

CONSORZIO INTERUNIVERSITARIO
**“ISTITUTO NAZIONALE DI
BIOSTRUTTURE E BIOSISTEMI”**

WORKSHOP

SU

“BIOTECNOLOGIE”

ABSTRACT

6-8 SETTEMBRE 2001

BRESSANONE (BZ)

Comitato Scientifico

Prof. Antonio Cambria
Prof. Giulio Magni
Prof. Damiano Gustavo Mita
Prof. Claudio Nicolini
Prof. Riccardo Pierantoni
Prof. Adelio Rigo

Comitato Organizzativo

Prof. Adelio Rigo
Dott. Paolo Occhialini
Sig.ra Lucia Occhioni
Dott. Lucio Zennaro

Segreteria

I.N.B.B.
Viale delle Medaglie d'Oro, 305
Tel. 0635340153
Fax 0635451637
e-mail: inbbamm@inbb.it
[http:// www.inbb.it](http://www.inbb.it)

WORKSHOP INBB
6/7/8 SETTEMBRE 2001

“Biotecnologie”

GIOVEDI' 6 SETTEMBRE

h. 14,00 Registrazione dei partecipanti

h. 15,00 *Introduzione*
Prof. Damiano Gustavo Mita

h. 15,15 – 19,00 *Sessione “Biotecnologie agroalimentari ed ambientali”*

Prof.ssa Chiara Tonelli – Università degli Studi di Milano
“Piante resistenti allo stress”

Prof. Quirico Migheli – Università degli Studi di Sassari
“Antagonisti microbici per la protezione delle piante”

Prof. Eduardo Patriarca – IIGB, CNR Napoli
“Fissazione dell'azoto”

h. 17,10 – 17,30 *Coffee break*

Prof.ssa Anita Toffanin – Università degli Studi di Pisa
“I batteri malolattici del vino: approcci molecolari e tecnologici”

Prof. Antonio Cambria - Università degli Studi di Catania
“Le laccasi: aspetti strutturali e biotecnologici”

VENERDI' 7 SETTEMBRE

h. 9,00 – 13,00 *Sessione “Biotecnologie industriali e metodologie innovative”*

Prof.ssa Enrica Galli - Università degli Studi di Milano
“Sviluppo di microrganismi per processi di bioconversione di molecole di interesse industriale ed ambientale”

Prof. Mario De Rosa – II Università degli Studi di Napoli
“Fermentatori per la produzione di biomasse”

Prof. Damiano Gustavo Mita – II Università degli Studi di Napoli
“Bioreattori”

h 11,00 - 11,20 *Coffee Break*

Prof. Adelio Rigo – Università degli Studi di Padova
“Biosensori”

Prof. Massimo Grattarola – Università degli Studi di Genova
“Reti Neuronalì”

h. 13,00 - 15,00 *Pausa*

h. 15,00 – 19,00 *Sessione “Ingegneria Genetica e Proteomica”*

Prof. Fabio Malavasi – Università degli Studi di Torino
“Impiego di recettori cellulari di superficie nel disegno e costruzione di nuovi immunofarmaci”

Prof. Bruno Samorì – Università degli Studi di Bologna
“Nel mondo delle singole molecole con la microscopia a scansione di forza”

Prof. Lorenzo Silengo - Università degli Studi di Torino
“Applicazioni biotecnologiche di animali transgenici”

h. 17,00 - 17,20 *Coffee Break*

Prof.ssa Catia Sorgato – Università degli Studi di Padova
“Le proteine prioniche”

Prof. Giuseppe Zanotti – Università degli Studi di Padova
“Studi di interazione della protein-chinasi CK2 con inibitori”

SABATO 8 SETTEMBRE

h. 9,00 – 13,30 *Sessione “Biotecnologie per la salute”*

Prof. Lucio Annunziato - Università degli Studi “Federico II” di Napoli
“Aspetti Cellulari e molecolari dello scambiatore Na⁺ - Ca²⁺ nell’anossia cerebrale”

Prof. Rodolfo Quarto – Università degli Studi di Genova
“Produzione di tessuto osseo”

Prof. John Guardiola – IIGB – CNR Napoli
“Vaccini ricombinanti”

h. 11,00 - 11,20 *Coffee Break*

Prof. Paolo Madeddu – Resp. Sez. Terapia Genica Lab. Naz
“Rigenerazione del sistema arterioso”

Prof. Carlo Ventura – Resp. Sez. Biologia Cellulare Lab. Naz
“Era post-genomica: nanobiotecnologie del DNA e studio della cardiogenesi in cellule staminali”

Prof. Claudio Nicolini - Università degli Studi di Genova
Considerazioni conclusive “Nuove frontiere delle biotecnologie: le nanobiotecnologie”

INDICE

| | PAG. |
|---|-----------|
| PRIMA SESSIONE - “<i>BIOTECNOLOGIE AGROALIMENTARI ED AMBIENTALI</i>” | 7 |
| SECONDA SESSIONE - “<i>BIOTECNOLOGIE INDUSTRIALI E METODOLOGIE INNOVATIVE</i>” | 13 |
| TERZA SESSIONE - “<i>INGEGNERIA GENETICA E PROTEOMICA</i>” | 21 |
| QUARTA SESSIONE - “<i>BIOTECNOLOGIE PER LA SALUTE</i>” | 27 |
| POSTER | 35 |

PRIMA SESSIONE

“BIOTECNOLOGIE AGROALIMENTARI ED AMBIENTALI”

LACCASI STRUTTURA E APPLICAZIONI BIOTECNOLOGICHE

Antonio Cambria

*Università degli Studi di Catania – Dipartimento di Scienze Chimiche Sez. Biochimica
V.le Andrea Doria, 6 – 95030 Catania*

Le laccasi sono membri di una famiglia di enzimi detti “multicopper oxidases” o “blue oxidases”, essendo caratterizzate da un intenso colore blue. Esse sono largamente distribuite in natura in molte specie di piante e di funghi. Strutturalmente sono glicoproteine monomeriche o multimeriche, con differente contenuto di carboidrati e di atomi di rame. Le laccasi fungine contengono di solito quattro atomi di rame (per mole di proteina), essenziali per l’attività enzimatica, e manifestano una larga specificità per alcuni substrati riducenti, la cui ossidazione e’ accoppiata alla riduzione di una molecola di ossigeno ad acqua. La laccasi proveniente da un ceppo di Basidiomicete, *Rigidoporus lignosus*, e’ stata purificata, nel nostro Laboratorio, fino alla apparente omogeneità ed alcuni parametri strutturali e cinetici sono stati determinati. Successivamente, altre ricerche sulla struttura secondaria e sulla stabilità termica dell’enzima sono state condotte utilizzando la spettroscopia nell’infrarosso con trasformata di Fourier, in collaborazione con l’ U.O. INBB dell’Università di Ancona. I risultati ottenuti dimostrano la presenza prevalente di domini con strutture β che, congiuntamente ai quattro atomi di rame, contribuiscono a conferire all’enzima una struttura compatta e una elevata stabilità termica. Queste caratteristiche strutturali, insieme alla larga specificità, soprattutto per substrati fenolici, hanno suggerito la possibilità di utilizzare le laccasi in alcune applicazioni biotecnologiche (biosensori, bioreattori). Queste ultime sono state effettuate presso le U.O. del Consorzio INBB afferenti all’Università di Padova (Prof. Rigo) e all’Università di Genova (Prof. Nicolini).

ANTAGONISTI MICROBICI PER LA PROTEZIONE DELLE PIANTE

Quirico Migheli, Barbara Scherm

*Università degli Studi di Sassari - Dipartimento di Protezione delle Piante
Via Enrico De Nicola, 9 - 07100 Sassari
e-mail: migheli@uniss.it*

Funghi, batteri e virus fitopatogeni sono causa di gravi danni alle piante coltivate e spontanee. Alcuni funghi parassiti, in particolare, oltre a determinare forti riduzioni delle produzioni agricole, possono contaminare irrimediabilmente le derrate alimentari, producendo micotossine estremamente pericolose per la salute umana e animale.

Diversi fattori, quali l'eccessiva presenza di residui di fitofarmaci negli alimenti, la contaminazione del terreno e delle falde acquifere, gli effetti dei trattamenti antiparassitari sulla microflora e sulla fauna utili, la selezione di popolazioni dei patogeni resistenti ai prodotti più utilizzati e la diminuzione dei principi attivi registrati per uso agricolo, hanno reso necessaria la progressiva riduzione dell'impiego di fitofarmaci per la lotta contro i fitopatogeni.

In tale ottica la lotta biologica, che prevede la distribuzione in campo o in ambiente protetto di microrganismi antagonisti in grado di contenere gli attacchi dei patogeni, rappresenta un'utile strategia di protezione delle piante a basso impatto ambientale.

Gli antagonisti microbici possono agire attraverso diversi meccanismi, quali la competizione per la nicchia ecologica, l'antibiosi, l'iperparassitismo e l'induzione nelle piante di uno stato di minore recettività o addirittura di resistenza nei confronti dei patogeni.

Nel corso dell'ultimo decennio, le ricerche nel campo della selezione, dello studio dei meccanismi d'azione, della formulazione e della manipolazione genetica di antagonisti microbici impiegabili nella lotta biologica contro i fitopatogeni ha portato a risultati molto incoraggianti.

In questa rassegna verranno prese in considerazione le principali fasi di sviluppo di un antagonista microbico: selezione, saggi di attività, manipolazione genetica, formulazione e valutazione dell'impatto ambientale in vista della registrazione come biofitofarmaco.

FISSAZIONE DELL'AZOTO

Eduardo J. Patriarca

Eduardo J. Patriarca
IIGB, CNR
via Marconi N°10
80125-Naples, Italy
Tel. +39-0817257223
Fax. +39-0817257202
e-mail: patriarca@iigbna.iigb.na.cnr.it

L'utilizzo di microrganismi azotofissatori simbiotici è una pratica agricola efficace e soprattutto ecologicamente corretta, in grado di fornire alle piante la quasi totalità del loro fabbisogno d'azoto assimilabile (NH_4^+). Invece, l'applicazione di fertilizzanti chimici, pur raggiungendo lo stesso scopo, esercita un impatto ambientale fortemente negativo. Negli ultimi vent'anni, sebbene le biotecnologie siano state considerate lo strumento più adatto allo scopo di aumentare la resa del processo di fissazione biologica dell' N_2 , i risultati concreti ottenuti sono stati pochi rispetto alle aspettative. L'esito non soddisfacente dell'approccio biotecnologico sembra determinato sia dalla complessità dei processi coinvolti, come la biologia dello sviluppo dei noduli radicali azotofissatori, sia dall'inadeguata conoscenza dei meccanismi molecolari che regolano l'interazione pianta-batterio. Oggi la letteratura è concorde nell'identificare la regolazione dell'assimilazione del NH_4^+ fra i principali fattori che determinano l'efficienza del processo simbiotico. Come i dati dimostrano, il grado di efficienza del processo cresce con: (i) l'aumento dell'attività nitrogenasica (sovraespressione dei geni *nif* o aumentata respirazione); (ii) la riduzione della capacità d'assimilazione dell' NH_4^+ da parte del partner batterico (mutanti deficienti in GOGAT); (iii) l'aumento della capacità di assimilare NH_4^+ da parte della pianta ospite (alti livelli di GS); (iv) l'insensibilità alla presenza di concentrazioni di NH_4^+ che normalmente inibiscono il processo di interazione simbiotica. Di contro, le manipolazioni genetiche che invertono la direzione di tali processi determinano effetti contrari, ovvero diminuiscono il grado d'efficienza del processo simbiotico.

I BATTERI MALO-LATTICI DEL VINO: APPROCCI MOLECOLARI E BIOTECNOLOGICI

Annita Toffanin

*Università degli Studi di Pisa - Dipartimento di Microbiologia
Via del Borghetto, 80 – 56124 Pisa*

La fermentazione malolattica (F.M.L.) consiste nella conversione di L(-)malato a L(+)lattato e anidride carbonica. Avviene nel vino per opera di microrganismi appartenenti al gruppo dei batteri lattici. La sostituzione delle due valenze acide del malato con l'unico gruppo acido presente nel lattato ha come effetto la diminuzione dell'acidità del vino. Vari sono i microrganismi che sono capaci di operare la F.M.L. nei vini prodotti nelle varie aree geografiche di produzione. Tra questi i generi *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Lactobacillus* sono tra i più importanti sia perchè sono i responsabili più frequenti delle F.M.L. che avvengono spontaneamente sia per il loro diffuso impiego in fermentazioni pilotate. Tra questi *Leuconostoc oenos*, recentemente riclassificato come *Oenococcus oeni*, comprende ceppi che si sono adattati maggiormente alle condizioni dell'ambiente vino, caratterizzate da notevole stringenza in termini di pH, presenza di sostanze ad azione antibatterica (es. anidride solforosa) e concentrazione alcolica. La F.M.L. avviene posteriormente alla fermentazione alcolica ed è generalmente considerata desiderabile al fine di: (i) abbassare l'acidità del vino, (ii) migliorarne le caratteristiche organolettiche e (iii) aumentarne la stabilità microbiologica.

La conoscenza del processo offre possibilità di miglioramento della tecnica produttiva enologica con maggior rilevanza per le regioni climatiche caratterizzate da basse temperature e tendenza all'eccesso in acidità. Tecniche biotecnologiche innovative quali l'impiego di *freeze-dried starters* e l'utilizzo di cellule/enzimi immobilizzati sono di grande interesse per le ripercussioni sulle tecniche di produzione. Applicazioni finalizzate di tecniche molecolari rende possibile il controllo in tempo reale del processo e/o il rapido riconoscimento di microrganismi coinvolti. Recentemente ha acquisito importanza la possibilità di isolare e caratterizzare nuovi ceppi microbici che consentano la tipizzazione del prodotto. Il trasferimento della capacità di operare la F.M.L. a *Saccharomyces cerevisiae* ha avuto esiti parziali anche per problemi di espressione del sistema oltre che per considerazioni sull'opportunità dell'operazione.

PIANTE RESISTENTI AGLI STRESS

Chiara Tonelli

*Università degli Studi di Milano - Dipartimento di Genetica e di Biologia dei microrganismi
Via Celoria 26, 20133 Milano, Italy
tel. +39.02.5835.5007 fax. +39.02.58355044
e-mail: chiara.tonelli@unimi.it*

Dal momento della semina a quello del raccolto le piante coltivate, malgrado i miglioramenti introdotti nelle tecniche colturali, devono fronteggiare numerose avversità ambientali che ne limitano la produzione. Gli stress ambientali di tipo abiotico sono molti e comprendono la siccità, gli eccessi di precipitazioni, il vento, il freddo, le alte temperature, la carenza di elementi nutritivi, gli eccessi di sale e di ioni tossici nel terreno e gli inquinanti atmosferici o dell'acqua. Le risposte della pianta a questi stress sono molto complesse. Geni indotti da alcuni di questi stress sono stati identificati ad esempio in piante selvatiche che mostrano una naturale resistenza ad alcune avversità. Il recente completamento del sequenziamento del genoma di *Arabidopsis*, pianta modello per lo studio degli organismi vegetali, ha dato un forte impulso allo sviluppo di ricerche che affrontano in modo globale la risposta della pianta alle varie condizioni ambientali. L'obiettivo è quello di comprendere nel dettaglio a livello molecolare la via di traduzione del segnale di stress e l'isolamento e la successiva modificazione dei fattori trascrizionali che regolano i pathway di risposta. Alcuni di questi fattori sono stati recentemente isolati e caratterizzati da un punto di vista funzionale e la loro applicazione biotecnologica in piante coltivate è in studio.

L'ottenimento in futuro di piante resistenti agli stress ambientali permetterebbe non solo di ridurre le perdite di produzione ma soprattutto di poter estendere la coltivazione a quelle terre marginali che attualmente non sono coltivabili perché troppo ricche in sali o ad altissimo rischio di siccità.

SECONDA SESSIONE

**“BIOTECNONOLOGIE INDUSTRIALI E
METODOLOGIE INNOVATIVE”**

FERMENTATORI PER LA PRODUZIONE DI BIOMASSE

Chiara Schiraldi, Isabella Di Lernia, Angela Martino, Mariateresa Giuliano e Mario De Rosa

Seconda Università di Napoli - Dip. Medicina Sperimentale, Sez. di Biotecnologie e Biologia Molecolare
Via Costantinopoli 16, 80138 Napoli

I processi fermentativi hanno assunto importanza crescente in molti comparti industriali quali quello cosmetico, alimentare e, in particolar modo, farmaceutico. La fermentazione da scienza empirica è, quindi, diventata una scienza razionale che si basa sempre di più su modelli matematici descrittivi dei processi biologici. Inoltre, anche l'impiantistica ed il controllo dei bioprocessi hanno avuto un notevole sviluppo sia dal punto di vista scientifico che applicativo. La crescita di una coltura microbica per l'ottenimento sia di biomassa che di prodotti correlati (metaboliti primari, enzimi, proteine) può essere limitata in termini di velocità di duplicazione e di resa a causa dell'accumularsi di composti tossici. Lo sviluppo di una coltura "fed-batch" è spesso autolimitato, infatti, durante il processo, si verifica l'accumulo di sostanze di inibizione (quali l'acido acetico o l'acido lattico) che non permettono al microrganismo di essere indefinitamente in fase di crescita.

