

CONSORZIO INTERUNIVERSITARIO

***Istituto Nazionale
Biostrutture e Biosistemi***

V CONVEGNO NAZIONALE

CATANIA, 3-5 OTTOBRE 2002

**AULA MAGNA – DIPARTIMENTO DI MATEMATICA E INFORMATICA
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA
VIALE ANDREA DORIA, 6
CATANIA**

V CONVEGNO NAZIONALE I.N.B.B.

<i>Comitato Scientifico</i>

Prof. Damiano Gustavo Mita

Prof. Antonio Cambria

Prof. Carlo Di Benedetta

Prof. Anna Maria Giuffrida Stella

Prof. Paolo Madeddu

<i>Comitato Organizzatore</i>

Prof. Damiano Gustavo Mita

Dott. Paolo Occhialini

Sig.ra Lucia Occhioni

<i>Segreteria Organizzativa</i>
--

I.N.B.B.

Viale delle Medaglie D'Oro, 305

00136 Roma

Tel 06/35340153 Fax. 06/35451637

inbbamm@inbb.it

ORGANI DEL CONSORZIO I.N.B.B.

Presidente INBB

Prof. Damiano Gustavo Mita

Direttore INBB

Dott. Paolo Occhialini

Consiglio Direttivo INBB

Prof. Ivano Bertini

Prof. Maurizio Brunori

Prof. Antonio Cambria

Prof. Alberto Cangiano

Prof.ssa Rita Casadio

Prof. Claudio Cobelli

Prof. Carlo Di Benedetta

Prof. Ferruccio Fazio

Prof. Carlo Frediani

Prof. Leonardo Gaspa

Prof. Gaetano Irace

Prof. Giulio Magni

Prof. Francesco Mauro

Prof. Damiano Gustavo Mita

Prof. Claudio Nicolini

Dott. Paolo Occhialini

Prof. Riccardo Pierantoni

Prof. Adelio Rigo

Prof. Giuseppe Rotilio

Prof. Vittorio Tomasi

Prof. Paolo Viglino

Giunta Esecutiva INBB

Prof. Claudio Cobelli

Prof. Ferruccio Fazio

Prof. Damiano Gustavo Mita

Prof. Claudio Nicolini

Dott. Paolo Occhialini

Prof. Riccardo Pierantoni

Prof. Vittorio Tomasi

Prof. Giuseppe Rotilio

Laboratorio Nazionale

Direttore

Prof. Leonardo Gaspa

Resp. Sez. Tec. Biomediche

e Terapia Genica

Prof. Paolo Madeddu

Resp. Sez. Biologia Cellulare

Prof. Carlo Ventura

Collegio dei Revisori

Dott.ssa Liana Meucci

Dott.ssa Daniela Procaccia

Dott.ssa Marina Tesauero

INDICE

<i>Programma V Convegno Nazionale</i>	<i>Pag. 5</i>
<i>Relazione introduttiva del Presidente Prof. D.G. Mita</i>	<i>Pag. 7</i>
<i>Abstract comunicazioni</i>	<i>Pag. 11</i>
<i>Abstract poster</i>	<i>Pag. 55</i>
<i>Unità di Ricerca INBB</i>	<i>Pag. 115</i>

V CONVEGNO NAZIONALE I.N.B.B.
Programma

GIOVEDÌ 3 OTTOBRE 2002

h. 14,30 Registrazione dei partecipanti

h. 16,00 Apertura dei lavori:

PROF. FERDINANDO LATTERI (*Rettore Università degli Studi di Catania*)

PROF. UMBERTO SCAPAGNINI (*Sindaco della Città di Catania*)

ON.LE NELLO MUSUMECI (*Presidente Prov. Catania*)

Saluto dei Presidi:

PROF. RENATO PUCCI (*Facoltà Scienze MFN*)

PROF. GIUSEPPE RONSISVALLE (*Facoltà Farmacia*)

PROF. AGOSTINO SERRA (*Facoltà Medicina e Chirurgia*)

h. 16,45 Introduzione:

PROF. DAMIANO GUSTAVO MITA (*Presidente I.N.B.B.*)

h. 17,30 1° Tavola Rotonda

“Priorità del Sistema Ricerca Nazionale: obiettivi e risorse finanziarie del PNR”

Partecipano:

PROF. GIANNI FABRI (*Comm. FIRB MIUR*)

PROF. VINCENZO LUNGAGNANI (*Rapp. Assobiotech*)

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

PROF. CLAUDIO NICOLINI (*Pres. Polo Naz. Bioelettronica*)

PROF. UMBERTO SCAPAGNINI (*Europarlamentare*)

DOTT. SALVO COFFA (*ST Microelectronics*)

DOTT. PAOLO SASSETTI (*Esperto di Venture Capital*)

Conclude:

ON. STEFANO CALDORO (*Sottosegretario MIUR*)

VENERDÌ 4 OTTOBRE 2002

h. 09,15 **Sessione “Biosistemi e Bioregolazioni”**

Chairman: PROF.SSA MARIA SVELTO

Comunicazioni scientifiche

1. **Prof. Fabio Benfenati** “Interazioni proteina-proteina coinvolte nel controllo del rilascio di neurotrasmettitore”
2. **Prof. Antonio Contestabile** “Role of the trascription factor, creb, in the survival promoted by activation of NMDA receptor in cerebellar granule cells and by nitric oxide in the same neurons and in neuroblastoma cells.”
3. **Prof. Egidio D’Angelo**
4. **Prof. Antonio Frigeri** “Interferenza dell’RNA: un nuovo metodo per lo studio del ruolo dell’acquaporina-4 negli astrociti di mammifero e nell’edema cerebrale”
5. **Dott.ssa Annalisa Nicotra** “Clonaggio ed analisi dell’espressione della CX39, un nuovo membro della famiglia multigenica delle connesine”

h. 11,30 **Sessione “Biotecnologie”**

Chairman e PROF. MARIO DE ROSA

Comunicazioni scientifiche

1. **Prof.ssa Donatella Barra** “An amphibian antimicrobial peptide expressed in nicotiana tabacum confers resistance against bacteria and fungi”
2. **Prof.ssa Marilena Cipollaro** “Riparo enzimatico e ‘real time’ per lo studio del DNA antico”
3. **Prof. Marco Mascini** “DNA Biosensors for enviromental monitoring”
4. **Prof. Mosé Rossi** “Recenti progressi sulla biologia molecolare degli ipertermofili”

h. 15,00 **Sessione “Neuroscienze”**

Chairman: PROF. PIERGIORGIO STRATA

Comunicazioni scientifiche

1. **Prof. Piero Paolo Battaglini** “Dynamics of the fronto-parietal network for reaching movements in humans : an EEG approach”
2. **Prof. Pietro Enrico Di Prampero** “La massima potenza muscolare “esplosiva” degli arti inferiori di astronautici dopo volo spaziale prolungato”
3. **Prof. Massimo Matelli** “Trasformazioni sensori-motorie nei primati: basi anatomiche”

4. **Prof. Vincenzo Perciavalle** “Rappresentazione neurale asimmetrica della posizione dell’arto anteriore nella corteccia paleocerebellare e nel nucleo interposto del ratto”

h. 17,00 2° Tavola Rotonda

“La valutazione nel sistema università-ricerca del Paese”

Partecipano:

PROF. CESARE BALDUINI (*Comm. Garanti PRIN*)
PROF. CARLO CALANDRA (*Comm. Naz. Valutazione*)
PROF. ENRICO RIZZARELLI (*Comm. Naz. Riforma Univ.*)
PROF. ARMIDO RUBINO (*Presid. Comm. Garanti PRIN*)
PROF. PIERGIORGIO STRATA (*Univ. Torino*)

h. 18,30 Chiusura dei lavori della giornata

SABATO 5 OTTOBRE 2002

h. 9,15 **Sessione “Biomeccolecole”**

Chairman: PROF. ENRICO RIZZARELLI

Comunicazioni scientifiche

1. **Prof. Umberto Benatti** “Gli acidi peptidil nucleici modificati come potenziali farmaci antinfiammatori”
2. **Prof.ssa Maria Rosa Ciriolo** “Modulazione dello stato redox intracellulare ed induzione della morte cellulare programmata da parte del glutathione disolfuro”
3. **Prof. Lorenzo Pinna** “Enzimologia molecolare della protein chinasi CK2: un esempio di stachanovismo catalitico”
4. **Prof. Pietro Pucci** “Strategie di proteomica per l’analisi conformazionale di proteine”

h. 11,15 **Sessione “Biostrumentazione e Bioelettronica”**

Chairman: PROF. CLAUDIO NICOLINI

Comunicazioni scientifiche

1. **Prof. Ermanno Di Zitti** “Fabbricazione di strutture nanoelettroniche mediante superreticoli di nanoparticelle di oro tiolate”
2. **Prof. Luigi Fortuna** “Non linear circuits for the analysis of DNA microarrays”
3. **Prof. Carmelina Ruggiero** “Nanobioscience: foundation and applications”
4. **Prof. Bruno Samori** “Stretching single molecules with the scanning force microscope”

h. 15,00 **Sessione “Cellule.”**

Chairman: PROF. EDON MELLONI – PROF. CESARE BALDUINI

Comunicazioni scientifiche

1. **Prof. Giovanni Antonini** “Attività citoprotettiva della ovotransferrina”
2. **Prof. Bruno Giardina** “Ciclo di ossigenazione-desossigenazione dell’Hb e modulazione metabolica dell’eritrocita: studi funzionali e computazionali”
3. **Prof. Giorgio Lenaz** “The mitochondrial production of oxygen radical species and the role of coenzyme Q as an antioxidant”
4. **Prof. Giulio Magni** “NMN Adenyltransferase: a key enzyme in nad homeostasis”

h. 17,00 **Sessione “Unità Funzionali Biologiche Supramolecolari”**

Chairman: PROF.SSA RITA CASADIO

Comunicazioni scientifiche

1. **Dott.ssa Maria Luisa Di Paolo** “Fattori fisici che modulano la funzione delle ammino ossidasi”
2. **Dott. Piero Fariselli** “Interactomica in silicio: predizione di interazioni tra proteine in etero-complessi con reti neurali”
3. **Prof. Neri Niccolai** “Una nuova dimensione della biologia strutturale: studi dell’accessibilità delle superfici proteiche”
4. **Prof. Isidoro Pepe** “Energetica della fototrasduzione: attività miocinasica nei dischi dei bastoncelli della retina”

h. 19,00 Chiusura del Convegno

RELAZIONE INTRODUTTIVA

Prof. Damiano Gustavo Mita

Il mondo accademico e quello della ricerca del nostro Paese vivono ormai da anni in acque particolarmente agitate per l'adozione di scelte politiche con scarsa partecipazione e condivisione collettiva degli attori interessati, tutte in un contesto di costante e progressiva diminuzione delle risorse finanziarie. Ormai siamo notoriamente al di sotto dell'1% del PIL di risorse complessive per R&S, quando nel '93 eravamo all'1,3%, inutile tentare paragoni con quanto investito in R&S dagli altri paesi industrialmente avanzati: ne usciremmo profondamente mortificati.

