinare ioni metallici aventi conformazioni corrispondenti a ben definiti minimi di energia e la modulazione della loro attività catalitica, farmacologia e di trasporto degli elettroni.

Risultati ottenuti

Sono stati studiati i meccanismi catalitici di metallo-enzimi contenenti lo ione rame nel sito attivo: A questo scopo sono state eseguite misure di tipo cinetico, spettroscopico, insieme ad analisi grafiche dei siti attivi usando strutture cristallografiche da PDB. Infine sono in corso simulazioni di dinamica molecolare e browniana. Questi studi ci hanno permesso di mettere in luce il ruolo delle interazioni elettrostatiche che regolano l'interazione sito attivo-substrato. Sono inoltre state sviluppate e messe a punto sonde che permettono la determinazione dello stato di ossidazione dello ione metallico nel sito attivo di alcuni enzimi.

A partire dalle conoscenze acquisite attraverso questi studi, sono stati progettati polipeptidi in grado di coordinare efficacemente lo ione rame e di svolgere funzioni catalitiche. La struttura di questi peptidi è stata parzialmente caratterizzata e correlata all'attività catalitica di tipo ossidasico e dismutasico.

Sono state infine prese in considerazione alcune piccole biomolecole coinvolte nel trasferimento degli elettroni nei sistemi cellulari. Tra queste sono state considerate soprattutto molecole appartenenti alla classe dei polifenoli che presentano un interesse legato al loro particolare chimismo oltre che alla loro elevata attività come antiossidanti. Il chimismo di questi composti è stato studiato in sistemi modello capaci di riprodurre in vitro i fenomeni perossidativi cellulari.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000

Scarpa, M., Momo, F., Viglino, P., Vianello, F., & Rigo, A. (1997) Activated oxygen species in the oxidation of glutathione. *Biophys. Chem.*, 60, 53-61.

Galzigna, L., Schiappelli, M. P., Scarpa, M., & Rigo, A. (1997) A peroxidase-catalyzed sulfoxidation of promethazine. *Free Rad. Res.* 27, 501 - 504.

Stevanato, R., Gasparini, R., Di Paolo, M. L., Vianello, F., & Rigo, A. (1997) Substrate structure and bovine amine oxidase activity *Ital. J. Biochem.*, 46, 109- 112.

Vianello, F., Scarpa, M., Viglino, P., Rigo, A. (1997) Deuterium distribution in lactate as tracer of metabolic pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237, 650- 652.

Galzigna, L., Schiappelli, M. P., Rigo, A., & Scarpa, M. (1999) A rat brain fraction and different purified peroxidases catalyzing the formation of dopaminochrome from dopamine *Biochim. Biophys. Acta* 1427, 329-336.

Corazza, A., Vianello, F., Zennaro, L., Gourova, N., Di Paolo, M. L., Signor, L., Marin, O., Rigo, A. & Scarpa, M. (1999) Enzyme mimics complexing Cu(II) ion: structure-function relationship *J. Peptide Res.* 54, 491-504.

Rigo, A., Vianello, F., Clementi, G., Rossetto, M., Scarpa, M., Vrhovsek, U. & Mattivi, F. (2000) Contribution of proanthocyanidins to the peroxy radical scavenging capacity of some Italian red wines. *J. Agric. Food. Chem.* 48, 1996-2002.

Rigo, A., Vianello, F., Clementi, G., Rossetto, M., Scarpa, M., Vrhovsek, U. & Mattivi, F. (2000) The peroxy radical scavenging capacity of some Italian red wines. *Bio-flavonoids & Polyphenols in Health & Disease*, Dinard (France)

De Iuliis, A., Zanatta, L., De Santo, C., Ferrari, J., Scarpa, M., Rigo, A. & Galzigna, L. (2000) Brain dopamine peroxidase and Parkinson's disease. *Basic and Clinical Enzymology 2000*, May 2000, p. 103.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

1. determinare l'influenza di parametri fisici e ambientali del sito attivo dell'ammino ossidasi sul meccanismo catalitico dell'enzima stesso. Tra i parametri saranno considerati: le costanti di ionizzazione dei residui ammino acidici presenti nel sito attivo, la costante dielettrica locale, l'idrofobicità del sito attivo, la capacità di diffusione del substrato (etc)
2. comprendere i meccanismi di trasferimento degli elettroni in alcuni polifenoli
3. progettare analoghi sintetici (polipeptidi) della superossido dismutasi..

Collaborazioni internazionali in atto

Dr. Monika Fuxreiter, Mount Sinai School of Medicine, New York (USA) e Università di Budapest (Ungheria)

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

NMR Bruker 300 MHz, NMR a frequenza variabile, ESR Bruker, Spettrofotometri, Sintetizzatore di peptici Stazione grafiche e di calcolo

Parole Chiave

Ammino ossidasi, Superossido dismutasi, Peptici, Polifenoli

UNITA' DI RICERCA INBB
Napoli

Responsabile Scientifico
Prof. Rossi Francesco

Linea di Ricerca

Modulazione e controllo farmacologico dei sistemi cardiovascolare, respiratorio e nocicettivo

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Rossi Francesco	PO	francesco.rossi@unina2.it
Lampa Enrico	PO	enrico.lampa@unina2.it

Non Aderenti INBB

Vacca Ciro	PA	
Berrino Liberato	PA	liberato.berrino@unina2.it
Filippelli Amelia	PA	amelia.filippelli@unina2.it
Filippelli Walter	FT	walter.filippelli@unina2.it
Maione Sabatino	PA	sabatino.maione@unina2.it
D'Amico Michele	RU	michele.d'Amico@unina2.it
D'Agostino Bruno	DR	d'agostino.bruno@unina2.it
Falciani Maddalena	BC	maddalena.falciani@unina2.it
Vitelli Maria Redenta	BC	
Marrocco Giuseppina	BC	
Rinaldi Barbara	DR	
Oliva Patrizia	DR	
Palazzo Enza	A	enza.palazzo@unina2.it
Esposito Ferdinando	BC	
Marabese Ida	A	ida.marabese@unina2.it
de Novellis Vito	A	
Di Filippo Clara	DR	
Mazzeo Filomena	BC	filomena.mazzeo@unina2.it
Motola Giulia	DR	
Palla Adriana	PT	adriana.palla@unina2.it

Sede Unità di Ricerca

Dip. di Medicina Sperimentale - Sezione di Farmacologia
Seconda Università di Napoli Via Costantinopoli, 16 - 80138 Napoli
Telefono: 081-5665878 Fax: 081-5665878

Sezione INBB di appartenenza

Napoli

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

L'attività di ricerca è stata rivolta allo studio della farmacologia cardiovascolare, respiratoria e della nocicezione.

Nell'ambito della farmacologia cardiovascolare, sono stati condotti studi *in vivo* sulla modulazione centrale e periferica della funzione cardiovascolare e studi *in vitro* sui meccanismi recettoriali alla base di risposte funzionali a vari mediatori nel controllo del tono vascolare. Inoltre, è stata valutata *in vitro* e *in vivo* la cardiotossicità dei farmaci antineoplastici e si è cercato di identificare i meccanismi di stimolazione del *pathway* del calcio in colture primarie di cardiomiociti di ratto. Infine, sono stati condotti studi di biologia molecolare sugli oligonucleotidi antisense per valutare il loro utilizzo nella prevenzione della stenosi e restenosi arteriosa e come farmaci antiipertensivi.

Per quanto riguarda la farmacologia respiratoria, sono stati condotti studi *in vitro* sui mediatori coinvolti nel controllo del tono broncomotore, sui mediatori della flogosi nell'asma bronchiale e studi *in vivo* sulla modulazione del tono broncomotore nelle vie aeree di animali immunizzati e non.

Nella modulazione farmacologica della nocicezione, sono stati condotti studi atti a valutare come le neurotrasmissioni aminoacidergiche, i cannabinoidi e la nocicettina sono coinvolti nella regolazione del dolore e sono stati caratterizzati i meccanismi di azione dei farmaci antidolorifici.

Infine, sono state condotte ricerche in farmacologia clinica sui farmaci dell'apparato cardiovascolare, sui farmaci dell'apparato respiratorio, sugli antibiotici e sono stati condotti studi di farmacovigilanza e di farmacoepidemiologia con lo scopo di connettere la farmacologia tradizionale alle istanze dei clinici e della collettività.

Risultati ottenuti

Per quanto riguarda la farmacologia cardiovascolare: a) è stata dimostrata l'interazione dell'endotelina-1 con nuovi mediatori del sistema cardiovascolare quali l'adrenomedullina e l'ouabaina nel controllo della pressione arteriosa; b) sono stati valutati gli effetti antiipertensivi nei ratti geneticamente ipertesi di nuovi farmaci appartenenti alla famiglia degli antagonisti dell'endotelina e di oligonucleotidi antisense del recettore AT₁ per l'angiotensina II; c) è stato dimostrato il ruolo protettivo svolto dagli acidi grassi poliinsaturi della serie omega-3, componenti del fish oil, nella cardiotoxicità da antracicline.

Per quanto riguarda la farmacologia respiratoria, esperimenti condotti *in vivo* ed *in vitro* hanno dimostrato il ruolo degli inquinanti ambientali nelle modificazioni dei neurotrasmettitori e dei recettori coinvolti nel tono broncomotore ed il ruolo del monossido d'azoto nelle esacerbazioni di patologie asmatiformi indotte da tali inquinanti.

Infine, per quanto riguarda la farmacologia della nocicezione è stato dimostrato il ruolo dei recettori metabotropici del glutammato, a livello dell'area grigia periacqueduttale e dei nuclei del rafe, nella modulazione del dolore neuropatico.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000

1. D'AMICO M., ROSSI F., WARNER T.D.: Regulation of blood pressure by L-arginine-nitric oxide pathway within the superior colliculus of rats. *Eur. J. Pharmacol.* **328**: 65-67, 1997.
2. D'AMICO M., DI FILIPPO C., ROSSI F.: Depressor responses to endothelin-1 into the superior colliculus of rats: predominant role of endothelin ET_B receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **347**: 71-75, 1998.
3. PIZZIRUSSO A., OLIVA P., MAIONE S., D'AMICO M., ROSSI F., BERRINO L.: Role of vasopressin on excitatory aminoacids mediated pressor responses in the periaqueductal gray area. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol.* **357**: 514-518, 1998
4. STELLA L., DE NOVELLIS V., MARABESE I., BERRINO L., MAIONE S., FILIPPELLI A., ROSSI F.: The role of A₃ adenosine receptors in central regulation of arterial blood pressure. *Brit. J. Pharmacol.* **125**: 437-440, 1998.
5. D'AGOSTINO B., FILIPPELLI A., FALCIANI M., ROSSI F.SCA, ROSSI F.: Endothelin-1 and bronchial hyperresponsiveness in the rabbit. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol.* **358**: 561-566, 1998.
6. MAIONE S., MARABESE I., LEYVA J., PALAZZO E., DE NOVELLIS V., ROSSI F.: Characterization of mGluRs which modulate nociception in the PAG of the mouse. *Neuropharmacology* **37**: 1475-1483, 1998.
7. D'AMICO M., DI FILIPPO C., ESPOSITO F., ROSSI F., FILIPPELLI A.: Injection of endothelin-1 into raphe obscurus of rats induces depressor responses predominantly through endothelin ET_A receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol.* **359**: 471-476, 1999.
8. MAIONE S., MARABESE I., OLIVA P., DE NOVELLIS V., STELLA L., ROSSI F.SCA, FILIPPELLI A., ROSSI F.: Periaqueductal gray matter glutamate and GABA decrease following subcutaneous formalin injection in rat. *Neuroreport* **10**: 1403-1407, 1999.
9. MAIONE S., MARABESE I., ROSSI F.SCA, BERRINO L., PALAZZO E., TRABACE L., ROSSI F.: Effects of persistent nociception on periaqueductal gray glycine release. *Neuroscience* **97**: 311-316, 2000.
10. MAIONE S., OLIVA P., MARABESE I., PALAZZO E., ROSSI F.SCA, BERRINO L., ROSSI F., FILIPPELLI A.: Periaqueductal gray matter metabotropic glutamate receptors formalin-induced nociception. *Pain* **85**: 183-189, 2000.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Le prospettive e gli obiettivi sono l'approfondimento del ruolo di mediatori, come l'adrenomedullina, i leucotrieni, la nocicettina e i cannabinoidi, nella regolazione di organi e sistemi; l'utilizzo della terapia genica con oligonucleotidi antisense nell'ipertensione arteriosa e nella restenosi; l'identificazione di molecole strutturalmente diverse da quelle già conosciute ma più soddisfacenti nel trattamento di determinate patologie e la sintesi di composti che rappresentino varianti strutturali di farmaci già noti ma che risultino dotati di una maggiore selettività ed efficacia di azione con un più vantaggioso rapporto costo/beneficio.

Collaborazioni internazionali in atto

ADVENIER C. – Faculté de Médecine – Paris Ouest Université Paris V.

PAGE C.P. – Department of Pharmacology, King's College, University of London, UK

WARNER T.D. - The William Harvey Research Institute, London, UK.

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Set up per elettrofisiologia extracellulare, Fluorimetro, Sistema di acquisizione dati computerizzato Mac Lab, Apparecchio Langendorf per cuore isolato, Pulmonary Monitoring System, Apparecchi stereotassici per ratto e topo

Parole Chiave

Farmaci, Neurotrasmettitori, Sistema cardiovascolare, Sistema respiratorio, Nocicezione

UNITA' DI RICERCA INBB
Napoli

Responsabile Scientifico
Prof. Mosè Rossi

Linea di Ricerca

Gli estremofili come fattorie cellulari

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Mosè Rossi PO rossii@dafne.ibpe.na.cnr.it

Non Aderenti INBB

Bartolucci Simonetta PO bartoluc@cds.unina.it

Guagliardi Annamaria RU guaglia@cds.unina.it

Moracci Marco R CNR moracci@dafne.ibpe.na.cnr.it

Pisani Francesca R CNR pisani@dafne.ibpe.na.cnr.it

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Chimica Biologica – Università Federico II

Via Mezzocannone 16 – 80134 Napoli

081 8661341

081 8661341

rossii@dafne.ibpe.na.cnr.it

Sezione INBB di appartenenza

Napoli

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

L'attività svolta comprende lo studio dei meccanismi che a livello molecolare hanno permesso lo sviluppo della vita alle alte temperature.

I modelli sono stati vari enzimi e proteine e il DNA di vari microrganismi termofili

Risultati ottenuti

Risoluzione della struttura di varie proteine; studio del rapporto tra struttura e funzione; clonaggio ed espressione di geni di termofili in mesofili; sviluppo di biosensori; costruzione di un plasmide "shuttle" per esportare geni in termofili

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000

C. Aguilar, I. Sanderson, M. Moracci, M. Ciaramella, R. Nucci, M. Rossi, L.H. Pearl: Crystal structure of the α -glycosidase from the hyperthermophilic Archaeon *Sulfolobus solfataricus*: resilience as a key factor in thermostability. *Journal of Molecular Biology* 271, 789-802, 1997.

M. Moracci, A. Trincone, G. Perugino, M. Ciaramella, M. Rossi: Restoration of the Activity of Active-Site Mutants of the Hyperthermophilic β -Glycosidase from *Sulfolobus solfataricus*: Dependence of the Mechanism on the Action of External Nucleophiles. *Biochemistry*, 37(42): 17262-270, 1998

R. Cannio, P. Contursi, M. Rossi, S. Bartolucci: An Autonomously Replicating Transforming Vector for *Sulfolobus solfataricus*. *J. Bacteriol.* 180, 3237-3240, 1998

B. Ren, G. Tibbelin, D. De Pascale, M. Rossi, S. Bartolucci, R. Ladenstein: A protein Disulfide Oxidoreductase from the Archaeon *Pyrococcus furiosus* contains two Thioredoxin fold units. *Nature Structural Biology* 5, (7), 603-611, 1998

F.M. Pisani, M. De Felice, G. Manco, M. Rossi: Domain organization and biochemical features of *Sulfolobus solfataricus* DNA polymerase. *Extremophiles* 2, 171-177, 1998

F.M. Pisani, M. De Felice, M. Rossi: Amino acid residues involved in determining the processivity of the 3'-5' exonuclease activity in a family B DNA polymerase from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Biochemistry*, 37(42): 15005-12, 1998

S. D'Auria, P. Herman, M. Rossi, J.R. Lakowicz: The fluorescence emission of the apo-glucose oxidase from *Aspergillus niger* as probe to estimate glucose concentrations. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 263: 2, 550-553, 1999

A. Giordano, R. Cannio, F. La Cara, S. Bartolucci, M. Rossi, C. Raia: Asn249Tyr Substitution at the Coenzyme Binding Domain Activates *Sulfolobus solfataricus* Alcohol Dehydrogenase and Increases Its Thermal Stability. *Biochemistry*, 38(10), 3043-3054, 1999

G. Manco, E. Giosuè, S. D'Auria, P. Herman, G. Carrea, M. Rossi: Cloning, Overexpression and Properties of a New Thermophilic and Thermostable Esterase with Sequence Similarity to Hormone Sensitive Lipase Subfamily from the Archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Arch. Biochem. Biophys.* 373, 182-192, 2000

F.M. Pisani, M. De Felice, F. Carpentieri, M. Rossi: Biochemical characterisation of clamp-loader complex homologous to eukaryotic factor C from hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Journal of Molecular Biology* 301, 617-73, 2000.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Sviluppo ulteriore della ricerca sulla struttura-funzione degli enzimi degli estremofili e applicazioni di essi in sistemi produttivi

Collaborazioni internazionali in atto

Università Tecnologica - Amburgo

University College – Londra

University of Maryland – Baltimora (USA)

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Sequenziatore di proteine; fermentatore ad alta temperatura; Silicon graphics.

Parole Chiave

Estremofili; enzimi; biotecnologie; biosensori.