Per questo motivo assumono particolare interesse i processi di rimozione *in situ* del prodotto (ISPR), che permettono di controllare la concentrazione di alcuni composti chiave durante la crescita, in modo da ottimizzare i processi di fermentazione aumentandone la produttività, in relazione o alla concentrazione in biomassa o ai prodotti metabolici di interesse. La ricerca sperimentale, in questo settore, ha come scopo principale l'individuazione di tecniche fermentative innovative che permettano la produzione di colture ad alta densità cellulare. I vantaggi di tali colture sono notevoli e consistono nella riduzione del volume di lavoro, nella semplificazione dei processi a valle e nel miglioramento della resa, che nell'insieme portano ad una riduzione dei costi di produzione (Shay L. K., 1987). Il nostro gruppo ha sviluppato un bioreattore innovativo a membrane microfiltranti che permette la rimozione del terreno esausto ed il reintegro di opportune soluzioni saline e nutrienti, mantenendo nel recipiente di fermentazione le cellule microbiche in condizioni ambientali ottimali (pH, agitazione, aerazione, T). Tale bioreattore è stato utilizzato per la crescita ad alte densità cellulari del microrganismo termoacidofilo *Sulfolobus solfataricus* Gθ, raggiungendo 38 g/L in peso secco e dimostrando la possibilità di ottenere una biomassa metabolicamente attiva anche a densità così alte. Nonostante i notevoli miglioramenti ottenuti nel processo di microfiltrazione, non risulta conveniente utilizzare il wild-type per la produzione di enzimi, a causa delle condizioni estreme di fermentazione. Uno dei maggiori inconvenienti all'applicazione di questi enzimi su larga scala risiede proprio nella difficoltà di produzione di elevate quantità a bassi costi. Il superamento di tale ostacolo è possibile attraverso un approccio concertato tra ingegneria genetica, ingegneria biochimica e progettazione di bioreattori innovativi. I geni responsabili per l'espressione dell' α -glucosidasi (α -gly, dell'enzima formante trealosil destrine (TDFE) e dell'enzima formante trealosio (TFE), da Sulfolobales sono stati clonati in *Escherichia coli* BL21 (DE3) ed *Escherichia coli* Rb-791 rispettivamente. Tali batteri ricombinanti sono stati coltivati nel bioreattore a membrana con successo permettendo di ottenere rese in biomassa 6-15 volte superiori ai rispettivi processi batch. Inoltre è stata migliorata notevolmente la produzione enzimatica grazie a strategie mirate di induzione che hanno incrementato la produzione fino a 12500 U/L per l'gly, 792 U/L per TDFE, 25300 U/L per TFE.

Recentemente il bioreattore a microfiltrazione è stato utilizzato per la fermentazione ad alta densità di probiotici. In particolare è stato coltivato *Lactobacillus delbruekii* ssp *bulgaricus*, che è utilizzato diffusamente come starter dell'industria lattiero casearia. Negli esperimenti di microfiltrazione è stato possibile mantenere la concentrazione di acido lattico al di sotto dei 20 g/L (molto inferiore alla concentrazione di inibizione) per un tempo prolungato così ottenendo una resa in biomassa di 20 g/L rispetto ad i 2.5 g/L ottenibili in esperimenti batch.

Durante la validazione del bioreattore a moduli microfiltranti sono stati utilizzati microrganismi estremofili, mesofili ricombinanti e probiotici, in tutti i casi il processo fermentativo è stato migliorato in termini di rese in prodotto (biomassa, enzimi, acido lattico) dimostrando che la tecnica dell'ISPR è vantaggiosa in un ampio spettro di applicazioni.

Shay, L.K., Hunt, H. R., and Wegner, G.H. (1987) *High productivity fermentation process for cultivation industrial microorganisms*. Ind. Microbiol. J. 2: 79-85.

Schiraldi C., Marulli F., Di Lernia I., Martino A. e De Rosa M. *Extremophiles* (1999) 3: 199-204

Schiraldi C., Martino A., Acone M., Di Lernia I., Di Lazzaro A., Marulli F., Generoso M, Carteni M. and De Rosa M. *Biotechnol Bioeng* (2000) 70(6):670-676

Martino A., Schiraldi C., Fusco S., Di Lernia I., Costabile T., Pellicano T., Marotta M., Generoso M., van der Oost J., Sensen C.W., Charlebois R. L., Moracci M., Rossi M., De Rosa M. *J. of Mol. Catal. B: Enzymatic* (2001) vol 11/46,787-794

Schiraldi C., Acone M., Giuliano M., Di Lernia I., Maresca C., Carteni M. and De Rosa M.. *Extremophiles, published online* (2001) DOI 10.1007/5007920100194

SVILUPPO DI MICRORGANISMI PER PROCESSI DI BIOCONVERSIONE DI MOLECOLE DI INTERESSE INDUSTRIALE ED AMBIENTALE

Enrica Galli

Università degli Studi di Milano
Dipartimento di Genetica e di Biologia dei Microrganismi
via Celoria 26 - 20133 Milano
tel. 02.5835 5055; e-mail: enrica.galli@unimi.it

Le nuove tecnologie, oltre a costituire uno degli strumenti fondamentali per l'avanzamento della conoscenza scientifica dei fenomeni biologici, possono sul piano applicativo offrire soluzioni alternative e migliorare processi di trasformazione nei più diversi ambiti produttivi. In questo contesto le bioconversioni costituiscono un esempio di interesse nel campo della biocatalisi e si presentano come una valida e competitiva alternativa alla sintesi chimica nella produzione di numerosi composti di interesse industriale. Le bioconversioni sfruttano l'enorme varietà di reazioni esistenti nel mondo microbico attraverso l'utilizzo di enzimi e cellule intere, per modificare in maniera selettiva e con buone rese la struttura di molecole di partenza per ottenere prodotti utili con caratteristiche migliori rispetto agli analoghi già conosciuti. E' particolarmente importante sottolineare che le reazioni catalizzate da questi enzimi rendono le bioconversioni migliori rispetto alle sintesi chimiche per la specificità nel riconoscimento del substrato, per la regio- e stereospecificità della reazione in cui viene in genere prodotto uno solo dei due enantiomeri e infine per le condizioni di reazioni blande ed economicamente vantaggiose. La via biologica offre inoltre il vantaggio di poter ottenere prodotti otticamente attivi evitando così il ricorso a processi di risoluzione delle miscele racemiche che potrebbero rivelarsi costose e provocare la perdita di una parte del prodotto di partenza. La maggior parte dei sistemi enzimatici utilizzati in processi di bioconversione sono di origine microbica.

I composti ossidrilati, intermedi di interesse industriale nella sintesi di polimeri e di prodotti farmaceutici possono essere prodotti per via biologica mediante reazioni che prevedono modificazione dei sostituenti con formazione dei gruppi ossidrilici o mediante reazioni di ossidrilazione diretta per intervento di ossigenasi.

Il nostro gruppo è interessato allo studio e all'applicazione di ossigenasi prodotte da batteri del genere *Pseudomonas*, capaci di ossidrilare diversi idrocarburi aromatici. Sono stati ottenuti ceppi ricombinanti di *E.coli* in cui sono state clonate rispettivamente una naftalene diossigenasi per la produzione di dioli e catecoli e la stirene monoossigenasi per la produzione di epossidi.

Verranno riportati i dati ottenuti dai processi di bioconversione con i due biocatalizzatori sviluppati.

NEUROENGINEERING: BIOARTIFICIAL NETWORKS OF REAL NEURONS

Massimo Grattarola

*Università degli Studi di Genova - Neural and Bioelectronic Technologies Group, DIBE
Via Opera Pia, 11/a - 16145 Genova
e-mail: gratta@dibe.unige.it*

Networks of neurons can be cultured and kept in healthy conditions for a long time in experimental in vitro preparations. The characterization of the collective emerging properties of networks of neurons in more and more taking advantages of the tools offered by microfabrication technologies, originally developed for the microelectronic industries. Therefore a new area of research (“Neuroengineering”) is emerging at the interface between neurobiology and microelectronics, where neuroscience research issues are approached under brand new perspectives and by means of powerful new tools.

A specific example of micro-hardware is represented by the development of thin-film based planar and 3D arrays of substrate microelectrodes (MEAs) to be in vitro coupled to populations of cultured neurons. MEAs technology offers the unique opportunity to simultaneously monitor/stimulate the multi-site spatial and temporal electrophysiological activity of cultured networks of neurons, on a time scale that is long enough (i.e. up to weeks) to identify the emergence and development of synaptic connections and of spatial patterns of coordinated behaviour.

Examples of the MEA approach, based on data present in the literature and on our own data, will be presented.

I BIOREATTORI

Damiano Gustavo Mita

*II Università degli Studi di Napoli
Dipartimento di Medicina Sperimentale
Via S.M. di Costantinopoli, 16 - 80138 Napoli*

Saranno illustrate le caratteristiche costruttive di vari tipi di bioreattori tradizionali operanti in condizioni isoterme e le modalità del loro funzionamento. Saranno quindi discusse, su basi analitiche, le differenti condizioni sperimentali in cui è conveniente usare ciascun tipo di bioreattore.

L'interesse applicativo di questa tecnologia sarà posto in risalto con un accenno ad alcuni processi biotecnologici industriali in cui i bioreattori hanno trovato largo impiego.

Sarà infine descritto un nuovo tipo di bioreattore operante in condizioni non-isoterme e saranno illustrati i vantaggi dell'impiego di questa nuova categoria di bioreattori rispetto al loro funzionamento in condizioni isoterme.

Verranno presentati alcuni esempi in cui la tecnologia dei bioreattori non-isotermi è stata applicata con successo, anche se a livello di laboratorio, a processi di interesse nel settore alimentare, ecologico e farmaceutico.

Referenze bibliografiche

- 1)- P.M. Doran, Bioprocess Engineering Principles, Academic Press
- 2)- O. Levenspiel, Ingegneria delle reazioni chimiche, Editrice Ambrosiana
- 3)- Pubblicazioni Mita - da richiedere a: Mita@unina2.it

BIOSENSORI: COSA SONO, A COSA SERVONO, VANTAGGI E LIMITI

Adelio Rigo

*Università degli Studi di Padova, Dipartimento di Chimica Biologica
V.le G. Colombo, 3 - 35121 Padova*

Verrà fatto un esame critico dello stato dell'arte nel campo della biosensoristica, delle possibili applicazioni dei biosensori e soprattutto dei loro vantaggi e limiti in modo da offrire, a tutti quelli che hanno curiosità per l'argomento, le linee guida per la realizzazione di questi devices. Saranno discussi alcuni esempi e illustrate le prospettive in questo settore delle biotecnologie.

TERZA SESSIONE

“INGEGNERIA GENETICA E PROTEOMICA”

USE OF CELL SURFACE RECEPTORS IN THE MAKING OF NEW IMMUNOPHARMACEUTICALS

Fabio Malavasi

*University of Torino Medical School - Laboratory of Immunogenetics, Department of Genetics, Biology and Biochemistry
Via Santena, 19 - 10126 Torino,
E-mail: fabio.malavasi@unito.it*

This survey is an overview of the applications of murine, humanized and recombinant monoclonal antibodies for *in vivo* diagnostic and therapeutic applications. Monoclonal antibodies (mAb) have been applied to the diagnosis and therapy of an array of human diseases. The initial failures of early clinical trials have been overcome through the production of a new generation of mAb which features reduced immunogenicity and improved targeting abilities. The early models of mAb therapy were focused on enhancing the cytolytic mechanisms against the tumor cells. More recently, successful mAb-based therapies were targeted to molecules involved in the regulation of growth of cancer cells. This has highlighted the relevance of understanding receptor-mediated signaling events, and may provide new opportunities for anti-tumor antibody targeting. Despite all the difficulties, clinical data is outlining an increasingly significant role for antibody-mediated cancer therapy as a versatile and powerful instrument in cancer treatment. One reasonable expectation is that treatment at an earlier stage in the disease process or in minimal residual disease may be more advantageous.

NEL MONDO DELLE SINGOLE MOLECOLE CON IL MICROSCOPIO A SCANSIONE DI FORZA

**Bruno Samorì, Anna Bergia, Yasser Bustanji, Matteo Conti, Laura Fiume,
Giampaolo Zuccheri**

*Università di Bologna - Dipartimento di Biochimica
Via Irnerio 48, 40126 Bologna*

In quest'era post-genomica la ricerca biologica sembra porsi come obiettivo primario la compilazione "orizzontale" di un catalogo delle sequenze proteiche con i loro ruoli fisiologici. Studi strutturali più "verticali" e meno descrittivi, sui meccanismi che presiedono, da una parte alla espressione dei geni, e dall'altra ai meccanismi fisico-chimici dei funzionamenti delle diverse proteine devono essere parimenti promossi.

Nuove tecnologie di indagine a livello di singole molecole permettono di condurre analisi delle proprietà meccaniche del DNA e delle proteine. Si prevede che queste acquisizioni potranno portare nel prossimo futuro alla scoperta di una varietà di architetture ed elementi strutturali sui quali si potranno porre le basi per un nuovo approccio cosiddetto "meccanochimico" al funzionamento di molti sistemi biologici.

Questo approccio è richiesto anche dalla sempre più consolidata consapevolezza che i processi cellulari non sono il risultato di una serie complessa di reazioni chimiche sequenziali e parallele indotte dalla diffusione e dalle collisioni molecolari casuali, quanto i prodotti di processi mecano-chimici di trasporto direzionali.

La microscopia a forza atomica, in particolare nelle sue applicazioni denominate di spettroscopia di forza, si può porre l'obiettivo di studiare le basi molecolari di questi processi.

(1) B. Samorì "Stretching, tearing and dissecting single molecules of DNA" *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1998, 37, 2198-2200

(2) B. Samorì "Stretching Single Molecules along unbinding and unfolding pathways with the Scanning Force Microscope" *Chemistry Eur. J.* 2000, 23, 4249-4255

LE PROTEINE PRIONICHE

M. Catia Sorgato

Università degli Studi di Padova - Dipartimento di Chimica Biologica
V.le G. Colombo, 16 – 35121 Padova

I prioni sono una nuova classe di particelle infettive responsabili dell'insorgenza e propagazione delle encefalopatie spongiformi trasmissibili (TSE), o malattie prioniche. Le TSE colpiscono sia gli animali sia l'uomo per cause sporadiche, infettive o genetiche e provocano degenerazione spongiforme del tessuto cerebrale con morte neuronale, proliferazione astrogliale e, spesso, deposizione di amiloide. Le principali patologie animali sono lo scrapie degli ovini e l'encefalopatia spongiforme bovina (BSE), mentre tra quelle umane ricordiamo la malattia di Creutzfeldt-Jacob (CJD), e l'insonnia familiare. Recentemente, è stata descritta nell'uomo una variante di CJD, causata presumibilmente da ingestione di carni infette da BSE.

Il prione manca di quantità apprezzabili di acidi nucleici (quindi di batteri e virus) perchè resiste ad agenti che li inattivano. E', infatti, costituito quasi esclusivamente da una proteina, detta PrP^{Sc}, che viene codificata dallo stesso gene di una glicoproteina cellulare, chiamata proteina prionica (PrP^c), costitutivamente espressa a più alte concentrazioni nel sistema nervoso centrale dove si ancora al foglietto esterno della membrana plasmatica neuronale. Nonostante il diverso modo di trasmissione delle TSE, secondo l'ipotesi "proteina only" l'agente eziologico è comune a tutte le forme ed è la proteina prionica stessa che diventa patogena non per modificazioni covalenti ma per una variazione della sua conformazione. Sia che si generi nella cellula originaria (forme sporadiche e genetiche) sia che provenga dall'esterno (forme infettive), è stato proposto che la PrP^{Sc} faccia assumere la sua stessa conformazione aberrante alla forma nativa, attraverso un meccanismo autocatalitico iniziato dall'interazione PrP^{Sc}-PrP^c. Tuttavia, per spiegare la difficoltà di trasmissione delle TSE da una specie ad un'altra, è stato anche postulato che a favorire il meccanismo di conversione nell'ambito di una stessa specie intervengano altre molecole, quale i chaperoni proteici.

Recentemente, è stata identificata una seconda proteina prionica che assoglia alla parte strutturata della PrP^c. Per questa ragione viene chiamata doppel (doppione) (Dpl). Quando espressa nel cervello di animali privi della PrP^c, il Dpl provoca sintomi (atassia) e degenerazione neuronale (delle cellule del Purkinjie) come la PrP^{Sc}, pur se apparentemente non dà origine a forme PrP^{Sc}-simili.

In questa presentazione, riporterò su dati raccolti *in vitro* o in cellule su: *i.* il meccanismo di trasformazione PrP^c-PrP^{Sc} mediato da chaperoni proteici; *ii.* la possibilità che la PrP^c subisca eventi di fosforilazione durante il suo ciclo cellulare e che sia implicata nel metabolismo del calcio; *iii.* l'uso di chimere fluorescenti per seguire il metabolismo della PrP^c (nativa o mutata) e del Dpl.

INTERACTION OF PROTEIN KINASE CK2 WITH EFFECTORS AND INHIBITORS

**Giuseppe Zanotti, Roberto Battistutta, Stefania Sarno, Erika De Moliner and
Lorenzo A. Pinna**

*University of Padova - Department of Organic Chemistry and CNR Biopolymer Research Center
Via Marzolo 1- 35131 Padova*

*University of Padova - Department of Biological Chemistry and CNR Biomembrane Research Center
Viale G. Colombo 3, 35121 Padova*

CK2 is an essential, ubiquitous and highly pleiotropic member of the protein kinase family with as many as 200 protein substrates known to date, many of which are implicated in signal transduction, gene expression and cell regulation. CK2 is generally isolated as a holoenzyme composed by two catalytic subunits (α and/or α') and two regulatory β subunits. The crystal structure of a complex between the catalytic α subunit of *Zea mays* CK2 and a 23-mer peptide reproducing the C-terminal sequence 181-203 of the human CK2 regulatory β subunit has been determined at 3.2 Å resolution. The complex, composed of two α chains and two peptides, presents a molecular two-fold axis, with each peptide interacting with both α -chains. In the derived model of the holoenzyme, the regulatory subunits are positioned on the opposite side in respect of the opening of the catalytic sites, that remain accessible to substrates and co-substrates. The β subunit can influence the catalytic activity both directly and by promoting the formation of the α_2 dimer. The overall structure of the complex suggests that oligomerization *per se* may modulate catalytic activity in a subtle manner, because each catalytic chain interacts with the active site of the other. Furthermore, the two active sites are so close in space that they can simultaneously bind and phosphorylate two phosphoacceptor residues of the same substrate.

The structure of a complex of CK2 α subunit with different inhibitors (emodin, TBB) has been also determined. Details of the structures will be described.