Con puntuale frequenza trapelano notizie, spesso contrastanti, di nuove riforme degli studi universitari e di riorganizzazione dell'attività degli Enti di Ricerca. La comunità scientifico-accademica appare spesso frastornata e poco reattiva, incapace di determinare gli eventi politico-istituzionali che ne influiscono così pesantemente l'attività. La tavola rotonda prevista in questa giornata inaugurale del V Convegno Nazionale discuterà della situazione odierna in relazione alle priorità dettate dalle recenti Linee guida per la politica scientifica e tecnologica del Governo (deliberate dal CIPE il 19/4 u.s.) e dalle relative risorse finanziarie previste dalla approvanda Legge Finanziaria del 2003.

Tali linee guida prevedono che l'azione del Governo si sviluppi su 5 assi strategici: 1) sostegno alla Ricerca di Base; 2) supporto alla ricerca su tecnologie chiave a carattere multisettoriale; 3) potenziamento delle attività di ricerca industriale al fine di aumentare la capacità del sistema produttivo italiano nel trasformare le nuove conoscenze in maggior valore aggiunto; 4) promozione delle capacità di innovazione nei processi e nei prodotti da parte delle PMI valorizzando sinergie a livello territoriali; 5) promozione del sistema di rete delle grandi infrastrutture e dei processi di internazionalizzazione dell'attività di ricerca. Per questi obiettivi il Governo, compatibilmente con gli equilibri di finanza pubblica, intende aumentare i finanziamenti assegnati al sistema pubblico di ricerca, nel prossimo quadriennio, dall'attuale 0,6% all'1% del PIL.

A fronte di tali lodevoli propositi, che però aspettiamo di veder concretizzati nella finanziaria del prossimo anno, dobbiamo evidenziare come anche il nostro Consorzio Interuniversitario possa risentire di questa situazione con le difficoltà che dovrà superare per continuare a sviluppare la sua azione che qui di seguito vengo a presentare.

* * * *

A circa 10 anni dall'atto di Costituzione dell'INBB (27/1/93), a circa 7 anni dal riconoscimento formale da parte del Ministero Vigilante (11/12/95), e a circa 4 anni dall'inizio del mio mandato, colgo l'occasione della presentazione delle attività degli aderenti al Consorzio e dei lavori del V Convegno Nazionale per sviluppare alcune considerazioni su quanto realizzato, a partire dalla mia nomina e con particolare riferimento agli ultimi due anni, ossia dalla relazione del IV Convegno Nazionale in Roma. Un cenno sarà rivolto anche alle prospettive future, considerando soprattutto le esperienze maturate in questi anni.

1) Risultati di carattere generale:

Dal punto di vista operativo gli eventi più significativi sono stati:

- 1- le modifiche di statuto;
- 2- l'aumento del numero delle Università consorziate;
- 3- la decisione di far proseguire la vita dell'INBB;
- 4- la stipula convenzioni quadro con Enti di Ricerca.

1.1 Statuto

Il nuovo statuto, consultabile presso il nostro sito www.inbb.it, è stato reso più snello e meno farraginoso. Tra le principali modifiche apportate ricordiamo: i) la nuova sede legale coincidente con la sede operativa; ii) la non eleggibilità del Presidente dopo il secondo mandato; iii) l'organizzazione degli aderenti in settori (di ricerca) costituiti non in base ai settori scientifico-disciplinari, ma in base alle attività di ricerca svolte ed identificati da specifiche declaratorie. Operativamente questa riorganizzazione è tuttora in corso.

1.2 Università consorziate

Il numero delle Università consorziate è aumentato gradualmente, ma costantemente; ora siamo giunti a 24 Università, con la recente adesione dell'Università di Milano "Bicocca". Attualmente sono in corso le pratiche per l'adesione degli atenei di Trieste e di Cagliari.

1.3 Proseguo della vita del Consorzio

Secondo lo Statuto il Consorzio poteva essere sciolto dopo 10 anni dalla sua istituzione (ossia al 26/1/2003), salvo diversa delibera del Consiglio Direttivo. Il Consiglio Direttivo, nella seduta del 27 febbraio u.s., ha deliberato la prosecuzione dell'attività per altri 10 anni.

1.4 Convenzioni quadro

Sono state stipulate Convenzioni quadro con l'Istituto Superiore per la Prevenzione e la Sicurezza sul Lavoro (ISPESL) e con il Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR). Riferiremo a parte su questo punto.

2) Attività svolta

2.1 Attività di ricerca

Oltre all'attività di ricerca svolta istituzionalmente con i fondi ottenuti attraverso le proprie strutture, numerose nostre Unità di Ricerca hanno utilizzato le strutture INBB per accedere a fondi di finanziamento. Non ci sono stati bandi del nostro Ministero vigilante, sia nell'ambito del Fondo Integrativo Speciale per la Ricerca (FISR), che del Fondo per gli Investimenti della Ricerca di Base (FIRB) o del Programma Operativo Nazionale (PON), in cui Unità Operative INBB non abbiano partecipato sia come singole Unità che come soggetti coordinatori. Numerose applicazioni sono state anche presentate presso altre fonti di finanziamento come il Ministero della Salute (Fondi dell'1% per la Ricerca Finalizzata), l'ISPESL ed il CNR. A fronte delle numerose domande presentate e dei finanziamenti ottenuti, con un trend di tipo esponenziale, cosa che riempie di soddisfazione gli organi direttivi dell'INBB, devo comunque segnalare una certa inerzia degli aderenti nel prendere iniziative autonome da far risalire all'INBB. Nonostante i numerosi solleciti ad organizzarsi in cordate per le richieste di finanziamento e nonostante le tempestive comunicazioni circa i bandi e i loro contenuti, i risultati raggiunti sono dovuti in larga parte alla dinamicità e all'impegno del Direttore e all'iniziativa incessante delle Sezioni del Laboratorio Nazionale di Osilo.

Un sentito ringraziamento ed un plauso convinto ai colleghi aderenti che sono riusciti, come Unità di Ricerca INBB, ad ottenere finanziamenti dal settore privato.

Ma non solo sullo scenario nazionale l'INBB ha fatto sentire la sua voce. Particolarmente attiva in campo internazionale è stata l'attività della Sezione del Laboratorio Nazionale diretta dal Prof. Paolo Madeddu, che ha ottenuto notevoli finanziamenti dalla Juvenile Diabetes Foundation (New York), un significativo contributo per borse di studio dalla Comunità Europea (Marie Curie Fellowship) e recentemente un prestigioso grant dalla European Diabetes Foundation/Servier.

Posta a 100 l'entità dei finanziamenti nel 2002 (comprensiva di quelli già formalmente deliberati, ma ancora non attribuiti, con un bilancio che si avvicinerà a 1,4 milioni di Euro), si può apprezzare la progressione dei finanziamenti: 11% nel 1999, 64% nel 2000, 91% nel 2001.

Come ebbi modo di riferire a Roma, per un definitivo decollo del Consorzio è importante consolidare "il volano" che permetta all'INBB di assumere impegni economici nell'interesse di ancora maggiori Unità di Ricerca. Quando questa politica, di cui solo gli aderenti possono essere i protagonisti, sarà pienamente compresa ed attuata, solo allora l'INBB potrà considerarsi veramente decollato.

2.2 Politica di formazione

Uno dei fiori all'occhiello dell'attività dell'INBB è l'attenzione sempre maggiore verso la formazione di giovani leve di ricercatori. A tal proposito basta ricordare il numero di borse di studio concesse per attività di ricerca, per la partecipazione a scuole, workshop e convegni. Queste borse sono state 67 nel 1999, 71 nel 2000, 74 nel 2001 e 76 nel 2002.

Questa attività è stata particolarmente apprezzata dal Ministero vigilante che del capitolo formazione ha fatto uno dei parametri principali per giudicare l'attività dei Consorzi Interuniversitari.

Comunque, indipendentemente dalla politica del Ministero, questa attività ha dato i suoi frutti non solo a livello nazionale (molti nostri borsisti sono diventati assegnisti o ricercatori), ma ha ottenuto prestigiosi riconoscimenti anche a livello internazionale. A tale proposito è emblematico il risultato del Dott. Pier Luigi Martelli, borsista INBB nel 2001, dell'Unità della Prof.ssa Casadio, che pochi giorni fa ha ottenuto in Canada, al Convegno Internazionale su "Intelligent Systems for Molecular Biology", il premio 2002 per il miglior lavoro presentato. Questo Congresso è organizzato annualmente dalla International Society of Computational Biology ed il lavoro di Martelli faceva parte dei 41 selezionati per la presentazione orale, su 207 sottomessi.

2.3 Accordi stipulati

Come già accennato, nell'ultimo anno l'INBB ha stipulato Convenzioni-quadro con l'ISPESL e con il CNR, finalizzate alla elaborazione ed attuazione di programmi di ricerca comuni, alla individuazione di tematiche di reciproco interesse ed allo scambio bidirezionale di personale e di servizi. Apposite commissioni inizieranno a lavorare quanto prima per definire alcune priorità per il futuro.

Numerose altre convenzioni o accordi di collaborazione sono stati stipulati con industrie private, nonché con Dipartimenti universitari, tutte finalizzate allo svolgimento di specifici progetti di ricerca.

3) Prospettive future

Parlare di prospettive future è sempre difficile ed impegnativo, soprattutto quando si vuole che queste non rimangano sogni "nel cassetto", cosa sempre possibile quando la loro attuazione non dipende esclusivamente dalla volontà di chi le propone. Tra le principali prospettive individuate dall'INBB elenchiamo: a) la mai sopita propensione a trasformare il Consorzio in Istituto Nazionale; b) la costituzione sul territorio di nuove sezioni tematiche del Laboratorio Nazionale; c) la formulazione di un piano triennale di sviluppo; d) la diversificazione dei servizi del Consorzio agli aderenti.

3.1 Trasformazione del Consorzio in Istituto

Questa operazione costituisce da sempre uno degli obiettivi prioritari del Consorzio (come testimonia la nostra denominazione), anche se la realizzabilità ed i tempi relativi non sono affatto prevedibili. Nel difficile quadro di riferimento delineato a grandi linee all'inizio di questa mia relazione, la creazione di un nuovo Istituto Nazionale, proprio nel momento in cui viene ipotizzata la soppressione di alcuni Enti Nazionali di ricerca esistenti, sembra

un'impresa titanica. Nonostante questa difficoltà, gli organi direttivi del nostro Consorzio continueranno ad operare in questa direzione, cercando di costruire le condizioni favorevoli per un obiettivo del genere, utilizzando tutte le opportunità ed agendo possibilmente di concerto con altri Consorzi organizzati su tematiche biologiche/biotecnologiche/mediche.