UNITA' DI RICERCA INBB
Roma

Responsabile Scientifico
Prof. Giuseppe Rotilio

Linea di Ricerca

Biomolecole

titolo

Biomolecole dello stress ossidativo

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Rotilio Giuseppe	PO	rotilio@uniroma2.it
Battistoni Andrea	RU	andrea.battistoni@uniroma2.it
Rossi Luisa	RU	luisa.rossi@uniroma2.it

Non Aderenti INBB

Carri Maria Teresa	RU	Carri@bio.uniroma2.it
Pacello Francesca	BC	Francesca.pacello@uniroma2.it
Filomeni Giuseppe	DR	Filomeni@bio.uniroma2.it
D'Orazio Melania	DR	Dorazio@uniroma2.it

Sede Unità di Ricerca

Università di Roma "Tor Vergata" - Dipartimento di Biologia

Via della Ricerca Scientifica

06-72594373

06-72594311

rotilio@uniroma2.it/

Sezione INBB di appartenenza

Roma Tor Vergata

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Numerosi processi cellulari ed eventi patologici sono modulati da processi redox. Il nostro gruppo studia i meccanismi molecolari rame-dipendenti nelle cellule nervose in relazione a specifiche patologie (sclerosi laterale amiotrofica e malattia di Menkes) ed il coinvolgimento dell'enzima Cu,Zn superossido dismutasi (Cu,ZnSOD) nei processi di virulenza batterica

Risultati ottenuti

Abbiamo sviluppato un modello cellulare di sclerosi laterale amiotrofica e stiamo utilizzando un modello animale della malattia di Menkes per studiare eventuali alterazioni a carico di marcatori molecolari del processo apoptotico ed identificare i passaggi in cui potrebbero essere coinvolti il rame e l'enzima superossido dismutasi.

La forma familiare della sclerosi laterale amiotrofica è frequentemente associata a mutazioni nel gene codificante per la Cu,ZnSOD. I nostri dati indicano che un'alterata chimica del rame legato al sito attivo delle forme mutate dell'enzima possa indurre un aumento dello stress ossidativo all'interno delle cellule. Inoltre, abbiamo dimostrato che la resistenza all'apoptosi mediata da ossido nitrico è strettamente correlata ai livelli e all'integrità della Cu,Zn superossido dismutasi e che il bilancio tra specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto regola l'apoptosi in cellule di neuroblastoma.

Attraverso l'uso di modelli cellulari abbiamo dimostrato che variazioni nell'espressione del gene *sodC* (che codifica per la Cu,ZnSOD) possono modulare la sopravvivenza batterica all'interno dei macrofagi. Abbiamo anche osservato che tale enzima influenza la capacità dei batteri di sopravvivere in cellule epiteliali, suggerendo che anche in tali tipi cellulari siano operativi dei meccanismi di controllo della proliferazione batterica basati sulla produzione di radicali dell'ossigeno. Siamo inoltre impegnati nella caratterizzazione molecolare delle Cu,ZnSOD prodotte da diversi batteri patogeni (*Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella typhimurium*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus ducreyi*) e non patogeni (*E.coli* K12)..

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000

1. Battistoni, A., Folcarelli, S., Cervoni, L., Polizio, F., Desideri, A., Giartosio, A., and Rotilio, G. "Role of the dimeric structure in Cu,Zn superoxide dismutase. pH-dependent, reversible denaturation of the monomeric enzyme from *Escherichia coli*" (1998) *J.Biol.Chem.* 273, 5655-5661
2. Battistoni, A., Donnarumma, G., Greco, R., Valenti, P., and Rotilio, G. "Overexpression of a hydrogen peroxide-resistant periplasmic Cu,Zn superoxide dismutase protects *Escherichia coli* from macrophage killing" *Biochem Biophys Res Commun.* (1998) 243, 804-807
3. Bordo, D., Matak, D., Djinovic-Carugo, K., Rosano, C., Pesce, A., Bolognesi, M., Stroppolo, M.E., 4) Falconi, M., Battistoni, A., and Desideri, A. "Evolutionary constraints for dimer formation in prokaryotic Cu,Zn superoxide dismutase" *J.Mol.Biol.* (1999) 285, 283-296
4. Battistoni, A., Mazzetti, A.P., and Rotilio, G. "In vivo disulfide bond formation in Cu,Zn superoxide dismutase in *Escherichia coli*" *Febs letters* (1999) 413, 313-316
5. Gabbianelli R, Ferri, A, Rotilio G, Carri, MT. Aberrant copper chemistry as a major mediator of oxidative stress in a human cellular model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem.* (1999) 73, 1175-80.
6. Battistoni, A., Pacello, F., Folcarelli, S., Ajello, M., Donnarumma, G., Greco, R., Ammendolia, M.G., Touati, D., Rotilio, G., and Valenti, P. "Increased expression of periplasmic Cu,Zn superoxide dismutase enhances the survival of *Escherichia coli* invasive strains within nonphagocytic cells." *Infection and Immunity.* 2000. 68, 30-37
7. Ciriolo, MR, De Martino, A, Lafavia, E, Rossi, L, Carri, MT, Rotilio, G. Cu,Zn-superoxide dismutase-dependent apoptosis induced by nitric oxide in neuronal cells. *J Biol Chem* (2000) 275, 5065-72
8. Pesce, A., Battistoni, A., Stroppolo, M.E., Polizio, F., Nardini, M., Kroll, J.S., Langford, P.R., O'Neill, P., Sette, M., Desideri, A. and Bolognesi, M. Functional and crystallographic characterization of *Salmonellatyphimurium* Cu,Zn superoxide dismutase coded by the *sodCI* virulence gene. *Sottomessa a J.Mol.Biol.* (2000) 302, 465-78
9. Ferri, A, Gabbianelli, R, Casciati, A, Paolucci, E, Rotilio, G, Carri, MT Calcineurin activity is regulated both by redox compounds and by mutant familial amyotrophic lateral sclerosis-superoxide dismutase. *J Neurochem.* (2000) 75, 606-613.
10. Sette, M., Bozzi, M., Battistoni, A., Fasano, M., Paci, M. and Rotilio, G. "Investigation of the active site of E.coli Cu,Zn superoxide dismutase reveals the absence of the copper-coordinated water molecule. Is the water molecule really necessary for the enzymatic mechanism?" *FEBS Lett.* (2000) 483, 21-26.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

I nostri principali obiettivi sono: a) contribuire a delineare i meccanismi attraverso i quali le alterazioni redox promuovono la neurodegenerazione b) valutare se la Cu,ZnSOD batterica possa rappresentare un nuovo bersaglio per lo sviluppo di nuove strategie mirate al controllo delle infezioni batteriche

Collaborazioni internazionali in atto

Prof. JS Kroll - Imperial College School of Medicine at St. Mary's - Department of Paediatrics

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Spettrometro ESR Bruker ESP 300

Spettrometro per assorbimento atomico Perkin Elmer

Strumentazione completa per studi di biochimica, di biologia molecolare e cellulare

Parole Chiave

Superossido dismutasi, stress ossidativo, sclerosi laterale amiotrofica, neurodegenerazione, virulenza batterica

UNITA' DI RICERCA INBB
Ancona

Responsabile scientifico
Prof. Ruggieri Silverio

Linea di ricerca

Meccanismi biochimici di trasduzione nella interazione pianta-patogeno

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Ruggieri Silverio PO ruggieri@popcsi.unian.it

Non Aderenti INBB

Orsomando Giuseppe RU orsomando@popcsi.unian.it

Lorenzi Maria DR lt400195@ascu.unian.it

Mezzetti Bruno RU mezzetti@popcsi.unian.it

Sede Unità di Ricerca

Università di Ancona, Dipartimento di Biotecnologie Agrarie e ambientali - via Ranieri 60131 Ancona
071/2204395 071/2802117 ruggieri@popcsi.unian.it

Sezione INBB di appartenenza

Roma "Tor Vergata"

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Studio dei determinanti biochimici coinvolti nel riconoscimento ospite-patogeno e nella cascata metabolica di trasduzione per l'attivazione della difesa coinvolgenti l'omeostasi redox cellulare, aspetti enzimologici e biotecnologici. Purificazione di elicitori e tossine proteiche rilasciate dal patogeno fungino; identificazione di recettori enzimatici; studio della fluttuazione del NAD in relazione alla interazione pianta-patogeno.

Pubblicazioni dal 1997 al 2000

- 1) Magni G., Emanuelli M., Amici A., Raffaelli N. and Ruggieri S.: "Purification of Human Nicotinamide Mononucleotide Adenylyltransferase". *Methods in Enzymology (Vitamins and Coenzymes)* 1997, 280, 241-247.
- 2) Magni G., Raffaelli N., Emanuelli M., Amici A., Natalini P. and Ruggieri S.: "NMN adenylyltransferase from Yeast and Other Microorganisms". *Methods in Enzymology (Vitamins and Coenzymes)* 1997, 280, 248-255.
- 3) Amici A., Emanuelli M., Magni G., Raffaelli N., Ruggieri S.: "Pyrimidine nucleotidases from human erythrocyte possess phosphotransferase activities specific for pyrimidine nucleotides". *FEBS Letters* 1997, 419, 263-267.
- 4) Raffaelli N., Pisani F.M., Lorenzi T., Emanuelli M., Amici A., Ruggieri S. and Magni G.: "Characterization of Nicotinamide Mononucleotide Adenylyltransferase from Thermophilic Archaea". *J. Bacteriology* 1997, 179, 7718-7723.
- 5) Magni G., Amici A., Emanuelli M., Raffaelli N., Ruggieri S.: "Enzymology of NAD synthesis". *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* 1998, Part A-73, D.L. Purich (ed.), John Wiley and Sons, New York, in press.
- 6) Raffaelli N., Emanuelli M., Pisani F.M., Amici A., Lorenzi T., Ruggieri S. and Magni G.: "Identification of the Archaeal NMN Adenylyltransferase Gene". *Mol. Cell. Biochem.* 1998, in press.

Parole chiave

Biochimica, patogeni, piante, difesa, enzimi, NAD, stress ossidativo, bilancio redox.

UNITA' DI RICERCA INBB
Roma

Responsabile Scientifico
Prof. Rustichelli Franco

Linea di Ricerca

Strutture di Biomolecole

titolo

Studio delle proprietà strutturali, conformazionali e di associazione di molecole biologiche mediante tecniche di scattering dei raggi X e dei neutroni.

Proprietà strutturali Proteine, lipidi, acidi nucleici

Scattering raggi X e dei neutroni

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Maria Grazia Ponzi Bossi RU mg.bossi@alisf1.unian.it.

Non Aderenti INBB

Mariani Paolo PA P.Mariani@alisf1.unian.it.

Carsughi Flavio RU F.Carsughi@alisf1.unian.it

Dubini Bruno PT E.Maccioni@alisf1.unian.it

Maccioni Elisabetta BC M.Pisani@alisf1.unian.it

Michela Pisani DR L.Saturni@alisf1.unian.it

Saturni Letizia BC F.Spinozzi@alisf1.unian.it

Spinozzi Francesco BC v.stanic@alisf1.unian.it

Stanic Vesna DR

Sede Unità di Ricerca

Università di Ancona - Istituto di Scienze Fisiche, Facoltà di Medicina e Chirurgia - via Ranieri 65, 60131 Ancona
071 2204602 071 2204605 isf@alisf1.unian.it

Sezione INBB di appartenenza

Roma "Tor Vergata"

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Studio delle proprietà strutturali ed energetiche di differenti sistemi macromolecolari di interesse biologico: proprietà strutturali e polimorfiche di sistemi lipidici in acqua (in particolare strutture di tipo non-lamellare in presenza di zuccheri) e proprietà strutturali e di aggregazione di proteine in soluzione.

Risultati ottenuti

Sistemi lipidici: sono state analizzate le proprietà strutturali del sistema monooleina/acqua in presenza di zuccheri a differente concentrazione. Ultimamente abbiamo studiato il polimorfismo della monooleina sia inglobata in vetri di trealosio che in presenza di un eccesso di soluzione di trealosio. I risultati hanno mostrato che il trealosio ha un forte effetto stabilizzante sulla struttura cubica che la monooleina forma in eccesso d'acqua. Sono state inoltre determinate le caratteristiche strutturali di fasi lipidiche di monooleina in soluzione di maltosio, raffiniosio, maltotriosio, maltotetraosio e saccarosio in funzione della concentrazione dello zucchero e della temperatura; sono stati studiati gli effetti stabilizzanti analizzando le proprietà di curvatura e l'energia di fasi cubiche bicontinue in presenza dei 4 disaccaridi, mediante tecniche di stress osmotico e diffrazione dei raggi X.

Sono inoltre stati completati gli esperimenti di diffrazione dei raggi X in funzione della pressione meccanica sullo stesso sistema monooleina/acqua (svolte presso il sincrotrone di Trieste, Elettra), che hanno permesso di determinare parzialmente il diagramma di fase pressione-concentrazione e di evidenziare come ad elevata pressione l'energia libera delle diverse strutture non lamellari sia determinata principalmente da una variazioni continua della curvatura spontanea.

Per quanto riguarda lo studio delle proprietà strutturali di proteine in soluzione, sono stati completati e analizzati una serie di esperimenti di diffusione a piccoli angoli dei raggi X e dei neutroni che hanno portato alla caratterizzazione delle proprietà strutturali e conformazionali di due diverse proteina: una transglutaminase, la cui conformazione è stata ricostruita in presenza ed in assenza di effettori che ne controllano l'attività mediante metodi Monte Carlo e la lattoglobulina, di cui sono state determinate le proprietà di aggregazione e dimerizzazione a pH acido all'aumentare della forza ionica della soluzione; la terza è una emocianina di Carcinus, di cui sono state studiate le proprietà di dissociazione in funzione della temperatura.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000

1. S. Dante, M.G. Ponzi Bossi, F. Rustichelli: "Langmuir Blodgett Films of Archeal Lipids: properties and perspectives". In " *Electrical and related Properties of Organic Solids. 3. High technology*" Vol. 24, pp 431-443 (R.W. Munn, A. Miniewicz and B. Kuchta eds) Kluwer Academic Publishers, Netherland (1997)

2. P. Mariani, R. Casadio, F. Carsughi, M. Ceretti and F. Rustichelli: "Structural analysis of membranes from photosynthetic bacteria by SANS". *Europhys. Lett.*, 37, 433-438 (1997).
3. G.P. Spada, S. Bonazzi, A. Garbesi, S. Zanella, F. Ciuchi and P. Mariani: "A study of the self-assembly of 2-deoxyguanosine 3'-5' cyclic monophosphate, d(cGp), by CD and X-ray diffraction". *Liquid Crystals*, 22, 341-348 (1997).
4. G. Gottarelli, G. Proni, G.P. Spada, S. Bonazzi, A. Garbesi, F. Ciuchi and P. Mariani: "The self-assembly and liquid crystal formation of d(GpGpApGpG)". *Biopolymers*, 42, 561-574 (1997).
5. P. Mariani, F. Ciuchi and L. Saturni: "Helix-specific interactions induce condensation of guanosine four-stranded helices in concentrated salt solutions". *Biophysical Journal*, 74, 430-435 (1998).
6. A. Ambrosini, G. Bossi, S. Dante, B. Dubini, L. Gobbi, L. Leone, M.G. Ponzi Bossi, G. Zolse: "Lipid-Drug Interaction: Thermodynamic and Structural Effects of Antimycotic Fluconazole on DPPC Liposomes" *Chem. Phys. Of Lipids* 95, 37-47 (1998)
7. P. Mariani, F. Rustichelli, L. Saturni, L. Cordone: "Stabilization of Monoolein Pn3m Cubic Structure on Trehalose Glasses". *European Biophysical Journal*, 28, 294-301 (1999).
8. G. Baldini, S. Beretta, G. Chirico, H. Franz, E. Maccioni, P. Mariani, F. Spinozzi: "Salt-induced association of lactoglobulin by light and X-ray scattering". *Macromolecules*, 32, 6128-6138 (1999).
9. P. Mariani, F. Carsughi, F. Spinozzi, S. Romanzetti, F. Rustichelli, C.M. Bergamini: "Ligand-induced conformational changes in tissue Transglutaminase: Monte Carlo analysis of small angle data". *Biophysical Journal*, 78, 3240-3251 (2000).
10. F. Spinozzi, F. Carsughi, P. Mariani, C. V. Teixeira, L. Amaral: "SAS from inhomogeneous particles with more than one domain of scattering density and arbitrary shape". *Journal Applied Crystallography*, 33, 556-559 (2000).

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Il programma di ricerca riguarda lo studio strutturale di mesofasi liotropiche colonnari di acidi nucleici e di derivati polinucleosidici, l'analisi strutturale di fasi lipidiche e di films di Langmuir Blodgett e infine lo studio strutturale, conformazionale e di aggregazione di alcune proteine in soluzione. Gli obiettivi di questa ricerca sono l'individuazione dei parametri che descrivono l'assemblaggio, la formazione e la crescita dei macroaggregati (più o meno strutturati) che si osservano in acqua, l'analisi degli effetti di sali, del pH o della temperatura sulle proprietà di aggregazione e sull'eventuale polimorfismo liotropico ed infine la determinazione e analisi dei differenti contributi elettrostatici, di idratazione ed entropici alle forze responsabili della formazione dei macroaggregati e delle strutture di tipo liotropico. Le tecniche adottate sono la diffrazione dei raggi X e la diffusione a piccoli angoli dei raggi X e dei neutroni. In particolare, alcuni esperimenti saranno effettuati anche in presenza di stress osmotico o sotto pressione meccanica, al fine di avere informazioni sui contributi energetici che determinano la stabilità delle diverse strutture osservate.

Collaborazioni internazionali in atto

Istituzione: ILL Institut Laue Langevin - IBS Institut Biologie Structurale, Grenoble

Campo di Interesse: Scattering neutronico di membrane

Referente: Giuseppe Zaccai.

Istituzione: BAM, Berlino

Campo di Interesse: Struttura delle Membrane

Referente: Manfred Hentschel

Paese: USA

Istituzione: NIH, National Institutes of Health, Bethesda.