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" *Eur. J. Biochem.* (2000) **267**, 5184-5190

R. BATTISTUTTA, S. SARNO, E. DE MOLINER, E. PAPINTTO, 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

QUARTA SESSIONE

“BIOTECNOLOGIE PER LA SALUTE”

ASPETTI CELLULARI E MOLECOLARI DELLO SCAMBIATORE $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ NELL'ANOSSIA CEREBRALE

**Annunziato L., Tortiglione A., Pignataro G., Minale M., Secondo A., Amoroso S.,
Di Renzo GF.**

*Università degli Studi di Napoli "Federico II", Unità di Farmacologia, Dip. Neuroscienze e Scienze del Comportamento, Facoltà di Medicina e Chirurgia
Via S. Pansini 5, 80131 - Napoli
e-mail: lannunzi@unina.it*

Lo scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) è un trasportatore ionico bidirezionale presente a livello della membrana plasmatica che accoppia la translocazione di 3 Na^+ con quella di 1 Ca^{2+} . La funzione fondamentale di NCX è quella di regolare l'omeostasi intraneuronale del Ca^{2+} e del Na^+ attraverso l'estrusione del Ca^{2+} e l'influsso del Na^+ (*forward mode*) o l'influsso del Ca^{2+} e l'estrusione del Na^+ (*reverse mode*)⁽¹⁾. Dal momento che in condizioni di anossia/ischemia l'omeostasi di tali ioni viene ad essere alterata⁽²⁾, è stato valutato il ruolo svolto da NCX in un modello cellulare di anossia metabolica e di ischemia cerebrale *in vivo*. Gli studi *in vitro* sono stati condotti effettuando esperimenti su una linea di cellule gliali (C6) sottoposte ad ipossia chimica. L'attività di trasporto di NCX è sensibile al trattamento con composti ossidanti⁽³⁾. Tali sostanze favorirebbero, mediante un cambiamento conformazionale, il passaggio dalla forma ridotta e meno attiva, alla forma ossidata e più attiva di NCX, consentendo quindi un maggiore influsso di Ca^{2+} ed una conseguente estrusione di Na^+ dalla cellula. A tale scopo è stato utilizzato il sodio nitroprussiato (SNP), una molecola che, oltre alla proprietà di rilasciare NO, può liberare Fe^{3+} . In condizioni di ipossia chimica il SNP determina un incremento dell'attività di NCX, valutata come aumento della $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mediante l'utilizzo del probe fluorescente FURA2-AM, ed esplica un effetto protettivo sul danno cellulare, valutato in termini di riduzione sia del rilascio di LDH che della positività delle cellule al propidio ioduro. L'effetto del SNP è completamente revertito in presenza del *Bepidil* e del 5-(*N*-4-chlorobenzyl)-2',4'-dimethylbenzamide (CB-DMB), due inibitori di NCX. Lo stesso effetto protettivo non è stato esplicito né dal SIN-1, un altro farmaco in grado di rilasciare NO, né dall'8-bromo-GMPciclico, un analogo del GMP ciclico che è l'effettore finale dell'azione dell'NO. I risultati ottenuti da tali studi suggeriscono pertanto che il SNP riduce marcatamente il danno indotto nelle cellule gliali C6 dall'ipossia chimica attraverso l'attivazione di NCX, mediata dagli ioni Fe^{3+} ed NO-indipendente, determinando un influsso di Ca^{2+} ed un efflusso di Na^+ ^(4,5). Per avvalorare i risultati ottenuti *in vitro*, è stato valutato il ruolo svolto da NCX in un modello sperimentale di ischemia cerebrale *in vivo*. A tale proposito ratti maschi SD sono stati sottoposti ad Occlusione Permanente dell'Arteria Cerebrale Media (pMCAO). Il danno ischemico cerebrale è stato valutato in termini di volume di infarto, sviluppatosi dopo 24h dall'occlusione, con la tecnica colorimetrica del TTC (2,3,5-Triphenyl Tetrazolium Chloride). In tale modello di ischemia cerebrale *in vivo*, sono stati utilizzati due inibitori di NCX, il *Bepidil* ed il *GLU-XIP*. In particolare, il *GLU-XIP* è un peptide sintetico costituito da 20 aminoacidi la cui sequenza riproduce quella presente nella regione dello scambiatore denominata *eXchange Inhibitory Peptide*, che ha la peculiarità di inibire selettivamente lo scambiatore. Per favorire il passaggio attraverso la membrana cellulare, lo XIP è stato glicosilato su un solo sito tirosinico, così da poter utilizzare il trasportatore per il glucosio (GLUT). I risultati degli esperimenti mostrano come nei ratti trattati intracerebroventricolarmente (ICV) con il *Bepidil* (5, 20, 40 e 120 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ a 3, 6 e 22h dopo l'intervento di pMCAO) e con il *GLU-XIP* (40 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, 1 $\mu\text{l}/\text{h}$ per 24h, mediante pompe osmotiche, dall'inizio della pMCAO) si verifichi un aumento del volume ischemico significativamente maggiore rispetto ai ratti che hanno ricevuto, con le stesse modalità di somministrazione, il solo veicolo. Pertanto, tali risultati suggeriscono che l'attivazione di NCX, operante nel *reverse mode*, esercita un effetto protettivo sul danno cellulare indotto dall'ipossia chimica, laddove un blocco farmacologico di tale attività ha come conseguenza un peggioramento del danno cellulare indotto sia dall'anossia metabolica *in vitro* che dall'ischemia cerebrale *in vivo*.

- (1) Sanchez-Armass S. and Blaustein M.P. (1987) *Am. J. Physiol.* 252, C595-C603.
- (2) Amoroso S., Sensi S., Di Renzo GF., and Annunziato L. (1993) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 264, 515-520
- (3) Reeves J. P., Bailey C.A., and Hale C.C. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 4948-4955.
- (4) Amoroso S., De Maio M., Russo G.M., Catalano A., Bassi A., Montagnani S., Di Renzo GF., and Annunziato L. (1997) *Br. J. Pharmacol.* 121, 303-309.
- (5) Amoroso S., Tortiglione A., Secondo A., Catalano A., Montagnani S., Di Renzo G.F., and Annunziato L. (2000) *J. Neurochem.* 74, 1505-1513.

VACCINI RICOMBINANTI

John Guardiola

*Istituto Internazionale di Genetica e Biofisica - CNR
Via Guglielmo Marconi, 10 – 80125 Napoli
e-mail: guardiol@iigb.na.cnr.it*

La progettazione di vaccini dotati di un efficace valore protettivo nei confronti di patologie causate da agenti infettivi è tuttora una problematica aperta. Condizione essenziale affinché un vaccino stimoli un'immunizzazione durevole, specifica ed efficace da parte dell'organismo è la capacità della formulazione di indurre un'immunità sia cellulare che umorale.

Il sistema immune, infatti, opera secondo due categorie funzionali, quella basata sulla risposta umorale e quella basata sulla risposta cellulo-mediata. La prima si realizza attraverso la produzione da parte delle cellule B di anticorpi neutralizzanti diretti contro determinanti antigenici presenti sulla superficie di agenti infettivi di origine extracellulare (virus, batteri ed altri organismi parassitari) con la concomitante attivazione di cellule T-helper, mentre la seconda è mediata da cellule effettrici (T citolitiche o T-CLT) che distruggono le cellule infettate dell'ospite attraverso diretto contatto cellulare o mediante il rilascio di molecole che posseggono attività di lisi. I vaccini finora utilizzati sono in generale di due tipi: inattivati ed attenuati. Per quanto riguarda i vaccini inattivati, l'agente patogeno viene prodotto in grande quantità e inattivato mediante l'uso di sostanze chimiche che però non ne alterano il potenziale immunogenico. I vaccini attenuati si basano invece sulla somministrazione dell'agente patogeno vivo, ma privato della virulenza, mediante, per esempio, l'isolamento di mutanti spontanei attenuati dell'agente patogeno. L'attenuazione si ottiene ai fini pratici anche con il passaggio del ceppo virulento attraverso un altro ospite o in cellule in cultura. Il vantaggio dei vaccini ottenuti mediante inattivazione o attenuazione di un agente patogeno vivo risiede nella loro capacità di determinare un'immunità durevole nel tempo, mentre gli svantaggi sono legati al rischio di contaminazione da parte di altri organismi, alla reversione od alla residua virulenza della preparazione oltre che alla necessità di conservazione in condizioni controllate della preparazione. Il primo dei vaccini, quello ottenuto ormai 200 anni fa da Jenner contro il vaiolo, è risultato alla moderna analisi essere un vaccino in grado di stimolare sia la risposta umorale che quella cellulare, da cui la sua grande efficacia; al contrario, dopo di Jenner, la maggior parte dei vaccini ottenuti risultano piuttosto stimolare la produzione di anticorpi protettivi. Per ovviare a questa ed altre limitazioni dei vaccini classici è stata avviata già da tempo un'ampia serie di studi che mira alla progettazione di vaccini innovativi. In particolare sono stati sviluppati vaccini basati su peptidi sintetici antigenici, sull'espressione di antigeni ricombinanti veicolati da vettori di varia natura e dotati di proprietà diverse o sull'uso di DNA. Saranno descritti gli approcci correntemente impiegati per lo sviluppo di vaccini innovativi e discusse le problematiche inerenti alla loro costruzione, efficacia ed impiego.

NUOVE FRONTIERE DELLE BIOTECNOLOGIE:LE NANOBIOBIBOTECNOLOGIE

Claudio Nicolini

*Università degli Studi di Genova, DISTBIMO
Corso Europa, 30 – 16132 Genova*

Le Nanobiotecnologie rappresentano il seme di ricerche fortemente integrate fra loro sugli aspetti più innovativi delle Biotecnologie ,alla frontiera della Fisica e della Chimica, per l'ottenimento di nuove strutture ,di nuovi materiali ,processi e dispositivi, a funzione molecolare, caratterizzati da dimensioni dell'ordine del nanometro o inferiori, sia partendo da materiali (top-down approach) che da molecole (bottom-up approach) anche mediante lo sviluppo delle tecnologie più appropriate , quali nanolitografia, luce di sincrotrone ,tecnologie a nanofilms (Langmuir Blodgett,Langmuir Shaeffer ,Layer By Layer e self-assembly) e microscopia alla risoluzione atomica utilizzando nanotubi al carbonio e fullereni . Il tema delle nanobiotecnologie ,iniziato nel nostro paese con proteine fotosensibili e metalloproteine, sta ricevendo un interesse crescente nel mondo accademico ed industriale, sia in Europa sia negli Stati Uniti e in Giappone con estensione ad una vasta classe di polimeri conduttori (dai nanotubi al carbonio funzionalizzati ai politiofeni ed alle polianisidine) . Una miriade di settori applicativi stanno emergendo partendo dalla sintesi e manipolazione funzionale di materiali strettamente organici che si possono considerare le punte avanzate di diversi settori mera estensione:

- Delle biotecnologie tradizionali quali la postgenomica via DNA chip ,la nanobiocatalisi via ingegnerizzazione di multistrati enzimatici e la cristallizzazione di proteine ad oggi irrisolte con templati di nanofilm e la loro caratterizzazione a risoluzione atomica via luce di sincrotrone
- dell'energia quali fuels cells, automobili all'idrogeno, trasporto ed immagazzinamento dell'idrogeno
- della componentistica microelettronica quali emettitori di campo, transistori, condensatori, fili molecolari, diodi e resistori interamente organici verso il superamento dei rispettivi limiti attuali e con processi produttivi efficienti ed a costi estremamente ridotti .

Possibili esempi dei prodotti industriali ottenibili sono dispositivi che permettano di compiere, a livello molecolare, operazioni di rivelazione, amplificazione, commutazione, immagazzinamento, elaborazione e trasmissione dell'informazione, operazioni di tipo catalitico , operazioni di biotecnologia avanzata, sviluppo di nuove protesi per il settore biomedico, di nuovi materiali per tutto il settore industriale. Verranno dati alcuni esempi di assoluta avanguardia:

- la manipolazione di strutture, dispositivi, molecole o atomi mediante tecniche AFM con nanotubi;
- l'esecuzione di operazioni elettroniche a livello di singolo elettrone e di singola molecola con numerosi cammini elettronici multidirezionali,
- la costruzione con precisione nanometrica di materiali basati su politiofeni
- l'indirizzamento di singole molecole organiche e biologiche fotosensibili in LED,in celle fotovoltaiche e schermi piatti od in nanotrasduttori di rivoluzionarie proprietà'.In alcuni di questi settori il nostro paese ha una leadership mondiale con centri di eccellenza sia industriale sia accademico-scientifica ed esistono prospettive di significativa valenza industriale che stanno anche favorendo meccanismi di spin-off per ricercatori nostrani.

PRODUZIONE DI TESSUTO OSSEO

Rodolfo Quarto, Ranieri Cancedda

*Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Centro di Biotecnologie Avanzate
Genova*

Lo sviluppo della tecnologia biomedica ed il miglioramento delle possibilità terapeutiche ha esasperato l'esigenza da parte dei clinici di disporre in quantità non limitanti di tessuti da utilizzare nella chirurgia ricostruttiva. L'avanzamento delle conoscenze della biologia cellulare, l'affinamento delle tecniche di coltura e le nuove tecnologie di produzione di biomateriali rende possibile immaginare, ed in alcuni casi realizzare, la ricostruzione "in vitro" di tessuti scheletrici in grado di sostituire quelli malati.

L'osso è un tessuto unico per caratteristiche biologiche e meccaniche. La scelta di biomateriali come potenziali sostituti è quindi particolarmente delicata per la complessità delle specifiche di riferimento proprie del tessuto osseo. Finora, per sostituzioni di articolazioni (ad esempio articolazione dell'anca, del ginocchio etc.), la scelta è caduta su protesi metalliche, le uniche al momento in grado di garantire le caratteristiche di resistenza meccanica e fluidità di movimento richieste. Per interventi di chirurgia ricostruttiva (ricostruzione di segmenti ossei asportati in seguito a traumi e neoplasie ad es.) la scelta del materiale sostitutivo è invece più ampia; tessuto osseo prelevato dal paziente stesso durante l'intervento (trapianto autologo), da cadavere o da animale.

Da qualche anno sono sempre più utilizzati biomateriali del tipo bioceramiche, idrossiapatiti (HA) o tricalciofosfati (TCP) o bioceramiche miste (HA/TCP).

Le bioceramiche tuttavia non sono osteoinduttive (sono cioè incapaci di suscitare risposte biologiche) e non hanno caratteristiche meccaniche (resistenza e flessibilità ad es.) ideali (non sono quindi la prima scelta in caso di sostituzioni di grandi segmenti ossei). Infatti il biomateriale ideale dovrebbe avere requisiti quali: resistenza meccanica, flessibilità e biodegradabilità. Dovrebbe inoltre essere sterile, osteoinduttivo, osteoconduttivo, non evocare reazioni infiammatorie e/o di rigetto nell'organismo ospite, di facile approvvigionamento e conservazione.

Un tessuto composito costituito da uno stroma poroso, possibilmente riassorbibile e completamente compatibile con l'ambiente biologico umano, imbibito in una coltura di cellule autologhe espanse in vitro, può trovare enormi possibilità di impiego nella patologia ricostruttiva dell'apparato locomotore.

Nel nostro laboratorio è stato condotto uno studio utilizzando come modello sperimentale animali di grande taglia. Veniva eseguita la sostituzione di un segmento diafisario tibiale di lunghezza di 3,5 cm con un cilindro cavo di ceramica HA macroporosa associato alle cellule mesenchimali staminali dal midollo osseo prelevate precedentemente dallo stesso animale ed espanse in vitro. Abbiamo osservato un notevole accrescimento dell'osso neformato all'interno dei pori della ceramica nel gruppo dove erano impiantate anche le cellule staminali mesenchimali rispetto al gruppo controllo.

Sulla base dei risultati ottenuti nel modello animale è stato intrapreso uno studio clinico sperimentale in pazienti con importanti perdite segmentali di tessuto osseo.

In parallelo abbiamo avviato una linea di studio sull'utilizzo di biomateriali non ceramici come veicolo per cellule osteoprogenitrici.

ERA POSTGENOMICA: NANOBIOTECNOLOGIE DEL DNA E STUDIO DELLA CARDIOGENESI IN CELLULE STAMINALI

Carlo Ventura

*Università degli Studi di Sassari, Dipartimento di Scienze Biomediche, Laboratorio di Ricerche Cardiovascolari
V.le An Pietro, 43/b 07100 - Sassari
Divisione di Biologia Cellulare del Laboratorio Nazionale dell'Istituto Nazionale di Biostrutture e Biosistemi,
V.le Sant'Antonio, snc 07033 - Osilo (Sassari).*

L'analisi di specifici contesti di espressione genica rappresenta una delle sfide più importanti per la comprensione di complessi fenomeni di interesse biomedico, quali la proliferazione e il differenziamento cellulare o l'organizzazione dei tessuti in specifiche architetture d'organo. E' ormai sempre più evidente come le sequenze geniche rappresentino soltanto uno dei livelli di organizzazione del genoma eucariotico e come l'organizzazione spazio-temporale degli eventi che regolano l'espressione genica costituisca un livello di complessità di grado ancor più elevato nella definizione delle proprietà biologiche degli organismi.