3.2 Costituzione di nuove sedi del Laboratorio Nazionale

Si intende approfondire nei prossimi anni un notevole impegno nella creazione di laboratori tematici, quali sezioni del Laboratorio Nazionale, in quelle sedi dove ci saranno le condizioni per operazioni di questo tipo, con attenzione particolare nelle Regioni dell'Obiettivo 1. Le condizioni essenziali sono quelle già indicate in passato: a) disponibilità di locali ad hoc per l'INBB ad uso gratuito (differenti da quelli universitari in uso istituzionale alle Unità proponenti); b) presenza di finanziamento di programmi e/o progetti di ricerca pluriennali che possano garantire il funzionamento autonomo delle strutture. Solo in tale contesto potranno essere valutate iniziative che il "volano" dell'INBB potrebbe contribuire a rafforzare.

3.3 Piano triennale di sviluppo

Questo obiettivo, che d'ora in poi dovrà costituire una tappa fissa del nostro Consorzio, è tutto dipendente dalla nostra volontà collettiva di aderenti e sembrerebbe il più immediato da poter realizzare. Colgo l'occasione per chiedere ufficialmente la vostra collaborazione. Chiunque sia interessato a contribuire alla stesura del piano triennale, non deve far altro che comunicarcelo: mi auguro che il prossimo anno ne veda l'adozione.

3.4 La diversificazione dei servizi per gli aderenti

La diversificazione dei servizi agli aderenti da parte del Consorzio dovrà essere orientata specialmente nelle seguenti tre direzioni: 1) ampliamento delle attività a livello internazionale, e più specificamente europeo, partecipando ai bandi del VI Programma Quadro; 2) attività di trasferimento tecnologico verso il mercato delle ricerche più promettenti, anche sostenendo investimenti volti alla garanzia della proprietà intellettuale e iniziative di marketing tecnologico; 3) forme più innovative di sostegno finanziario (ad esempio: venture capital) per le attività più avanzate di ricerca applicata e sviluppo precompetitivo del Laboratorio Nazionale e di alcune Unità di Ricerca finalizzate a prodotti innovativi.

4) Ringraziamenti

Al termine di questa introduzione/relazione sento il dovere di ringraziare tutti coloro che hanno contribuito all'organizzazione del Convegno Nazionale di Catania ed alla edizione del volume dell'attività del Consorzio e dei lavori del Convegno.

Ringrazio la Segreteria dell'INBB (Lucia Occhioni e Cristiana Citton) ed il Comitato Scientifico Promotore (Prof. Antonio Cambria, Prof. Federico Cicirata, Prof. Carlo Di Benedetta, Prof.ssa Anna Maria Giuffrida Stella, Prof. Paolo Madeddu). Ringrazio anche Voi per il tempo dedicato a leggermi. Ad maiora per l'INBB.

ABSTRACT

DELLE COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE

Sessione di Biosistemi e Bioregolazioni

INTERAZIONI PROTEINA-PROTEINA COINVOLTE NEL CONTROLLO DEL RILASCIO DI NEUROTRASMETTITORE

Silvia Giovedì, Rosaria Ferrari, Franco Onofri, Anna Fassio e Fabio Benfenati

DIPARTIMENTO DI MEDICINA SPERIMENTALE, SEZIONE DI FISIOLOGIA UMANA, UNIVERSITÀ DI GENOVA, VIALE BENEDETTO XV, 3, 16132 GENOVA.

Le sinapsine costituiscono una famiglia di fosfoproteine neuronali associate alle vescicole sinaptiche, di primaria importanza nella regolazione del rilascio di neurotrasmettitore. Anche se il principale ruolo delle sinapsine è quello di regolare la formazione e il mantenimento di un vasto pool di riserva di vescicole sinaptiche e la plasticità sinaptica a breve termine (Benfenati et al., 1992; Greengard et al., 1993), recenti studi biochimici e fisiologici suggeriscono un loro coinvolgimento in fasi più tardive del processo di neuroesocitosi (Humeau et al., 2001). Con lo scopo di identificare specifiche interazioni tra sinapsine e altre proteine delle terminazioni nervose, abbiamo utilizzato una library di peptidi esposti sulla superficie di batteriofagi filamentosi (Vaccaro et al., 1997) per selezionare sequenze peptidiche leganti la sinapsina I con elevata affinità. I peptidi corrispondenti ai cloni fagici più reattivi sono stati sintetizzati chimicamente e sono stati ottenuti anticorpi policlonali anti-peptide purificati per affinità. Gli anticorpi sono stati analizzati per la loro capacità di riconoscere specifiche bande proteiche in immunoblots di frazioni subcellulari di cervello di ratto. Quelli prodotti contro il peptide YQYIETSMQ (syn21) hanno riconosciuto una proteina specifica delle vescicole sinaptiche del peso di 25 kDa. La proteina di 25 kDa comigra con Rab3, una proteina G associata alle vescicole sinaptiche che riveste un ruolo importante nel processo di esocitosi. Esperimenti di immunoblotting e separazione mediante elettroforesi bidimensionale hanno dimostrato che la proteina di 25 kDa corrisponde a Rab3 ed ha un'identica distribuzione subcellulare di Rab3 endogena. Un'interazione tra la sinapsina I e Rab3 è stata anche dimostrata da esperimenti di marcatura per fotoaffinità e mediante coprecipitazione della sinapsina I da un estratto di sinaptosomi con Rab3 ricombinante. Mediante l'utilizzo di mutanti troncati della regione COOH-terminale della sinapsina I e di forme mutate della proteina Rab3 si è inoltre osservato che l'interazione coinvolge la regione COOH-terminale della sinapsina I e il dominio effettore di Rab3. Questa interazione viene marcatamente diminuita da un eccesso di Rabphilin3, una delle principali proteine effettrici di Rab. Il legame della sinapsina I a Rab3 ricombinante è saturabile ed in grado di modulare sia l'attività GTPasica di Rab3 che lo scambio GDP/GTP. L'interazione con la sinapsina I stimola l'attività GTPasica di Rab3 sia nella forma purificata che nella forma associata alle vescicole sinaptiche in maniera dose-dipendente e ne stimola l'associazione con il GTP. La presenza di sinapsina I associata alla membrana delle vescicole sinaptiche previene inoltre la dissociazione di GDP-Rab3 in presenza di RabGDI. Questi risultati suggeriscono che la sinapsina I possa agire come un modulatore endogeno dell'attività di Rab3 e del suo stato di associazione alle vescicole sinaptiche, influenzandone la traslocazione che si verifica durante il ciclo eso-endocitotico delle vescicole e modulandone l'effetto inibitorio sugli eventi di fusione delle vescicole sinaptiche pronte per l'esocitosi.

Benfenati F., Valtorta F., Chieragatti E., Greengard P. (1992) Interaction of free and synaptic vesicle-bound synapsin I with F-actin. *Neuron* 8: 377-386.

Greengard P., Valtorta F., Czernik A.J., Benfenati F. (1993) Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function. *Science* 259: 780-785.

Vaccaro P., Dente L., Onofri F., Zucconi A., Martinelli S., Valtorta F., Greengard P., Cesareni G., Benfenati F. (1997) Anti-synapsin monoclonal antibodies: epitope mapping and inhibitory effects on phosphorylation and Grb2 binding. *Mol. Brain Res.* 52: 1-16.

Humeau F., Doussau F., Vitiello P., Greengard P., Benfenati F., Poulain B. (2001) Synapsin controls both transition between multiple synaptic vesicle stores during short-term plasticity. *J. Neurosci.* 21: 4195-4206.

ROLE OF THE TRANSCRIPTION FACTOR, CREB, IN THE SURVIVAL PROMOTED BY ACTIVATION OF NMDA RECEPTOR IN CEREBELLAR GRANULE CELLS AND BY NITRIC OXIDE IN THE SAME NEURONS AND IN NEUROBLASTOMA CELLS

Antonio Contestabile, Elisabetta Ciani, Barbara Monti

DEPARTMENT OF BIOLOGY, UNIVERSITY OF BOLOGNA

Cerebellar granule cells are a widely adopted model of primary neuron cultures in which to study mechanisms of neuronal survival or death (Contestabile, *The Cerebellum*, 1: 41-55, 2002). It is well known, that these neurons require stimulation of the NMDA receptor, or alternatively depolarizing culture conditions (obtained by raising K⁺ concentration to > 25 mM), in order to survive and differentiate. Our group has recently demonstrated that availability of nitric oxide (NO) is a further requirement for survival of differentiated granule cells (Ciani et al., *J. Neurochem.*, 81: 218-228, 2002). We report now that survival effects mediated by NMDA and NO have the activation of the transcriptional factor CREB, as a downstream common step. CREB phosphorylation increases with the differentiation of granule neurons kept in trophic conditions, while non trophic conditions negatively affect both their viability and CREB activity, measured in terms of phosphorylation and transcriptional activity. Activation of the NMDA receptor is sufficient to rescue both neuronal survival and the deficiency of CREB activity, effects that are abolished in parallel by NMDA receptor antagonists. Differentiated cerebellar granule neurons chronically kept in conditions of NO deprivation through long-lasting inhibition of nitric oxide synthase, undergo apoptotic death which is paralleled by a decrease of phosphorylation and transcriptional activity of CREB. Molecular dissection of this pathway points at cGMP/PKG as intermediate effectors. We also identify Bcl-2 as one of the neuronal anti-apoptotic genes downregulated by NO shortage and decreased CREB activity. These results support the existence of a functional link between NMDA receptor activity and nitric oxide production in brain development (Contestabile, *Brain Res. Rev.*, 32: 476-509, 2000), and in particular in the critical phase determining survival and differentiation or apoptotic elimination of differentiating neurons. The human neuroblastoma cell line, SK-N-BE, increases its resistance to cell death caused by serum deprivation in clones overexpressing human neuronal nitric oxide synthase gene or in wild-type cells exposed to exogenous sources of nitric oxide. The impaired viability of serum-deprived parental neuroblastoma cells was accompanied by a strong decrease of CREB phosphorylation and transcriptional activity. This effect too was substantially decreased in nitric oxide synthase overexpressing clones or in wild-type cells supplemented with exogenous nitric oxide. To confirm the role of CREB in survival, ectopic expression of CREB and/or protein kinase A, largely counteracted serum deprivation-induced cell death. Taken together, these results point at CREB activity as a key step of the main survival pathways operating in neurons.