Campo di Interesse: Forze e interazioni tra quadrieliche di guanosine.

Referente: Helmut Strey

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

- Generatore di raggi X Ital-Structures 3.5 kW, equipaggiato con un diffrattometro a doppio cristallo

- Generatore di raggi X Philips 3.5 kW, con multirivelatore curvo INEL CPS120;

- Generatore di raggi X Philips 3.5 kW, equipaggiato con camera di Guinier.

- Generatore ad anodo rotante Rigaku RU300, equipaggiato con diffrattometro per polveri e due camere pin-hole per diffusione a piccoli angoli.

- Vasca per deposizione di film Langmuir- Blodgett e acquisizione delle curve isoterme: strumento LB-MDT-4000 prodotto da MDT corporation (Mosca)

- Microcalorimetro Perkin Elmer DSC 7;

Parole Chiave

Biomolecole, struttura, raggi X, autoassemblaggio, fasi liquido-cristalline

UNITA' DI RICERCA INBB
Bologna

Responsabile Scientifico
Prof. Bruno Samorì

Linea di Ricerca

Immagini e Manipolazione di singole molecole col microscopio a forza atomica (SFM)

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Samorì Bruno PO samorì@alma.unibo.it

Non Aderenti INBB

Zuccheri Giampaolo	BC	giampa@alma.unibo.it
Conti Matteo	DR	conti@alma.unibo.it
Bercia Anna	DR	annabergia@hotmail.com
Bustanji Yasser	DR	yBustanji@yahoo.com
Fiume Laura	DR	fiume@alma.unibo.it
Fuji Nagami	BC	f-nagami@hotmail.com

Sede Unità di Ricerca

Via S.Giacomo, 11 – 40126 Bologna (Italia)

051/2094387

051/2094387

samorì@alma.unibo.it/

Sezione INBB di appartenenza

Bologna

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Il Programma di attività era incentrato sull'utilizzo della tecnica SFM sulle seguenti quattro linee di ricerca:

- 1) Lo studio della struttura, assemblaggio e condensazione delle fibre di cromatina.
- 2) Lo sviluppo di un metodo di indagine delle fluttuazioni conformazionali e delle proprietà meccaniche locali di singole catene di DNA in funzione della loro sequenza.
- 3) La formazione e lo studio strutturale di complessi nucleo proteici pilotati da meccanismi di riconoscimento "indiretto".
- 4) Esperimenti di nanomanipolazione di singole molecole

Risultati ottenuti

1) I risultati di questo studio condotto in collaborazione con il laboratorio del Prof. Bustamante (Berkeley, CA) sono stati presentati all'interno di una review sulla osservazione della cromatina con la microscopia SFM.[1]

Questa linea di ricerca non è al momento più attiva.

2) Abbiamo sviluppato un metodo che ci permette di modulare i tempi di scala dei riarrangiamenti conformazionali di singole molecole di DNA superavvolto, ad osservarli in "tempo-reale" su una singola molecola. Questo ci ha permesso non solo di dimostrare l'esistenza ma anche di ottenere immagini delle fluttuazioni locali delle tensioni torsionali nelle molecole superavvolte. [2,3,4]

È stata studiata la struttura del genoma del virus B19 osservando in-situ una singola molecola di genoma dopo aperture con una proteasi un singolo virione.[5]

Abbiamo studiato gli effetti strutturali dell'interazione del DNA con policoni veicolanti mediante esperimenti di SFM. [6]

3) Le RIP (ribosome inactivating proteins) possono depurinare il DNA ed è stato dimostrato che posseggono una certa specificità di natura cinetica per i siti della loro azione enzimatica. Sono stati condotti studi sulla specificità di sequenza nella loro azione utilizzando come substrati gli stessi DNA palindromici sopra menzionati. Questo ci ha permesso di correlare i siti di legame con le proprietà meccaniche locali del DNA legate alle sequenze. [7]

4) Questa nuova linea di ricerca è incentrata sull'utilizzo dell'SFM come sensore di forza in grado di misurare interazioni fra singole molecole e la forza di singoli legami. Abbiamo applicato questo approccio allo studio del legame utilizzato nella cromatografia di affinità per isolare proteine ricombinanti in cui è stata ingegnerizzata una coda istidinica. [8] Su questo nuovo approccio alla manipolazione di singole molecole è in corso di pubblicazione un articolo della serie Concepts richiesto da Chem. Eur. J.[9]

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000

- 1) Visualization and analysis of Chromatin by Scanning Force Microscopy Methods (1997) (A Companion to Methods in Enzymology), 12, 73-83.
- 2) Zuccheri G., Thei Dame R., Aquila M., Muzzalupo I., Samori B. Conformational fluctuations of supercoiled DNA molecules observed in real time with a scanning force microscope (1998) Applied Physics A 66, S585-S589
- 3) Samori B. (1998) Stretching, tearing and dissecting single molecules of DNA Angew. Chem. Int. Ed. Engl 37, 2198-2200
- 4) Zuccheri, G., Scipioni, A., Cavaliere, V., Gargiulo, G. De Santis, P., and Samori, B. Mapping the intrinsic curvature and the flexibility along the DNA chain. In pubblicazione.
- 5) Zuccheri, G., Bergia, A. Gallinella, G. Musiani, and M. Samori, B. Scanning force microscopy study on a single-stranded DNA: the genome of Parvovirus B19. In corso di stampa su ChemBioChem.
- 6) Laus, M., Sparnacci, K., Angeloni, A. S., Ensoli, B., Buttò, S., Caputo, a., Mantovani, I., Zuccheri, G., Samorì, B. and Tondelli L. Complex associates of plasmid DNA and a novel class of block copolymers with poly(ethylene glycol) and cationic segments as new vectors for gene delivery. In corso di stampa su Journal of Biomaterial Science
- 7) Barbieri, L., Valbonesi, P., Righi, F., Zuccheri, G., Monti, F., Gorini, P., Samori, B. and Stirpe, F. Polynucleotide:adenosine glycosidase is the sole activity of ribosome-inactivating proteins on DNA. In corso di stampa su Journal of Biochemistry.
- 8) Conti M., Falini G., Samori B. (2000) How Strong is the Coordination Bond between a His-tag and Ni-NTA? An Experiment of Mechanochemistry on Single Molecules. Angew. Chem. Int. Ed. Engl 39, 215-218
- 9) B. Samori (2000) Stretching Single Molecules along unbinding and unfolding pathways with the Scanning Force Microscope Chem. Eur. J. (in pubblicazione)

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Studi sulle proprietà meccaniche locali del DNA e suo ruolo nel riconoscimento DNA-proteine ed interazioni proteina-batteri, proteina-proteina.

Collaborazioni internazionali in atto

Prof. Gouliang Yang, Department of Physics, Drexel University Philadelphia (PA 19104).

Prof. Pier Paolo Pandolfi, Department of human genetics, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York (NY 10021).

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

1 microscopio SFM NanoScope IIIa della DI (Santa Barbara)

1 microscopio SFM NanoScope IIIa della DI (Santa Barbara) da noi modificato per nanomanipolazione

Parole Chiave

Microscopia SFM, DNA, Proteine, Nanomanipolazioni, Singole Molecole

UNITA' DI RICERCA INBB
Catania

Responsabile scientifico
Prof. Salvatore Sapienza

Linea di ricerca

Plasticità nel sistema nervoso centrale

Titolo

Effetti della stimolazione magnetica transcranica sul periodo silente muscolare dopo temporanea deafferentazione periferica, nell'uomo

Composizione del gruppo

Aderenti INBB

Sapienza Salvatore	PO	totisap@mbox.unict.it
Giuffrida Rosario	PO	giuffros@mbox.unict.it

Non aderenti INBB

Palmeri Agostino	RU	apalmeri@mbox.unict.it
Bellomo Maria	RU	

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Scienze Fisiologiche- Università di Catania Viale A. Doria, 6 - 95125 Catania
tel.: 095/336860 fax: 095/330645 e-mail: totisap@mbox.unict.it

Sezione INBB di appartenenza

Catania

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

La ricerca si è incentrata su due differenti linee:

- 1) Il primo studio si inserisce in un vasto piano di ricerca inteso a verificare l'azione integrativa di proiezioni discendenti dalla corteccia cerebrale, ovvero da formazioni nervose tronco-encefaliche, su strutture sottosegmentali sensitive e motorie. Dopo aver messo in luce il ruolo modulatore della corteccia motrice sull'attività manipolativa, si è voluto estendere l'indagine alle influenze discendenti che il sistema noradrenergico bulbare esercita sull'eccitabilità dei motoneuroni spinali. In particolare, ci si è proposti di studiare i meccanismi funzionali tramite i quali le fluttuazioni dell'attività del *locus coeruleus* sono in grado di modulare la riflessività del midollo spinale e del *brainstem*.
- 2) La seconda indagine ha riguardato le modificazioni reversibili che si verificano nella corteccia motrice primaria dell'uomo in seguito a deafferentazione transitoria dalle informazioni periferiche. In particolare, sono state studiate le variazioni del periodo silente, che rappresenta una pausa nell'attività elettromiografica dopo stimolazione magnetica transcranica nel corso di contrazione muscolare volontaria. Poiché è stato ampiamente accertato che il periodo silente, almeno nella sua componente più tardiva, ha una genesi corticale, uno studio accurato della latenza e della durata di tale periodo, in mancanza dei normali input sensoriali dovrebbe meglio chiarire i meccanismi di integrazione sensitivo-motoria al livello della corteccia cerebrale.

Risultati ottenuti

- 1) I dati ottenuti hanno dimostrato che anche nell'uomo, come già osservato nell'animale, il sistema noradrenergico esercita una potente azione modulatrice sia al livello dell'*output* spinale sia al livello dei circuiti riflessi che si estrinsecano nel *brainstem*. L'ulteriore approfondimento di tali conoscenze potrebbe trovare utile riscontro applicativo nel trattamento di disordini motori, sia centrali che periferici.
- 2) E' stato trovato che la durata del periodo silente nei muscoli prossimali rispetto al blocco sensoriale transitorio risultava accorciata in confronto a quella nei muscoli omologhi controlaterali, ritornando tale durata ai valori di controllo subito dopo la rimozione del blocco. Questo risultato da un alto conferma dati precedenti che hanno dimostrato come la rimozione di afferenze sensoriali incrementi l'eccitabilità corticale, dall'altro indica che l'accorciamento della durata del periodo silente potrebbe essere conseguente ad una disinibizione delle aree motrici corticali.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000

- 1) Aicardi G., Giuffrida R., Sapienza S., Canedi A., Rapisarda C. - *J. Biol. Res.*, 1997, 73: 101-106.
- 2) Palmeri A., Bellomo M., Giuffrida R., Raffaele R., Sapienza S. - *Boll. Acc. Gioenia Sci. nat.*, 1997, Vol. 30, 353: 299-311.
- 3) Catania M.V., Bellomo M., Giuffrida Raff., Giuffrida Ros., Giuffrida Stella A.M., Albanese V. - *Eur. J. Neurosci.*, 1998, 10: 3479-3490.
- 4) Bellomo M., Giuffrida R., Palmeri A., Sapienza S. - *Arch. It. Biol.*, 1998, 136: 215-223.
- 5) Ghezzi P., Bernardini R., Giuffrida R., Bellomo M., Manzoni C., Comoletti D., Di Santo E., Benigni F., Mennini T. - *Europ. Cytokine Netw.*, 1998, 9: 139-144.
- 6) Palmeri A., Bellomo M., Giuffrida R., Sapienza S. - *Neuroscience*, 1999, 88 (1): 135-150.
- 7) Giuffrida R., Malatino L.S., Bellomo M., Sapienza S. - *Int. J. Dev. Neurosci.*, 1999, 17: 99-107.
- 8) Palmeri A., Sapienza S., Giuffrida R., Bellomo M., Rampello L., Vecchio I., Raffaele R. - *NeuroReport*, 1999, 10 (6): 1225-1229.
- 9) Palmeri A., Restivo D.A., Casabona A. - *Brain Res.*, 2000, 867 (1-2): 210-216.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Il piano di ricerca per i prossimi anni prevede la prosecuzione delle linee già intraprese sia nell'animale che nell'uomo, con particolare riguardo all'approfondimento dei meccanismi corticali e sottocorticali che sottendono alla funzione motoria.

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

- Elettromiografo Cadwell Excel Plus
- Sistema acquisizione segnali bioelettrici
- Apparato stereotassico D.K.I.
- Sistema elaborazione delle immagini

Parole chiave

neurofisiologia - plasticità sistema nervoso - stimolazione magnetica transcranica - deafferentazione periferica

UNITA' DI RICERCA INBB
Trento

Responsabile Scientifico
Prof.ssa Scarpa Marina

Linea di Ricerca

Biomolecole

titolo

Specie reattive nelle cellule. Processi patologici e di invecchiamento.

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Scarpa Marina	PA	scarpa@science.unitn.it
D'Amato Elvira	PT	damato@science.unitn.it

Non Aderenti INBB

Lunelli Lorenzo	A	lunelli@science.unitn.it
Mattivi Fulvio	A	mattivi@ismaa.it

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Fisica - Università di Trento- Via Sommarie 14 38050 Povo-Trento

0461.882029

0461.881696

scarpa@science.unitn.it

Sezione INBB di appartenenza

Padova

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Radicali liberi e specie reattive dell'ossigeno molecolare sono coinvolti in numerosi processi patologici, processi che possono essere rallentati o inibiti da alcune categorie di molecole ad azione antiossidante.

Studi recenti hanno dimostrato che alcuni alimenti possiedono quantità rilevanti di composti di varia natura che appartengono alla categoria dei polifenoli. Di questi alimenti fanno parte la piccola frutta (mirtillo, fragola ciliegia, lampone, mora, etc), il vino rosso ed alcuni tipi di infusi vegetali. Studi epidemiologici insieme ad esperimenti su cellule, modelli animali e anche sull'uomo, hanno indicato che la presenza di tali composti produce effetti talvolta molto rilevanti sui processi quali l'invecchiamento probabilmente grazie alle loro caratteristiche antiossidanti. Un esame della letteratura prodotta negli ultimi anni mostra che sono ora disponibili molte informazioni sugli effetti protettivi e terapeutici di composti polifenolici naturali. Sono però quasi totalmente assenti studi di base mirati a comprendere il meccanismo di questi composti *in vitro* e *in vivo*.

In nostro gruppo di ricerca si pone l'obiettivo di studiare l'azione di alcuni antiossidanti di origine naturale, in sistemi modello, con particolare riferimento alla rimozione delle specie reattive dell'ossigeno formate durante lo stress ossidativo e alla inibizione dell'ossidazione di substrati organici (ad esempio l'acido linoleico). Nel contempo si continueranno le ricerche riguardanti lo studio dei meccanismi molecolari, che si sono rivelati essere molto complessi, che sono alla base dell'attività antiossidante di alcuni composti a basso peso molecolare ed enzimatici. In particolare, per individuare alcuni degli steps dei meccanismi molecolari, verranno eseguiti studi di tipo cinetico. Infine ci si propone di individuare e quantificare la formazione di intermedi transienti (radicali liberi) derivati dagli antiossidanti (mediante Risonanza di Spin Elettronico).

Risultati ottenuti

Sono stati sviluppati e messi a punto metodi elettrochimici e metodi basati sull'impiego delle risonanze magnetiche (nucleare ed elettronica) per la misura *in vitro* e, potenzialmente anche *in vivo*, delle specie reattive dell'ossigeno molecolare. In particolare è stato recentemente messo a punto un metodo di riferimento capace di caratterizzare la capacità antiossidante di composti puri e di matrici complesse quali gli alimenti (vini, frutta, etc.). L'affidabilità e accuratezza di questo metodo ha permesso di eseguire uno studio cinetico che ha messo in luce alcuni aspetti fino ad ora sconosciuti dell'azione degli antiossidanti.

Sono stati proseguiti studi mirati a chiarire alcuni aspetti molecolari di patologie connesse con la degenerazione cerebrale e l'invecchiamento.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000

Galzigna, L., Schiappelli, M. P., Scarpa, M., & Rigo, A. (1997) A peroxidase-catalyzed sulfoxidation of promethazine. *Free Rad. Res.* 27, 501 - 504.

Galzigna, L., Schiappelli, M. P., Rigo, A., & Scarpa, M. (1999) A rat brain fraction and different purified peroxidases catalyzing the formation of dopaminochrome from dopamine *Biochim. Biophys. Acta* 1427, 329-336.

Corazza, A., Vianello, F., Zennaro, L., Gourova, N., Di Paolo, M. L., Signor, L., Marin, O., Rigo, A. & Scarpa, M. (1999) Enzyme mimics complexing Cu(II) ion: structure-function relationship *J. Peptide Res.* 54, 491-504.

Rigo, A., Vianello, F., Clementi, G., Rossetto, M., Scarpa, M., Vrhovsek, U. & Mattivi, F. (2000) Contribution of proanthocyanidins to the peroxy radical scavenging capacity of some Italian red wines. *J. Agric. Food. Chem.* 48, 1996-2002.

Rigo, A., Vianello, F., Clementi, G., Rossetto, M., Scarpa, M., Vrhovsek, U. & Mattivi, F. (2000) The peroxy radical scavenging capacity of some Italian red wines. *Bio-flavonoids & Polyphenols in Health & Disease*, Dinard (France)

De Iuliis, A., Zanatta, L., De Santo, C., Ferrari, J., Scarpa, M., Rigo, A. & Galzigna, L. (2000) Brain dopamine peroxidase and Parkinson's disease. *Basic and Clinical Enzymology 2000*, May 2000, p. 103.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Sono attualmente in corso alcuni esperimenti per acquisire ulteriori informazioni sui meccanismi molecolari che sono alla base dell'attività antiossidante.