Nel presente studio, abbiamo utilizzato cellule embrionali pluripotenti per studiare i meccanismi molecolari che innescano la comparsa del fenotipo cardiaco, uno degli eventi morfogenetici più precoci nel corso dell'embriogenesi. Le cellule P19 sono una linea di cellule staminali murine che possono essere avviate al differenziamento verso tipi cellulari diversi in presenza di agenti differenzianti, sviluppando un fenotipo cardiaco se coltivate in presenza di dimetil solfossido (DMSO). Il trattamento delle cellule P19 con DMSO ha indotto l'espressione dei geni codificanti per GATA-4 e per Nkx-2.5, due fattori di trascrizione appartenenti rispettivamente alla famiglia delle "zinc-fingers" e degli "homeodomains" essenziali per lo sviluppo cardiaco in diverse specie animali, dalla drosofila all'uomo. Non sono al momento noti attivatori intracellulari di tali fattori di trascrizione. In questa ricerca abbiamo dimostrato che le cellule P19 esprimono il gene della prodinorfina, un gene delle endorfine che codifica per la famiglia delle dinorfine, agonisti naturali dei recettori oppioidi κ . Le cellule P19 erano anche in grado di sintetizzare e secernere la dinorfina B, prodotto biologicamente attivo del gene della prodinorfina. L'attivazione dei geni GATA-4 ed Nkx-2.5 da parte del DMSO era preceduta da un notevole aumento dell'espressione del gene della prodinorfina e della sintesi e secrezione della dinorfina B. L'effetto del DMSO era mediato a livello della trascrizione genica, come evidenziato da esperimenti di nuclear-run off transcription effettuati in nuclei isolati. In questo studio abbiamo scoperto come la sola dinorfina B, in assenza di DMSO, fosse in grado di innescare la trascrizione di GATA-4 ed Nkx-2.5, inducendo anche l'espressione dei geni α -myosin heavy chain (MHC) e myosin light chain-2V (MLC), due specifici markers di differenziamento cardiaco. Inoltre, esperimenti di istoimmunofluorescenza hanno evidenziato come cellule esposte alla dinorfina B fossero marcate positivamente con MF 20, un anticorpo monoclonale murino specifico per la MHC. Il blocco dei recettori oppioidi κ con un antagonista selettivo e il knockout del gene della prodinorfina con uno specifico oligonucleotide antisense fosforotioato risultavano in grado di bloccare la cardiogenesi nella linea cellulare oggetto di studio, indicando un ruolo autocrino di un gene oppioide nei processi di crescita e differenziamento cellulare. In seguito abbiamo cercato di verificare se il ruolo di regista della cardiogenesi svolto dal gene della prodinorfina potesse implicare l'orchestrazione del genoma in unità trascrizionali complesse formate dalla modulazione spazio-temporale dell'espressione di molteplici geni. A tale scopo, abbiamo utilizzato una nanobiotecnologia del DNA nota come "Serial Analysis of Gene Expression (SAGE)". Nella SAGE, campioni di mRNA isolati da cellule P19 in diverse fasi del differenziamento cardiaco indotto dalla dinorfina B sono stati dapprima retrotrascritti in cDNA a doppio filamento. Successivamente il cDNA è stato processato per mezzo di un "Anchoring Enzyme", NI aIII, che termina la sua corsa generando in tutti i retrotrascritti un unico sito corrispondente al punto più vicino alla coda di poly (A). Il cDNA così ottenuto è stato

legato a un linker di DNA contenente il sito per un “Tagging Enzyme”, Bsm FI, in grado di tagliare il cDNA 9 bp a valle del punto di legatura. Viene così generato un frammento (tag) di 9 bp sufficiente ad identificare un singolo gene in ciascuno dei frammenti di cDNA legati al linker. I diversi tags vengono isolati e legati fra loro in modo da formare un “concatamero” che viene clonato in un vettore per il successivo sequenziamento. L’analisi di ciascuna sequenza di 9 bp consente di definire specifici profili di espressione genica nel contesto sperimentale studiato. Dati quantitativi relativi alla prevalenza di ciascun gene espresso possono essere desunti dalla frequenza con cui una determinata sequenza viene riscontrata. La SAGE consente inoltre di identificare nuovi potenziali trascritti sulla base del riscontro di tags sconosciuti. Nei nostri esperimenti la SAGE ha rivelato che l’ esposizione delle cellule P19 alla dinorfina B, oltre ad attivare geni cardiogenetici e cardiospecifici, era in grado di innescare l’ induzione di un ben più complesso programma di espressione genica. Questo programma comprendeva diversi geni delle endorfine, geni di recettori orfani nucleari, geni preposti alla sintesi di molecole chiave nelle vie di trasduzione del segnale PKC/MAPK/PI3K, geni associati al controllo dell’omeostasi citoplasmatica del calcio, geni proapoptotici e geni coinvolti nella sopravvivenza cellulare allo stress apoptotico. Con l’ ausilio della tecnologia SAGE prevediamo di comprendere più a fondo i meccanismi responsabili della modulazione su vasta scala dell’ attività funzionale del genoma durante la cardiogenesi.

POSTER

EFFECT OF UV-B ON SYNECHOCYSTIS PCC 6803 PHYCOBILISOMES APPARATUS

Maria Bianchetti¹, Eva Hideg², Imre Vass², Lello Zolla¹

¹*Dipartimento di Scienze Ambientali, Università degli Studi della Tuscia Viterbo, Italy*

²*Institute of Plant Biology, Biological Research Center, Hungarian Academy Of Sciences, Szeged, Hungary.*

In our lab we set up an HPLC method for the separation of whole phycobilisome (PB) apparatus and characterisation by mass spectrometry.

We took advantage of this method to follow the effect of UVB irradiation on proteins component PB. We noticed a general decreasing of protein components, but mainly of the phycocyanin b, as evidenced by the dramatic decrease of its peak. Previously other groups found the PB apparatus to be sensitive to UV treatment, as revealed by spectroscopic techniques and SDS-PAGE analysis of protein components, but, so far we know, nobody shed light on the mechanism underlying the UV action.

Here our aim was to elucidate this mechanism, particularly we looked for reactive oxygen species involved that can be generated by UVB irradiation.

First of all we irradiated isolated phycobilisomes and we followed the UV damage during the irradiation time monitoring the changes in absorbance and in protein composition by SDS-PAGE.

Results of experiments on isolated phycobilisomes

-As consequence of UVB irradiation the organisation, protein composition, and the conformational properties of the phycobilisome apparatus are damaged,

-Radicalic species are involved, but not the OH.

-Most probably the radical signal belongs to carbonic centered radicals.

-Oxygen reactive species are involved in generation of radicalic profile seen in EPR, which almost disappears both in anaerobic condition and in presence of ascorbate.

The next step was to make clear the contribution of bilin pigment, particularly check if it is directly effected by UVB radiation and if there is radical species generation.

Results of experiment on free pigment

-A new signal arises, which looks different from what previously obtained for the pigment-protein complexes.

-The OH. radicals generated in situ show a profile different from the signal obtained from the free pigment, but very similar to what seen in the whole phycobilisomes.

We can conclude that UVB irradiation triggers a radicals cascade, we trapped some of the intermediate.

What we planned to do:

-Further experiments are necessary in to identify the different components of radicals cascade triggered by UVB irradiation

-Moreover, it would be extremely interesting to check for the recovery of leaving cells after the UVB irradiation, in order to clarify if any repair mechanisms occurs.

THE DYNAMICS OF ANS BINDING TO TUNA APOMYOGLOBIN MEASURED WITH FLUORESCENCE CORRELATION SPECTROSCOPY

Ettore Bismuto^{‡§}, Enrico Gratton[†], Don C. Lamb[†]

^{‡§}*Dipartimento di Biochimica e Biofisica, Seconda Università di Napoli, 80138 Napoli, Italy*

[†]*Department of Physics, University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, Illinois 61801-3080*

The dynamics of the binding reaction of ANS to native and partly folded (molten globule) tuna and horse apomyoglobins has been investigated by fluorescence correlation spectroscopy and frequency domain fluorometry. The reaction rate has been measured as a function of apomyoglobin and ANS concentrations, pH, and temperature. Examination of the autocorrelation functions shows that the reaction rate is fast enough to be observed in tuna apomyoglobin while the reaction rate in horse apomyoglobin is on the same time scale as diffusion through the volume or longer. Specifically, for tuna apomyoglobin at pH 7 and room temperature the on rate is $2,200 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ and the off rate is $5,900 \text{ s}^{-1}$, in comparison to $k_{on} = 640 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ and $k_{off} = 560 \text{ s}^{-1}$ for horse myoglobin as measured by Lamb et al (2000). The independence of the reaction rate from the ANS concentration indicates that the reaction rate is dominated by the off rate. The temperature dependence of the on-rate shows that this rate is diffusion limited. The temperature dependence of the off rates analyzed by Arrhenius and Ferry models indicates that the off rate depends on the dynamics of the protein. The differences between horse and tuna apomyoglobins in the ANS binding rate can be explained in terms of the three-dimensional apoprotein structures obtained by energy minimization after heme removal starting from crystallographic coordinates. The comparison of the calculated apomyoglobin surfaces shows a 15% smaller cavity for tuna apomyoglobin. Furthermore, a negative charge (D44) is present in the heme cavity of tuna apomyoglobin that could decrease the strength of ANS binding. At pH 5 the fluorescence lifetime distribution of ANS-apomyoglobin is bimodal suggesting the presence of an additional binding site in the protein. The binding rates determined by FCS under these conditions show that the protein is either in the open configuration or is more flexible, making it much easier to bind. At pH 3, the protein is in a partially denatured state with multiple potential binding sites for ANS molecule and the interpretation of the autocorrelation function is not possible by simple models. This conclusion is consistent with the broad distribution of ANS fluorescence lifetimes observed in frequency domain measurements.

E. Bismuto, E. Gratton, D. Lamb. 2001. Biophys J 81, in press.

IMMUNOSAGGIO DELL' ACIDO DOMOICO PRESENTE NEI FRUTTI DI MARE

D. Botta, L. Micheli, G. Palleschi, D. Moscone

*Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche,
Università "Tor Vergata", Roma, Italia
Telefono. +39-6-72594421; Fax 39-6-72594328;
E-mail: Danila.Moscone@uniroma2.it*

L'Acido Domoico, un amminoacido naturale prodotto dalla diatomea marina *Pseudonitzschia Pungens*, è il composto più potente di una classe di neurotossine responsabili della sindrome nota come "Amnesic Shellfish Poisoning" (ASP). Questa tossina non provoca effetti nocivi negli animali marini che si nutrono della diatomea, ma l'ingestione da parte dell'uomo interferisce con la trasmissione dei segnali nervosi, causando vari sintomi e persino morte. Per salvaguardare la salute pubblica e gli interessi delle industrie distributrici di pesce si rende necessaria la messa a punto di un sistema valido e semplice per la determinazione dell'Acido Domoico (DA) nei frutti di mare.

Il Mouse BioAssay (MBA), sebbene di inestimabile valore durante il periodo iniziale di indagini su questa tossina, non è adatto per misure di routine, non solo per motivi etici e pratici, ma anche perché non è abbastanza sensibile da rivelare concentrazioni di DA pari al limite di legge di 20 µg/g di tessuto. Il metodo attualmente utilizzato per rilevare la presenza di DA in campioni contaminati è la cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC), associata ad una varietà di tecniche di estrazione. Il monitoraggio dell'estratto di frutti di mare richiede, però, un metodo dotato di notevole specificità, sensibilità e semplicità, tutte caratteristiche offerte dall'Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA).

Per questo motivo il lavoro è focalizzato sulla realizzazione di un sistema di determinazione del DA, basato su immunosensori elettrochimici monouso (*screen-printed electrodes*, SPEs). La reazione di affinità antigene-anticorpo avviene sulla superficie dell'elettrodo di grafite (elettrodo di lavoro), modificata mediante immobilizzazione dei vari biocomponenti che compongono la catena immunochimica.

La determinazione dell'analita viene eseguita tramite competizione tra l'antigene libero, come standard o nel campione, e quello immobilizzato sulla superficie dell'elettrodo "screen-printed" per il legame con l'anticorpo specifico per il DA. Successivamente, viene aggiunto un anticorpo secondario coniugato con l'enzima *Fosfatasi Alcalina* (AP), uno dei marcatori più usati per le reazioni immunologiche. La tecnica elettrochimica usata per la rivelazione è la Voltammetria Differenziale ad Impulsi (DPV).

Le curve di calibrazione realizzate hanno mostrato un range di lavoro compreso tra 10^{-3} e 1 µg/mL di tossina. Misure preliminari effettuate in presenza di estratto di mollusco non hanno evidenziato un effetto matrice, almeno alla diluizione di 1:1000 (w/v), necessaria per poter osservare, nel range di concentrazione del saggio, il limite di legge imposto per la tossina.

I risultati finora ottenuti sono particolarmente incoraggianti, sia per quanto riguarda la semplicità operativa e la rapidità dell'analisi rispetto alle tecniche tradizionalmente usate, sia per la sensibilità del metodo.

CARATTERIZZAZIONE STRUTTURALE E FUNZIONALE DELL'NMN ADENILTRASFERASI UMANA RICOMBINANTE

**Monica Emanuelli, Francesco Carnevali, Francesca Pierella, Franca Saccucci*, Adolfo Amici,
Nadia Raffaelli, Giulio Magni.**

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

L'importanza del dinucleotide piridinico nel mantenimento dell'omeostasi della cellula non è esclusivamente legata alla partecipazione del NAD ai processi ossidoriduttivi e alle reazioni di ADP-ribosilazione. E' stato infatti recentemente evidenziato che la concentrazione intracellulare di tale coenzima interviene nella modulazione dell'espressione di alcune proteine, quali ad esempio la p53, ed inoltre alti livelli di NAD favoriscono i processi di recupero cellulare conseguenti a un danno al DNA (1). Pertanto, una migliore conoscenza dei processi che conducono alla biosintesi del NAD può risultare importante per la messa a punto di nuove strategie rivolte alla prevenzione e al trattamento del cancro. Nell'ambito di tale biosintesi il nostro interesse è da tempo rivolto allo studio dell'enzima NMN adeniltrasferasi (NMNAT), che partecipa ad entrambe le vie metaboliche, che portano alla biosintesi del dinucleotide piridinico, trasferendo un residuo di acido adenilico dall'ATP all'NMN con produzione di NAD e pirofosfato inorganico (2). Tale attività enzimatica, indispensabile nei procarioti per la sopravvivenza cellulare, è molto bassa a livello delle cellule tumorali, rappresentando pertanto un potenziale bersaglio per i trattamenti chemioterapici. L'importanza di tale enzima è inoltre accresciuta dalla sua partecipazione alla bioconversione della tiazofurina, un potente agente oncolitico, nel metabolita farmacologicamente attivo. L'NMNAT è stata purificata da numerose fonti, sia eucariotiche sia procariotiche, ed è stata caratterizzata nelle sue proprietà molecolari e funzionali. Una più completa definizione delle caratteristiche strutturali di alcune NMNAT è stata inoltre ottenuta a seguito del clonaggio dei rispettivi geni e della successiva espressione delle proteine ricombinanti. Gli studi più recenti sono stati rivolti alla caratterizzazione dell'NMNAT umana (3). Il cDNA relativo è stato isolato da una libreria di cDNA di placenta e la sequenza determinata, contenente l'intera regione codificante (837 bp), corrisponde ad una proteina di 31,9 KDa. Dal confronto della struttura primaria dell'NMNAT umana con quella di tutte le altre NMNAT a tutt'oggi conosciute, è stato possibile identificare la sequenza consensus GXFXPX(T/H)XXH, che potrebbe pertanto rappresentare un motivo comune a tutte le NMNAT, sia eucariotiche sia procariotiche.

Gli studi di struttura tridimensionale hanno evidenziato che l'NMNAT umana presenta caratteristiche peculiari rispetto alla controparte procariotica (4).

Esperimenti di Northern blot, effettuati utilizzando numerosi tessuti umani normali e alcune linee cellulari tumorali, hanno rivelato la presenza di un trascritto di 3,1 Kb e di un secondo, relativamente meno rappresentato, di 4,1 Kb. I risultati ottenuti sembrerebbero suggerire una ridotta espressione dell'NMNAT dopo la trasformazione neoplastica. Gli studi di localizzazione cromosomica, effettuati utilizzando tecniche di ibridazione *in situ* di sonde fluorescenti, indicano che il gene relativo all'NMNAT è localizzato a livello del braccio corto del cromosoma 1 (1p32-35).

Le proprietà cinetiche dell'enzima ricombinante appaiono sostanzialmente identiche a quelle dell'enzima nativo. Studi di specificità di substrato hanno evidenziato che l'NMNAT è in grado di utilizzare substrati alternativi all'ATP, sia di natura purinica sia pirimidinica, catalizzando pertanto la sintesi di dinucleotidi analoghi del NAD. Tali osservazioni preliminari aprono la strada allo studio di nuove vie metaboliche che coinvolgono l'NMNAT.

1. Jacobson EL *et al.* (1999) *Mol. Cell. Biochem.* 193, 69-74
2. Magni G *et al.* (1999) *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 73 (A), 135-182
3. Emanuelli M *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 406-412
4. D'Angelo I *et al.* (2000) *Structure* 8, 993-1004

INDUZIONE DI STATI PARZIALMENTE STRUTTURATI DELLA MIOGLOBINA MEDIANTE FLUOROALCOLI

Mariateresa Casillo, Clorinda Malmo, Gaetano Irace, Ivana Sirangelo

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

Il raggiungimento della conformazione nativa, biologicamente attiva, delle proteine è un processo graduale e sequenziale che passa attraverso la formazione di stati parzialmente strutturati. Nel caso della mioglobina è stato identificato uno stato intermedio le cui caratteristiche sono simili al cosiddetto stato “molten globule”. Questo intermedio presenta una regione strutturata formata dalle eliche A, G ed H ed una regione priva di elementi organizzati. Soluzioni acquose di fluoroalcoli hanno l'effetto di indurre struttura secondaria e di provocare cambiamenti conformazionali nelle proteine. In questa comunicazione viene esaminato, in particolare, l'effetto dell'esafluoroisopropanolo (HFIP) sulla struttura della mioglobina. I risultati ottenuti indicano che in seguito all'interazione con soluzioni acquose di HFIP al 4% v/v, la proteina assume uno stato conformazionale le cui caratteristiche sono simili a quelle dello stato “molten”. Infatti, gli spettri di dicroismo circolare nel vicino UV mostrano la scomparsa delle bande di attività dicroica relative alle catene laterali dei residui amminioacidici aromatici e al gruppo prostetico. Questo indica che l'HFIP distrugge la struttura terziaria della proteina e influenza il legame dell'eme al suo sito, o per riduzione dell'affinità o per disorganizzazione del sito stesso. In queste condizioni sperimentali la mioglobina conserva, comunque, circa l'85% della sua struttura secondaria, come si evidenzia dagli spettri di dicroismo circolare nel lontano UV.

Misure di emissione di fluorescenza dei due residui triptofanilici, localizzati nella regione N-terminale della proteina, evidenziano che in seguito all'azione dell'HFIP, l'intensità di fluorescenza aumenta notevolmente; questo è indicativo di un cambiamento conformazionale che determina la disorganizzazione del sito eminico con conseguente allontanamento del gruppo prostetico. Infatti, la presenza dell'eme ha un effetto smorzante sulla fluorescenza dei residui triptofanilici. Inoltre, le proprietà emissive dei residui indolici nel nuovo stato conformazionale lasciano ipotizzare che la regione N-terminale conserva elementi di organizzazione strutturale. Contemporaneamente, sono state effettuate misure di fluorescenza con l'ANS, una sonda estrinseca che si lega al sito eminico nell'apomioglobina. I risultati ottenuti mostrano che lo stato intermedio indotto dall'HFIP lega l'ANS con proprietà emissive diverse da quelle dell'apoproteina in condizioni native indicando che il sito eminico ha perso la sua organizzazione strutturale. Da una analisi comparativa delle proprietà emissive dei fluorofori intrinseci ed estrinseci, emergono differenze tra lo stato “molten” indotto dall'HFIP e quello che si osserva lungo il processo di denaturazione indotto da acidi.