INTERFERENZA DELL'RNA: UN NUOVO METODO PER LO STUDIO DEL RUOLO DELL'ACQUAPORINA-4 NEGLI ASTROCITI DI MAMMIFERO E NELL'EDEMA CEREBRALE

Antonio Frigeri, Grazia Paola Nicchia, Grazia Maria Liuzzi e Maria Svelto

DIPARTIMENTO DI FISIOLOGIA GENERALE ED AMBIENTALE E DIPARTIMENTO DI BIOCHIMICA E BIOLOGIA MOLECOLARE, UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI BARI, VIA AMENDOLA 165/a, BARI

I meccanismi attraverso i quali le cellule del cervello rispondono a cambiamenti di volume indotti da variazioni dei gradienti osmotici sono ancora poco conosciuti. Tra le acquaporine finora scoperte, l'acquaporina-4 (AQP4) è abbondantemente espressa nel cervello, principalmente a livello degli astrociti. Poiché la sua espressione è fortemente polarizzata a livello dei processi perivascolari, il suo ruolo potrebbe essere legato ai fenomeni di osmoregolazione e dell'omeostasi idrica che si verificano nel cervello. E' noto in letteratura che questa proteina è legata alla formazione ed allo sviluppo della barriera ematoencefalica (Nico et al., 2001), è coinvolta nella distrofia muscolare di Duchenne (Frigeri et al., 1998; 2001; 2002) e nella formazione dell'edema cerebrale (Manley et al., 2000). Studi abbastanza recenti effettuati su topi knock-out (KO) per il gene dell'AQP4, mostrano che questi topi danno una migliore risposta, in termini di sopravvivenza, dei topi wild-type, in un modello di edema cerebrale causato da intossicazione acuta con acqua. Poiché i farmaci utilizzati per la cura dell'edema cerebrale sono gli stessi da ormai 60 anni, questi esperimenti sui topi KO aprono una nuova prospettiva rappresentata dall'inibizione specifica dell'AQP4 come approccio terapeutico per ridurre la formazione di edema in diversi disordini cerebrali (Manley et al., 2000).

Abbiamo recentemente dimostrato che colture primarie di astrociti possono essere utilizzate come modello sperimentale per lo studio del ruolo fisiopatologico della AQP4 in quanto la proteina è espressa abbondantemente e funzionalmente attiva (Nicchia et al., 2000). Poiché non esistono inibitori specifici dell'AQP4, abbiamo deciso di utilizzare la recentissima tecnologia dell'interferenza dell'RNA (RNAi) al fine di inibire l'espressione dell'AQP4 in colture primarie di astrociti e valutare gli effetti biochimici, morfo-funzionali e di alterazione genica che questa inibizione determina.

La tecnologia dell'RNAi è basata su un processo di inattivazione genica post trascrizionale, altamente specifico, presente in piante ed animali, innescato da RNA a doppia elica (dsRNA) omologo alla sequenza del gene da sopprimere (Fire, 1999; Elbashir et al., 2001). Questo tipo di soppressione genica, post-trascrizionale, è stato scoperto per la prima volta in *C.elegans* (Fire, 1999) ed è stato usato con successo anche in piante, nematodi e in *Drosophila*. Al contrario, il suo utilizzo inizialmente non è stato possibile per cellule di mammifero nelle quali il dsRNA può innescare una serie di reazioni a catena che portano a degradazione aspecifica di mRNAs. I mediatori della degradazione specifica degli mRNA sono dei frammenti di 21-22 nucleotidi di "small interfering RNA" (siRNA) generati dal taglio di dsRNA più lunghi ad opera della ribonucleasi III. Studi recenti indicano che questi piccoli frammenti di dsRNA di 21 nucleotidi sono in grado di sopprimere in modo specifico l'espressione di geni endogeni ed eterologhi in diverse linee cellulari di mammifero (Elbashir et al., 2001).

I nostri recenti risultati indicano che un frammento di RNA duplex di 21 paia di basi (siRNA), complementare ad una porzione dell'AQP4, è in grado di sopprimere in modo altamente specifico l'espressione dell'AQP4 in colture primarie di astrociti di ratto. Analisi di RT-PCR semiquantitativa e di Western blot mostrano come il frammento di siRNA, specifico per l'AQP4, determina una riduzione progressiva della AQP4. In termini di mRNA, l'AQP4 si riduce del 21 %, 37 % e 70 % rispettivamente dopo 2, 4 e 6 giorni dal trattamento. Parallelamente la riduzione dell'AQP4 in termini di proteina è del 45 % e 83 % dopo 4 e 6 giorni dal trattamento. L'aspetto più interessante di questo lavoro è che la soppressione del gene dell'AQP4 determina profonde variazioni nella morfologia degli astrociti in coltura i quali si trasformano da astrociti caratterizzati da una forma più tozza e poligonale (fibrosi), in astrociti caratterizzati dalla presenza di numerosissimi sottili prolungamenti (protoplasmatici). Inoltre, misure di permeabilità all'acqua effettuate su astrociti in sospensione, utilizzando la tecnica dello "stopped flow light scattering", mostrano che la permeabilità osmotica (Pf) di astrociti trattati con siRNA per l'AQP4 si riduce di circa il 50 % rispetto a quello degli astrociti trattati con un siRNA controllo. Pertanto, il fenotipo associato alla soppressione dell'AQP4, caratterizzato dalla trasformazione di astrociti dalla forma poligonale in astrociti provvisti di numerosissimi prolungamenti, potrebbe essere spiegato come una trasformazione della cellula per aumentare il rapporto superficie/volume, quale estremo tentativo per incrementare gli scambi idrici e compensare l'assenza dell'AQP4. Infine, un'analisi del profilo di alterazione genica è stato avviato utilizzando la tecnica dei "microarray" di cDNA. A questo scopo, l'analisi è stata incentrata su 1200 geni di interesse per la neurobiologia (Affimetrix) al fine di valutare solo i geni coinvolti nei disordini osmotici cerebrali. Tutti questi dati indicano che l'AQP4 svolge un importante ruolo fisiologico nella regolazione del flusso d'acqua e del volume durante l'attività cellulare degli astrociti. Inoltre, l'importanza di questo studio risiede nel fatto che per la prima volta si mostra l'utilizzo della tecnologia dell'RNAi come approccio innovativo per lo studio della funzione di un'acquaporina in cellule in coltura. Infine, questa tecnica potrebbe eventualmente essere utilizzata come terapia genica specifica per intervenire sulla la formazione di edema in diversi disordini cerebrali.

CLONAGGIO ED ANALISI DELL'ESPRESSIONE DELLA CX39, UN NUOVO MEMBRO DELLA FAMIGLIA MULTIGENICA DELLE CONNESSINE.

A. Nicotra¹, S. Martinez², D. Cicero¹ e F. Cicirata¹

1-DIP. SCIENZE FISIOLOGICHE UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA, V.LE A. DORIA 6, 95125- CATANIA

2-ISTITUTO DI NEUROSCIENZE, UNIVERSITÁ MIGUEL HERNANDEZ- CTRA. DE VALENCIA, KM18, 03550, SAN JUAN- ALICANTE (SPAGNA)

Le Gap junction (GJ) sono canali costituiti da sei proteine dette connessine, permeabili a piccole molecole e coinvolti nella cooperazione metabolica, nella sincronizzazione cellulare, nel controllo della crescita e nella regolazione dello sviluppo. Questo lavoro è stato progettato con l'obiettivo di identificare connessine non ancora note, ritenendo ciò fondamentale per lo studio delle proprietà funzionali delle GJ. E' stato così realizzato il clonaggio di un nuovo gene della famiglia delle connessine nel pollo ed è stata analizzata la sua espressione in tessuti del sistema nervoso e non in varie fasi dello sviluppo embrionale e nell'adulto. L'RNA totale è stato estratto dal SNC e da altri tessuti del pollo adulto e dal tubo neurale di embrioni nello stadio HH 21, retrotrascritto e amplificato con primer degenerati progettati sulle regioni conservate della famiglia delle Cx. I prodotti di amplificazione sono stati subclonati e sequenziati. Uno dei cloni isolati non corrispondeva per intero a nessuna connessina nota ma mostrava un elevato grado di omologia con i membri della famiglia delle Cx. Questo frammento è stato usato come sonda in un'analisi di Southern Blot eseguita su prodotti di PCR ottenuti usando primer progettati in base all'omologia del frammento con altre Cx. La regione codificante così identificata ha una lunghezza di 1032 bp e il peso molecolare della proteina corrispondente è di 39 KDa. In accordo con la nomenclatura correntemente accettata per questa classe di proteine, il nuovo gene individuato è stato chiamato cCx39. L'allineamento con altre connessine ha confermato che questa sequenza rappresenta un nuovo membro della famiglia delle Cx. Il più alto livello di omologia è stato trovato nei due loops extracellulari, mentre il grado di omologia a livello del loop intracellulare è molto basso. La distribuzione dell'mRNA corrispondente è stata esaminata mediante RT-PCR e Northern Blot. Con quest'analisi è stato identificato un singolo trascritto di circa 2.7 Kb nel tubo neurale, nel midollo spinale, nel tronco dell'encefalo e nella corteccia cerebrale nonché nel cuore, nel fegato, nel rene, e nelle arterie; non è stato rilevato alcun segnale nel mesencefalo e nel muscolo scheletrico. Inoltre l'analisi per Ibridazione in Situ ha mostrato una espressione topologicamente e temporalmente differenziata. Nell'embrione precoce è stata riscontrata un'espressione marcata a livello della parte posteriore delle vescicole telencefaliche, nel pretetto, nell'istmo e in parte del romboencefalo. In stadi più avanzati l'espressione appare particolarmente evidente a livello dei primordi del tetto e della corteccia cerebellare. Infine nell'adulto si presenta notevole l'espressione nel tetto ottico, nel plesso corioideo e nello strato granulare interno ed esterno del cervelletto.

Sessione di Biotecnologie

AN AMPHIBIAN ANTIMICROBIAL PEPTIDE EXPRESSED IN NICOTIANA TABACUM CONFERS RESISTANCE AGAINST BACTERIA AND FUNGI

D. Ponti, M.L. Mangoni, G. Mignogna, M. Simmaco and D. Barra

DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOCHIMICHE 'A. ROSSI FANELLI' - UNIVERSITÀ LA SAPIENZA, PIAZZALE ALDO MORO 5, 00185 ROMA

Plant disease is one of the leading causes of crop loss, preventing the effective food distribution in the world. With the increased public concerns about the use of chemicals on food crops, there is a clear need for alternatives, including biotechnological ones. Advances in genetic engineering have made possible the development of plants with new predictable phenotype. In particular, to increase resistance against diseases, different genetic strategies have been proposed which include utilization of antibacterial proteins of both plant and non-plant origin.

A large number of antimicrobial peptides from different organisms have been characterized. Esculentins are a family of antimicrobial peptides from skin secretions of *Rana esculenta* displaying potent antimicrobial activities, with negligible effects on eukaryotic cell membranes. In particular, esculentin-1 is a 46-amino acid residue-peptide, with a C-terminal disulfide bridge, effective against a wide variety of human pathogens (*Staphylococci*, *Yersinia*, *Pseudomonas* and *Candida* species) with lethal concentration values ranging from 0.1 μ M to 1.5 μ M. Preliminary experiments indicated esculentin-1 and its analogues as ideal candidates for genetic engineering of plants, as they display *in vitro* a potent activity against *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* and *Phytophthora nicotiana*.