Un aspetto che si intende esplorare riguarda l'influenza della ripartizione degli antiossidanti a natura polifenolica tra le fasi (acquosa, lipidica) sull'inibizione dei fenomeni perossidativi. Il sistema sperimentale da noi attualmente utilizzato per misurare la capacità antiossidante è infatti eterogeneo e non è completamente chiarito in quale fase avvengono i singoli fenomeni molecolari e come la diffusione tra le fasi influisca sui processi osservati.

Si proseguiranno inoltre gli studi finalizzati alla misura di produzione specie reattive dell'ossigeno molecolare in sistemi cellulari ed in vivo, estendendo questi studi anche a casi patologici.

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Strumentazione elettrochimica, Spettrofotometri, ESR Bruker

Parole Chiave

Antiossidanti, Enzimi antiossidanti, Radicali, Superossido

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Uno dei principali obiettivi della ricerca sarà lo studio della regolazione dell'attività transacetilasi (TA). Dai dati da noi ottenuti mediante l'impiego di inibitori di proteine chinasi e di proteine fosfatasi su cellule endoteliali intatte in coltura, è stato ipotizzato che questo enzima è attivato con un meccanismo di fosforilazione. Inoltre, da esperimenti eseguiti con analoghi recettoriali dell'ATP è emerso che l'attivazione della TA è mediata dal recettore purinergico P2u/P2Y2 la cui azione è mediata da proteine G di membrana. I P2Y purinocettori sono stati caratterizzati nelle cellule endoteliali solo con approcci di tipo farmacologico basato sul profilo di attività di analoghi dell'ATP. Tuttavia, diversi recettori P2Y e P2X presenti in cellule endoteliali sono stati attualmente identificati e clonati. Al fine di determinare se solo P2u/P2Y2 o altri membri del gruppo recettoriale P2Y sono coinvolti nell'attivazione della TA mediata da ATP, come primo approccio, intendiamo utilizzare la tecnica della trasfezione transiente con vari cDNA senso e antisense tio-oligonucleotidi. Gli esperimenti di trasfezione transiente, in presenza di lipofectamina, veicolo per la trasfezione, saranno eseguiti su colture di cellule endoteliali con tio-oligonucleotidi senso e antisense di sequenza specifica per i recettori P2Y. Dopo la trasfezione l'attività TA verrà determinata. In alternativa, isoleremo l'RNA totale dalle cellule endoteliali trattate e non trattate e eseguiremo una Reverse Polimerase Chain Reaction (RT-PCR) con primers specifici dei recettori P2Y. I prodotti della RT-PCR saranno analizzati con elettroforesi su gel di agarosio in presenza di bromuro di etidio.

Come è noto, i recettori la cui azione è accoppiata alle proteine G-di membrana, rappresentano il maggiore gruppo di proteine di membrana coinvolte nella trasduzione del segnale che comprende l'attivazione di classici effettori quali l'adenilato ciclasi, le fosfodiesterasi, le fosfolipasi, così come l'attivazione di diverse proteine chinasi. In particolare, le principali vie di trasduzione del segnale che portano all'espressione e alla regolazione di geni vedono coinvolte le MAP chinasi ERK1-ERK2, p38, ERK5. Allo scopo di verificare quale di queste vie regola l'attivazione della TA, intendiamo eseguire esperimenti con inibitori delle MAP chinasi ERK1-ERK2 e p38 (rispettivamente, PD98059, SB203580) commercialmente disponibili, pretrattando le cellule endoteliali intatte prima della stimolazione con ATP. Come primo approccio sperimentale, pertanto, le cellule endoteliali in coltura verranno trattate con gli inibitori delle proteine chinasi e successivamente stimolate con ATP. Successivamente, le cellule verranno rimosse dalla piastra di coltura mediante scraping e verranno preparati omogenati cellulari sui quali verrà eseguito il saggio di attività enzimatica. Successivamente all'identificazione della specifica MAP chinasi coinvolta nell'attivazione della TA sarà possibile progettare esperimenti più mirati a identificare la via di trasduzione del segnale a monte e a valle di essa. Gli esperimenti di fosforilazione saranno condotti usando la tecnica dell'elettroforesi bidimensionale su gel che permette anche la determinazione del numero di siti di fosforilazione. Questa tecnica è basata su una duplice separazione elettroforetica: la prima per elettrofocusing e la seconda per SDS-PAGE. La mappa proteica bidimensionale così ottenuta verrà rivelata con tecniche immunoenzimatiche dopo Western Blot con anticorpi anti-TA, già in nostro possesso, e potrà in tal modo essere determinato il numero di siti di fosforilazione. Intendiamo inoltre approfondire lo studio della regolazione delle tre attività enzimatiche che la TA possiede (cioè TA_L, TA_S, AH). Nostri dati preliminari indicano infatti che nelle cellule stimolate queste tre attività sono diversamente regolate nell'enzima da membrana e in quello citosolico. Inoltre, sarà eseguita la caratterizzazione cinetica delle tre attività enzimatiche. Gli esperimenti finora descritti saranno condotti su cellule endoteliali da aorta polmonare bovina, commercialmente disponibili. Tuttavia, è di notevole interesse verificare se la via di trasduzione del segnale che regola l'attività transacetilasi ha le stesse caratteristiche in cellule endoteliali umane. A tale scopo prepareremo linee primarie di cellule endoteliali umane da cordone ombelicale e stabiliremo, preliminarmente agli esperimenti sopra descritti, se la TA è coinvolta anche in queste cellule nella sintesi di PAF e acil-PAF.

Collaborazioni internazionali in atto

È in atto una forma di collaborazione stabile e continuativa con il gruppo di ricerca della Basic and Applied Research Unit della Oak Ridge Associated Universities, Oak Ridge, TN, USA, gruppo nel quale vengono condotte ricerche analoghe. Il coinvolgimento di questo gruppo è di notevole importanza nelle diverse fasi di preparazione, realizzazione e valutazione della parte sperimentale.

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

- HPLC biocompatibile
- Elettroforesi Capillare
- Sistema di acquisizione di immagini in luce trasmessa, riflessa, fluorescenza e chemiluminescenza
- Apparecchiatura per gel elettroforesi bidimensionale e software di riconoscimento e quantizzazione
- Spettrofotofluorimetro
- Microscopio a fluorescenza con sistema di acquisizione di immagini con telecamera

Parole Chiave

Transacetilasi, PAF, Fattore di Attivazione Piastrinico, acil-PAF

UNITA' DI RICERCA INBB
Genova

Responsabile Scientifico
Prof.ssa Sparatore Bianca

Linea di Ricerca

Caratterizzazione di nuovi modulatori del differenziamento cellulare

titolo

Ruolo della proteina HMG1 extracellulare e della PKC teta nel differenziamento di cellule murine ed umane

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Sparatore Bianca	PO	traspar@unige.it
Patrone Mauro	PA	patrone@mfnpmn.it
Passalacqua Mario	RU	traspar@unige.it

Non Aderenti INBB

Pedrazzi Marco	DR	traspar@unige.it
----------------	----	------------------

Sede Unità di Ricerca

Università degli Studi di Genova-Dipartimento di Medicina Sperimentale-Sezione di Biochimica - Viale Benedetto XV, 1-16132 Genova

0103538151	010354415	Traspar@unige.it
------------	-----------	------------------

Sezione INBB di appartenenza

Genova

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Due principali obiettivi da raggiungere in questo triennio riguardavano 1) la caratterizzazione dei meccanismi molecolari con cui la proteina HMG1 extracellulare promuove la risposta differenziativa di cellule neoplastiche che crescono aderenti alla matrice o in sospensione. I modelli cellulari utilizzati sono proprio alcuni di quelli già stati identificati in grado di rilasciare HMG1 nel mezzo esterno in seguito a stimoli di induttori chimici. In particolare abbiamo utilizzato soprattutto cellule eritroleucemiche di topo (cellule MEL) e la linea di neuroblastoma umano LAN-5. 2) il coinvolgimento di altre isoforme della PKC nel processo differenziativo delle cellule MEL. Infatti precedenti studi avevano dimostrato che isoforme classiche e nuove della famiglia delle PKC giocavano funzioni differenti nel processo multifasico del differenziamento indotto da esametilenebisacetammide (HMBA).

Risultati ottenuti

Le cellule MEL indotte con HMBA, accumulano proteina HMG1 nel mezzo esterno e la legano alla plasmamembrana durante la fase del commitment. Ciò è indispensabile per il differenziamento eritroide: bloccando l'interazione HMG1-cellula si ha resistenza all'induzione. Anche astrociti di tipo 1 da ratti neonati, stimolati con vari agonisti, esportano HMG1 nel mezzo esterno. HMG1 extracellulare è inoltre uno stimolo potente per il differenziamento di cellule di origine nervosa. In una linea di neuroblastoma umano essa è attiva nel promuovere la formazione dei prolungamenti neuritici. I dati ottenuti sulle funzioni della PKC teta hanno dimostrato che la cinasi è specificamente localizzata sui cinetocori e centrosomi di cellule mitotiche, in forma attiva e trova substrati proteici bersaglio. Al contrario la sua espressione è repressa in cellule MEL non proliferanti, indicando la sua partecipazione alla regolazione del ciclo cellulare. In cellule PC12 la PKC teta ha una funzione nel processo di acquisizione della morfologia neuronale. La associazione della cinasi al citoscheletro di actina, mediata da una aumentata espressione e da una modificazione post-traduzionale dell'enzima, promuove il differenziamento neuronale di questa linea. Anche nelle cellule LAN-5 la stessa cinasi interviene nel differenziamento indotto da acido retinoico. Il ruolo essenziale della PKC teta è stato provato mediante la realizzazione di un fenotipo cellulare a basso contenuto dell'enzima che non è in grado di rispondere all'induttore con l'emissione di prolungamenti neuritici.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000

1. Secretion and binding of HMG1 protein to the external surface of the membrane are required for murine erythroleukemia cell differentiation
M. Passalacqua, A. Zicca, B. Sparatore, M. Patrone, E. Melloni, S. Pontremoli. (1997) FEBS Lett. 400,275-279.
2. Stimulated astrocytes release high-mobility group 1 protein, an inducer of LAN-5 neuroblastoma cell differentiation
M. Passalacqua, M. Patrone, G.B. Picotto, M. Del Rio, B. Sparatore, E. Melloni, S. Pontremoli (1998) Neurosci. 82, 1021-1028.
3. Protein kinase C-theta is specifically localized on centrosomes and kinetochores in mitotic cells. M. Passalacqua, , M. Patrone, B. Sparatore, E. Melloni, S. Pontremoli. (1999) Biochem. J. 337, 113-118.
4. Protein kinase C-theta is specifically activated in murine erythroleukemia cells during mitosis. M. Passalacqua, , M. Patrone, B. Sparatore, M. Pedrazzi, E. Melloni, S. Pontremoli. (1999) FEBS Lett. 453, 249-253.
5. Neuronal differentiation of PC12 cells involves changes in protein kinase C-theta distribution and molecular properties. B. Sparatore, Patrone, M. Passalacqua, M. Pedrazzi, S. Pontremoli., E. Melloni (2000) Biochem. Biophys. Res. Commun. 275, 149-153.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

I progetti di ricerca prossimi sono volti a valutare se il recettore per HMG1 sulle cellule MEL sia identificabile con l'unica molecola recettoriale fino ad ora indicata quale sito di legame per HMG1 su diversi tipi cellulari e definita recettore per i prodotti di glicazione avanzata (RAGE). Per ottenere queste informazioni verranno utilizzati anticorpi messi a punto da ricercatori che collaborano a queste ricerche e che forniranno anche plasmidi contenenti la sequenza del RAGE nativo o mancante del dominio citoplasmatico e quindi inefficace per la trasduzione del segnale.

Collaborazioni internazionali in atto

Prof. David Stern (Columbia University-New York); Prof. R.A. Rifkind (Sloan Kettering Memorial-New York)

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Microscopio confocale; Sequenziatore proteine; Sequenziatore DNA; Storage phosphor system; sistemi FPLC e HPLC

Parole Chiave

Differenziamento cellulare; proteina cinasi C teta; proteina HMG1; cellule eritroleucemiche; cellule di neuroblastoma umano.

- and Molecular Modelling*" Italian J. Biochemistry 1997, 46 (Suppl. 1), 143-147
- 6) Hirata I.Y., Cezari M.H.S., Boschov P., Garratt R.C., Ito A.S., Spisni A., Franzoni L. and Juliano L. "Reduction of ortho-Aminobenzoyl-proline Fluorescence due to Formation of Pyrrolobenzodiazepine-5,11-dione" 1998, Letters in Peptide Science, 4, 1-10
 - 7) Franzoni L., Nicastro G., Pertinhez T.A., Oliveira E., Nakaie C.R., Paiva A.C.M., Schreier S. and Spisni A. "Structure of two fragments of the Third Cytoplasmic Loop of the Rat Angiotensin II AT_{1A} Receptor: Implications with Respect to Receptor Activation and G-Protein Selection and Coupling" Journal of Biological Chemistry 1999, 274, 227-235
 - 8) Duranti M.A., Franzoni L., Sartor G., Benedetti A., Iwai L.K., Gruber A., Zingales B., Guzman F., Kalil J., Spisni A. and Cunha-Neto E. "Trypanosoma Cruzi: Conformational Preferences of Antigenic Peptides Bearing the Immunodominant Epitope of the B13 Antigen" Exp. Parasitol., 1999, 93, 38-44
 - 9) Abbate F., Franzoni L., Löhr F., Lücke C., Ferrari E., Sorbi R.T., Rüterjans H. and Spisni A. "Letter to the Editor: Complete ¹H, ¹⁵N and ¹³C Assignment of the Recombinant Mouse Major Urinary Protein" J. Biomol. NMR, 1999, 15, 187-188
 - 10) Lücke C., Franzoni L., Abbate F., Löhr F., Ferrari E., Sorbi R.T., Rüterjans H. and Spisni A. "Solution Structure of a Recombinant Mouse Major Urinary Protein" European J. Biochem, 1999, 266, 1210-1218

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Completare la descrizione delle porzioni citoplasmatiche del recettore della angiotensina II e dello α -adrennergico. Completare la struttura in soluzione della cRBP, determinarne la struttura di alcune tossine presenti in funghi e nel veleno dei serpenti. Clonare ed esprimere mutanti sito specifici della MUP per modularne la funzione biologica

Collaborazioni internazionali in atto

- Prof. Gian Luigi Rossi, Istituto di Scienze Biochimiche, Università di Parma, Parma;
- Prof. Shirley Schreier, Instituto de Química, Departamento de Bioquímica, Universidade de São Paulo,
- Prof. Heinz Rüterjans, Institute of Biophysical Chemistry, J.W. Goethe University, Frankfurt, Germany.

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

- Spettrofotometro per dicroismo circolare Jasco J715
 - NMR Bruker AMX 400
- Sistema di purificazione di proteina Akta Purifier

Parole Chiave

NMR, CD, proteine, struttura, clonare dinamica.

UNITA' DI RICERCA INBB
Venezia

Responsabile Scientifico
Prof. Stevanato Roberto

Linea di Ricerca

Biofisica

titolo

Studio delle interazioni delle ammine alifatiche con sistemi biologici complessi - enzimi e membrane biologiche - e possibili conseguenze nelle loro proprietà.

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Stevanato Roberto PA rstev@unive.it

Non Aderenti INBB

Momo Federico PA momo@unive.it

Fabris Sabrina BC fabris@unive.it

Rovea Manuela PT rovea@unive.it

Zanin Achille PT azanin@unive.it

Sede Unità di Ricerca

Università Cà Foscari di Venezia, Dipartimento di Chimica Fisica - Dorsoduro 2137, 30123

0412578600

0412578594

rstev@unive.it

Sezione INBB di appartenenza

Padova

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Le poliammine sono molecole ubiquitarie di relativamente basso peso molecolare (50-200) costituite da una struttura lineare apolare di atomi di C intercalata da gruppi amminici protonati a pH fisiologico. Molte delle funzioni delle poliammine sembra possano ricondursi alla particolare struttura chimica molecolare che peraltro ne fa un modello interessante per lo studio delle interazioni ioniche ed idrofobiche con strutture sopramolecolari o macromolecole di particolare interesse biologico.

Scopo della ricerca degli ultimi anni è stato lo studio della natura e della forza delle interazioni della spermina (SPM), una importante poliammina biologica, con macromolecole o strutture sopramolecolari di importanza biologica, quali i siti attivi di enzimi preposti alla loro regolazione, liposomi fosfolipidici e membrane biologiche.

Risultati ottenuti

Dal calcolo della costante di formazione K_f del complesso spermina-liposomi fosfolipidici formati da fosfolipidi con cariche differenti nella testa polare, si è verificato che la carica netta superficiale, ovvero il potenziale di membrana, governa le interazioni con la spermina. Mediante tecniche di spin-labeling applicate a liposomi formati da fosfolipidi fosfatidilcolinici e fosfatidilglicerolici multilamellari, è stato messo in evidenza che la spermina forma un complesso con i gruppi fosfato dei fosfolipidi, e induce importanti modificazioni ad alcune funzioni di membrana, quali la permeabilità all'acqua, e agisce come modulatore dei processi di diffusione per molecole cariche e polari.

Interpretando in termini di Michaelis-Menten il trasporto di spermina in mitocondri di fegato, si sono determinati i parametri cinetici del flusso e si sono proposti due possibili modelli per descrivere la localizzazione e la forma delle barriere energetiche che regolano il flusso di spermina attraverso la membrana.

Utilizzando spermina e molecole simili come substrati dell'ammino ossidasi di plasma bovino, si è trovato che le cariche positive in posizione 4 e 9 della molecola di SPM modulano in modo significativo i parametri cinetici della reazione di deaminazione ossidativa, suggerendo la presenza di due corrispondenti basi nel sito attivo nonché il fondamentale ruolo delle interazioni elettrostatiche nel meccanismo catalitico.