DISPOSABLE ELECTROCHEMICAL IMMUNOSENSORS FOR HORMONES DETECTION

Sonia Centi, Serena Laschi, Marco Mascini

Università degli Studi di Firenze
Dipartimento di Chimica
Via G. Capponi 9, 50121 Firenze (Italy)
Phone: +39 055 2757274, Fax: +39 055 2476972
E-mail: mascini@unifi.it

Disposable electrochemical immunosensors for human hormones detection in this work were developed. An immunosensor is based on an affinity reaction, which involves enzyme-labelled antigens and antibodies as signal amplification for the detection of a molecular target. The complex Ag:Ab was formed during the incubation, and the concentration of the analyte was determined by electrochemical measurement of an electroactive substrate, produced by the reaction with the enzyme-label. Immunosensors developed in this work are assembled by immobilisation of antibodies on the graphite surface of a disposable screen-printed electrode, that become the solid-phase in the immunotest realisation. The immunochemical test is then carried out using different immunoassay formats.

We investigated two different hormones, progesterone and human chorionic gonadotropine (hCG), by developing respectively an *direct competitive immunoassay* scheme and a *sandwich immunoassay* format. In both cases, *Alkaline phosphatase* (AP) as enzyme-label was used, coupled with *Differential Pulse Voltammetry* (DPV) as fast electrochemical technique.

Calibration curves performed demonstrate that immunosensors developed are able to detect both analytes in standard solutions. The low incubation time (less than 1 hour) and the fast electrochemical measurement (10 sec) make of these systems a possible alternative to classic ELISA tests.

DEVELOPMENT OF DEPOSITION TECHNIQUES FOR THE REALIZATION OF CYTOCHROME P450 NANOSTRUCTURES

Cristina Paternolli, Gilda De Luca, Paola Ghisellini and Claudio Nicolini

*Department of Biophysical M&O Sciences and Technologies,
University of Genova, Corso Europa 30, 16132 Genova, Italy
Tel. +390103538144, Fax +390103538346
e-mail: cristina@ibf.unige.it*

In this work different techniques was employed in order to optimize the development of nanostructures based on cytochrome P450 for application in biosensors (1).

P450s are promising enzymes as sensitive elements in biosensors for detection of xenobiotics and pollutant molecules because there are a huge number of molecular species with wide variety of substrate specificity (2, 3). In particular we have employed for this study different isoforms of cytochrome: P4502B4 (4), P450_{scc}, P4501A2, cytochrome b5.

For the immobilization of these molecules on solid supports, several combinations of well-known techniques as Langmuir-Schaefer, adsorption, protective plate method and layer by layer were utilized to improve working conditions and the stability of the nanoarchitetctures realized (5).

The structures were characterized by UV-Vis spectroscopy, Brewster Angle Microscopy, Circular Dicroism and Nanogravimetry. At least, cyclic voltammetry was used to verify the best conditions in which redox reactions take place.

In particular structures in presence of polymers (nafion, polytiophene) were studied and tested in order to increase the voltammetric signal and to optimize the electron transfer. These heterostructures were realized to improve the catalitic properties of the immobilized enzyme.

References

- (1) C. Nicolini, V. Erokhin, P. Ghisellini, C. Paternolli, M.K. Ram and V. Sivozelhezov, "P450_{scc} engineering and nanostructuring for cholesterol sensing", *Langmuir* 2001, 17, 3719-3726.
- (2) H. Masayuki, "Application of P450s for biosensing: combination of biotechnology and electrochemistry", *Materials Science and Engineering C* 12, 103-109, 2000.
- (3) Brosen K., Drug-metabolizing enzymes and therapeutic drug monitoring in psychiatry, *Ther. Drug Monit.* 18, 393-396, 1996
- (4) C. Paternolli, P. Ghisellini, C. Nicolini, Development of immobilization techniques of cytochrome p450-gst fusion protein, *Colloids and Surfaces B* in press 2001.
- (5) Y. Lvov, in Y. Lvov and H. Mohwald (Eds.), *Protein architecture: interfacing molecular assemblies and immobilization biotechnology*, Marcel Dekker, New York, 2000, Chapter 13

TRATTAMENTO ISOTERMO E NON ISOTERMO DI ACQUE REFLUE DELL'AGRICOLTURA MEDIANTE UREASI IMMOBILIZZATA

S. Di Martino¹, H. El Sheriff¹, A. De Maio², M. Portaccio², D. G. Mita^{1,2}

1) *Istituto Internazionale di Genetica e Biofisica del CNR- via Guglielmo Marconi, 12, 80125 - Napoli- Italia.*

2) *Dipartimento di Medicina Sperimentale- Seconda Università di Napoli- via S. M. di Costantinopoli, 16, 80138 Napoli- Italia.*

L'attività dell'enzima ureasi, immobilizzato su tre membrane di nylon graftate chimicamente con il monomero metilmetacrilato (MMA), è stata caratterizzata in condizioni isoterme e non isoterme .
Scopo della ricerca, in particolare, è stato lo studio dell' effetto della lunghezza dello spaziatore sull'attività enzimatica.

Per le prime due membrane, indicate come M₁ ed M₂, sono stati utilizzati esametildiammina (HMDA) ed idrazina, come spaziatore lungo e corto, rispettivamente. La terza membrana, indicata con M₃ è stata ottenuta immobilizzando l' ureasi direttamente sulla membrana graftata.

La caratterizzazione isoterma ha riguardato lo studio dell'attività catalitica in funzione del pH, della temperatura e della concentrazione di substrato.

I risultati hanno indicato che l'immobilizzazione produce:

- 1) lo spostamento dell'optimum di pH verso valori più acidi rispetto all'enzima libero
- 2) profili di attività in funzione della temperatura delle tre membrane diversi tra loro e rispetto all' enzima libero.

I risultati ottenuti in un bioreattore funzionante in condizioni non isoterme hanno evidenziato che:

- a) l'attività catalitica delle membrane risulta sempre più alta, a tutte le concentrazioni di substrato utilizzate, rispetto alle condizioni isoterme
- b) l'incremento percentuale di attività decresce all' aumentare della concentrazione di substrato
- c) l' affinità dell' enzima per il substrato aumenta.

Le membrane catalitiche ottenute con i sistemi di immobilizzazione finora descritti, possono essere utilizzate nel trattamento di acque reflue dell'agricolture ricche di urea. .

THIN FILM CAPACITOR

Victor Erokhin^{1,2}, Claudio Nicolini¹, Svetlana Erokhina¹

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

²*Polo Nazionale Bioelettronica, Via delle Testuggini, snc - Rome*

Phone: +39 010 353 84 41, Fax: +39 010 529 92 00

E-mail: svetla@ibf.unige.it

The capacitor is an important element of microelectronic circuits. The capacity value is reverse proportional to the distance between the electrodes (thickness of the insulator layer). However, currently available methods do not permit decreasing the thickness of the insulator to infinity without break down of insulator during the procedure of the top electrode formation.

The aim of the present work is a realization of a capacitor with ultrathin insulator layer.

The aggregation of nanoparticles formed in Langmuir-Blodgett (LB) precursor of fatty acid salts permits to obtain thin semiconductor films [1]. Copper sulfide (CuS) aggregated layers revealed a very high conductivity (resistance less than $1\Omega\times\text{cm}$), when the thickness of the film is more than 30 nm. Therefore, thin films of CuS were selected to be used as electrodes for the realization of the capacitor. LB films of copper behenate irradiated with electron beam was used as insulator. The electron beam treatment procedure produces the cross-linking of fatty acid molecules in the irradiated area and this area becomes insoluble in organic solvents [2]. Insolubility of the layer is very important as it must be unaffected during the top layer formation, that is formed by particle aggregation by chloroform washing.

Its of great importance that the process of the top electrode fabrication is not invasive. It prevents short-circuits through the insulator. Several capacitors were realized and tested. In particular, the capacity value of 3 nF was obtained for the capacitor with 4 mm^2 electrode area and 110 nm insulator thickness.

Impedance measurements of the capacitors were performed at different frequencies.

A minimum thickness of the insulator layer between electrodes, when short-circuits begin to appear, was determined

[1] P. Facci, V. Erokhin, A. Tronin, C. Nicolini, J. Phys. Chem. 98 (1994) 13323.

[2] L.A. Feigin, Yu.M.Lvov, V.I. Troitsky, Sov.Sci.Rev./Sec.A.Phys.Rev., Ed.I.M.Khalatnikov, 11, part 4,(1989) 285-377.

ESR AND DSC MEASUREMENTS AS PROBE OF EFFECTS OF NITROSOPROPOFOL ON ENERGETIC PARAMETERS OF MITOCHONDRIAL METABOLISM

Cristina Fiore, Sabrina Fabris, Federico Momo, Roberto Stevanato

Dipartimento di Chimica Fisica, Università di Venezia

Nitric oxide (NO) is an important messenger molecule involved in many pathological and physiological processes. The paradox of NO acting as both a physiological regulator and a cytotoxic agent was apparently resolved when it was found that NO reacts with superoxide to produce the cytotoxic agent peroxynitrite ONOO⁻.

Nanomolar concentrations of NO rapidly and reversibly inhibited cytochrome oxidase in competition with oxygen, as shown with isolated cytochrome oxidase, mitochondria and cells. This evidence suggested the possibility that NO is a physiological regulator of mitochondrial respiration. In a recent study we investigated a possible involvement of the NO system in the mitochondrial effects of 2,6-diisopropylphenol (DPP), a widely used anaesthetic known as propofol.

In our mitochondrial preparations DPP was added diluted in ethanol and NO was supplied by using nitrosoglutathione (GSNO) as a donor. It was found that a synergism exists between NO and the anaesthetic which leads to the full abolition of respiration and we suggested that the effects might be ascribed to little amounts of a new molecule possibly derived from the interaction of DPP and GSNO in the mitochondrial environment.

The experiment was translated *in vitro* at the same experimental conditions. It resulted that, in the presence of Cu²⁺, but analogous catalysing effects could be carried out by copper proteins, propofol reacts with S-nitrosoglutathione to give 2,6-diisopropyl-4-nitrosophenol (DPPNO) and 4,4'-dihydroxy-3,3',5,5'-tetraisopropylbiphenyl (dipropofol), as confirmed by spectrophotometric, gaschromatographic and mass spectrometric analysis.

These results could have relevant implications also in pharmacology because we observed that DPPNO, synthesised through a procedure pointed out by our research group on the basis of literature indications, greatly enhances its effects on mitochondrial respiration and oxidative phosphorylation being the effective concentrations shifted to values lower than those previously reported for propofol. As an example, 50 μ M propofol did not show apparent effects on energetic parameters of mitochondrial metabolism while 50 μ M DPPNO have dramatic consequences for mitochondrial respiration, transmembrane potential and ATP synthesis and consequently also for the cellular energy availability.

The chemical nature of the reaction leading to the DPPNO formation is in agreement with a mechanism initiated by a phenoxyl radical, produced, in aerobic conditions, by a strong oxidative agent, and the suggested pathway is compatible with the mitochondrial environment. These evidences might be of some importance in understanding the way of action of propofol and in elucidating the various sorts of clinical effect reported in literature.

The metabolic evidences on isolated mitochondria fit well with the observations on model systems (multilamellar liposomes), which demonstrate the different possibility of interactions with the membrane phospholipid moiety of DPP and DPPNO, as well as with the shift of the pK_a of the phenolic hydroxyl to a near-physiological pH due to presence of NO bound to the aromatic ring.

ESR, DSC and mitochondrial respiration preliminary measurements on phenol and nitrosophenol analogous compounds appear to evidence the strategic role of both NO group and aliphatic structures present in the same molecule. In fact, while the first increases the molecular polarity and the possibility of interactions with the polar groups of lipidic bilayer hydrophilic heads, the second ones tend to carrier the molecule in the more hydrophobic phase, provoking the disorganisation for effect of the steric hindrance of the hydrocarbon residues.

STUDY OF CYTOCHROME P4501A2 NANOSTRUCTURES FOR SENSOR APPLICATIONS

Paola Ghisellini, Cristina Paternolli, Mirco Antonini and Claudio Nicolini

*Department of Biophysical M&O Sciences and Technologies,
University of Genova, Corso Europa 30, 16132 Genova, Italy
Tel. +390103538144, Fax +390103538346
e-mail: paola@ibf.unige.it*

In order to optimize biodevice assembly for a possible application in biosensors, thin films of cytochrome P4501A2 were realized and characterized (1, 2).

Cytochrome P4501A2 is an isoform of a large family of heme enzymes (P450s) promising for the application of biosensors; in fact there are a huge number of molecular species with wide variety of substrate specificity.

This enzyme plays a critical role in the metabolism of the sex hormone estradiol, aromatic amines, caffeine and certain drugs (3). For its properties, this cytochrome is a potential active enzyme for drug monitoring and it has particular importance for clinical psychopharmacology.

The thin films were realized utilizing Langmuir-Schaefer, alternated layers adsorption and spreading techniques (4).

The characterization of the films was performed by means of nanogravimetry, spectrophotometry, circular dichroism and Brewster Angle Microscopy. Preliminary analysis of the P450 films functionality was realized by spectrophotometric characterization, monitoring the cytochrome spin-state transitions (5) and by cyclic voltammetry.

The aim of the work is to compare the different techniques of deposition utilized in order to obtain highly stable and ordered nanostructures of cytochrome P4501A2.

The characterized structures can be employed for the realization of a biosensor for the dope detection.

References

- (1) C. Paternolli, P. Ghisellini and C. Nicolini, "Development of immobilization techniques of cytochrome P450-GST fusion protein", *Colloids and Surfaces B*, in press 2001.
- (2) C. Nicolini, V. Erokhin, P. Ghisellini, C. Paternolli, M.K. Ram and V. Sivozelhezov, "P450scc engineering and nanostructuring for cholesterol sensing", *Langmuir*, in press 2001.
- (3) Brosen K., *Drug-metabolizing enzymes and therapeutic drug monitoring in psychiatry*, *Ther. Drug Monit.* 18, 393-396, 1996.
- (4) Y. Lvov, in Y. Lvov and H. Mohwald (Eds.), *Protein architecture: interfacing molecular assemblies and immobilization biotechnology*, Marcel Dekker, New York, 2000, Chapter 13
- (5) O. Guryev, V. Erokhin, S. Usanov and C. Nicolini, "Cytochrome P450scc spin state transitions in the thin solid films", *Biochemistry and Molecular Biology International*, 1996, 39(1), 205-214.

STRUCTURAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF TRUNCATED FORMS OF HUMAN PROTEIN KINASE CK2 α SUBUNIT

S. Sarno¹, P. Ghisellini², R. Battistutta³ and L. A. Pinna¹

¹ Department of Biological Chemistry and CNR Biomembrane Research Center, Università' di Padova, viale G. Colombo 3, 35121 Padua, Italy

² Distbimo, University of Genova, Corso Europa 30, 16132 Genoa, Italy

³ Department of Organic Chemistry and CNR Biopolymer Research Center, University of Padova, via Marzolo 1, 35131 Padova, Italy

Protein kinase CK2 is a highly conserved, ubiquitous, pleiotropic Ser/Thr protein kinase and more than 200 are the phosphorylated cellular proteins [1, 2]. Many of these proteins are implicated in a wide variety of cellular functions, with special reference to transcription, translation, signal transduction and cellular regulation. The CK2 holoenzyme is an heterotetrameric form composed of two α and/or α' catalytic subunits and two regulatory β -subunits. Protein kinase CK2 displays high constitutive active both as holoenzyme and as isolated catalytic subunits. All the efforts to purify and get a homogeneous population of human α catalytic subunit were unsuccessful due to its tendency to undergo limited proteolysis on its C-terminal end. In fact crystal structures were obtained with the catalytic subunit of *Zea mays* CK2, shorter and therefore more stable respect to the human α [3, 4]. Hence we decided to create a more stable truncated form of human α subunit, $\alpha\Delta 336-392$, to gain information about the role of this region and to try to solve the crystal structure of this, alone or in complex with β subunit.

Moreover in order to assess the relevance of the amino terminal segment in conferring high basal activity to protein kinase CK2 α subunit several mutants have been generated bearing either deletions or substitutions expected to disrupt the interactions between the N-terminal segment and the activation loop. Mutants were expressed in *E. coli* and characterized for their biochemical properties and CD spectra.

References

1. Allende J.E., Allende C.C. (1995) Protein kinases. 4. Protein kinase CK2: an enzyme with multiple substrates and a puzzling regulation, *FASEB J.* 9, 313-323.
2. Pinna L.A., Meggio F. (1997) Protein kinase CK2 ("casein kinase-2") and its implication in cell division and proliferation, *Prog. Cell Cycle Res.* 3, 77-97.
3. Niefind K Guerra B, Pinna LA, Issinger OG, Schomburg D. (1998) Crystal structure of the catalytic subunit of protein kinase CK2 from *Zea mays* at 2.1 Å resolution *EMBO J.* 17, 2451-2462.
4. Battistutta R, Sarno S., De Moliner E., Papinutto E., Zanutti G., Pinna L.A. (2000) The replacement of ATP by the competitive inhibitor emodin induces conformational modifications in the catalytic site of protein kinase CK2. *J. Biol. Chem.* 275, 29618-29622.

PRODUZIONE DI LATTE DELATTOSATO MEDIANTE BIOREATTORI NON ISOTERMI

V. Grano, N. Diano, M. Portaccio, D. G. Mita

*Istituto Internazionale di Genetica e Biofisica- CNR.
Viale Marconi, 12
80125 Napoli*

Tutti i bioreattori attualmente impiegati in processi biotecnologici industriali operano in condizioni isoterme, in nessuno di essi cioè è applicata una qualche disuniformità spaziale della temperatura. Da alcuni anni, invece, è stata sviluppata una linea di ricerca basata sullo studio degli effetti prodotti da un gradiente di temperatura sull'attività di enzimi immobilizzati. Tale ricerca ha provato che l'attività di enzimi immobilizzati in presenza di un gradiente di temperatura aumenta rispetto all'attività misurata in comparabili condizioni isoterme. Venendo quindi a considerazioni sull'opportunità o meno di utilizzare bioreattori non isotermi, bisogna notare che un incremento di attività enzimatica, implica una riduzione dei tempi di produzione, e quindi dei costi, di un processo biotecnologico industriale che utilizzi tale tipo di bioreattori.