As a possible approach to enhance plant resistance, a DNA coding for an esculentin-1 analogue (Met28Leu) was fused at the C-terminal end of the leader sequence of *Phaseolus vulgaris* endopoly-galacturonase-inhibiting protein (PGIP-1), under the control of 35S promoter. This construct was then introduced into *Nicotiana tabacum* via *Agrobacterium* transformation.

The antimicrobial peptide was isolated from the intercellular fluids of healthy leaves of transgenic plants, suggesting that it was properly processed, secreted outside cells and accumulated in the intercellular spaces. The morphology of transgenic plants was unaffected. Challenging these plants with bacterial or fungal phytopathogens demonstrated enhanced resistance up to the second generation. Furthermore, transgenic plants showed insecticidal properties.

The finding that the expression of the esculentin-1 analogue in plant strongly increases the resistance to microorganisms makes this peptide an extremely promising alternative defence tool, that can find application in several fields, from floriculture to food production and storage.

RIPARO ENZIMATICO E 'REAL TIME' PCR PER LO STUDIO DEL DNA ANTICO

M. Cipollaro, S. Del Gaudio, G Di Bernardo, S. Di Biase*, D. Labella*, U. Galderisi, A. Cascino,

*DIPARTIMENTO DI MEDICINA SPERIMENTALE, SEZIONE DI BIOTECNOLOGIE E BIOLOGIA MOLECOLARE, (email:marilena.cipollaro@unina2.it), * MERIGEN BIOLOGIA MOLECOLARE (email: merigen@tin.it).*

Obiettivi

Il DNA estratto da reperti antichi è costituito da molecole frammentate ed altamente danneggiate. I danni includono sia modificazioni di basi (ossidazione e deaminazione) sia rotture di un singolo filamento quali nicks o gaps o estremità sporgenti. Tutti questi danni interferiscono in varia maniera con le procedure di PCR utilizzate per l'analisi del DNA. La frammentazione impone che i target da amplificare siano costituiti da frammenti di circa 200 coppie di basi. Le molecole che garantiscono un'alta probabilità di successo del processo di amplificazione sono quelle altamente rappresentate quali il DNA mitocondriale o sequenze ripetute in tandem. Per poter ottenere ampliconi e sequenze di tratti di geni nucleari abbiamo tratto vantaggio dalla presenza di cross-links interstrand che pure sono presenti sulle molecole di DNA antico. Per superare il grande problema della contaminazione (crossy-over) da DNA umano moderno che sarebbe favorito nell'amplificazione rispetto a quello antico, poco rappresentato e danneggiato, abbiamo analizzato il DNA estratto da campioni ossei di equidi sepolti dall'eruzione del Vesuvio del 79 d.C. Lo scopo di questa ricerca è quello di riparare il DNA antico con DNA polimerasi di *E. coli* e con T4 ligasi. e di quantificare il numero di molecole di aDNA che, una volta riparate, diventano substrato della Taq polimerasi nelle successive reazioni di amplificazione.

Metodi

L'estrazione di DNA è stata fatta in condizioni denaturanti per garantire che le molecole su cui sono presenti cross-link interstrand e che si denaturano perciò solo parzialmente possano rinaturare e rappresentare quindi il substrato più opportuno per le successive reazioni di riparo. Il riparo enzimatico è stato effettuato sottoponendo gli estratti all'azione combinata della DNA polimerasi di *E. coli* e della DNA ligasi. Sono stati progettati ed utilizzati: 1) primers per l'amplificazione di due frammenti del DNA mitocondriale della regione di controllo e del 16S rDNA, rispettivamente di 200 e 147 coppie di basi 2) primers per l'amplificazione di frammenti dei geni p53', epsilon globina e gamma interferone. Le amplificazioni sono state condotte su estratti sia prima che dopo il riparo enzimatico. Gli ampliconi sono stati sequenziati con la tecnica del dye-terminator. L'allineamento delle sequenze antiche con le omologhe sequenze moderne è stato eseguito con il software MegAlign (DNASTAR Inc.) e con il metodo Clustal.

La metodica utilizzata per la quantificazione del DNA riparato è stata la "real time" PCR con l'impiego della molecola intercalante SYBR Green che conferisce al DNA a doppia elica una fluorescenza specifica e permette la quantificazione delle molecole neosintetizzate.

L'ottimizzazione della metodica ha richiesto in primo luogo la produzione di uno standard di riferimento a titolo noto di DNA di equide moderno e, in secondo luogo, la progettazione di primers e del protocollo, che garantissero la massima stringenza della reazione, al fine di ridurre la presenza di prodotti aspecifici (artefatti o dimeri) che, incorporando il colorante, potrebbero contribuire all'aumento del background di fluorescenza. Per la messa a punto della metodica sono stati sottoposti a valutazione i seguenti parametri: efficienza di amplificazione, linearità, riproducibilità, robustezza e possibilità di cross-contamination. La calibrazione è stata ottenuta utilizzando, come standard di riferimento un DNA di equide moderno, opportunamente purificato e quantificato spettrofotometricamente.

Risultati

L'amplificazione del DNA mitocondriale ha dato risultato positivo sugli estratti dei sei equidi antichi analizzati. Il riparo enzimatico ha permesso di ottenere l'amplificazione dei geni nucleari selezionati.

Conclusioni

Le metodiche utilizzate hanno permesso di aumentare l'amplificabilità dei geni nucleari e di ottimizzare le procedure che consentono di conoscere il numero di molecole presenti ed amplificabili in un estratto contenente DNA antico e di quantificare il numero di quelle molecole che, essendo substrato per gli enzimi del riparo, possono essere reclutate in una successiva reazione di amplificazione.

Referenze:

1. Cipollaro, M., Di Bernardo, G., Galano, G., Galderisi, U., Guarino, F.M., Angelini F. and Cascino A. (1998) Ancient DNA in human bone remains from Pompeii archaeological site. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247, 901-904.
2. Cipollaro, M., Di Bernardo, G., Forte, A., Galano, G., Galderisi, U., Guarino, F.M., Angelini, F. and Cascino, A. (1999) Ancient DNA analysis of human bone remains from the Caius Iulius Polybius house in Pompeii. *Croat. Med. J.* 40 (3), 392-397.

3. Guarino, F. M., Angelini, F., Odierna, G., Bianco, M. R., Di Bernardo, G., Forte, A., Cascino, A. and Cipollaro, M. (2000) Detection of DNA in ancient bones by histochemical methods. *Biotech. Histochem.* 75 (2), 110-117.
4. G. Di Bernardo, S. Del Gaudio, U. Galderisi, A. Cascino and M. Cipollaro: “Enzymatic repair of selected crosslinked homoduplex molecules enhances nuclear gene rescue from Pompeii and Herculaneum remains”, *Nucl. Acids Res.* 30, 4e16, (2002)

This research is financed in part by the National Research Council (CNR 99.00618.36) and by the Campania Regional Authorities L.R. 41-1999 to M.C. and in part by MURST PRIN-2001 to A.C.

DNA BIOSENSORS FOR ENVIRONMENTAL MONITORING

Marco Mascini

*DIPARTIMENTO DI CHIMICA - UNIVERSITÀ DI FIRENZE - VIA GINO CAPPONI 9, 50121 FIRENZE ITALY
EMAIL: mascini@unifi.it*

A Biosensor is a device where a coupling has been realized between a biological element responsible for the molecular recognition and the element responsible for the transduction of the signal.

As DNA Biosensor we refer as a coupling between an oligonucleotide formed with known sequence of bases or a complex structure of DNA (like a DNA from calf thymus) and a transduction device, which could be electrochemical, optical or piezoelectric sensor.

In the last years great interest has raised for such coupling and in the laboratory of the applicant several procedures and applications have been worked out to exploit for analytical purposes such coupling.

In the recent international Conferences (The Fifth World Congress on Biosensors Berlin June 1998 and the Sixth World Congress on Biosensors San Diego May 2000) an increasing number of reports have been presented on the development of DNA Biosensors. The most important points are related to the possibility to obtain a device rapid, cheap, simple and reliable. This is necessary to solve the increasing analytical problems linked to pollution, to the detection of genetic disorders, to the detection of polymorphism, and to the detection of pathogen microorganisms by the evaluation of the hybridization reaction.

The base technique consists, in the most of the proposed applications, in the immobilization procedure on the surface of the sensor of a base sequence called as "probe". Such probe looks for the "target" in the sample solution. This is formed by the complementary sequence of the immobilized oligonucleotide. This is called hybridization. The evaluation of the extent of the hybridization allows concluding if in the sample solution the complementary sequence of the probe was present or not. Such kind of measurement can be exploited by optical, piezoelectrical or electrochemical sensors.

An important parameter of such research is the immobilization procedure of oligonucleotide on the surface of the sensor. This defines for the most cases the sensitivity, i.e. the minimum concentration of the target we can measure, and moreover the selectivity, i.e. the difference between the signals obtained with a complementary sequence and a non-complementary one. The various research groups are proposing continuously new strategies to enhance the sensitivity and the selectivity.

Very important also is the choice of the principle of the transduction; optical methods are very sensitive, but the apparatus reported up to now are very complex (like SPR) and very expensive; electrochemical sensors seem very elegant and quite cheap and very selective. The electrochemical biosensors can be also produced as screen-printed device disposable and this give an additional interest because they eliminate completely the contamination effect from one sample to another. This is an important problem in the genetic laboratory where the amplification stage is to be performed.

Recently (Clin. Chem. 46 (2000) 31-37) we demonstrate as a simple disposable device electrochemical (screen printed) can allow the identification of the polymorphism due to the possible presence of the different isophorms of the Apolipoprotein E. This is due to two puntiforms mutations in the gene codifying the protein.

The substitution in the two positions of the gene of a thymin instead of a cytosine determines 6 different types of proteins and this can be completely solved by the electrochemical biosensors with specific oligonucleotides immobilized on the surface. In such paper for the first time we evidenced as the PCR (Polymerase Chain Reaction) can be completely compatible with the subsequent use of electrochemical DNA biosensors realized by immobilizing a sequence known of bases on a graphite based sensor.

In other recent papers (Biosensors and Bioelectronics 15 (2000) and Anal. Chim. Acta 418 (2000) 1-9) we exploit a piezoelectric device by immobilizing a specific sequence of bases of the pathogen microorganism *Aeromonas* belonging to the gene codifying for the formation of the toxin Aerolysin.

Aeromonas can be present in water, milk, cheese, in ice cream, in sausages etc.

Therefore it seems quite important establish its presence and its eventual pathogenicity.