Al fine di approfondire quest'ultimo aspetto con ammino ossidasi di origine vegetale, si è messo a punto un nuovo metodo per la purificazione dell'ammino ossidasi di pisello.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000

1. Stevanato, R., Gasparini, R., Di Paolo, M.L., Vianello, F., Rigo, A. *Substrate structure and bovine serum amine oxidase activity*. Ital. J. Biochem. 46/1, 109-112 (1997).
2. Stevanato, R., Wisniewska, A., Momo, F. *Interaction of spermine with Dimyristoyl-L- α -Phosphatidyl-DL-glycerol multilamellar liposomes* Arch. Biochem. Biophys. 346(2), 203-207 (1997).
3. Vianello, F., Malek-Mirzayans, A., Di Paolo, M.L., Stevanato, R., Rigo, A. *Purification and characterization of amino oxidase from pea seedlings*. Protein Expr. Purif. 15(2), 196-201 (1999)
4. Toninello, A., Dalla Via L., Stevanato, R., Yagisawa S. *Kinetics and free energy profiles of spermine transport in liver mitochondria* Biochemistry, 39/2, 324-331 (2000).

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Mono, di e poliammide lineari alifatiche sono biomolecole di particolari caratteristiche chimicofisiche che ne fanno interessanti probe di differenti tipi di interazioni deboli: elettrostatiche; idrofobiche e legami idrogeno. Utilizzando tali molecole a differenti condizioni sperimentali ci si propone di interpretare la natura ed il ruolo svolto dalle distinte interazioni deboli: i) nel riconoscimento e nella formazione del complesso enzima-substrato della reazione di deaminazione ossidativa catalizzata da amminoossidasi diverse; ii) nella formazione di addotti con liposomi a differente composizione fosfolipidica; iii) nei meccanismi di trasporto transmembrana.

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

1. Spettrometro ESR Bruker 200D;
2. Calorimetro Differenziale a scansione Setaram DSC92;
3. Gascromatografo GC17A con rivelatore a selezione di massa QP5000 Shimadzu e pirolizzatore CDS Pyroprobe 1000;
4. Spettrofotometro UV-VIS-NIR Beckman DU 640;
5. Ossigrafo con microelettrodo Microelectrodes e detector microamperometrico Amel 559;
6. Microcalorimetro LKB 2107.

Parole Chiave

interazioni deboli; ammine; liposomi fosfolipidici; meccanismi catalitici, meccanismi di trasporto.

Risultati ottenuti

AQP2. La nostra unità è impegnata nello studio del ruolo della fosforilazione nella attivazione della AQP2 in cellule renali in coltura. Impiegando noti inibitori della protein chinasi A (PKA) abbiamo dimostrato che la attivazione della PKA porta alla fosforilazione della stessa AQP2, segnale importante per attivare la sua traslocazione verso la membrana apicale. Tuttavia abbiamo ottenuto evidenze sperimentali che la fosforilazione della AQP2 non è essenziale nel processo di traslocazione. Infatti, agenti che inibiscono le fosfatasi quali l'acido ocaidaico, alterando lo stato di polimerizzazione del citoscheletro di actina, provocano traslocazione della AQP2 non fosforilata (Valenti et al. J. Cell Sci. 2000). Inoltre abbiamo analizzato il ruolo della AQP2 in patologie caratterizzate da disordini del bilancio idrico. Nel nostro laboratorio abbiamo messo a punto un'analisi semiquantitativa di AQP2 escreta nelle urine dei pazienti esaminati, mediante western blot. Analizzando i dati ottenuti, si è trovata una buona correlazione tra la quantità di AQP2 escreta e severità del disordine (Valenti et al. JASN 2000). Questo tipo di indagine potrebbe rappresentare un utile strumento clinico per la precisa identificazione della eziologia del disordine del bilancio idrico.

AQP4. Abbiamo analizzato l'espressione della AQP4 nel sistema neuro-muscolare del topo mdx che rappresenta il modello animale della Distrofia muscolare di Duchenne (DMD). I risultati da noi ottenuti mostrano una forte riduzione della espressione di questa acquaporina nel muscolo scheletrico e nel cervello e formazione di edema cerebrale, indicando un coinvolgimento della AQP4 nella patogenesi della DMD.

AQP8. Il gene AQP8 di topo è stato clonato, caratterizzato e mappato e poi mutato per essere usato nella generazione di topi transgenici AQP8. Al presente, noi abbiamo generato topi eterozigotici per la mutazione in AQP8. La distribuzione tissutale di AQP8 è stata definita per RT-PCR, Western blot ed immunofluorescenza.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000

1. G. VALENTI, G. PROCINO, M. CARMOSINO, A. FRIGERI, R. MANNUCCI, I. NICOLETTI, M. SVELTO
The phosphatase inhibitor Okadaic Acid induces AQP2 translocation independently from AQP2 phosphorylation in renal collecting duct cells J. Cell. Sci. 133, (Pt11), 1985-1992, 2000
2. A. FRIGERI, G.P. NICCHIA, B. NICO, F. QUONDAMATTEO, R. HERKEN, L. RONCALI, AND M. SVELTO
"Aquaporin-4 deficiency in skeletal muscle and brain of dystrophic mdx-mice". FASEB J., 2000, in press.
3. GP. NICCHIA; A. FRIGERI; GM LIUZZI; MP. SANTACROCE; B. NICO; P. PROCINO; F. QUONDAMATTEO; HERKEN R; L. RONCALI; M. SVELTO "Aquaporin-4 containing astrocytes sustain a temperature and mercury-insensitive swelling in vitro". Glia, 2000, 31:29-38.
4. G. VALENTI; G. PROCINO; M. CARMOSINO; A. FRIGERI, R. MANNUCCI, I. NICOLETTI AND M. SVELTO. "The phosphatase inhibitor okadaic acid induces AQP2 translocation independently from AQP2 phosphorylation in renal collecting duct cells. Journal of Cell Science., 2000, 113:1985-1982.
5. G. VALENTI, A. LAERA, G. PACE, G. ACETO, M. L. LOSPALLUTI, R. PENZA, F. P. SELVAGGI, M. L. CHIOZZA, M. SVELTO Role of aquaporin 2 in the osmoregulatory function of the kidney in enuretic children J Am Soc Nephrol. Oct;11(10):1873-1881, 2000
6. G. CALAMITA, C. SPALLUTO, A. MAZZONE, M. ROCCHI AND M. SVELTO. Cloning, structural organization and chromosomal localization of the mouse *Aquaporin-8* water channel gene. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 85: 237-241, 1999.
7. G. VALENTI, G. PROCINO, U. LIBENHOFF, A. FRIGERI, P.A. BENEDETTI, G. ANHERT-HILGER, B. NURNBERG, M. SVELTO, AND W. ROSENTHAL " A heterotrimeric G-protein of the Gi family is required for cAMP-triggered trafficking of AQP2 in kidney epithelial cells'.
J. Biol. Chem., 273, (35), 22627-22634, 1998
8. A. FRIGERI, G.P. NICCHIA, J.M. VERBAVATZ, G.VALENTI, AND M. SVELTO "Expression of Aquaporin-4 in Fast-Twitch Fibers of Mammalian Skeletal Muscle"
J. Clin. Invest.,102, 1-9, 1998
9. A. FRIGERI; GP. NICCHIA; JM. VERBAVATZ; G. VALENTI; M. SVELTO "Expression of aquaporin-4 in fast-twitch fibers of mammalian skeletal muscle". Journal of Clinical Investigation,1998 Aug 15;102(4):695-703.
10. G. VALENTI; G. PROCINO; U. LIEBENHOFF; A. FRIGERI; PA. BENEDETTI; G. ANHERT-HILGER; B. NURNBERG; M. SVELTO; W. ROSENTHAL. "A heterotrimeric G protein of the Gi family is required for cAMP-triggered trafficking of aquaporin 2 in kidney epithelial cells". Journal of Biological Chemistry ,1998 Aug 28;273(35):22627-22634.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

AQP2. E' stato riportato che alcune forme di diabete insipido nefrogenico sono causate da mutazioni della AQP2. Ci proponiamo di trasfettare cellule renali di dotto collettore con la AQP2 mutata in questi particolari siti. Lo scopo e' quello di analizzare se la AQP2 mutata e' disturbata nel suo traffico intracellulare e in quali compartimenti subcellulari viene ritardata. Per analizzare i segnali intracellulari che regolano la traslocazione della AQP2 ci proponiamo di studiare l'effetto di alcune tossine clostridiali quali la tossina della pertosse e la tossina tetanica sulla traslocazione della AQP2 nel nostro modello cellulare. L'effetto del pretrattamento con varie tossine su parametri di permeabilita' idrica verra' analizzato mediante tecnica microfluorimetrica,

AQP4 Ci proponiamo di analizzare l'espressione della AQP4 nelle biopsie umane di muscolo di pazienti affetti da DMD e altre forme di distrofia muscolare. Questi esperimenti ci permetteranno di chiarire quale ruolo ha l'AQP4 nella distrofia muscolare.

Noi intendiamo completare la generazione di topi transgenici AQP8 e di caratterizzare il loro fenotipo allo scopo di definire i ruoli fisiologici di AQP8. Previa trasfezione di AQP8 in cellule di adenocarcinoma di colon, noi intendiamo studiare la regolazione di AQP8 sia a livello genico che di proteina.

AQP8 Noi ci proponiamo di generare topi transgenici AQP8 dalla cui caratterizzazione fenotipica definire i ruoli fisiologici esercitati dalla acquaporina -8. Ci proponiamo anche di caratterizzare biochimicamente la proteina AQP8 e di definire la sua distribuzione tissutale e localizzazione subcellulare nonch  la sua regolazione.

Collaborazioni internazionali in atto

Prof. Rainer Herken, Zentrum Anatomie, Abteilung Histologie, Universitaet Goettingen, D-37075 Goettingen, Germany.

Prof. Peter Agre, Dept. Of Biological Chemistry, School of Medicine, Johns Hopkins University, Baltimora, USA.

Pof. Walter Rosenthal, Istituto di Farmacologia Molecolare, Berlino (Germania)

Principali attrezzature di cui dispone l'Unit  di Ricerca

Camera per colture cellulari completa

Microscopio a fluorescenza

Apparato per elettroforesi ed Immunoblot

Attrezzatura di base per biologia molecolare

Apparato microfluorimetrico per misure di trasporto d'acqua

Centrifughe e Ultracentrifughe

Parole Chiave

Acquaporine; rene; muscolo; cervello; apparato gastroenterico

UNITA' DI RICERCA INBB
Milano

Responsabile Scientifico
Dott. Sergio Todde

Linea di Ricerca

Radiochimica

titolo

Sintesi di radiotraccianti marcati con emettitori di positroni (Carbonio-11 e Fluoro-18)

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Fazio Ferruccio	PO	fazio@mednuc.hsr.it
Gilardi Maria Carla	PA	chicca@mednuc.hsr.it
Todde Sergio	RU	sergiot@mednuc.hsr.it
Messa Cristina	RU	cmessa@mednuc.hsr.it
Moresco Rosa Maria	PT	rosam@mednuc.hsr.it
Gilardi Maria Carla	PA	chicca@mednuc.hsr.it

Non Aderenti INBB

Matarrese Mario	A	mariom@mednuc.hsr.it
Caprinelli Assunta	A	assuntac@mednuc.hsr.it
Perugini Franco	A	francop@mednuc.hsr.it
Sudati Francesco	PT	francos@mednuc.hsr.it
Vaghi Mauro	PT	murov@mednuc.hsr.it

Sede Unità di Ricerca

Servizio di Medicina Nucleare, Istituto Scientifico H San Raffaele, Università di Milano-Bicocca, CNR-INB - Edificio LITA, Via Fratelli Cervi, 93 Segrate
02-2643-2716 02-26415202 fazio@mednuc.hsr.it

Sezione INBB di appartenenza

Milano

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

L'attività di ricerca ha riguardato la sintesi di precursori, degli standard e la marcatura con carbonio-11 e Fluoro-18 di radiotraccianti potenzialmente utilizzabili con la PET per lo studio dei sistemi di neurotrasmissione coinvolti nelle patologie psichiatriche, cardiache e per la diagnosi clinica in campo oncologico. In particolare la ricerca era indirizzata alla radiosintesi di radiotraccianti per lo studio delle funzioni serotoninergiche, dopaminergiche e adrenergiche e gabaergiche.

Risultati ottenuti

- 1) Sono stati sintetizzati ed anche utilizzati nell'uomo i seguenti radiotraccianti :
[¹⁸F]FESP, Antagonista dei recettori D₂ della dopamina e 5-HT₂ della serotonina
[¹⁵O]H₂O, Flusso cerebrale e miocardico
[¹⁵O]BUTANOLO, Flusso cerebrale
[¹¹C]m-idrossi EFEDRINA, Agonista adrenergico
[¹²³I]□-CIT, Inibitore di reuptake della dopamina e della serotonina
[¹¹C]FLUMAZENIL, Antagonista dei recettori delle benzodiazepine
[¹⁸F]FLUOROESTRADIOLO, Recettori degli estrogeni
[¹¹C]RACLOPRIDE, Antagonista dei recettori D₂ della dopamina
[¹¹C]FE-D-CIT, Inibitore di reuptake della dopamina
[¹¹C]SCH-23390, Antagonista dei recettori D₁ della dopamina
[¹¹C]CARAZOLOLO, Antagonista dei recettori □₁/□₂ adrenergici
[¹¹C]MCN, Inibitore di reuptake della serotonina
[¹¹C]MDL-100907, antagonista dei recettori 5-HT_{2A} della serotonina
- 2) Sono stati sintetizzati e valutati nell'animale da laboratorio i seguenti radiotraccianti:
[¹¹C]FLUVOXAMINA, Inibitore di reuptake della serotonina
[¹¹C]CGP62349, GABA_B antagonista
[¹¹C]ISOVALEROIL-CARNITINA Metabolismo cerebrale
[¹¹C]PNU-167760, Antagonista dei recettori 5-HT_{1A} della serotonina

[¹¹C]BISOPROLOLO, Antagonista α_1 adrenergico.
 [¹¹C]ICI-118551, Antagonista α_2 adrenergico.
 [¹¹C]CLOMIPRAMINA, Antidepressivo tricyclico
 [¹¹C]OLANZAPINA, Antipsicotico atipico
 [¹¹C]SB-235753, Antagonista dei recettori D₄ della dopamina
 [¹¹C]E-2020, Antagonista dei recettori M₂ muscarinici
 [¹¹C]LZ66, Antagonista dei recettori A₂ dell'Adenosina
 [¹¹C]PALMITATO, Metabolismo acidi grassi

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000

1. Matarrese M, Soloviev D, Todde S, Magni F, Colombo D, Galli Kienle M and Fazio F. Synthesis of [¹¹C]-methyl-¹¹C]fluvoxamine - a potential serotonin uptake site radioligand. *Appl Radiat Isot*, 1997; 48 (6):749-754.
2. Matarrese M, Soloviev D, Moresco RM, Ferri V, Simonelli P, Magni F, Colombo D, Todde S, Carpinelli A, Fazio F, Galli Kienle M. Synthesis and biodistribution of \pm [¹¹C]-1-phenyl-4-((5-methoxytetralin-1-yl)propyl)-piperazine (PNU-157760), a putative radioligand for 5-HT_{1A} receptors. *Bioorg Chem*, 1998; 26: 91-102.
3. Studenov AR, Berridge MS, Soloviev DV, Matarrese M, Todde S. High yield synthesis of [¹¹C]-acetone through selective quenching of methyl lithium. *Nucl Med Biol*, 1999; 26(4): 431-435.
4. Matarrese M, Soloviev D, Cappelli A, Todde S, Moresco RM, Anzini M, Vomero S, Sudati F, Carpinelli A, Perugini F, Galli Kienle M, Fazio F. Synthesis of the novel [¹¹C]-labelled quinoline carboxamides: analogues of PK 11195 as putative radioligands for PET studies of peripheral benzodiazepine receptors. *J Labelled Cpd Radiopharm*, 1999, 42(1): 397-399
5. Todde S, Moresco RM, Monopoli A, Simonelli P, Cacciari B, Varaldi P, Matarrese M, Carpinelli A, Galli Kienle M, Fazio F. Radiosynthesis and biodistribution of [¹¹C]LZ66, a new potent and selective ligand for A_{2A} receptor system. *J Labelled Cpd Radiopharm*, 1999, 42(1): 176-178.
6. Matarrese M, Soloviev D, Moresco RM, Todde S, Simonelli P, Colombo D, Magni F, Carpinelli A, Fazio F, Galli Kienle M, Synthesis and in vivo evaluation of 3-[¹¹C]methyl-(3-methoxy-naphtalen)-2-yl-(1benzyl-piperidin)-4-yl-acetate (SB-235753), as a putative Dopamine D₄ receptors antagonist for PET. *J Labelled Cpd Radiopharm*, (2000) 43, 359-374.
7. Carpinelli A, Matarrese M, Moresco RM, Simonelli P, Todde S, Magni F, Galli Kienle M, Fazio F. Radiosynthesis of [¹²³I]CIT, a selective ligand for the study of dopaminergic and serotonergic systems in human brain. *Appl. Radiat. Isot.* (2000) in press
8. Soloviev DV, Matarrese M, Moresco RM, Todde S, Bonasera TA, Sudati F, Simonelli P, Magni F, Colombo D, Carpinelli A, Galli Kienle M, Fazio F. Asymmetric synthesis and preliminary evaluation of (R)- and (S)-[¹¹C]bisoprolol, a putative α_1 -selective adrenoceptor radioligand. *Neurochemistry International* (2000), in press
9. Todde S, Moresco RM, Frostl W, Stampf P, Matarrese M, Carpinelli A, Magni F, Galli Kienle M, Fazio F. Synthesis and in vivo evaluation of [¹¹C]CGP62349, a new GABA_B receptor antagonist. *Nucl. Med. Biol.*, (2000), in press
10. Moresco RM, Matarrese M, Soloviev D, Simonelli P, Rigamonti M, Gobbo C, Todde S, Carpinelli A, Galli Kienle M, Fazio F. Synthesis and in vivo evaluation of [¹¹C]ICI 118551 as a putative subtype selective α_2 -adrenergic radioligand. *Int. J. Pharm.*, (2000), in press.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Proseguirà la ricerca volta a realizzare nuovi radiotraccianti per la PET. In particolare le aree sulle quali si rivolgerà l'attenzione saranno quelle dei sistemi glutammatergico, adrenergico di reuptake site, cannabinoidi, NK1. Verranno inoltre selezionati e valutati nuovi traccianti per lo studio dell'ipertensione (ACE inibitori)

Collaborazioni internazionali in atto

1. Hopitaux Universitaires du Genève, Division de Médecine Nucléaire, Hôpital Cantonal, Geneve (CH)
2. Radionuclidic Center Vrije Universiteit, De Boelelaan 1085, 1081HV Amsterdam.