Tra le applicazioni industriali dei bioreattori non isotermi è stata presa in considerazione l'idrolisi del lattosio nel latte al fine di produrre latte delattosato da destinare agli intolleranti al lattosio. Alla base della realizzazione di questo progetto, vi è stata l'ottimizzazione dei seguenti parametri: a) scelta della membrana e della tecnica di immobilizzazione dell'enzima; b) geometria del bioreattore; c) fonte dell'enzima β -galattosidasi; d) scelta di alcuni parametri operativi come la temperatura media, il gradiente di temperatura, il tempo di residenza del latte nel bioreattore, tempo di immobilizzazione dell'enzima, etc.).

Riguardo la procedura di immobilizzazione, il Nylon è stato grafitato con il monomero GMA (glicidilmetacrilato) con un percento di grafting pari a 14. L'attivazione e l'immobilizzazione avvengono utilizzando esametildiammina come spaziatore e gluteraldeide come agente legante. Come enzima si è utilizzato l'enzima di produzione industriale: MAXILACT LX 5000 della Gist-brocades.

I primi studi sono stati effettuati con un bioreattore a geometria planare in quanto tale sistema è più semplice da studiare e da caratterizzare.

Ottimizzando tutti i parametri sopra citati si è ottenuta una membrana in grado di convertire il 75% del lattosio inizialmente presente nel latte in 4.2 ore in condizioni non isoterme ($\Delta T=30^{\circ}C$, $T_{av}=25^{\circ}C$), mentre lavorando in condizioni isoterme paragonabili occorrerebbero più di 10 ore.

Dalla letteratura si trova che tempi più lunghi sono necessari per la produzione isoterma della stessa entità di idrolisi di lattosio nel latte.

MUTAGENESI E CARATTERIZZAZIONE STRUTTURALE DELLA SUBUNITÀ ALFA DELL'ENZIMA PROTEIN-CINASI CK2 UMANA, CON PARTICOLARE RILIEVO AL RAPPORTO STRUTTURA/FUNZIONE

Elena Grasselli, Laura Vergani, Graziano Noviello and Claudio Nicolini

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biofisiche M & O, C.so Europa 30, Genova

La protein-chinasi CK2 (anche nota come caseina chinasi II) è un enzima ad attività serin-treonin cinasica che svolge un ruolo centrale in molti processi biologici quali proliferazione e differenziamento cellulare, regolazione del ciclo e risposta allo stress cellulare (Litchfield et al.). Questo enzima ubiquitario presenta molteplici substrati tra cui enzimi del metabolismo (Zhang et al.), fattori di trascrizione quale max (Bousset et al.), oncoproteine come c-myc (Luscher et al.) ed oncosoppressori come p53 (McKendrick et al.). E' stato inoltre osservato come il livello intracellulare della CK2 aumenti sia in tumori solidi che in tumori del sangue.

Dal punto di vista strutturale la CK2 e' un etero-tetramero formato da quattro subunità, due catalitiche α (o α') e due regolatorie β , che e' ben conservato evolutivamente. Ciò nonostante si e' visto che in particolari circostanze e/o in determinati organismi può esistere e funzionare la subunità catalitica α priva della subunità regolatoria.

Recentemente è stata risolta la struttura cristallografica della subunità α della CK2 di *Zea Mays* (Battistutta et al.), mentre al momento non hanno avuto successo i tentativi di cristallizzare quella umana. La subunità umana si è dimostrata inoltre meno stabile rispetto a quella vegetale, come evidenziato dalla comparsa di una più o meno intensa banda di degradazione nella procedura di purificazione. La nostra domanda è quindi: quali differenze nella struttura primaria possono rendere conto di queste differenze funzionali?

E' noto che le due proteine differiscono per il numero d'aminoacidi (332 per quella da mais rispetto ai 391 della umana), con la CK2 α umana che presenta una coda aminoacidica in più all'estremità C' terminale. Partendo proprio dalle differenze 'funzionali' il nostro studio si prefigge pertanto di approfondire la conoscenza della relazione struttura-funzione di questo enzima.

A tal fine abbiamo innanzitutto allineato le sequenza dei due enzimi, che presentano un'omologia del 65% per la regione allineata. Si osserva che per quanto riguarda la coda C-Terminale, la subunità umana mostra una significativa percentuale di prolina, amminoacido noto per essere interruttore di alfa elica. Sulla base di questi dati abbiamo quindi deciso di modificare la struttura primaria della subunità α umana proprio nella coda C-terminale. Abbiamo pertanto identificato due proline vicine (in posizione 382 e 384) e tramite tecniche di mutagenesi sito-specifica siamo andati a sostituire due basi in modo da trasformare le proline in alanine. Queste due mutazioni puntiformi sono state scelte per tentare di indurre almeno un parziale 'folding' di questa regione. Con studi di 'modeling' molecolare si era trovato che la coda C terminale e' prevalentemente in random-coil.

A tutt'oggi e' stata ottimizzata la procedura di espressione e purificazione della subunità α nativa che e' stata caratterizzata strutturalmente tramite Dicrosimo circolare. La subunità nativa e' stata mutagenizzata ed al momento si sta completando il lavoro di screening dei cloni mutanti. La proteina mutata verrà quindi espressa e purificata ed analizzata tramite CD. Test funzionali standard biochimici permetteranno di confrontare l'attività della proteina nativa rispetto a quella mutata ed indagare così se e come cambiamenti nella struttura primaria sono correlati a cambiamenti nella struttura secondaria e nella funzionalità.

Bibliografia

Battistutta R., Sarno S., De Moliner E., Issinger OG., Zanotti G., Pinna IA. The crystal structure of the complex of *Zea mays* alpha subunit with a fragment of human beta subunit provides the clue to the architecture of protein kinase CK2 holoenzyme. *Eur J. Biochem.* 2000 267(16) 5184-90

Bousset K, Henriksson M, Luscher-Firzlaff JM, Litchfield DW, Luscher B. Identification of casein kinase II phosphorylation sites in Max: effects on DNA-binding kinetics of Max homo- and Myc/Max heterodimers. *Oncogene* 1993 Dec;8(12):3211-20.

Litchfield DW, Luscher B. Casein kinase II in signal transduction and cell cycle regulation. *Mol Cell Biochem* 1993 Nov;127-128:187-99.

Luscher B, Kuenzel EA, Krebs EG, Eisenman RN. Myc oncoproteins are phosphorylated by casein kinase II. *EMBO J* 1989 Apr;8(4):1111-9.

McKendrick L, Meek DW . A novel system to investigate the phosphorylation of the p53 tumor suppressor protein by the protein kinase CK2. *Cell Mol Biol Res* 1994;40(5-6):555-61.

Zhang S, Kim KH. Protein kinase CK2 down-regulates glucose-activated expression of the acetyl-CoA carboxylase gene. : *Arch Biochem Biophys* 1997 Feb 15;338(2):227-32.

ROLE OF CELL SHAPE IN THE CONTROL OF CHROMATIN STRUCTURE AND FUNCTION

Myriam Grattarola*, Laura Vergani*, GC Mascetti[#] and Claudio Nicolini*

(* *Department of Biophysical Sciences and Technologies M & O, School of Medicine, University of Genova, Italy*

([#]) *X-Istituto di Calcolo Scientifico-Institute for Scientific Computing, S.r.l. Genova, Italy*

Cell shape has been proposed as one of the regulatory mechanisms of the cells. We mechanically modified the cell shape of *in vitro* cultured fibroblasts by altering cell spreading through growth on different substrata. Cellular adhesion is in fact altered when substratum is coated with specific polymers and this affects cell geometry. We treated tissue plastic dishes alternatively with collagen and poly-HEMA, which respectively increase and decrease substratum adhesiveness and induce changes of cell shape. Fibroblasts on untreated substratum represent our control. Our goal was to verify if the induced modifications of cellular morphometry are reflected on nuclear morphology and architecture and hence on chromatin transcription. An integrated biophysical-biochemical approach (using Differential scanning calorimetry, Fluorescence microscopy and Affinity chromatography) allowed us to quantitatively analyse the morphometric and structural changes. By RNA-dot blot hybridization we evaluated if these alterations are coupled with functional modifications of chromatin. The results show as an altered cell shape induces an unbalance in the transcription of some critical genes, suggesting the existence of a strict interrelationship between cell shape/nuclear architecture/chromatin structure/gene expression. As conclusion our data support the hypothesis that nuclear architecture, together with promoter elements and other regulatory factors, can provide a level of control of gene expression through its strict association with chromatin structure.

IDENTIFICAZIONE DI UNA ATTIVITÀ ATPASICA ASSOCIATA AL FATTORE DI TRASCRIZIONE NAD^R DA *ESCHERICHIA COLI*

Teresa Lorenzi, Nadia Raffaelli, Adolfo Amici, Monica Emanuelli, Giulio Magni

Istituto di Biochimica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Ancona, 60131 Ancona

In *Escherichia coli* ed in *Salmonella typhimurium* la trascrizione dei geni coinvolti sia nella sintesi *de novo* che nelle vie di recupero del NAD⁺ è sotto il controllo negativo del prodotto del gene *nadR* [1]. Oltre a svolgere la funzione di repressore, il NadR partecipa al trasporto dell'NMN attraverso la membrana citoplasmatica modulando l'attività della proteina integrale di membrana PnuC, che è una NMN permeasi [2]. Recentemente abbiamo dimostrato che il NadR è in grado di catalizzare la sintesi del NAD⁺ a partire da NMN e ATP [3]. È stato quindi ipotizzato che, in caso di carenza di NAD⁺, il NadR stimoli l'uptake dell'NMN e contemporaneamente lo converta a NAD⁺. L'attività NMN adeniltrasferasica associata al NadR è contraddistinta da una caratteristica sequenza "consensus" ([T/H]XGH), presente nella regione N-terminale della proteina, tipica di enzimi dotati di attività α - β fosfodiesterasica. Nella regione C-terminale del NadR è presente un'altra sequenza "consensus" (GXXXXGK[TS]) che caratterizza enzimi ad attività β - γ fosfodiesterasica nei confronti dell'ATP o del GTP [4]. La disponibilità della proteina ricombinante da *E.coli*, purificata ad omogeneità, ci ha consentito di dimostrare, mediante saggi in HPLC, che il NadR catalizza la rottura del legame β - γ fosfodiesterasico dell'ATP.

Tale attività ha un pH ottimale di 6,5 ed è metallo dipendente.

Esperimenti sono in corso al fine di indagare se l'idrolisi dell'ATP ad ADP e fosfato sia accoppiata ad una reazione di fosforilazione.

L'individuazione di questa nuova attività catalitica accresce l'importanza che il NadR ha nell'ambito del metabolismo cellulare del NAD⁺ e getta le basi per la formulazione di nuove ipotesi sul significato fisiologico della proteina.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Tritz, G.J., Chandler, J.L. (1973) *J. Bacteriol.*, 114, 128-136
- [2] Zhu, N., Olivera, B.M., Roth, J.R. (1991) *J. Bacteriol.*, 173, 1311-1320
- [3] Raffaelli, N., Lorenzi, T., Mariani, P.L., Emanuelli, M., Amici, A., Ruggieri, S., Magni, G. (1999) *J. Bacteriol.*, 181, 5509-5511
- [4] Moller, W., Amons, R. (1985) *FEBS*, 186, 1-6

INDICATOR-FREE ELECTROCHEMICAL DNA BIOSENSOR FOR THE DETECTION OF HYBRIDIZATION REACTION

Fausto Lucarelli, Giovanna Marrazza, Ilaria Palchetti, Marco Mascini

Università degli Studi di Firenze
Dipartimento di Chimica
Via G. Capponi 9, 50121 Firenze (Italy)
Phone: +39 055 2757274, Fax: +39 055 2476972
E-mail: mascini@unifi.it

A new approach of an indicator-free electrochemical DNA hybridisation biosensor (1,2) is applied to the detection of hybridisation reactions. The biosensor format involves the immobilisation of an inosine-substituted (guanine-free) probe onto the screen printed electrode transducers, the hybridisation reaction and the direct square wave voltammetric detection of the duplex formation through the measurement of the oxidation peak of the guanine of the target sequence.

Careful attention to the probe immobilisation conditions is crucial for minimising the guanine signal due to the non-specifically adsorbed sequences. Other relevant experimental parameters such as ionic strength, hybridisation time, the use of hybridisation accelerators were examined and optimised.

The analysis of real samples requires the amplification of genomic DNA by PCR (3). The biosensor has been applied to the detection of genetically modified organisms (GMO) and genetic polymorphisms of apolipoprotein E in human blood samples.

References

- (1) J. Wang, G. Rivas, J.R. Fernandes, J.L.L. Paz, M. Jiang, R. Waymire, *Analytica Chimica Acta*, 1998, 375, 197-203
- (2) J. Wang, A-N. Kawde, *Analytica Chimica Acta*, 2001, 431, 219-224
G. Marrazza, G. Chiti, M. Mascini, M. Anichini, *Clinical Chemistry*, 2000, 46:1, 31-37

STUDIO DEI MECCANISMI MOLECOLARI DELLA CARDIOGENESI IN CELLULE STAMINALI PLURIPOTENTI

**Margherita Maioli*#, Marina Fadda*, Emiliana Maninchedda*, Cinzia Sanna*,
Elisabetta Zinellu*, Elisabetta Serra*, Carlo Ventura*#**

**Dipartimento di Scienze Biomediche, Sezione Biochimica, Viale San Pietro 43/B 07100 Sassari*

#Laboratorio Nazionale dell'Istituto Nazionale Biostrutture e Biosistemi, 07033 Osilo (SS)

Il fattore di trascrizione GATA-4, contenente dita di zinco, e il gene omeotico Nkx-2.5 controllano l'architettura cellulare e l'organogenesi, e sono in grado di indurre cardiogenesi in cellule embrionali esposte all'agente differenziante dimetilsulfossido (DMSO).

Sono tuttavia ignoti gli attivatori endogeni di tali fattori di trascrizione. Nel presente lavoro abbiamo dimostrato che le cellule pluripotenti P19 esprimono il gene della prodinorfina, codificante per i peptidi oppioidi appartenenti alla famiglia delle dinorfine. Inoltre le cellule P19 erano in grado di sintetizzare e secernere la dinorfina B, prodotto biologicamente attivo del gene della prodinorfina. L'espressione indotta dal DMSO dei geni GATA-4 ed Nkx-2.5 era preceduta da un significativo incremento dell'espressione del gene della prodinorfina e della sintesi e secrezione della dinorfina B. L'effetto esercitato dal DMSO avveniva a livello trascrizionale.

In assenza di DMSO la dinorfina B era in grado di indurre l'espressione dei geni Nkx-2.5 e GATA-4, determinando inoltre la comparsa dei trascritti α -myosin heavy chain (MHC) e myosin light chain-2V, due markers di avvenuto differenziamento cardiaco.

In cellule P19 esposte alla dinorfina B, la comparsa di un fenotipo miocardico è stata inoltre valutata mediante immunofluorescenza ed utilizzando l' MF20, un anticorpo selettivo per MHC

In cellule P19 sottoposte a trattamento differenziante con DMSO in presenza di un antagonista dei recettori κ , o di un oligonucleotide antisense fosforotioato diretto contro il gene della prodinorfina non era possibile osservare la comparsa di un fenotipo miocardico.

Questi ultimi risultati suggeriscono che il sistema endorfinergico oggetto di studio potrebbe agire in maniera autocrina come induttore endogeno del processo di cardiogenesi.

**“FLUORESCENCE ENERGY TRANSFER” TRA RESIDUI TRIPTOFANILICI
DELL'APOMIOGLOBINA E SONDA ESTRINSECA
1,8-ANILINONAFTALENSOLFONATO**

Clorinda Malmo, Ivana Sirangelo, Mariateresa Casillo, Gaetano Irace

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

L'1,8-anilinaftalensolfonato (ANS) è una delle più comuni sonde fluorescenti impiegate nella caratterizzazione strutturale e dinamica di tasche idrofobiche presenti nelle proteine. L'impiego di questa sonda è dovuta alla sua peculiarità di essere solo debolmente fluorescente in soluzione acquosa ma di manifestare un'intensa fluorescenza in solvente apolare. È noto che l'apomioglobina è in grado di legare questo fluoroforo nel sito idrofobico della molecola deputato a contenere l'eme. L'apomioglobina è una proteina globulare ad elevato contenuto di alfa-elica. Essa è costituita dalla successione di otto eliche (A, B,...,H) riavvolte a formare il sito eminico. Solitamente l'elica A contiene due residui triptofanilici in posizione 7 e 14. In seguito al legame tra ANS ed apomioglobina, la resa quantica del fluoroforo estrinseco aumenta di circa 200 volte ed il massimo di emissione si sposta da 510 nm a 460 nm. Contemporaneamente, la fluorescenza dei residui triptofanilici diminuisce drasticamente in seguito all'instaurarsi di fenomeni di trasferimento non radiativo di energia con meccanismo di Forster, nel quale i residui triptofanilici si comportano da donatori e l'ANS da accettore.

Nella presente comunicazione è esaminata l'interazione tra ANS ed apomioglobina con lo scopo di comprendere quale dei due residui è maggiormente coinvolto nel trasferimento di energia. I risultati, ottenuti impiegando la proteina selvatica, i mutanti monotriptofanilici (W7F e W14F) ed un mutante privo di residui indolici (W7YW14F), indicano che il trasferimento di energia riguarda esclusivamente il residuo triptofanilico in posizione 14. Poiché l'efficienza del transfer dipende dalla distanza e dall'orientamento tra gruppo donatore e gruppo accettore, è ragionevole ipotizzare che, nella struttura nativa dell'apoproteina, i momenti di emissione e di eccitazione del W14 e dell'ANS siano pressoché paralleli. Analogamente, l'assenza di trasferimento tra W7 ed ANS suggerisce un orientamento prevalentemente perpendicolare dei rispettivi momenti. La combinazione di questi risultati con i dati cristallografici potrà consentire di stabilire l'orientamento del fluoroforo nel sito eminico.