In such occasion the oligonucleotide has been immobilized with a procedure more complex exploiting the affinity avidin-biotin and by reacting on the gold surface, (the reactive and sensitive surface of the piezoelectric crystal), a thiol to which avidin can be immobilized and then the oligonucleotide biotinilated can be easily fixed. This allows obtaining the final probe, which is able to detect in various real samples, the presence of the pathogen microorganism.

Recently (in press) a preliminary study on biosensor as new analytical tool for GMO detection has been reported. The biosensor approach is based on affinity sensors (DNA-based), indicating the applicability of these devices to the GMO detection

RECENTI PROGRESSI SULLA BIOLOGIA MOLECOLARE DEGLI IPERTERMOFILII

M. Rossi, S. Bartolucci*, R. Cannio, M. Ciaramella

ISTITUTO DI BIOCHIMICA DELLE PROTEINE - VIA MARCONI 10 - 80125 NAPOLI

*UNIVERSITA' DI NAPOLI FEDERICO II

Gli ipertermofili sono procarioti, per la maggior parte appartenenti alla terza linea evolutiva della vita, quella degli Archeobatteri. Essi si trovano e vivono in ambienti terrestri e marini estremi per temperatura, pH, salinità, pressione e perciò sono chiamati estremofili.

Negli ultimi anni, la biologia degli archeobatteri ipertermofili ha stimolato molti studi focalizzati a scoprire, a livello molecolare, l'adattamento alle condizioni di vita alle alte temperature, nonché la loro relazione evolutiva con gli altri organismi.

Recentemente sono state ottenute le sequenze dell'intero genoma di alcuni microrganismi ipertermofili e altre sono in corso. Le sequenze di questi genomi sono di aiuto per la scoperta di nuove proteine ed enzimi con particolari proprietà e con grande potenziale applicativo per la loro termostabilità e termoattività. In aggiunta si è trovato che i processi relativi alla struttura e funzione del genoma, come la replicazione del DNA, la trascrizione etc. sono effettuate da complessi molecolari che rappresentano una versione semplificata di quelli degli eucarioti.

L'analisi dei geni degli ipertermofili, sino ad ora basata sulla loro espressione funzionale in sistemi eterologhi, ha fornito molti esempi di efficiente espressione e recupero di enzimi termofili attivi in ospiti mesofili dimostrando che, spesso, un folding corretto si può ottenere in ambienti molto differenti dalle condizioni native. Questo non è sempre vero, in quanto ci sono proteine che necessitano di modifiche post-traduzionali e non possono essere prodotte in forma attiva in altri ospiti o proteine che necessitano di fattori di stabilizzazione, come i soluti compatibili o chaperonine molecolari.

Si è individuata la necessità di sviluppare un sistema genetico manipolativo per gli ipertermofili per identificare la funzione dei geni e delle proteine e, più in generale, per interpretare la grande quantità di dati emergenti dalle sequenze genomiche.

E' stato sviluppato un sistema genetico per *Sulfolobus solfataricus* basato su un vettore che contiene l'origine di replicazione autonoma del virus SSV1 e un gene codificante una variante termostabile della igromicina fosfotransferasi usato come marker di selezione.

Questo vettore permette di esprimere geni omologhi ed eterologhi in *Sulfolobus solfataricus* e di utilizzare questo microrganismo come una fabbrica cellulare. Esempi di espressione sono un'alcool deidrogenasi e una β -galattosidasi.

Più in generale, saranno discussi gli sviluppi più recenti nella genetica e biologia molecolare dell'archeobatterio termoacidofilo *Sulfolobus* che è stato usato come sistema modello per studi biochimici, strutturali e genetici negli archeobatteri in generale.

Sessione di Neuroscienze

DYNAMICS OF THE FRONTO-PARIETAL NETWORK FOR REACHING MOVEMENTS IN HUMANS: AN EEG APPROACH

P. Paolo Battaglini

BRAIN CENTER FOR NEUROSCIENCE, DEPARTMENT OF PHYSIOLOGY AND PATHOLOGY, UNIVERSITY OF TRIESTE, TRIESTE, ITALY.

Programming of reaching movements is characterized by the complex activation of several cortical areas widely distributed in a fronto-parietal network. The visual information, collected by the occipital visual areas, is transferred to the dorsal parietal cortex where the target of the required action is coded in appropriate coordinates. Information is then transferred to premotor areas in the frontal cortex, where the required motor act is selected and hence moved to motor areas where the required movement is precisely coded and started. Although intensive research has been carried out in the characterization of this large-scale neural network, it is unclear how the activation of these cortical areas is organized in space and time. In this context, it is widely accepted that the posterior parietal cortex and the premotor areas of the frontal lobe are strictly interconnected through a huge system of cortico-cortical association fibers. It is becoming more and more evident that this system of fibers may segregate different aspects of the visuomotor role played by this complex fronto-parietal network.

To investigate the involvement of such a wide region of cortex and to examine the entire fronto-parietal network, event-related potentials (ERPs) during visually guided arm movements were studied in 13 healthy subjects. Each subject was asked to perform 3 tasks with his right arm. In a reaching task, subjects reached a white spot randomly presented in the first quadrant of a touch screen while fixating straight ahead. In the control tasks, visually triggered no-goal arm movements and finger tapping were performed. EEG was recorded from 30 electrodes distributed throughout the whole head. Subjects who had longer reaction time and lower movement velocity showed higher reaching precision, suggesting a trade-offs relationship between time required for movement programming and space accuracy. ERP components in the reaching condition always had larger amplitudes than in the other tasks.

Two positive components (P1 and P2) were present in the frontal region. Simultaneously to P1 and P2, two negative components, N1 and N2, were identified over the posterior parietal cortex. When averaging with respect to movement onset, the amplitudes of P1 and N1 were much lower, suggesting that they were driven more by the visual information than by the motor output, while P2 and N2 completely disappeared, hidden by the motor evoked potential. The evolution in time of EEG activity revealed a simultaneous fronto-parietal activation which appeared twice before movement onset.

On the basis of these results, it seems that during the preparation of a movement towards the peri-personal space, parietal and frontal areas are simultaneously active and that this pattern of activation is repeated twice before the onset of movement. It is likely that the first parieto-frontal activation reflects the neuronal activity subserving target selection and that the second one concerns the neural activity related to the selection of the required motor movement and to the instruction to move. If present data will be confirmed, the common view of a dorsal *stream* of visual processing devoted to the control of action in the peri-personal space has to be modified in favor of a dorsal *system*, where parietal and frontal areas cooperate in simultaneously (and not serially) programming reaching movements, with neural information which reverberates between the two regions during all the programming phase of movement execution.

LA MASSIMA POTENZA MUSCOLARE “ESPLOSIVA” DEGLI ARTI INFERIORI DI ASTRONAUTI DOPO VOLO SPAZIALE PROLUNGATO

Pietro Enrico di Prampero, Guglielmo Antonutto

*DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE BIOMEDICHE, PIAZZALE KOLBE 4, 33100 UDINE
(pprampero@makek.dstb.uniud.it)*

Scopo di questo studio è stata l'analisi degli effetti dell'esposizione prolungata alla microgravità, che si verifica nel corso dei voli spaziali, sulla massima potenza esplosiva degli arti inferiori dell'uomo. La massima potenza esplosiva (MEP) è stata determinata, prima e immediatamente dopo missioni a bordo della stazione spaziale MIR di durata da venti giorni a tredici mesi, mediante uno speciale egodinamometro multifunzionale (Multipurpose Ergometer Dynamometer, MED) costruito con finanziamento ASI. Tale strumento è costituito essenzialmente da una coppia di piattaforme delle forze combinate con un cicloergometro isocinetico (Antonutto et al., J. Appl. Physiol 1999, Zamparo et al., Eur. J. Appl. Physiol. 1997; 2000). Il MED consente quindi l'esecuzione sia di tradizionali esercizi cicloergometrici a frequenza di pedalate costante, sia di esercizi di tipo esplosivo degli arti inferiori della durata di circa 300 ms, simili ad un salto verticale a piè pari alla massima potenza. I risultati, ottenuti su sette astronauti, hanno dimostrato che la massima potenza esplosiva è ridotta al 65 % rispetto ai valori pre volo dopo circa un mese di permanenza a bordo e si riduce ulteriormente fino a raggiungere il 50 % del valore pre volo dopo circa sei mesi, valore a cui sembra stabilizzarsi, almeno nei limiti temporali dei tredici mesi da noi studiati. Anche l'attività elettromiografica di superficie a livello del vasto esterno, vasto interno e retto femorale, si riduce in modo proporzionale alla riduzione della MEP. Al contrario della MEP, la massa muscolare degli arti inferiori si riduce in media del 10%, indipendentemente dalla durata della permanenza in microgravità. Questa osservazione ci ha indotto ad ipotizzare che il calo della potenza esplosiva dopo esposizione alla microgravità sia dovuto solo in piccola parte all'ipotrofia muscolare, ma che dipenda invece in larga misura da un'alterazione del controllo motorio. Tale ipotesi è suffragata dall'osservazione che la massima potenza sviluppata dagli stessi soggetti nel corso di 6 - 7 pedalate massimali al cicloergometro per una durata di circa 5 - 7 s (Massima Potenza al Cicloergometro, MCP) è ridotta solo del 25% rispetto ai valori pre volo, indipendentemente dalla durata dello stesso. Infatti, per le ovvie differenze di biomeccanica del gesto, lo sviluppo della massima potenza al cicloergometro richiede una coordinazione motoria meno raffinata di quanto non richieda lo sviluppo della MEP. Gli esperimenti riassunti sopra, ci hanno quindi portato ad ipotizzare che la drammatica caduta di massima potenza esplosiva osservata dopo volo spaziale sia in larga parte dovuta ad una riorganizzazione del controllo motorio indotta dall'assenza di gravità. La permanenza a bordo della stazione spaziale, abolendo di fatto la forza peso, indurrebbe infatti gli astronauti ad evitare azioni muscolari rapide e violente, a favore di movimenti delicati e lisci. Ne seguirebbe una riprogrammazione del controllo motorio che, al rientro a Terra, penalizzerebbe il soggetto, rendendolo incapace di eseguire quelle azioni muscolari violente e rapide che sono alla base della MEP. In altre parole, la situazione dell'astronauta sarebbe l'esatto contrario di quanto si verifica nelle prime settimane di un allenamento di forza in cui si osserva un aumento della forza muscolare, non accompagnato però da alcun aumento di massa, ma dovuto esclusivamente ad una migliore e più efficace coordinazione motoria. Infine, l'osservazione che, dopo riposo prolungato a letto, la riduzione della MEP e della massa muscolare sono dello stesso ordine di grandezza (Ferretti et al. J. Physiol. (London), 2000) sembra coerente con l'ipotesi della riorganizzazione motoria formulata sopra: durante riposo a letto infatti il vettore gravitazionale è solo modificato di direzione, non abolito.