Parole Chiave

Radiotracers, Receptors, Radiopharmaceuticals.

UNITA' DI RICERCA INBB
Bologna

Responsabile Scientifico
Prof. Vittorio Tomasi

Linea di Ricerca

Impiego di oligonucleotidi antisense diretti al nucleo e di molecular beacons in studi riguardanti il ruolo delle caveole nell'angiogenesi, e per la identificazione di polimorfismi a livello dei promotori dei geni per interleuchine e prostaciclina sintasi

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Tomasi Vittorio PO Tomasi@alma.unibo.it

Non Aderenti INBB

Spisni Enzo RU Spisni@alma.unibo.it

Santi Spartaco A

Licastro Federico PA Licastro@alma.unibo.it

Guarnieri Tiziana PT Guarnieri@alma.unibo.it

Griffoni Cristiana BC Tomasi@alma.unibo.it

Riccio Massimo DR

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Biologia Sperimentale, Università di Bologna - Via Selmi 3 40126 Bologna
0512094147 051251208 tomasi@alma.unibo.it

Sezione INBB di appartenenza

Bologna

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni (max. 2000 caratteri)

Obiettivi

Linea 1. Oligonucleotidi antisense diretti contro enzimi della cascata dell'acido arachidonico: loro meccanismo d'azione e impiego come anti-infiammatori. La tecnologia antisense appare particolarmente utile quando non esistano inibitori selettivi e privi di effetti secondari. Questo è il caso della fosfolipasi A2 citosolica (cPLA2) e cicloossigenasi (COX). Un secondo aspetto rilevante è il potenziamento dell'effetto di un antisense quando venga veicolato al nucleo dove viene messo in grado di bloccare la espressione di geni specifici.

Abbiamo quindi deciso di studiare il meccanismo d'azione di antisense diretti contro cPLA2 e COX 1 e 2, valutando la loro distribuzione cellulare e cinetica di uptake in cellule endoteliali, monociti e cellule HeLa.

Gli obiettivi principali sono stati l'individuazione di sequenze capaci di favorire la ritenzione nucleare favorendo un prolungamento del loro effetto come premessa al loro impiego in vivo come anti-infiammatori.

Linea 2 ruolo delle caveole e di costituenti caveolari nella regolazione della fase morfogenetica dell'angiogenesi. L'angiogenesi si può utilmente dividere in due fasi: nella prima fase le cellule endoteliali proliferano fino in vitro a raggiungere confluenza, nella seconda fase le cellule debbono decidere se andare in apoptosi o stabilire contatti fra proteine di adesione che innescano la costruzione di un nuovo capillare. I segnali che innescano questo switch sono poco conosciuti

Sulla base di osservazioni di gruppo di Palade e del gruppo Risau che studiando l'effetto del VEGF sull'angiogenesi, notavano un clustering delle caveole come evento primario della fase morfogenetica, abbiamo deciso di stabilire se alcuni costituenti caveolari come le efrine ed un enzima che porta alla sintesi di prostaciclina (PGIS) fossero coinvolti nella regolazione dell'angiogenesi. A questo scopo abbiamo messo a punto una serie di tecniche adatte allo studio delle caveole e dei costituenti caveolari: immunoprecipitazione con anticorpi specifici, Far western blot, microscopia confocale con anticorpi specifici al fine di co-localizzare caveolina-1 e proteine presunte caveolari, preparazione di una proteina di fusione glutatione transferasi-caveolina, over expression di una proteina di fusione caveolina-GFP.

Linea 3 Valutazione del polimorfismo di promotori di alcuni geni coinvolti nell'angiogenesi ed in processi infiammatori. E' noto che alcune citochine (in particolare interleuchine 1 e 6) rappresentano una risposta adattativa a processi infiammatori che in ultima analisi comportano anche uno stimolo angiogenico. L'entità della risposta è estremamente variabile in popolazioni umane ed è stata suggerita una spiegazione basata sul polimorfismo a livello di promotori genici. Per affrontare questi aspetti che richiedono analisi su numerosi campioni abbiamo deciso l'impiego di molecular beacons oligo antisense opportunamente modificati nelle regioni 3' e 5' che si appaiano in modo altamente specifico con la sequenza senso. L'appaiamento allontana la regione 3' (che contiene il fluoroforo) dalla regione 5' che contiene il quencher e genera un segnale di fluorescenza solo nel caso in cui l'appaiamento sia perfetto (rivelando quindi i single base polymorphisms). Questo approccio è rilevante al fine della comprensione di patologie a larga diffusione come l'ipertensione arteriosa (coinvolgimento del promotore della prostaciclina sintasi come

dimostrato nello Suita study Circulation 2000) e il morbo di Alzheimer (studio in collaborazione con il gruppo di Licastro, Pat.generale, Bologna)

Risultati ottenuti

Linea 1. Utilizzando un antisense messo a punto presso la Smithkline e attivo come inibitore specifico della cPLA2 abbiamo stabilito una sua localizzazione esclusivamente nucleare a livello di strutture subnucleari discrete somiglianti ai PML bodies ma non agli speckles. Alla ricerca di un docking site per l'antisense abbiamo isolato mediante cromatografia di affinità (V.Vlassov and P.Laktionov, Novosibirsk, Russia) una proteina di 37 kd capace di legare l'antisense in modo selettivo mediante un motivo strutturale del tipo TAAAT. La proteina è stata sequenziata ed è risultata identica ad un enzima glicolitico (GAPDH). È stato confermato che l'enzima purificato lega oligonucleotidi contenenti la sequenza TAAAT che interagisce con lo stesso sito allosterico legante NAD⁺ (Rossmann fold). Quindi GAPDH monomero oltre a regolare a livello nucleare importanti funzioni come apoptosi, si comporta come una proteina navetta capace di traslocare oligonucleotidi contenenti la sequenza TAAAT dal citoplasma ai PML bodies dove riteniamo possa mediare effetti degli antisense sulla maturazione di molecole di pre-mRNA. Sono in corso studi volti a chiarire tale aspetto e a identificare altre sequenze ripetitive responsabili della ritenzione nucleare di antisense. L'inserimento di tali sequenze in un costrutto dovrebbe prolungare l'azione di un antisense e renderlo adatto per promuovere lo splicing alternativo di pre-mRNA.

Questi risultati sono stati comunicati in diversi congressi internazionali, pubblicati in parte (Nucleosides-Nucleotides) ed il lavoro in extenso è stato inviato a BBA.

Linea 2. Se le caveole sono coinvolte nell'angiogenesi debbono contenere molecole coinvolte nel processo. Abbiamo deciso di esaminare la possibile localizzazione della efrina B2 e della PGI2 sintasi poiché dati della letteratura sono in accordo con un loro possibile ruolo. Esperimenti di immunoprecipitazione con anticorpi anti-caveolina-1 hanno permesso di identificare sia efrina B2 che PGI2 sintasi in immunoprecipitati, il che è stato confermato immunoprecipitando con anticorpi anti efrina e anti PGI2-s. Tuttavia l'impiego del metodo di flottazione su gradiente di frazioni cellulari insolubili in Triton-X-100 (Brown e Rose, 1992) mentre ha permesso di confermare la co-localizzazione PGI2-s / caveolina ha rivelato la non co-localizzazione efrina-caveolina. Confermando dati recenti sulla sua localizzazione nei rafts. Esperimenti di co-localizzazione al microscopio confocale hanno ulteriormente confermato tali dati. In aggiunta la deplezione di colesterolo mediante filipin in condizioni in cui le caveole vengono distrutte, provoca contemporaneamente un calo dell'attività enzimatica e un blocco dell'angiogenesi valutata su gel di fibrina in un sistema a 3D. Infine un blocco dell'angiogenesi si verifica utilizzando un antisense diretto contro l'enzima capace di diminuire il livello (western blot) e che diminuisce l'attività e blocca l'angiogenesi. La dimostrazione che PGI2 sintasi è sicuramente un componente caveolare sostiene l'intervento delle caveole nell'angiogenesi e spiega gli effetti terapeutici degli analoghi stabili della PGI2 nel trattamento dell'ipertensione polmonare primaria (Fishman 1998) e il ruolo protettivo nella ipertensione essenziale (Suita Study). Queste ricerche stanno proseguendo in seguito alla sintesi di una proteina chimerica GST-caveolina e alla disponibilità di un vettore che si è rivelato efficace nella overexpression di un gene codificante per una fusion caveolina-GFP. Questi risultati sono stati comunicati in congressi internazionali, in parte pubblicati (Spisni et al, Proceedings of 11th Congress on Adv. Prostaglandins and Leukotrienes Res, in corso di stampa) e il lavoro in extenso è stato inviato a Exp. Cell Res.

Linea 3. Il gruppo di Licastro ha dimostrato che la presenza di alcuni alleli del gene della interleuchina 1 e 6 permette di predire l'insorgenza dei sintomi della malattia di Alzheimer avvalorando le ipotesi che la malattia sia sostenuta da un processo infiammatorio cerebrale, innescato da interleuchina 1 e 6, con coinvolgimento dei mediatori dell'infiammazione come Cox-2 e PGI2 che rappresenta il prodotto principale dell'enzima nell'uomo. Sono iniziati studi per verificare l'esistenza di single nucleotide polymorphism a livello di promotori di tali geni utilizzando tecniche convenzionali e i molecular beacons su DNA estratto da leucociti umani di soggetti normali e pazienti Alzheimer. Il gruppo di Licastro ha pubblicato un lavoro su Ann. Neurology (2000)

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000

1. Spisni, E., and Tomasi, V. (1997). Involvement of prostanoids in angiogenesis. In "Tumour Angiogenesis" (R. Bicknell, C.E. Lewis, and N. Ferrara, Eds.), Oxford University Press, N.Y., pp.291-300.
2. P.-L. Lollini, G. Palmieri, C. De Giovanni, L. Landuzzi, G. Nicoletti, I. Rossi, C. Griffoni, F. Frabetti, K. Scotlandi, S. Benini, N. Bandini, A. Santoni, P. Nanni (1997) Expression of interleukin-15 (IL-15) in human rhabdomyosarcoma, osteosarcoma and Ewing's sarcoma. *Int. J. Cancer* 71, 732-736.
3. E. Spisni, M. Cavazzoni, C. Griffoni, E. Calzolari, V. Tomasi (1998) Evidence that photodynamic stress kills Zellweger fibroblasts by a non apoptotic mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* 1402, 61-69.
4. V. Tomasi, E. Spisni, C. Griffoni, S. Santi (1998) Nuclear targeting of antisense oligonucleotides: modification of pre-mRNA splicing or inhibition of polyadenylation? *Nucleosides Nucleotides* 17, 2073-2080.
5. Tomasi V. (1998) Gene therapy or antisense? Letter to the Editor, *Nature Biotech* 16, 496.
6. C. Griffoni, E. Spisni, M. Orlandi, S. Santi, M. Riccio, V. Tomasi (1999) A 38 kDa nuclear protein is involved in the retention of an antisense oligonucleotide directed against cytosolic phospholipase A2. *Nucleosides Nucleotides* 18 (6-7), 1673-1676.

7. - V. Tomasi, E. Spisni, C. Griffoni, G. Bartolini, M. Orlandi, S. Santi (1997) Is nuclear targeting of antisense stabilized oligonucleotides dependent on pre-messenger-RNA stability? *Mol. Biol. Cell* 8 (suppl. S), poster 2529. 37° Congresso annuale della American Society for Cell Biology, Washington D.C., 13-17 dicembre 1997.
8. - V. Tomasi, E. Spisni, C. Griffoni, G. Bartolini, M. Orlandi, S. Santi (1997) Use of antisense oligonucleotides to modify pre- mRNA splicing: relevance to angiogenesis control. "Nucleic acids and related macromolecules: synthesis, structure, function and application", Ulm (Germania) 4-9 settembre 1997 (comunicazione O33).
9. - C. Griffoni, E. Spisni, M. Orlandi, S. Santi, M. Riccio, V. Tomasi (1998) A 38 kDa nuclear protein is involved in the retention of an antisense oligonucleotide directed against cytosolic phospholipase A2. XIII International Round Table "Nucleosides, nucleotides and their biological applications", Montpellier, 6-10 settembre 1998 (poster 391).
10. - V. Tomasi, C. Griffoni, E. Spisni, M. Orlandi, S. Santi (1998) Antisense phosphorothioate oligonucleotides (APO) inhibiting caveolin-1 synthesis to be used as anti-angiogenic drugs. "Antisense '98- Nature Biotechnology", London, 8-9 ottobre 1998 (book of abstracts pag. 45).
11. - C. Griffoni, E. Spisni, M. Orlandi, S. Santi, M. Riccio, V. Tomasi, P. Laktionov (1999) Identification of a 38 kDa protein present in speckles and involved in the nuclear retention of an antisense oligonucleotide directed against cytosolic phospholipase A2: possible role in the control of alternative pre-mRNA splicing. European Congress of Cell Biology (ECBO), Bologna, 8-11 maggio 1999 (book of abstracts E-3).
12. - E. Spisni, C. Griffoni, S. Santi, M. Riccio, V. Tomasi (1999) Detection of antisense phosphorothioate oligonucleotides (APO) inhibiting caveolin-1 synthesis to be used as anti-angiogenesis drugs. European Congress of Cell Biology (ECBO), Bologna, 8-11 maggio 1999 (book of abstracts I-20).

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Testare oligo antisense contro cPLA2, COX-2 e PGI2-s come anti-infiammatori in vivo su modelli animali e studi sui vettori ottimali per il delivery.

Knock-out del gene della caveolina-1 e verifica degli effetti sulla vasculogenesi ed angiogenesi.

Commercializzazione di kits basati sull'impiego di molecular beacons per lo studio di polimorfismi genici.

Collaborazioni internazionali in atto

linea 1 : Pavel.Laktionov e Valentin Vlassov, Academy of Science, Novosibirsk, Lab of Biorganic Chemistry, Russia

linea 2: V. Ullrich, Faculty of Biology, University of Konstanz , Germany

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

DNA/RNA synthesizer PERKIN-Elmer

DNA sequencer, Perkin-Elmer.

Microscopio confocale Saraastro con dispositivo per il monitoraggio di cellule vive

Unità completa per colture cellulari

Parole Chiave

Angiogenesi, oligonucleotidi antisense, malattia di Alzheimer, molecular beacons, mediatori della infiammazione

UNITA' DI RICERCA INBB
Sassari

Responsabile Scientifico
Prof.ssa Maria Grazia Tozzi

Linea di Ricerca

Metabolismo dei composti purinici: struttura e funzione della 5'-nucleotidasi citosolica

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Tozzi Maria Grazia

PA

Tozzi@ssmain.uniss.it

Non Aderenti INBB

Sgarrella Francesco

PA

dsfbio@ssmain.uniss.it

Allegrini Simone

RU

enomis@ssmain.uniss.it

Carta Maria Caterina

BC

Pinna Paolo

DR

Pesi Rossana

DR

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Scienze del Farmaco - Università degli Studi di Sassari- Via Muroni 23/A 07100 Sassari
079 228708 079228715

Sezione INBB di appartenenza

Catania

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Questo gruppo si occupa dello studio del metabolismo dei composti purinici in diversi sistemi cellulari. Il nostro scopo generale è quello di chiarire i diversi ruoli che i composti purinici svolgono nel metabolismo e nella sua regolazione, le interconnessioni con il metabolismo intermedio e gli eventi molecolari legati sia alla insorgenza di patologie riconducibili a dismetabolismi purinici, sia al ruolo svolto dagli enzimi del metabolismo purinico nei processi di attivazione, inattivazione e resistenza a profarmaci antitumorali ed antivirali. Gli obiettivi perseguiti in questi anni possono essere riassunti in 2 diversi punti: 1- Struttura e funzione della 5'-nucleotidasi citosolica: esprimere la proteina in un vettore procariotico in modo da ottenerne grandi quantità per gli studi strutturali e funzionali, studiare i livelli di espressione dell'enzima e la sua regolazione in diverse cellule ed organi, stabilirne il ruolo fisiologico. 2- Metabolismo dei deossinucleosidi: trasporto e catabolismo di deossinucleosidi e relativa regolazione con particolare riguardo al destino della porzione deossiribosidica, studio dei meccanismi di citotossicità di analoghi di composti purinici in diversi modelli cellulari.