CLONAGGIO ED ESPRESSIONE DI GENI DA *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* COINVOLTI NELLA SINTESI DEL NAD

Francesca Mazzola, Nadia Raffaelli, Leonardo Sorci, Adolfo Amici, Monica Emanuelli, Giulio Magni

Istituto di Biochimica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Ancona, 60131 Ancona

Tra le infezioni batteriche, la tubercolosi rappresenta la causa principale di morte oggi nel mondo a causa dell'insorgenza di ceppi di *Mycobacterium tuberculosis* multiresistenti ai principali antibiotici utilizzati. Le moderne strategie per il trattamento della tubercolosi sono tese all'identificazione di nuovi bersagli molecolari, come prerequisito allo sviluppo di nuovi farmaci ad azione antibatterica. Tali "targets" sono spesso rappresentati da enzimi-chiave del metabolismo cellulare. In particolare gli enzimi coinvolti nella biosintesi del NAD, che è una via metabolica essenziale in tutti gli organismi e presenta significative differenze tra eucarioti ed eubatteri, rappresentano dei candidati ideali. In seguito a ricerche di omologia di sequenza con proteine note, abbiamo individuato, nel genoma del *M. tuberculosis*, i geni codificanti per NadD e NadR. NadD è l'enzima nicotinato mononucleotide adeniltrasferasi (NaMNAT) che catalizza la sintesi del rispettivo dinucleotide (NaAD), reazione comune sia alla sintesi de novo sia alle vie di recupero del NAD [1]. NadR è l'unico fattore di trascrizione conosciuto nella biosintesi dei nucleotidi piridinici negli eubatteri ed è in grado di catalizzare la sintesi diretta di NAD a partire dal mononucleotide NMN [2,3]. Entrambi i geni sono stati clonati in vettori di espressione al fine di esprimere le rispettive proteine in *E. coli*. Sono stati utilizzati diversi vettori (pET-11a, pTrcHisA, pT7-7, pET-32b) e saggiate diverse condizioni di temperatura e di induzione; tuttavia entrambe le proteine ricombinanti hanno dimostrato una elevatissima tendenza alla formazione di corpi inclusi. Una parziale solubilizzazione si è ottenuta sia con la cotrasformazione con il plasmide pGROESL (contenente il gene per le ciaperonine), sia con i costrutti pET32b-*nadR* e pET-32b-*nadD* che permettono di ottenere le proteine di interesse fuse con la tireodossina. Attualmente è in corso la caratterizzazione delle proteine ricombinanti così solubilizzate. Tuttavia data la bassa resa di espressione si sta procedendo al clonaggio dei geni di interesse in vettori che permettono l'espressione delle proteine in un sistema omologo, e precisamente in *Mycobacterium smegmatis*.

1. Mehl, R.A. *et al.* 2000, J. Bacteriol. 182, 4372-4374
2. Foster, J.W. *et al.* 1990, J. Bacteriol. 172, 4187-4196
3. Raffaelli, N. *et al.* 1999, J. Bacteriol. 181, 5509-5511

PROPRIETÀ DELLE PIRIMIDINE NUCLEOTIDASI DA ERITROCITA UMANO

Valeria Naponelli, Adolfo Amici, Monica Emanuelli, Nadia Raffaelli, Giulio Magni

*Istituto di Biochimica
Facoltà di Medicina e Chirurgia
Università di Ancona 60131 Ancona.*

La maturazione degli eritrociti è accompagnata dalla degradazione dell'RNA e dal rilascio di mononucleotidi. Due pirimidine nucleotidasi (PN-I e PN-II), capaci di degradare in maniera specifica i nucleotidi pirimidinici monofosfato, sono state purificate ad omogeneità dalla frazione solubile degli eritrociti umani. La deficienza della PN-I è associata ad un'anemia emolitica non sferocitica ereditaria che viene trasmessa come carattere autosomico recessivo. La PN-I è stata da noi sottoposta a digestione sia chimica sia enzimatica: le sequenze dei peptidi ottenuti, immesse in banche dati di proteine, hanno mostrato una corrispondenza con quelle di 6 peptidi ottenuti dalla digestione della p36, una proteina prodotta in seguito ad induzione di cellule Raji con l'interferone α (1).

Il confronto delle sequenze amminoacidiche parziali della PN-I con sequenze espresse di cloni di cDNA ha permesso di ricavare l'intera sequenza codificante per la nucleotidasi. Esperimenti di amplificazione condotti su una library di placenta umana ci hanno consentito di clonare il cDNA della PN-I. La proteina codificata, che risulta essere costituita da 286 residui amminoacidici, è stata espressa in *Escherichia coli* portando alla produzione di un enzima ricombinante pienamente attivo. Abbiamo verificato nella proteina sovraespressa oltre all'attività nucleotidasica anche l'attività fosfotrasferasica già dimostrata nella proteina nativa. La sequenza della proteina ricombinante comprende sia le sequenze peptidiche determinate per la PN-I sia quelle determinate per la p36. Due antisieri di coniglio prodotti contro due peptidi ottenuti in seguito alla digestione triptica rispettivamente della p36 e della PN-I hanno riconosciuto sia la PN-I nativa sia quella ricombinante. Le proprietà molecolari delle due proteine sono essenzialmente le stesse e questo ci fa supporre che la p36 e la PN-I sono proteine identiche, sebbene il significato di tale identità sia ancora oscuro (2). Analisi effettuate in banca dati sulle sequenze ottenute in seguito a digestione con tripsina e con CNBr della PN-II hanno rivelato una elevata omologia con le sequenze sia di una nucleotidasi citosolica sia di una mitocondriale, chiamate rispettivamente dNT-1 e dNT-2 (3).

Le sequenze parziali della PN-II sono state confrontate con sequenze espresse di differenti cDNA umani presenti in banca dati. Uno dei cloni individuati è stato utilizzato per esprimere la proteina ricombinante di 201 residui in *Escherichia coli*. La PN-II ricombinante, purificata ad omogeneità, è risultata essere pienamente attiva ed ha dimostrato di essere dotata di una seconda attività catalitica cioè l'attività fosfotrasferasica, così come era stato osservato per la nucleotidasi nativa.

1. Rich SA *et al.* 1996, J Biol Chem 271, 1118-1126.
2. Amici A *et al.* 2000, Blood 96, 1596-1598.
3. Rampazzo C *et al.* 2000, J Biol Chem 275, 5409-5415.

LANGMUIR-BLODGETT FILMS OF LIPASE FOR BIOCATALYSIS

Laura Pastorino, Claudio Nicolini

*Department of Biophysical M&O Sciences and Technologies-University of Genoa,
Corso Europa 30, 16132, Genoa (Italy)
Phone: +39 010 3538541, Fax: +39 010 5299200
E-mail: laurap@ibf.unige.it*

Lipases (triacylglycerol ester hydrolases, EC 3.1.1.3) are ubiquitous enzymes that catalyze the hydrolysis of esters, especially long-chain triacylglycerols, to yield free fatty acids, di- and monoacylglycerols, and glycerol. Lipases are also capable of catalyzing the reverse reaction in anhydrous organic solvents. For this reason lipases are perceived as being one of the most important class of industrial enzymes [1]. Applications of enzymes for biocatalysis requires their immobilization in reactors in order to reduce the costs and to increase the yield of the product.

Langmuir-Blodgett (LB) and Langmuir-Schaefer (LS) techniques have been extensively investigated with respect to the fabrication of enzyme thin film for biotechnological applications [2].

Moreover the characteristic of lipases to be activated by interfaces encouraged us to apply the LB technique for the formation and the deposition of films of this enzyme.

In this work the lipase thin films were obtained by direct spreading the protein solution at the gas/liquid interface. Protein films were studied at the interface and then transferred onto a flat quartz, glass or silicon supports by means of the LS (horizontal lift) method.

The biophysical analysis, which was carried out mainly by means of circular dichroism, quartz crystal microbalance, UV-vis spectroscopy and Brewster Angle Microscopy, allowed us to study the main properties and features of such enzyme films.

The functionality of lipase in the LB films was checked by titration using olive oil as substrate. The results indicated that the catalytic activity of the enzyme not only was preserved but also increased with respect the solution.

[1] Villeneuve P. et al., Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 9, 113-148, 2000.

[2] Nicolini C., Trends in Biotechnology 15, 395-401, 1997.

IDENTIFICAZIONE DI PROTEINE NUCLEARI DIFFERENZIALMENTE ESPRESSE IN CELLULE TIROIDEE DI RATTO NORMALI (FRTL-5) E TRASFORMATE (KI-MOL) TRAMITE ANALISI PROTEOMICA

Paron Igor¹, Pines Alex², Scaloni Andrea³, Manzini Giorgio², Vetere Amedeo², Damante Giuseppe¹, Tell Gianluca²

¹*Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche - Università degli Studi di Udine*

²*Dipartimento di Biochimica, Biofisica e Chimica delle Macromolecole - Università degli Studi di Trieste*

³*IABBAM – Centro Internazionale Servizi di Spettrometria di Massa – CNR - Napoli*

L'elucidazione dei meccanismi regolativi alla base dell'espressione genica è di fondamentale importanza per la comprensione di eventi cellulari importanti quali lo sviluppo embrionale, il differenziamento cellulare o la perdita del controllo sul ciclo cellulare tipica delle cellule neoplastiche. Le proteine nucleari, tra cui i fattori di trascrizione, svolgono in maniera coordinata il ruolo chiave nella regolazione dell'espressione genica, determinando, in ultima analisi, il fenotipo di una cellula.

Negli ultimi anni sono state messe a punto numerose tecniche che permettono uno studio su larga scala di sistemi proteici complessi. L'insieme di tali tecniche, il cui utilizzo va sotto il nome di approccio proteomico, permette la risoluzione, l'identificazione, la quantificazione e la caratterizzazione di un insieme di proteine anche molto complesso, come l'insieme delle proteine espresse da una cellula in un determinato momento differenziativo.

Solo una piccola quantità delle proteine nucleari della cellula tiroidea sono state finora identificate e ancor meno si sa sul loro ruolo nel differenziamento cellulare. Il nostro studio è volto all'identificazione di proteine nucleari differenzialmente espresse tra cellule follicolari tiroidee di ratto FRTL-5 (normali) e Ki-mol (trasformate con Ki-ras).

Dall'analisi tramite elettroforesi bidimensionale (2D) degli estratti nucleari delle due linee cellulari si è proceduto all'identificazione di quegli spot proteici espressi differenzialmente e specificamente in ciascuna linea. Tali proteine, eluite direttamente da gel, sono state analizzate mediante spettrometria di massa (MALDI MS ed eventualmente tandem MS) fino ad ottenere informazioni sufficienti a caratterizzarle, in maniera univoca, tramite ricerca in banca dati.

I risultati ottenuti, oltre a dimostrare la validità dell'approccio sperimentale proposto, evidenziano nelle Ki-mol alcune proteine nucleari espresse specificamente già note per essere correlate al fenotipo trasformato in altre linee cellulari.

POLLUTANT SENSING LAYER BASED ON CYTOCHROME P450

Cristina Paternolli, Paola Ghisellini, Mirco Antonini and Claudio Nicolini

*Department of Biophysical M&O Sciences and Technologies,
University of Genova, Corso Europa 30, 16132 Genova, Italy
Tel. +390103538144, Fax +390103538346
e-mail: cristina@ibf.unige.it*

Cytochromes P450 are a large superfamily of heme-thiolate enzymes involved in the metabolism of many different organic substrates as drugs, fatty acids and toxic compounds (1).

Immobilization techniques preserving the functionality of the molecules were realized in order to use the potential properties of these enzymes in biosensors and bioelectronics (2).

The aim of the work is to realize cytochrome P450 thin films to detect pollutant atmosphere: carbon monoxide and styrene. In particular to observe the interaction between the heme group and carbon monoxide (CO) as Soret peak shift at 450nm and the index of spin state equilibrium variation to verify the presence of CO and styrene in the atmosphere, respectively (3).

Preliminary results show that the thin films obtained by spreading techniques give best response in CO detection, while to have styrene detection thin films realized by different deposition techniques were used.

Anyway, in order to realize the sensitive element as well ordered and highly stable structure, several immobilization techniques were employed. In particular Langmuir-Schaefer and alternated layers adsorption techniques were tested in order to investigate the best working conditions.

The structure stability is tested by Circular Dicroism spectra in function of the temperature.

Moreover morphological characterization of the realized nanostructures was performed by UV/Vis spectroscopy, Brewster Angle Microscopy, Cyclic Voltammetry, Nanogravimetry.

References

- (1) Gonzalez F.J., 1988, The molecular biology of cytochrome P450s. *Pharmacological Reviews* 40, 243-288.
- (2) Erokhin V., Facci P. and Nicolini C., 1995, *Two-dimensional order and protein thermal stability: high temperature preservation of structure and function.* *Biosensors & Bioelectronics* 10, 24-34.
- (3) White R.E., Coon MJ., 1980, Oxygen activation by cytochrome P450. *Annual Reviews of Biochemistry* 49, 315-356.

UNA NUOVA NMN-ADENILTRASFERASI UMANA: CLONAGGIO, ESPRESSIONE ETEROLOGA E CARATTERIZZAZIONE DELLA PROTEINA KIAA0479

Leonardo Sorci, Nadia Raffaelli, Francesca Mazzola, Adolfo Amici, Monica Emanuelli, Giulio Magni

Istituto di Biochimica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Ancona, 60131 - Ancona

Studi recenti, basati su dettagliate analisi di sequenza e strutturali, hanno messo in evidenza l'esistenza di una nuova famiglia di enzimi indicata come "famiglia delle *nucleotidil trasferasi*". L'azione catalitica di questi enzimi consiste nell'idrolisi del legame α - β fosfodiesterico di ribonucleosidi trifosfati (in particolare ATP e CTP) e trasferimento del gruppo nucleoside monofosfato (NMP) ad un substrato accettore (X) con liberazione di pirofosfato (PPi) :



Il loro comune denominatore è la presenza di una regione altamente conservata [T/H]XXH contenuta nel sito attivo e responsabile del legame al nucleoside trifosfato. Da molti anni stiamo studiando una particolare nucleotidil-trasferasi, l'NMN-adeniltrasferasi (NMN-AT) che è un enzima chiave nelle biosintesi del NAD⁺ in quanto catalizza lo step finale comune sia alla sintesi *de novo* che alle vie di recupero del dinucleotide piridinico. La reazione catalizzata dall'NMN-AT (E.C. 2.7.7.1) consiste nella conversione dell'NMN e ATP in NAD⁺ e pirofosfato. Ricerche in banca dati di sequenze proteiche comprensive della "signature" delle nucleotidil trasferasi ed omologhe a NMN-AT da varie fonti, hanno permesso di identificare una ipotetica proteina, denominata KIAA0479, espressa da un clone di cDNA di cervello umano [1]. Tale clone contiene una sequenza codificante di 924 bp corrispondente ad una proteina di 306 amminoacidi e massa molecolare di 34,296 kDa. L'elevata omologia con due NMN-AT eucariotiche, da lievito e da placenta umana, da noi identificate, clonate ed espresse [2, 3] ci ha indotto ad intraprendere uno studio di caratterizzazione delle sue proprietà molecolari e catalitiche. Il cDNA così individuato è stato impiegato per esprimere la proteina ricombinante di 346 residui in *E. coli*. Estratti di cellule di *E. coli* contenenti il plasmide ricombinante hanno rivelato la presenza di una evidente attività NMN-adeniltrasferasica. La proteina ricombinante KIAA0479, parzialmente purificata, analogamente ad altre NMN-AT da diverse fonti è attiva in un ampio intervallo di pH compreso fra 6 e 8.5, tuttavia il pH ottimale pari a 6 è significativamente più acido [2,3,4] . L'attività ottimale richiede la presenza di Mg⁺⁺ 0,5 mM, al contrario di tutte le altre NMN-AT che necessitano di concentrazioni dello ione di almeno un ordine di grandezza più elevate [3,4]. L'enzima ricombinante mostra una cinetica lineare verso l'NMN e l'ATP; i valori delle Km per l'NMN e per l'ATP sono rispettivamente di 91 mM e 0,87 mM. Queste proprietà cinetiche si discostano sensibilmente da quelle determinate per l'NMN-AT placentare le cui Km per l'NMN e l'ATP sono di 23 e 36 μ M rispettivamente [3]. Le differenze molecolari e cinetiche fino a qui riscontrate con l'NMN-AT placentare ci consentono di denominare la KIAA0479 come NMN-AT II.

1 Seki *et al.* 1997, DNA RESEARCH 4, 345-349

2 Emanuelli *et al.* 1999, FEBS letters 455, 13-17

3 Emanuelli *et al.* 2001, J Biol Chem 276, 406-412

4 Raffaelli *et al.*, 2001, Meth. Enzymol. 281-292

SELF-ASSEMBLY OF AMPHIPHILIC POLYTHIOPHENE MONOLAYERS ON HYDROFOBIC AND HYDROFILIC SUBSTRATES

Silvio Stagni[§], Riccardo Narizzano[§], Victor Erokhin[†], G. Mascetti[‡], and Claudio Nicolini[§]

[§]*Department of Biophysical M & O Sciences and Technologies, University of Genoa, Corso Europa 30, 16132 Genoa, Italy*

[†]*Polo Nazionale Bioelettronica, Via delle Testuggini, snc - Rome, Italy*

[‡]*Institute for Scientific Computing s.r.l. via Greto di Cornigliano, 6R – 16152 Genova, Italy*

Phone (+39)-(010)-3537429/ Fax 3538346,

E-mail: silvio@ibf.unige.it

Molecular structure and organization play important roles in electrical and optical properties of conjugated polymers. It is essential to understand the structure-property relationships of the conjugated polymers in order to create advanced materials with desirable properties. For this purpose Langmuir technique is the most suitable methods, as it allows to control film thickness and molecular organization [1]. Polythiophenes usually do not form stable monolayers at the air-water interface because thiophene nucleus is not sufficiently amphiphilic. Polythiophenes generally require the addition of surface active materials in order to form a stable monolayer [2]. On the other hand, mixing of conducting and insulating compounds leads to a considerable decrease of the charges mobility which results in a decrease of the conducting polymer (CP) electrical properties. The approach, suggested in this study, combines previously described techniques of the formation of thin films (LB, LS) using an amphiphilic CP. It is necessary to have a CP with amphiphilic properties in order to obtain a stable monolayer at the air-water interface. In fact the amphiphilic nature of the polymer allows it to assemble at the air-water interface forming a densely packed monolayer with highly ordered domains [3]. The amphiphilic poly(3-hexylthiophene-co-3'-acetic acid-2,5-thiophene) was prepared by chemical oxidative polymerization of 3-acetic acid thiophene (3AAT) and 3-hexylthiophene (3HT) monomers. The final structure of copolymer was determined by ¹H-NMR and FTIR spectroscopy. The difference of the resulting monolayers transferred onto hydrophobic and hydrophilic substrates was investigated by a fluorescence microscopy. Images taken by Charge Coupled Device (CCD) camera shown significant differences between the morphology of the copolymer films deposited onto hydrophilic or hydrophobic substrates. First one is irregular and contains many fractures while the second one is more regular with fewer zones of discontinuity and a large number of domains. Amphiphilic character of this polymer makes it particularly suitable for Langmuir technique allowing the formation of a densely packed monolayer at the air-water interface, which can be easily transferred onto a solid substrate with retention of the local order and a great control of the thickness, rendering this polymer as a promising material towards nanotechnological applications of CP.