TRASFORMAZIONI SENSORI-MOTORIE NEI PRIMATI: BASI ANATOMICHE

S. Rozzi, R. Calzavara, G. Luppino e M. Matelli

ISTITUTO DI FISIOLOGIA UMANA, UNIVERSITÀ DI PARMA, VIA VOLTURNO 39, 43100 PARMA

La corteccia motoria è costituita da un mosaico di aree anatomicamente e funzionalmente differenti. A differenza di quanto ritenuto in passato, tali aree non sono dedicate esclusivamente a funzioni esecutive ma risultano attivamente coinvolte nella trasformazione di un ampio spettro di informazioni sensoriali in appropriati comandi motori. Questa operazione neurale viene definita “trasformazione sensori-motoria”. Lo studio delle connessioni delle aree motorie ha mostrato che tre sono i territori corticali strettamente collegati con la corteccia a funzione motoria: la corteccia prefrontale, la corteccia cingolata e la corteccia parietale. L’informazione sensoriale raggiunge le aree motorie, prevalentemente, attraverso afferenze altamente specifiche del lobo parietale. Infatti, ciascuna area motoria risulta selettivamente collegata da connessioni bidirezionali con una specifica area parietale (circuiti parieto-frontali). Tale organizzazione anatomica del sistema motorio non rappresenta un sistema distribuito e polifunzionale ma consente di svolgere operazioni di trasformazione sensori-motoria in parallelo. Recentemente, nel nostro laboratorio sono stati definiti, mediante l’uso di traccianti neuronali, i circuiti parieto-frontali che originano sia dal lobulo parietale superiore, sia dal lobulo parietale inferiore. Non tutti i circuiti definiti anatomicamente sono stati studiati in dettaglio dal punto di vista neurofisiologico. Tuttavia per alcuni di essi disponiamo di sufficienti dati elettrofisiologici e comportamentali per delineare in dettaglio anche l’organizzazione funzionale. In particolare, verranno descritte le proprietà neuronali di un area frontale (F5) e di una parietale (AIP) selettivamente collegate in un circuito parietofrontale deputato all’organizzazione dei movimenti di prensione. I dati funzionali consentono di concludere che tale circuito trasforma le caratteristiche intrinseche dell’oggetto (descrizione pragmatica) nel tipo di prensione più adeguato per raggiungere lo scopo di afferrare l’oggetto stesso.

RAPPRESENTAZIONE NEURALE ASIMMETRICA DELLA POSIZIONE DELL'ARTO ANTERIORE NELLA CORTECCIA PALEOCEREBELLARE E NEL NUCLEO INTERPOSITO DEL RATTO

Vincenzo Perciavalle

*DIPARTIMENTO DI SCIENZE FISIologiche, UNIVERSITÀ DI CATANIA, VIALE A. DORIA 6, 95125 CATANIA,
ITALY (PERCIAVA@UNICT.IT)*

E' noto come il cervelletto riceva informazioni sia sulla situazione periferica che sui processi centrali attraverso numerosi sistemi precerebellari che proiettano sia alla corteccia che ai nuclei intracerebellari. In particolare, la pars intermedia del cervelletto, con il nucleo interposito ad essa funzionalmente correlato, sembra svolgere un ruolo importante nel controllo motorio, comparando segnali centrali relativi al movimento che si intende svolgere con informazioni generate dal movimento che realmente viene eseguito. Tuttavia, è ancora oggetto di controversia se parametri statici, come la posizione spaziale degli arti, sia rappresentata dall'attività dei neuroni cerebellari. Scopo della ricerca è stato quello di valutare l'effettività di una relazione tra parametri statici e attività dei neuroni del cervelletto.

A questo scopo è stata studiata, in ratti adulti Sprague-Dawley anestetizzati (uretano: 1,2 g/kg i.p.), l'attività spontanea di cellule di Purkinje della corteccia del paleocervelletto come anche del nucleo interposito in rapporto alla posizione nello spazio dell'arto anteriore ipsilaterale. L'attività tutto-o-nulla extracellulare dei neuroni studiati veniva derivata mediante micropipette di vetro riempite con una soluzione di KCl 1M. L'attività veniva filtrata, amplificata e inviata ad un PC per l'analisi on line (interfaccia e software EGAA; RC Electronics Inc. USA). Un robot controllato tramite un computer muoveva passivamente l'arto anteriore per raggiungere 15 differenti posizioni lungo il piano sagittale. L'arto veniva mantenuto in ciascuna posizione per 8 secondi e la posizione dell'arto era identificata sulla base delle coordinate cartesiane della zampa anteriore. L'attività spontanea dei neuroni veniva correlata a ciascuna posizione assunta dall'arto sulla base del seguente modello di regressione $F = \beta_0 + \beta_1 H + \beta_2 H^2 + \beta_3 H^3 + \beta_4 V + \beta_5 V^2 + \beta_6 V^3 + \epsilon$, dove la frequenza di scarica del neurone (F) era la variabile dipendente, le dimensioni orizzontali (H) e verticali (V) le variabili indipendenti $\beta_0 - \beta_6$ i coefficienti di regressione ed ϵ l'errore residuo. Tutte le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando il software SYSTAT versione 9 (Systat Inc, USA).

Sono stati selezionati 175 cellule di Purkinje e 156 neuroni del nucleo interposito la cui attività spontanea veniva modulata significativamente dalla posizione dell'arto ed è stato osservato che la maggior parte di loro, sia a livello della corteccia che del nucleo cerebellare, rappresentava preferenzialmente una dimensione spaziale del piano cartesiano. L'asse antero-posteriore, in particolare, era la direzione meglio rappresentata dalla scarica dei neuroni paleocerebellari studiati.

Questo risultato suggerisce che la pars intermedia del cervelletto potrebbe codificare la posizione dell'arto mediante un'asimmetrica rappresentazione delle coordinate spaziali dell'estremità dell'arto. E' interessante sottolineare come l'asse antero-posteriore rappresenti, sia dal punto di vista filogenetico che comportamentale, la direzione più comune sia per movimenti locomotori che manipolatori. Ne consegue che l'asimmetrica rappresentazione neurale della localizzazione spaziale dell'arto potrebbe essere la conseguenza adattativa di vincoli evolutivi.

Sessione di Biomolecole

GLI ACIDI PEPTIDIL NUCLEICI MODIFICATI COME POTENZIALI FARMACI ANTINFIAMMATORI

Benatti U., Scarfi S., Millo E., Giovine M., Pozzolini M., Clavarino E., Sturla L., Damonte G.

DIPARTIMENTO DI MEDICINA SPERIMENTALE, SEZIONE BIOCHIMICA,
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA, VIALE BENEDETTO XV, 1 16132 GENOVA

Gli Acidi Peptidil Nucleici (PNA) sono analoghi strutturali sintetici degli acidi nucleici naturali in grado di complementare selettivamente su sequenze geniche scelte come bersaglio e di inibire in vitro la trascrizione del DNA o la traduzione dell'mRNA. Le loro peculiari caratteristiche biomolecolari unite alla notevole stabilità in fluidi biologici e tessuti ne fanno dei potenziali farmaci nelle terapie antigene ed antisense di numerose malattie. Un noto impedimento al loro utilizzo in vivo è però dato dalla ridotta permeabilità cellulare che ne limita l'azione farmacologica ma che può essere superata grazie alla coniugazione con specifici vettori, principalmente di origine peptidica, in grado di trasportare i PNA nel citoplasma delle cellule o nei loro nuclei sedi della attività di queste molecole.

Studi di internalizzazione e stabilità: Nel nostro laboratorio è stato disegnato un peptide idrofobico (PLPL) che, una volta sintetizzato mediante le tradizionali tecniche di sintesi peptidica su fase solida e coniugato ad un piccolo PNA biotinilato, anch'esso sintetizzato con le suddette tecniche, ha dimostrato di promuovere una cospicua internalizzazione cellulare validata sia da metodi qualitativi (microscopia confocale) sia da metodi quantitativi (HPLC accoppiata alla spettrometria di massa). Della suddetta chimera sintetica è poi stato studiato il metabolismo in lisati cellulari ed in cellule intatte, dimostrando la notevole stabilità dei PNA nei sistemi biologici ed una degradazione tempo-dipendente della porzione peptidica dovuta ad una attività carbossi-peptidasica in direzione ammino-terminale in grado di rimuovere il peptide idrofobico in maniera completa nei lisati cellulari e solo parzialmente nelle cellule intatte in 24 ore di incubazione¹.

Il vettore idrofobico è stato poi successivamente utilizzato per studiare, in cellule intatte, l'efficacia inibitoria di diversi PNA antisense diretti contro due importanti pathways del processo infiammatorio macrofagico.

Inibizione di NO sintasi inducibile: Un PNA antisense diretto contro una sequenza omopurinica di 14 basi dell'mRNA di NO sintasi inducibile murina è stato dapprima sintetizzato attraverso le tecniche di sintesi peptidica su fase solida e successivamente testato su un sistema di sintesi proteica a cellula aperta per valutarne l'attività inibitoria. In breve il PNA ed il suo controllo aspecifico sono stati incubati con un lisato di reticolociti di coniglio contenente l'mRNA di iNOS quantificando poi la sintesi della proteina che è stata completamente inibita in presenza del PNA specifico². Successivamente si è utilizzato lo stesso PNA antisense coniugato o con un peptide idrofobico di 4 aminoacidi (FLFL) (PNA 4) o con un peptide di 6 (FLFLFL) (PNA 3). La linea cellulare macrofagica murina RAW 264.7 è stata dapprima incubata con i due PNA ed i rispettivi controlli per 4 e 7 giorni successivamente stimolata con LPS, quindi di ciascun campione è stata dosata l'attività di iNOS. Entrambi i PNA hanno mostrato di inibire specificamente l'attività NO sintasica con una percentuale del 44% per il PNA 3 dopo 4 giorni di incubazione, del 43% per il PNA 4 dopo 7 giorni³.

Inibizione della cicloossigenasi 2: Due PNA antisense rispettivamente diretti contro una sequenza di 16 basi sul sito di inizio della traduzione del messaggero di COX-2 (PNA 1a) e contro una sequenza omopurinica situata a valle di quest'ultima (PNA 2a) sono stati sintetizzati come tali e modificati per l'aggiunta di un peptide idrofobico di 4 aminoacidi (FLFL) (PNA 1 e 2). I PNA non modificati sono stati incubati con i reticolociti di coniglio in presenza del messaggero di COX-2 sia aggiunti contemporaneamente che previa pre-incubazione con il messaggero stesso prima di aggiungere il lisato. Nel primo esperimento si è avuta una inibizione del 67% per il PNA 1a, del 50% per il PNA 2a e del 57% per la miscela PNA 1a+2a mentre nel secondo caso la pre-incubazione ha permesso una inibizione totale della sintesi della proteina COX-2 con entrambi i PNA e con la miscela dei due. Successivamente i PNA modificati sono stati incubati con la linea di macrofagi murini RAW 264.7 per 24 ore e successivamente stimolati con LPS. La maggiore inibizione si è verificata dopo 7 ore dalla stimolazione con valori di inibizione della sintesi della proteina del 43, 40 e 46% per i PNA1, 2 e 1+2 valutata in western blot e confermata dalla riduzione di produzione delle prostaglandine dosate nei terreni di coltura rispettivamente del 50, 58 e 52%⁴.