Risultati ottenuti

I nostri risultati possono essere così riassunti. Obiettivo 1. La 5'-nucleotidasi citosolica bovina è stata clonata ed espressa in *Escherichia coli*. L'aggiunta di un His-Tag alla sequenza ci permette di ottenere elevati livelli di proteina purificabile in un solo passaggio. Utilizzando la sequenza del cDNA abbiamo anche potuto studiare i livelli di espressione della proteina in diversi tessuti ed organi umani. Abbiamo inoltre stabilito che la 5'-nucleotidasi citosolica è presente in cellule e tessuti in due forme, generabili per proteolisi limitata, distinguibili per caratteristiche elettroforetiche, cromatografiche e regolatorie. Infine, la determinazione della attività nucleotidasica in globuli rossi di pazienti affetti dalla sindrome di Lesh-Nyhan e da altre sindromi neurologiche della prima infanzia, ci ha permesso di ipotizzare un coinvolgimento di questa attività nella produzione di metaboliti citotossici responsabili di queste patologie. Obiettivo 2. Il risultato principale è stato l'identificazione di una attività adenosina fosforilasi in cellule tumorali, implicata nel metabolismo della deossadenosina.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000

1. F. Sgarrella, F.P.A. Poddie, M.A. Meloni, L. Sciola, P. Pippia, M.G. Tozzi "Channelling of deoxyribose moiety of exogenous DNA into carbohydrate metabolism: role of deoxyriboaldolase" *Comp. Biochem. Physiol.* 117B, 251-257 (1997)
2. S. Allegrini, R. Pesi, M.G. Tozzi, C.J. Fiol, B.R. Jhonson, S. Eriksson "Bovine cytosolic 5'-Nucleotidase IMP-GMP specific: cloning and expression of active enzyme in *E. coli*" *Biochem J.*, 328, 483-487 (1997).
3. R. Pesi, C. Baiocchi, S. Allegrini, E. Moretti, F. Sgarrella, M. Camici, and M.G. Tozzi "Identification, separation and characterisation of two forms of cytosolic 5'-nucleotidase/nucleoside phosphotransferase in calf thymus." *Biol. Chem.* 379, 699-704 (1998).

4. Allegrini S., Pesi R., Tozzi M.G., Eriksson S. "Expression and characterization of recombinant bovine cytosolic 5'-nucleotidase IMP-GMP specific" *Advances in experimental Medicine and Biology* 431, 231-235 (1998)
5. Pesi R., Allegrini S., Golfarini S., Baiocchi C., Moretti E., Camici M., Eriksson S., Tozzi M.G. "Identification of multiple forms of cytosolic 5'-nucleotidase phosphotransferase in rat tissues" *Advances in experimental Medicine and Biology* 431, 495-499 (1998)
6. V. Bemi, N. Tazzini, S. Banditelli, F. Giorgelli, R. Pesi, G. Turchi, A. Mattana, F. Sgarrella, M.G. Tozzi, and M. Camici "Deoxyadenosine metabolism in a human colon carcinoma cell line (LoVo) in relation to its cytotoxic effect in combination with deoxycoformycin" *Int. J. of Cancer*, 75, 713-720 (1998).
7. V. Bemi, G. Turchi, E. Margotti, F. Giorgelli, R. Pesi, F. Sgarrella, M.G. Tozzi, M. Camici "6-thioguanine resistance in a human colon carcinoma cell line with unaltered levels of hypoxanthine guanine phosphorybosil transferase activity" *Int. J. Cancer*, 82 556-561 (1999).
8. C. Emanuelli, R. Maestri, D. Corradi, R. Marchione, A. Minasi, M.G. Tozzi, M.B. Salis, M. Capogrossi, G. Olivetti, P. Madeddu "Dilated and failing cardiomyopathy with aging in bradykinin B₂ receptor knockout mice" *Circulation* 100 (23) 2359-2365 (1999)
9. Pesi R., Micheli V., Jacomelli G., Peruzzi L., Camici M., Garcia-Gil M., Allegrini S., Tozzi MG "Cytosolic 5'-nucleotidase hyperactivity in erythrocytes of Lesch-Nyhan syndrome patients" *NeuroReport* 11, 1827-1831 (2000).
10. Giorgelli F. Giannecchini M., Bemi V., Turchi G., Sgarrella F., Tozzi M.G., Camici M. "Role of the phosphorolysis of deoxyadenosine in the cytotoxic effect of the combination of deoxyadenosine and deoxycoformycin on a human colon carcinoma cell line (LoVo)" in press on *J. Cell. Biochem* (2000).

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Proseguiremo gli studi sulla 5'-nucleotidasi citosolica individuando la struttura del sito attivo e dei siti regolatori. Intendiamo inoltre determinare la sequenza del gene corrispondente e quella del sito promotore. Stiamo inoltre approfondendo i nostri studi sui metaboliti generati da una iperespressione della 5'-nucleotidasi in situazioni patologiche come induttori di apoptosi in cellule neuronali. Proseguiremo lo studio del metabolismo dei deossinucleosidi come carrier di porzione ribosidica utilizzabile come fonte di energia in situazioni di stress cellulare e la purificazione e caratterizzazione della attività adenosina fosforilasi identificata in cellule tumorali.

Collaborazioni internazionali in atto

Prof. Ulf Hellman Ludwig Institute for Cancer Research, Box 595, SE-751 24 Uppsala, Sweden

Prof. Staffan Eriksson Department of Veterinary Medical Chemistry, SLU, The Biomedical Centre, SE 75123 Uppsala, Sweden.

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Elettroforesi bidimensionale, HPLC, FPLC, elettroforesi zonale capillare, PCR, spettrofotometri.

Parole Chiave

5'-nucleotidasi citosolica, deossadenosina, Sindrome di Lesch-Nyhan, deossicoformicina, apoptosi

UNITA' DI RICERCA INBB
Laboratorio Nazionale Sezione di Biologia Cellulare Osilo (SS)

Responsabile Scientifico
Prof. Carlo Ventura

Linea di Ricerca

Studio dell' espressione genica nel corso del differenziamento cellulare

titolo

Analisi dei meccanismi molecolari responsabili della cardiogenesi in cellule staminali embrionali pluripotenti.

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Ventura Carlo	PA	chim_med@ssmain.unis.it
Tadolini Bruna	PO	tadolini@ssmain.unis.it
Maioli Margherita	DR	chim_med@ssmain.unis.it

Non Aderenti INBB

Sanna Cinzia	A	chim_med@ssmain.unis.it
Zinellu Elisabetta	A	chim_med@ssmain.unis.it
Maninchedda Emiliana	A	chim_med@ssmain.unis.it

Sede Unità di Ricerca

Laboratorio Nazionale dell' Istituto Nazionale di Biostrutture e Biosistemi, Osilo (Sassari) e Laboratorio di Ricerche Cardiovascolari, Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Sassari

Dipartimento di Scienze Biomediche, Sezione di Biochimica, Viale San Pietro 43/B, 07100 Sassari.

079-228277;079-3441006

079-228120

chim_med@ssmain.uniss.it

Sezione INBB di appartenenza

Laboratorio Nazionale dell' Istituto Nazionale di Biostrutture e Biosistemi

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

- Analisi dell'espressione di geni delle endorfine in modelli di cardiomiopatia ipertrofica idiopatica. Al riguardo è stata studiata la trascrizione del gene della prodinorfina in miociti isolati da cuori di Syrian hamsters cardiomiopatici (ceppo Bio 14.6). Nello stesso modello di cardiomiopatia ereditaria è stata studiata la sintesi e la secrezione di dinorfina B, prodotto biologicamente attivo del gene e sono state analizzate le possibili vie di trasduzione del segnale coinvolte nella modulazione del sistema endorfinergico oggetto di studio.
- Analisi dei meccanismi nucleari coinvolti nella regolazione della trascrizione di geni delle endorfine in cellule miocardiche normali e cardiomiopatiche.
- Modulazione dell' espressione di geni delle endorfine in risposta a stimoli fisici indipendenti dall' interazione cellulare con uno specifico ligando recettoriale. In questi studi si è cercato di dare una spiegazione molecolare della capacità di campi magnetici pulsati a frequenza estremamente bassa (ELF) di regolare l' attività di sistemi endorfinergici sia invitro che in vivo.
- Studio dei meccanismi molecolari responsabili della specificazione del fenotipo miocardico in cellule staminali embrionali pluripotenti. In questa ricerca abbiamo cercato di individuare i geni responsabili della cardiogenesi in cellule staminali e di verificare l' esistenza di un sistema peptidergico intrinseco alla cellula staminale stessa in grado di promuovere con un meccanismo autocrino il differenziamento cardiaco.

Risultati ottenuti

- Individuazione del gene della prodinorfina in miociti di Syrian hamsters normali e cardiomiopatici.
- Riscontro di una sovraespressione del gene e della dinorfina B in miociti cardiomiopatici in una fase assolutamente precoce della patologia, antecedente l' insorgenza dello scompenso cardiaco.
- Scoperta di isoenzimi nucleari della protein chinasi C (PKC) coinvolti nella regolazione della trascrizione del gene della prodinorfina durante la cardiomiopatia ipertrofica. Tali isoenzimi sono risultati essere residenti nel nucleo indipendentemente da processi di traslocazione dal citoplasma.
- Riscontro della capacità del sistema endorfinergico miocardico di modulare l' omeostasi citoplasmatica del calcio promuovendo il rilascio da depositi endocellulari dello ione. In questi studi è stato anche evidenziato un sovraccarico citoplasmatico di calcio nella cellula cardiomiopatica dovuto ad una anomala funzione del reticolo sarcoplasmatico ed è stato anche scoperto come lo stesso sovraccarico endocellulare di calcio fosse coinvolto nell' induzione del gen oppioide riscontrate nei miociti cardiomiopatici.
- Scoperta di una nuova famiglia di recettori oppioidi nel nucleo della cellula miocardica. Tali recettori erano sovraespressi nei nuclei isolati da miociti di hamsters cardiomiopatici. La loro stimolazione diretta in nuclei

isolati mediante dinorfina B o agonisti selettivi dei recettori oppioidi k era in grado di attivare specifici isoenzimi nucleari della PKC e di innescare la trascrizione del gene della prodinorfina.

- Per la prima volta in letteratura è stato dimostrato che l' esposizione diretta di nuclei isolati da cardiomiociti di ratto a campi magnetici pulsati di frequenza estremamente bassa (ELF-PMF) ha prodotto un marcato aumento della trascrizione del gene della prodinorfina attraverso l' attivazione di isoforme della protein kinasi C residenti nel nucleo.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000

1. Ventura C., Pintus G., Fiori M.G., Bennardini F., Pinna G., Gaspa L.: Opioid peptide gene expression in the primary hereditary cardiomyopathy of the Syrian hamster. Part I: Regulation of prodynorphin gene expression by nuclear protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 272: 6685-6692, 1997.
2. Ventura C., Pintus G., Tadolini B.: Opioid peptide gene expression in the primary hereditary cardiomyopathy of the Syrian hamster. Part II: Role of intracellular calcium loading. *J. Biol. Chem.* 272: 6693-6698, 1997.
3. Ventura C., Pintus G.: Opioid peptide gene expression in the primary hereditary cardiomyopathy of the Syrian hamster. Part III: Autocrine stimulation of prodynorphin gene expression by dynorphin B. *J. Biol. Chem.* 272: 6699-6705, 1997.
4. Nigro V., Okazaky Y., Belsito A., Piluso G., Matsuda Y., Politano L., Nigro G., Ventura C., Abbondanza C., Molinari A.M., Acampora D., Nishimura M., Hayashizaki Y., Puca G.A.: Identification of the Syrian hamster cardiomyopathy gene. *Human Molecular Genetics* 6: 601-607, 1997.
5. Pintus G., Tadolini B., Maioli M., Posadino A.M., Bennardini F., Bettuzzi S., Ventura C.: Heparin inhibits phorbol ester-induced ornithine decarboxylase gene expression in endothelial cells. *FEBS Letters* 423: 98-104, 1998.
6. Ventura C., Pintus G., Tadolini B.: Opioid peptide gene expression in the myocardial cell. *Trends in Cardiovascular Medicine* 8, 102-110, 1998.
7. Ventura C., Maioli M., Pintus G., Posadino A.M., Tadolini B.: Nuclear opioid receptors activate opioid peptide gene transcription in isolated myocardial nuclei. *J. Biol. Chem.* 273: 13383-13386, 1998.
8. Pintus G., Tadolini B., Maioli M., Posadino A.M., Gaspa L., Ventura C.: Heparin down-regulates phorbol ester-induced protein kinase c (PKC) gene expression in human endothelial cells: enzyme-mediated autoregulation of PKC- and α genes. *FEBS Letters* 449: 135-140, 1999.
9. Ventura C., Maioli M., Pintus G., Gottardi G., Bersani F.: Elf-pulsed magnetic fields modulate opioid peptide gene expression in myocardial cells. *Cardiovasc. Res.* 45: 1054-1064, 2000.
10. Ventura C., Maioli M.: Opioid peptide gene expression primes cardiogenesis in embryonal pluripotent stem cells. *Circ. Res.* 2000, in press.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

- Allestimento di specifiche metodiche per l' analisi di cambiamenti di vasti motivi funzionali del genoma durante il differenziamento miocardico in cellule staminali. Tali metodiche prevedono l' uso della "SAGE" (serial analysis of gene expression) e la costruzione di specifici DNA chips.
- Possibilità di differenziare in cellule miocardiche cellule staminali del midollo osseo.
- Studi in vivo che comportino l' impianto di cellule staminali predifferenziate in vitro nel miocardio dell' animale ricevente.
- Induzione di danni necrotici cardiaci controllati nell' animale da esperimento (crionecrosi e/o legatura di vasi coronarici) e rigenerazione del tessuto miocardico mediante trapianto di cellule staminali avviate in vitro al differenziamento verso il fenotipo cardiaco. In questi studi si prevede di utilizzare tecniche di microembolia coronarica per l' impianto delle cellule staminali e metodiche ultrasonografiche per valutare l' attività contrattile cardiaca in seguito al trapianto.
- Infine, se gli esperimenti in vivo sull' animale dovessero avere successo, prevediamo una fase terminale della ricerca da condurre in vivo nell' uomo

Collaborazioni internazionali in atto

- Prof. Edward G. Lakatta: Laboratory of Cardiovascular Sciences, Gerontology Research Center, National Institute on Aging – National Institutes of Health, Baltimore, MD U.S.A.
- Prof. Piero Anversa, Department of Medicine, Vosburgh Pavilion, New York Medical College, Valhalla, NY10595, U.S.A.
- Prof. Claudio Napoli, Department of Medicine, University of California at San Diego, CA U.S.A.

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Cappe a flusso laminare, incubatori a CO₂ per colture cellulari, microscopi a trasmissione, apparecchi per scintillazione liquida, HPLC, apparati per PCR.

Parole Chiave

Differenziamento Cellulare, Cellule Miocardiche, Endorfine, Espressione Genica, Fattori di Trascrizione

UNITA' DI RICERCA INBB
Udine

Responsabile Scientifico
Prof. Paolo Viglino

Linea di Ricerca

Caratterizzazione mediante l'uso di spettroscopia NMR ad alta risoluzione della struttura della β 2microglobulina in relazione alla formazione di intermedi amiloidogenici.

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Viglino Paolo	PO	pviglino@makek.dstb.uniud.it
Esposito Gennaro	PA	gesposito@makek.dstb.uniud.it
Corazza Alessandra	RU	acorazza@makek.dstb.uniud.it

Non Aderenti INBB

Verdone Giuliana	DR	gverdone@makek.dstb.uniud.it
------------------	----	------------------------------

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche P.le Kolbe 4 - 33100 Udine
0432-494320 0432-494301

Sezione INBB di appartenenza

Udine

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

E' noto che una quindicina di proteine, non correlate tra loro, aggregano e formano fibrille amiloidi *in vivo* portando ad una patologia nota come amiloidosi. La caratteristica comune delle amiloidosi è la conversione di proteine, normalmente solubili, in aggregati fibrillari, in cui le proteine sono organizzate in α -sheet ordinati a formare fibrille. Una di queste patologie è l'amiloidosi da emodialisi in cui la α 2microglobulina (α 2-m) umana, catena leggera del complesso maggiore di istocompatibilità I, si accumula nel sangue a causa del malfunzionamento del rene ed aggrega fino a formare placche, che si depositano nei tessuti. Tale patologia coinvolge più del 90 % degli emodializzati rivestendo perciò un notevolissimo interesse anche dal punto di vista clinico.

Inoltre poiché non vi è alcuna relazione di sequenza o strutturale tra le varie proteine che danno origine ad amiloidosi, riveste particolare interesse la comprensione del cammino attraverso cui queste diverse proteine giungono alla formazione di intermedi parzialmente "unfolded" e quindi aggregano a formare protofilamenti che danno poi origine alle fibrille e quindi alle placche. Lo studio della α 2-m ha quindi un duplice interesse sia dal punto di vista più squisitamente teorico collegato alle problematiche non ancora chiarite relative al folding di proteine sia un grandissimo interesse volto alla comprensione e possibile individuazione di soluzione di una grave patologia molto diffusa.

Risultati ottenuti

L'analisi delle fibrille *ex vivo* ha dimostrato che esse sono composte di proteine di lunghezza intera così come da frammenti. In particolare è stato dimostrato che specie troncate all'N terminale in cui mancano i primi 6 residui (α N6 α 2-m) hanno una maggiore tendenza all'aggregazione rispetto alla proteina nativa. In seguito a queste osservazioni è stato condotto uno studio per esaminare le modificazioni strutturali indotte dalla rimozione dei primi 6 residui. I risultati di questo studio effettuato mediante spettroscopia NMR, dicroismo circolare, misure di velocità di scambio idrogeno-deuterio, proteolisi limitata e spettrometria di massa hanno evidenziato che la perdita dei primi 6 residui della α 2-m non solo modifica la sua struttura tridimensionale, ma anche riduce la stabilità del suo "folding", facilita la formazione di fibrille a pH fisiologico ed aumenta l'idrolisi da parte degli enzimi proteolitici (Esposito et al. Protein Science (2000) 9, 831-845).

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000

1) Molinari H., Esposito G., Ragona L., Pegna M., Nicolai N., Brunne R. M., Lesk A. M. and Zetta L. Probing protein structure by solvent perturbation of NMR spectra: the surface accessibility of Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor. Biophysical Journal, 73, 382 - 386, (1997).

2) Esposito G., Fogolari E., Damante G., Formisano S., Tell G., Leonardi A., Di Lauro R. and Viglino P. Hydrogen-deuterium exchange studies of the rat thyroid transcription factor 1 homeodomain Journal of Biomolecular NMR, 9, 397 - 407, (1997).