References:

1. A. Ulman, An introduction to ultrathin organic films from Langmuir –Blodgett to self assembly, 1st ed., Academic press, Boston, 1991
2. S.C. Ng, X.C. Zhou, Z.K. Chen, P. Miao, H.S.O. Chan, S.F.Y. Li, and P. Fu, *Langmuir* 1998, 14, 1748
3. N. Reitzel, D.R. Greve, K. Kjaer, P.B. Howes, M. Jayaraman, S. Savoy, R.D. McCullough, J.T. McDevitt, and T. Bjornholm, *J.Am.Chem.Soc.* 2000, 122, 5788

ESPRESSIONE DEL CITOCROMO P450 2E1 NEL RENE DI RATTO DIABETICO: EFFETTI DEL TRATTAMENTO CON ANTIOSSIDANTI

D.Storage, D.Boeri, M.Maiello, C.Nicolini

Università di Genova - Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biofisiche, Mediche e Odontostomatologiche - C.so Europa 30 Genova.

In corso di diabete sono stati dimostrati sia un eccesso di produzione di radicali liberi, sia una riduzione delle capacità antiossidanti. La superfamiglia genica del Citocromo P450, monoossigenasi a funzione mista localizzata prevalentemente nel reticolo endoplasmatico e nei mitocondri, codifica per numerosi enzimi identificati in tutti i tessuti. Un'isoforma di particolare interesse in corso di diabete è il P4502E1, descritto aumentare in risposta ad un aumento dei corpi chetonici. Scopo del nostro lavoro è stato quello di verificare se il P4502E1 contribuisca allo stress ossidativo del diabete e se la sua espressione sia in rapporto con l'iperglicemia e con il trattamento antiossidante.

E' stata studiata l'espressione del CYP4502E1 (immunoblot) in reni di ratti diabetici e controlli, in dieta standard e/o supplementata con Vitamina E ed associazione di Vitamina E+C.

I dati ottenuti indicano come nei ratti diabetici insulinizzati, a 3 mesi dall'insorgenza del diabete, si assista ad un lieve incremento dell'espressione del P450, mentre dopo 6 mesi di diabete si verifichi una riduzione di circa il 15% rispetto ai controlli. L'espressione del P4502E1 nel rene di ratti diabetici insulinizzati sembra quindi essere dipendente dalla durata della malattia.

Sia il trattamento con vit. E sia l'associazione di Vit E+C ne determinano un incremento di circa il 30%, evidente già a 3 mesi. Le variazioni di espressione del CYP4502E1 correlano con l'HbA1 ($r=0.51$, $2p<0.05$) nei soggetti diabetici. Il trattamento con antiossidanti (Vit E e/o Vit E+C) sembra indurre l'espressione del P4502E1. Tale induzione ha effetti sia positivi (detossificazione di xenobiotici) sia negativi (produzione di anione superossido). Sarà quindi indispensabile individuare un sistema di protezione verso l'anione superossido per meglio trarre vantaggi dagli effetti positivi dell'attivazione del sistema enzimatico del P4502E1.

BIOREATTORI NON ISOTERMI: UNA NUOVA STRATEGIA PER LA PRODUZIONE ENZIMATICA DI ANTIBIOTICI β -LATTAMICI MEDIANTE PENICILLINA G ACILASI IMMOBILIZZATA

Travascio P., Zito E., D. Bencivenga U., D. G. Mita

*Dipartimento di Medicina Sperimentale
Via S.M. di Costantinopoli 16,
Seconda Università di Napoli,
80138 Napoli.*

*Institute of Genetics and Biophysics,
CNR
Via Marconi, 12
80125 Napoli*

Scopo della ricerca è stata la caratterizzazione della sintesi enzimatica dell'antibiotico β -lattamico cefalexina mediante la Penicillina G amilasi (PGA) immobilizzata. Tale caratterizzazione è stata effettuata in condizioni isoterme e non isoterme mediante un nuovo tipo di bioreattore.

È stata costruita una membrana catalitica in cui la PGA è stata legata covalentemente su una membrana di nylon graftata con butilmetacrilato (BMA). Esametildiammina (HMDA) e glutaraldeide (GA) sono state utilizzate rispettivamente come spaziatore ed agente legante. La sintesi enzimatica è stata condotta sotto "controllo cinetico" utilizzando il metil estere della fenilglicina (PGME) e l'acido 7-ammino-desacetossicefalosporanico (7-ADCA) come substrati. La reattività della membrana catalitica è stata studiata in condizioni isoterme in funzione del pH, della temperatura, della natura del tampone, delle concentrazioni dei due substrati ed del loro rapporto. I risultati ottenuti con l'enzima immobilizzato sono stati confrontati con quelli ottenuti in parallelo con l'enzima in fase libera. L'attività di sintesi è stata successivamente saggiata in presenza di gradienti di temperatura per mezzo di un bioreattore non isotermo.

Lo studio isotermo ha mostrato che il biocatalizzatore immobilizzato presenta una maggiore stabilità rispetto a pH alcalini ed alla temperatura, sebbene presenti una riduzione dell'affinità verso i due substrati rispetto alla forma libera. Inoltre, la sintesi catalizzata dalla PGA immobilizzata è limitata dal processo di diffusione. Queste limitazioni sono state superate operando in condizioni non isoterme, in cui si è ottenuto un recupero di affinità della PGA immobilizzata verso i suoi substrati. La produzione di cefalexina risulta aumentare linearmente con il gradiente di temperatura con un incremento medio del 30% quando la differenza di 1°C è applicata attraverso la membrana.

Questi risultati sono stati attribuiti al processo di termodialisi, che aumenta la diffusione di substrati/prodotti verso/dall'enzima. In questo modo l'enzima immobilizzato incontra una concentrazione maggiore di substrati con la conseguente diminuzione dei tempi e costi di produzione della cefalexina.

REQUIREMENT FOR *NEUROGENIN3* FOR COMMITMENT OF RETINOIC ACID-INDUCED ENDODERMIC CELLS INTO THE ENDOCRINE PANCREATIC DIFFERENTIATION PATHWAY

Amedeo Vetere, Eleonora Marsich, Gianluca Tell and Sergio Paoletti

Dept. Biochemistry, Biophysics and Macromolecular Chemistry
University of Trieste, Via L. Giorgieri 1, 34127 Trieste

The pancreas forms from two groups of cells that bud from the dorsal and ventral gut endoderm at the foregut/midgut junction on embryonic days (E) 9.5-10.5 in the mouse. During these events the differentiation into the different exocrine and endocrine cell types result from the orderly activation and extinction of a large number of transcription factors. In fact recent immunohistochemical analyses and genetic studies demonstrated that a network of transcription factors, including *Pdx1*, *Isl1*, *Pax4*, *Pax6*, *NeuroD*, *Nkx2.2*, *Hlxb9*, and *Ngn3* (1-3) are involved in the regulation of development of islet cells at different stages. In particular *Neurogenin3* (*Ngn3*), a member of a family of basic-loop-helix transcription factors involved in the determination of neural precursor cells in the neuroectoderm, have been shown to be expressed in the embryonic pancreas in an early step of the differentiation since mice lacking of this factor develop diabetes and die 1-3 days after birth. No islet of Langerhans can be found and the four islet cell types as well as endocrine precursor cells are lacking at all stage (3).

Indeed, although it is thought that the endocrine cells of the pancreas arise from a common progenitor, little is known about the molecular mechanisms that control lineage determination from pluripotent cells, and the correct sequence of activation of the transcription factors controlling the specification of pancreatic endocrine precursors remain unknown.

In this study we demonstrated that *Ngn3* is an essential factor for the commitment of endoderm cells, derived from retinoic acid differentiation of F9 pluripotent precursor, into the endocrine pancreatic differentiation pathway. In fact we shown that ectopic expression of *Ngn3* can induce expression *NeuroD* and of *Pax6* only in retinoic acid treated F9 cells but not in the undifferentiated precursors.

1) Kim, S.K. and Hebrok M. (2001) *Genes & Develop.* 15: 111-127

2) Hill M.E., Asa S.L. and Drucker D.L. (1999) *Molec. Endoc.* 13: 1474-1486

3) Gradwohl G, Dierich A., LeMeur MM. and Guillemot F. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 1607-1611

UN SISTEMA INNOVATIVO DI ANALISI PER IL MONITORAGGIO DELLA FERMENTAZIONE MALO-LATTICA

Laura Micheli, Giulia Volpe e Giuseppe Palleschi

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche
Università di Roma Tor Vergata, Via della Ricerca Scientifica, 1 - 00133 Roma
Tel. 06 7259 4423, Fax: 06 72594328
E-mail: Giuseppe.Palleschi@uniroma2.it

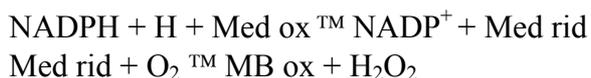
La produzione di vino con bassi livelli di acido malico è considerata un requisito per la commercializzazione di questa bevanda. Tradizionalmente, la via per ridurre la quantità di questo acido consiste nella crescita spontanea di batteri lattici, naturalmente presenti nel vino che sono responsabili della fermentazione malo-lattica (MLF). La MLF, in termini puramente chimici, consiste nella trasformazione dell'acido L-malico in acido L-lattico ed anidride carbonica. Gli aspetti più vistosi della fermentazione malo-lattica sono rappresentati da una sensibile diminuzione dell'acidità totale, da un conseguente innalzamento del pH e dalla produzione di CO₂ in quantità sufficiente a provocare effervescenza. Oltre alla deacidificazione, la MLF contribuisce al complesso aroma del vino, e gli conferisce, inoltre, un maggior grado di stabilità microbiologica. Recentemente per indurre la fermentazione malo-lattica è stata sviluppata la tecnologia delle colture "starter" che prevede l'inoculo del batterio *Oenococcus oeni* nel vino. Data l'elevata mortalità cui sono soggette le cellule batteriche (dei preparati liofilizzati commercializzati) aggiunte al vino dopo sola reidratazione, è opportuno che i preparati commerciali vengano "riattivati" adattando i batteri progressivamente al substrato in cui dovranno operare, al fine di aumentarne la sopravvivenza nel vino.

Nel corso degli ultimi anni sono stati proposti diversi protocolli di "riattivazione" per i batteri malo-lattici che prendono in considerazione anche il momento migliore per effettuare l'inoculo. Per tutte queste ragioni, che hanno come scopo finale il miglioramento della qualità organolettica dei vini, si rende necessario fornire ai vinificatori sistemi innovativi di analisi, semplici rapidi e poco costosi, per poter monitorare la fermentazione malo-lattica e stabilire così la migliore strategia per la sua induzione. A tale scopo, in questo lavoro, sono stati sviluppati biosensori per il monitoraggio della MFL, in particolare per la determinazione dell'acido lattico e dell'acido malico.

Il sensore per la determinazione dell'acido malico è stato sviluppato utilizzando l'enzima Malico che catalizza la seguente reazione:



il NADPH in presenza di un opportuno mediatore in forma ossidata (Med ox) riduce l'ossigeno molecolare presente in soluzione per formare H₂O₂. Le reazioni coinvolte sono le seguenti:



Il sensore per la determinazione dell'acido lattico è stato sviluppato utilizzando l'enzima Lattato Ossidasi che catalizza la seguente reazione:



In entrambi i casi H₂O₂ prodotta diffonde verso la superficie dell'elettrodo di platino polarizzato a +650 mV vs. Ag/AgCl generando un segnale di corrente che viene rivelato da un apposito strumento e messo in relazione alla concentrazione del metabolita.

I sensori sono stati inseriti in un sistema a flusso FIA (Flow Injection Analysis) e sono stati ottimizzati numerosi parametri quali il tipo di mediatore e la sua concentrazione, il pH dei tamponi di lavoro, la velocità di flusso, la concentrazione di NADP⁺ etc.

Per verificare l'efficacia dei sistemi sviluppati sulla matrice vino, soluzioni standard di acido malico e lattico sono state addizionate a campioni di vino, i quali, dopo opportuna diluizione, sono stati iniettati nei relativi sistemi ed analizzati. Il recupero ottenuto era compreso tra il 95 ed il 100% per l'acido malico e tra il 96 ed il 102% per l'acido lattico.

I sensori realizzati sono stati, infine, impiegati per monitorare micro-fermentazioni malo-lattiche, utilizzando preparati liofilizzati di *Oenococcus oeni* e seguendo un definito protocollo di riattivazione in vino.

I risultati ottenuti verranno presentati e discussi.

BIOSUPERFICI PER LO STUDIO DEL FATTORE DI FORMA E DELL'ORIENTAMENTO SPAZIALE DI BIOMOLECOLE TRAMITE MICROSCOPIA A FORZA ATOMICA

Lucio Zennaro e Silvia Bortoluzzi

*Università Padova, Dipartimento di Chimica Biologica
e-mail: zennaro@civ.bio.unipd.it, silvibor@civ.bio.unipd.it*

Molte funzioni cruciali per la vita cellulare sono strettamente connesse alla struttura delle biomolecole coinvolte. Ciò spiega l'accresciuto interesse in questi ultimi anni per la comprensione della correlazione tra struttura e funzione di una biomolecola. In queste indagini sono coinvolte differenti metodiche analitiche, che spaziano dalla cristallografia a raggi X all' NMR, alle tecniche di microscopia elettronica SEM e TEM. In molti casi, però, per comprendere alcune proprietà ed alcuni aspetti della funzione di una biomolecola può essere sufficiente conoscerne il fattore di forma e le dimensioni, e non necessariamente la sua struttura atomica dettagliata. La Microscopia a Forza Atomica (AFM) consente di ottenere immagini tridimensionali di biomolecole in ambiente fisiologico, coniugando rapidità d'indagine a semplicità di preparazione del campione. Tale metodica consente di ottenere "bioimmagini", cioè visualizzazioni dirette della forma, delle dimensioni, della disposizione e dell'orientamento spaziale di molecole d'interesse biologico. Questa prerogativa non è esclusiva dell'AFM, ma questa è l'unica microscopia che permette di operare senza modifiche irreversibili del campione, in ambiente fisiologico, in tempi brevi e con estrema sensibilità. Buone immagini AFM possono essere ottenute solo se la biomolecola è opportunamente ancorata ad una superficie piana. L'immobilizzazione di biomolecole su superfici è un' area di ricerca molto attiva: le strategie perseguite prevedono in genere l'introduzione di gruppi reattivi sulla superficie stessa in grado di formare legami covalenti con la biomolecola. Infatti, l'adsorbimento fisico delle biomolecole alla superficie, pur se facilmente realizzabile, non è un processo controllabile e porta facilmente alla denaturazione delle biomolecole stesse per interazione col supporto; ad esso quindi si preferisce un legame specifico biomolecola-superficie, che sia stabile nel tempo, che garantisca il mantenimento della conformazione molecolare e che sia controllabile modulando le condizioni di reazione. L'ottenimento di adeguate "biosuperfici", cioè di supporti estremamente piatti e chimicamente suscettibili all'interazione con specifiche biomolecole, costituisce un problema biotecnologico che si configura come il prerequisito fondamentale per lo studio mediante AFM delle caratteristiche strutturali e morfologiche delle molecole biologiche stesse.

A tal fine è stato depositato un film sottile d'oro, mediante la tecnica di gold sputtering, su supporti di vetro silanizzato. Lo spessore dello strato metallico depositato in funzione del tempo di sputtering è stato verificato tramite AFM, mentre la stabilità dello strato d'oro nelle condizioni sperimentali normalmente impiegate per la immobilizzazione di biomolecole è stata confermata tramite indagini con microscopia ottica. Su questi supporti sono stati quindi costruiti dei self assembling monolayers (SAMs) di tioli organici, contenenti gruppi S-H o S-S, su cui immobilizzare in modo controllato e specifico delle biomolecole. La versatilità di tali SAMs come biosuperfici è da ricondurre alla possibilità di creare monostrati autoassemblanti misti, cioè a due o più componenti, in cui almeno uno dei componenti contenga un gruppo funzionale utilizzabile per promuovere interazioni specifiche con biomolecole presenti in soluzione. Come componente caratterizzante della biosuperficie è stata utilizzata la biotina, una piccola molecola organica del peso pari a 244 Dalton che, inserita tramite legame covalente in una molecola biologicamente attiva, non ne altera l'attività biologica. Sono stati preparati SAMs misti di acido 3-mercaptopropionico e di una biotina modificata contenente un gruppo S-S, a diversi rapporti di concentrazione relativa per ottenere una biosuperficie con un numero controllato di molecole di biotina, cioè di siti di ancoraggio specifici per l'immobilizzazione successiva della Streptavidina.

Successivamente si è verificata la formazione del complesso biotina–streptavidina, complesso comunemente utilizzato in biochimica ed in molti ambiti immunodiagnostici per la sua elevata specificità e stabilità in diverse condizioni sperimentali. Utilizzando soluzioni a concentrazione variabile di streptavidina è stato dimostrato come il numero di molecole di proteina fissate alla biosuperficie dipenda direttamente dal numero di molecole di biotina inserite nel SAM misto.

Il supporto così ottenuto, costituito da superfici silanizzate e dorate ed attivate mediante l'impiego di SAMs a reattività "controllata", può essere proficuamente impiegato per l'immobilizzazione di biomolecole che possono essere visualizzate tramite la Microscopia a Forza Atomica a livello di singola molecola.