- 3) Berners-Price, S. J., Corazza, A., Guo, Z., Barnham, K. J., Sadler, P. J., Ohyama, Y., Leng, M. and Locker, D. "Structural transitions of a GG-platinated DNA duplex induced by pH, temperature and box A of high mobility-group protein 1" Eur. J. Biochem. 243, 782-791 (1997).
- 4) Fogolari F., Esposito G., Viglino P., Briggs J. and McCammon J. A. pKa shift effects on backbone amide base-catalyzed hydrogen exchange Journal of the American Chemical Society, 120, 3735-3738 (1998).
- 5) Esposito G., Viglino P., Fogolari F., Gaestel M. and Carver J. A. Selective NMR experiments on macromolecules: implementation and analysis of QUIET-NOESY" Journal of Magnetic Resonance, 132, 204-213, (1998).
- 6) Fogolari F., Zuccato P., Esposito G., and Viglino P. Biomolecular electrostatics with the linearized Poisson-Boltzmann Equation Biophysical J. 76, 1 - 16, (1999)
- 7) Scarselli M., Esposito G., De Magistris M. T., Domenighini M., Rappuoli R., Burrioni G. and Niccolai N. NMR studies of the structure-function correlations of T-cell epitope analogs from Pertussis toxin Eur. J. Biochem., in press.
- 8) Corazza A., Vianello F., Zennaro L., Gourova N., Di Paolo ML., Signor L., Marin O. Rigo A. and Scarpa M. Enzyme mimics complexing cu(II) ion: structure-function relationships J. Peptide Res. 54 491-504 (1999).
- 9) Esposito G., Michelutti R., Verdone G., Viglino P., Hernandez H., Robinson C.V., Amoresano A., Dal Piaz F., Monti M., Pucci P., Mangione P., Stoppini M., Merlini G., Ferri G. and Bellotti, V. Removal of N-terminal hexapeptide from human b₂-microglobulin facilitates protein aggregation and fibril formation. Protein Science 9, 831 – 845, (2000).
- 10) Fogolari F., Ugolini R., Molinari H., Viglino P. and Esposito G. Simulation of electrostatic effects in Fab-antigen complex formation Eur. J. Biochem. 267, 4861 – 4869 (2000).

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Il nostro obiettivo è la risoluzione della struttura tridimensionale mediante studi NMR della α 2-m intera e di due frammenti in cui mancano rispettivamente i primi 3 e 6 residui (α N3 α 2-m, α N6 α 2-m) e di alcuni mutanti che coinvolgono l'assenza di cariche positive in posizione 3 e 6 ritenute chiave per la stabilità della α 2m in soluzione. La α 2m, infatti, in soggetti normali, si trova associata al complesso maggiore di istocompatibilità I (MHCI); quando si trova in soluzione non associata al MHCI, come negli emodializzati in cui la sua concentrazione aumenta notevolmente, la sua solubilità è bassa. E' interessante cercare di comprendere quali sono i residui chiave per la stabilità della proteina in soluzione.

Inoltre ci si prefigge di chiarire quali porzioni della proteina sono maggiormente coinvolte negli intermedi amiloidogenici.

Collaborazioni internazionali in atto

C.V. Robinson

Oxford Centre for Molecular Sciences, University of Oxford, Oxford, United Kingdom

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Spettrometro NMR Bruker operante a 500 MHz sul ¹H dotato di probe con gradienti di campo.

3 stazioni grafiche Sgi per l'analisi dei dati NMR e per calcoli di meccanica e dinamica molecolare:

1) Octane, 2) O₂, 3) Indigo

rete di PC Linux

Parole Chiave

Amiloidosis, b₂-microglobulina, NMR, protein structure, protein folding

UNITA' DI RICERCA INBB
Udine

Responsabile Scientifico
Prof. Paolo Viglino

Linea di Ricerca

Studi di dinamica dell'omeodominio del fattore di trascrizione della tiroide di ratto mediante misure di rilassamento NMR.

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Viglino Paolo	PO	pviglino@makek.dstb.uniud.it
Esposito Gennaro	PA	gesposito@makek.dstb.uniud.it
Corazza Alessandra	RU	acorazza@makek.dstb.uniud.it

Non Aderenti INBB

Verdone Giuliana	DR	gverdone@makek.dstb.uniud.it
------------------	----	------------------------------

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche P.le Kolbe 4 – 33100 Udine
0432-494320 0432-494301

Sezione INBB di appartenenza

Udine

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Gli omeodomini sono una ben nota classe di domini di legame del DNA presenti in una grande famiglia di attivatori di trascrizione coinvolti nella determinazione dello sviluppo cellulare.

La struttura tridimensionale dell'omeodominio del fattore di trascrizione della tiroide di ratto (TTF1-HD) è stata determinata per via NMR (Esposito et al. 1996). Le caratteristiche strutturali del TTF1-HD sono tipiche degli omeodomini, ossia tre eliche connesse da un loop tra l'elica I e la II ed uno stretto turn tra l'elica II e l'elica III. L'elica di riconoscimento del DNA (elica III) è abbastanza ordinata anche in assenza di DNA. Nella terza elica del TTF1-HD è stata osservata una discontinuità nella catena di ponti idrogeno che stabilizzano l'elica per i frammenti altamente conservati Asn⁵¹-His⁵²-Arg⁵³; questa osservazione fa supporre la presenza di una flessione oppure di un più stretto avvolgimento locale dell'elica. Una discontinuità simile è stata notata anche in altri studi NMR su diversi omeodomini. Tuttavia la struttura cristallografica dell'omeodominio di Antennapedia non evidenzia una differente geometria del residuo chiave nel riconoscimento del DNA Asn⁵¹, perciò in assenza di una chiara evidenza sperimentale che confermi una interruzione strutturale della geometria dell'elica di riconoscimento l'anomalo comportamento di scambio dei protoni ammidici e dei dati di connettività NOE della porzione C-terminale dell'elica III devono essere interpretati nei termini di effetti di mobilità locale.

Per dare un contributo alla comprensione della dinamica del backbone del TTF1-HD abbiamo effettuato uno studio del rilassamento dell'¹⁵N dell'omeodominio del TTF1.

Risultati ottenuti

Ad alti campi magnetici il rilassamento del ¹⁵N è governato principalmente da interazioni dipolo-dipolo e da meccanismi di anisotropia di chemical shift. L'analisi dei dati sperimentali, per proteine globulari, effettuata utilizzando il modello di Lipari e Szabo fornisce una descrizione del moto nei termini di un singolo tempo di correlazione rotazionale globale della proteina, τ_m , un parametro d'ordine generalizzato, S^2 , ed un tempo di correlazione locale, τ_e .

Una prima analisi dei dati ottenuti porta a valori di τ_m di 10.5 ns e a parametri d'ordine compresi tra 0.4 e 0.7 per i residui N o C terminali, dove è ragionevole attendersi ampi moti ed alte velocità per le fluttuazioni dei vettori N-H, mentre risultano alti valori di S^2 per i residui coinvolti nel riconoscimento del DNA, quali il Gln⁵⁰ e la Tyr⁵⁴.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000

- 1) Molinari H., Esposito G., Ragona L., Pegna M., Niccolai N., Brunne R. M., Lesk A. M. and Zetta L. Probing protein structure by solvent perturbation of NMR spectra: the surface accessibility of Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor. *Biophysical Journal*, **73**, 382 - 386, (1997).
- 2) Esposito G., Fogolari F., Damante G., Formisano S., Tell G., Leonardi A., Di Lauro R. and Viglino P. Hydrogen-deuterium exchange studies of the rat thyroid transcription factor 1 homeodomain *Journal of Biomolecular NMR*, **9**, 397 - 407, (1997).
- 3) Fogolari F., Elcock A. H., Esposito G., Viglino P., Briggs J. and McCammon J. A. Electrostatics in the homeodomain interaction *Journal of Molecular Biology*, **267**, 368-381 (1997).
- 4) Fogolari F., Esposito G., Viglino P., Briggs J. and McCammon J. A. pKa shift effects on backbone amide base-catalyzed hydrogen exchange *Journal of the American Chemical Society*, **120**, 3735-3738 (1998).
- 5) Esposito G., Viglino P., Fogolari F., Gaestel M. and Carver J. A. Selective NMR experiments on macromolecules: implementation and analysis of QUIET-NOESY" *Journal of Magnetic Resonance*, **132**, 204-213, (1998).
- 6) Fogolari F., Zuccato P., Esposito G., and Viglino P. Biomolecular electrostatics with the linearized Poisson-Boltzmann Equation *Biophysical J.* **76**, 1 - 16, (1999)
- 7) Tell G., Pellizzari, L., Esposito G., Pucillo C., Macchia PE., DiLauro R. and Damante G. Structural defects of a Pax8 mutant that give rise to congenital hypothyroidism *Biochem. J.* **341**, 89-93 (1999)
- 8) Scarselli M., Esposito G., De Magistris M. T., Domenighini M., Rappuoli R., Burrioni G. and Niccolai N. NMR studies of the structure-function correlations of T-cell epitope analogs from Pertussis toxin *Eur. J. Biochem.* **265**, 313 -317 (1998)
- 9) Esposito G., Michelutti R., Verdone G., Viglino P., Hernandez H., Robinson C.V., Amoresano A., Dal Piaz F., Monti M., Pucci P., Mangione P., Stoppini M., Merlini G., Ferri G. and Bellotti, V. Removal of N-terminal hexapeptide from human b₂-microglobulin facilitates protein aggregation and fibril formation. *Protein Science* **9**, 831 - 845, (2000).
- 10) Fogolari F., Ugolini R., Molinari H., Viglino P. and Esposito G. Simulation of electrostatic effects in Fab-antigen complex formation *Eur. J. Biochem.* **267**, 4861 - 4869 (2000).

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

L'utilizzo di modelli quale il "model free approach", da noi utilizzato, per l'analisi dei dati di rilassamento potrebbe portare alla sottostima del τ_m di alcuni moti locali. In letteratura infatti, recentemente, iniziano ad evidenziarsi metodi alternativi al model free approach (come evidenziato ad es dal gruppo di Montelione).

Nostro interesse è quindi uno studio di metodi alternativi all'analisi dei dati e/o l'acquisizione di altre informazioni sperimentali, quali l'acquisizione di spettri ad frequenze differenti, in modo da potere meglio discriminare tra i vari tipi di moto coinvolti nella dinamica della proteina.

Uno studio di questo tipo effettuato sul TTF1-HD è poi generalizzabile ad altri tipi di proteine globulari.

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Spettrometro NMR Bruker operante a 500 MHz sul ¹H dotato di probe con gradienti di campo.

3 stazioni grafiche Sgi per l'analisi dei dati NMR e per calcoli di meccanica e dinamica molecolare:

1) Octane, 2) O₂, 3) Indigo

rete di PC Linux

Parole Chiave

NMR, TTF1-HD, omeodomini, rilassamento NMR, dinamica delle proteine

UNITA' DI RICERCA INBB
Padova

Responsabile Scientifico
Prof. Giuseppe Zanotti

Linea di Ricerca

Studi strutturali su protein chinasi mediante diffrazione dei raggi X

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Zanotti Giuseppe	PO	Zanotti@chor.unipd.it
Battistutta Roberto	RU*	Roberto@chor.unipd.it

Non Aderenti INBB

Calderone Vito.	BC	vito@chor.unipd.it
De Moliner Erika	DR	Erika@chor.unipd.it
Papinutto Elena	DR	Papinutto@chor.unipd.it

Sede Unità di Ricerca

Dip. Chimica Organica - U. di Padova Via Marzolo 1 35131 Padova - Italy
049-8275245 . 049-8275239

zanotti@chor.unipd.it

Sezione INBB di appartenenza

Padova

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

In collaborazione con il gruppo del prof. L. Pinna (U. di Padova), ci si e' proposti di effettuare studi strutturali riguardanti diverse chinasi, la principale delle quali e' la protein chinasi CK2.

La subunità catalitica della protein chinasi detta CK2 da *Zea mays* (precedentemente nota come casein chinasi) è stata recentemente cristallizzata (Guerra et al., 1998, Acta D54, 143-145) e la struttura 3D determinata (Nienfind et al., 1998, EMBO J. 17, 2451-2462); le coordinate atomiche sono disponibili. Nostro obiettivo e' stato quindi quello di preparare dei complessi proteina-inibitore e proteina-substrato per lo studio di alcuni aspetti del meccanismo catalitico. Si e' cercato anche di co-cristallizzare la subunità catalitica, alfa, insieme a peptidi della subunità beta e a proteine substrato. Altre chinasi oggetto di indagine sono state una chinasi da lievito ed una chinasi chimerica ad attivita' oncogenica, denominata NPM/ALK.

Risultati ottenuti

Viste le profonde analogie di comportamento in soluzione tra la proteina di mais e quella umana, nonché la totale conservazione di tutti i residui rilevanti per l'attività, la prima si può ritenere un buon modello per quest'ultima. Si sono ottenuto cristalli della subunità catalitica di mais con due diversi inibitori che si legano al sito del co-substrato; le relative strutture sono state risolte e affinate.

La struttura del complesso tetrameric tra le subunità catalitica e regolatrice della CK2 non e' noto. Siamo pero' riusciti ad ottenere cristalli e a determinare la struttura di un complesso tetrameric formato da due subunità catalitiche e due peptidi, corrispondenti al tratto C-terminale della subunità regolatrice. Dati in soluzione e la struttura 3D indicano fortemente che il complesso così formato è un buon modello del tetramero fisiologico. Una delle indicazioni più importanti di questo modello molecolare e' rappresentata dalla stretta vicinanza dei due siti attivi dell'enzima. Questo fatto, insieme al dato che molte proteine-substrato vengono fosforilate in due siti abbastanza vicini nello spazio, fa pensare che la funzione del tetramero sia quella di fosforilare contemporaneamente due siti Ser/Thr.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000

1-G. ZANOTTI, G. MALPELI, F. GLIUBICH, C. FOLLI, M. STOPPINI, L. OLIVI, A. SAVOIA AND R. BERNI " Structure of the trigonal crystal form of bovine annexin IV" *Biochem. J.* (1998) 329, 101-106

2-G. MALPELI, G. ZANOTTI, F. GLIUBICH, A. RIZZOTTO, S. K. NISHIDA, C. FOLLI AND R. BERNI "Crystallization and preliminary X-ray data for the human transthyretin-retinol-binding protein complex bound to and anti-RBP Fab" *Acta Cryst sect D* (1999), D55, 276-278

3-D. MATKOVIC-CALOGOVIC, A. LOREGGIAN, M.R. D'ACUNTO, R. BATTISTUTTA, G. PALU' AND G. ZANOTTI "Crystal structure of the B subunit of human heat-labile enterotoxin carrying peptides with anti-HSV activity" *J. Biol. Chem.*, (1999), 274, 8764-8769

4-R. J. TREVINO, F. GLIUBICH, R. BERNI, M. CIANCI, J. M. CHIRGWIN, G. ZANOTTI AND P. M. HOROWITZ "NH₂-terminal Sequence Truncation Decreases the Stability of Bovine Rhodanese, Minimally Perturbs its Crystal Structure and Enhances Interaction with GroEL Under Native Conditions" *J. Biol. Chem.*, (1999), 274, 13938-13947

5-G. ZANOTTI "Muscle fatty acid binding protein" *Biochim. Biophys. Acta* (1999) 1441, 94-105

6-G. ZANOTTI, A. BASSETTO, R. BATTISTUTTA, C. FOLLI, P. ARCIDIACO, M. STOPPINI AND R. BERNI "Structure at 1.44 Å resolution of a N-terminally truncated form of rat serum complement C3d,g fragment" *Biochim. Biophys. Acta* (2000) 1478, 232-238

7-M. CIANCI, F. GLIUBICH, G. ZANOTTI AND R. BERNI "Specific interactions of lipoate at the active site of rhodanese", *Biochim. Biophys. Acta* (2000), 36191, 1-6

8-R. BATTISTUTTA, S. SARNO, E. DE MOLINER, O. MARIN, G. ZANOTTI AND L.A. PINNA "The dimeric structure of a-subunit in complex with two α -peptides reveals the architecture of CK2 holoenzyme" *Eur. J. Biochem.* (2000) 267, 1-8

9-R. BATTISTUTTA, S. SARNO, E. DE MOLINER, E. PAPINTO, G. ZANOTTI AND L.A. PINNA "The replacement of ATP by the competitive inhibitor emodin induces conformational modifications in the catalytic site of protein kinase CK2" *J. Biol. Chem.* (2000), 275, 29618-29622

10-R. BATTISTUTTA, A. NEGRO AND G. ZANOTTI "Crystal structure of the mutant F99S/ M153T/ V163A of the Green-fluorescent protein" *Proteins: Structure, Function and Genetics* (2000) 41, 429-437

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Per chiarire gli aspetti sterici e conformazionali del meccanismo catalitico di questa chinasi, intendiamo preparare e determinare la struttura 3D di complessi tra la proteina e peptidi di sintesi con proprietà di substrato o inibitorie.

Il complesso tetrameric $\alpha_2\text{pep}_2$ interagisce con proteine substrato che subiscono una doppia fosforilazione mediante un'unica reazione catalizzata da due siti attivi. Poiché sono noti una quindicina di proteine che subiscono la doppia fosforilazione, cercheremo di cristallizzare l'addotto tra il tetramero chimerico da noi ottenuto e alcune di queste proteine-substrato, iniziando con la calmodulina, per la quale prove di modellizzazione hanno dato risultati promettenti, nonché di altri substrati al cui struttura tridimensionale non è ancora nota. Per questi ultimi, in caso di successo nella cristallizzazione si otterrebbe il doppio risultato di determinare allo stesso tempo la struttura dell'addotto e della proteina incognita. Cercheremo inoltre di ottenere cristalli di altre chinasi, in particolare NPM/ALK.

Collaborazioni internazionali in atto

Prof. Folkers e Dr Scapozza, ETH, Zurigo

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Generatore di raggi X ad anodo rotante con rivelatore bidimensionale

Stazioni grafiche

Sistemi di purificazione di proteine (FPLC, HPLC etc.)

Parole Chiave

Cristallografia di Proteine

Protein Chinasi

Struttura 3D