Questi promettenti risultati aprono la possibilità di utilizzare i PNA modificati nel trattamento di diverse patologie derivanti da infiammazioni croniche e acute in cui le suddette proteine sono spesso coinvolte.

Bibliografia:

1. Scarfi et al. (1997) *BBRC* 236, 323-6.
2. Giovine et al. (1998) *FEBS Lett.* 426, 33-6.
3. Scarfi et al. (1999) *FEBS Lett.* 451, 264-8.
4. Scarfi et al. (2002) *Biochemistry*, submitted.

MODULAZIONE DELLO STATO REDOX INTRACELLULARE ED INDUZIONE DELLA MORTE CELLULARE PROGRAMMATA DA PARTE DEL GLUTATIONE DISOLFURO.

Maria Rosa Ciriolo*, Giuseppe Filomeni, Giuseppe Rotilio.

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMEDICHE, UNIVERSITA' DI CHIETI "G.D'ANNUNZIO", DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA, UNIVERSITA' DI ROMA "TOR VERGATA".*

Lo stato redox intracellulare, inteso come un processo dinamico di equilibrio tra ossidanti ed antiossidanti, è alla base di numerosi processi connessi con la regolazione del ciclo cellulare. Tra le modificazioni ossido-riduttive più significative ci sono quelle a carico dei gruppi sulfidrilici, che possono influenzare la conformazione e l'attività funzionale di una proteina; ne consegue che nel caso in cui si tratti di un fattore di trascrizione si può modulare l'espressione di particolari geni. Il glutatione (GSH), tripeptide antiossidante altamente conservato in tutte le forme di vita aerobica, gioca un ruolo fondamentale nel controllo dello stato redox intracellulare, grazie alla sua capacità di interconversione nella forma ossidata (GSSG) e la successiva interazione con tioli proteici a formare disolfuri misti. In particolare, il processo di tiolazione reversibile del glutatione su residui di cisteine proteici, che altrimenti potrebbero essere ossidati in maniera irreversibile, rappresenta sia una prima linea di difesa della cellula da elevato stress ossidativo sia un sistema attraverso il quale il redox si trasforma in un evento di segnalazione cellulare (1). Tuttavia i processi molecolari che sono alla base della risposta cellulare in seguito a stress ossidativo non sono ancora chiaramente delineati. Obiettivo principale di questo lavoro è stato quello di modulare la proliferazione cellulare mediante sostanze redox-attive che agiscono non necessariamente all'interno della cellula.

Il sistema sperimentale utilizzato è rappresentato da cellule leucemiche in coltura di promonociti umani U937 trattati con glutatione disolfuro (GSSG). Questa specie di glutatione viene fisiologicamente prodotta all'interno della cellula e mantenuta a concentrazioni molto basse da sistemi enzimatici che la riducono a GSH. Tuttavia, in seguito a stress ossidativo, la concentrazione di GSSG aumenta notevolmente tanto da essere facilmente trasportata all'esterno prima di essere ridotta. Il GSSG extracellulare rappresenta, però, un agente non-permeabile, quindi eventuali effetti ossidanti devono essere operanti dall'esterno della membrana.

Le cellule U937 trattate con diverse dosi di GSSG erano indotte all'arresto della crescita, in maniera dose dipendente, e successivamente a morte con le caratteristiche morfologiche dell'apoptosi. Il blocco della proliferazione dipendeva, almeno in parte, dall'accumulo dell'inibitore delle chinasi ciclina-dipendenti p21 e dalla diminuzione della proteina antiapoptotica Bcl-2. Allo scopo di chiarire i meccanismi molecolari alla base di questi effetti abbiamo determinato i tioli di membrana, tramite l'utilizzo di un composto fluorescente non-permeabile, ed abbiamo osservato che in seguito al trattamento con GSSG i tioli di membrana titolabili erano significativamente diminuiti. Inoltre, la determinazione dello stato redox intracellulare sotto forma di GSH, GSSG e disolfuri misti ha messo in evidenza un calo di GSH a favore della formazione di disolfuri misti con tioli proteici. L'alterazione redox era evidenziabile 12 ore dopo il trattamento con GSSG e concomitante con un aumento delle specie reattive dell'ossigeno (ROS). Queste condizioni portavano quindi all'induzione del processo apoptotico tramite la via mitocondriale; infatti, il citocromo c era determinabile nel citosol delle cellule, insieme all'attivazione delle caspasi-9 e -3. Il trattamento con glutatione estere, un composto che viene facilmente internalizzato e trasformato in GSH, proteggeva dalla formazione dei disolfuri misti e allo stesso tempo inibiva completamente l'apoptosi. L'effetto tossico del GSSG sembra essere specifico per cellule di derivazione tumorale in quanto sia macrofagi sia linfociti primari non presentavano alcuna alterazione morfologica o biochimica in seguito al trattamento con GSSG anche a dosi molto elevate.

In conclusione il GSSG, ossidante non-permeabile, che non sembra avere effetti tossici su cellule differenziate può rappresentare un valido agente in grado di indurre una risposta antiproliferativa via scambio tioli/disolfuri ed essere utilizzato in terapie combinate con noti farmaci antitumorali, specialmente nel caso di chemioresistenza dovuta ad aumento di GSH.

- 1) Filomeni G., Rotilio G. and Ciriolo M.R.
Cell signalling and the glutathione redox system.
Biochem. Pharmacol. 64, 1057-1064 (2002).

ENZIMOLOGIA MOLECOLARE DELLA PROTEIN CHINASI CK2: UN ESEMPIO DI STACHANOVISMO CATALITICO

S. Sarno, M. Ruzzene, R. Battistutta*, F. Meggio, O. Marin, G. Zanotti*, L.A. Pinna

DIPARTIMENTI DI CHIMICA BIOLOGICA E DI *CHIMICA ORGANICA, UNIVERSITÀ DI PADOVA, VIALE G. COLOMBO 3, 35121 PADOVA.

Non esiste praticamente funzione cellulare che non sia regolata mediante fosforilazione proteica. Si è calcolato che questo processo reversibile interessi non meno di un terzo dell'intero proteoma di una cellula (il cosiddetto "fosfoproteoma"). Responsabili dell'evento fosforilativo sono le protein chinasi, che costituiscono la più vasta famiglia di enzimi, codificati da una percentuale significativa (circa il 2%) dell'intero genoma. In genere le protein chinasi, dato il loro ruolo di interpreti di segnali, sono enzimi strettamente regolati che diventano attivi solo in risposta a determinati stimoli. Esistono tuttavia rare eccezioni di protein chinasi "costitutivamente attive". L'esempio più clamoroso è costituito dalla CK2 (abbreviazione del vecchio termine fuorviante "casein chinasi-2"). Benchè sia stata una delle prime chinasi ad essere scoperta CK2 è rimasta per lungo tempo un'enigma, prima perchè non si conosceva nessuno dei suoi substrati endogeni (per questo veniva saggiata in vitro sulla caseina), poi perchè se ne stanno scoprendo troppi. Oggi il loro numero si aggira attorno ai 300 e si tratta per lo più di proteine che svolgono ruoli importanti soprattutto nell'espressione genica, nella trasduzione di segnali e nella biosintesi e degradazione delle proteine. Si ritiene che questo "superlavoro" giustifichi il fatto che CK2 debba essere costitutivamente attiva e si sospetta che a sua volta l'elevata attività costitutiva di CK2 sia responsabile del suo potenziale oncogenico rivelato dalla sua attività invariabilmente elevata nei tumori e da diversi modelli sperimentali nei quali CK2, se sovraespressa, induce neoplasie. Scopo della nostra indagine è da un lato scoprire le basi molecolari che conferiscono a CK2 la sua elevata attività costitutiva e la sua straordinaria pleiotropicità, dall'altro sviluppare inibitori altamente specifici che consentano di comprendere dettagliatamente le funzioni cellulari di questa chinasi.

Per raggiungere tali obiettivi si sta eseguendo un'analisi molecolare sistematica di CK2, articolata su tre livelli: mutazionale, strutturale e funzionale. L'analisi strutturale ha consentito innanzitutto di raccogliere indizi circa gli elementi che possono conferire a CK2 alcune caratteristiche peculiari. I mutanti fin qui generati, espressi ed analizzati sono già alcune dozzine e molti di questi manifestano alterazioni funzionali soprattutto per quanto riguarda il riconoscimento del substrato fosfoaccettore, il livello di attività catalitica intrinseca e la suscettibilità a determinati inibitori. Di alcuni dei quali si è anche risolta la struttura dei complessi con CK2. Questi stessi inibitori sono stati utilizzati per ottenere informazioni circa le funzioni svolte da CK2 in cellule viventi.

I principali risultati fin qui ottenuti hanno consentito di raggiungere le seguenti conclusioni: i) CK2 riconosce siti fosfoaccettori specificati da numerosi residui acidi grazie alla loro interazione con residui basici non conservati nelle altre chinasi e distribuiti attorno al sito catalitico, in particolare all'inizio dell'elica C, nel "loop glicinico" e nel "loop p+1"(1,2); ii) L'elevata attività costitutiva della subunità catalitica è conferita da speciali contatti del segmento N-terminale con il "loop di attivazione" che è così mantenuto in una conformazione "aperta" senza bisogno di fosforilazione e/o associazione con altre subunità come avviene nella maggior parte delle altre chinasi (3); iii) L'associazione con la subunità regolatoria (beta) garantisce il mantenimento dell'attività catalitica anche in assenza delle interazioni tra segmento N-terminale e "loop di attivazione" con un meccanismo che resta da chiarire; iv) L'elevata selettività dell'inibizione da parte del TBB (tetrabromobenzotriazolo) è dovuta alla particolare forma ed alle limitate dimensioni di una tasca idrofobica contigua al sito di legame dell'ATP, dove l'inibitore si inserisce, tasca che nelle altre chinasi tende ad essere più ampia (4). L'ampliamento di questa cavità infatti, ottenuta mutando alcuni residui ingombranti che la rivestono, ad alanina, genera mutanti di CK2 meno suscettibili ad inibizione da parte di TBB e di altri composti analogamente inibitori (5); v) Il TBB ed altri inibitori di CK2 inducono morte per apoptosi di cellule Jurkat rivelando un ruolo anti-apoptotico di CK2 (6). Questo è mediato almeno in parte dalla generazione di siti resistenti alle caspasi, in quanto l'apoptosi indotta da TBB è accompagnata da defosforilazione della proteina pro-apoptotica HS1 e dalla sua accelerata degradazione da parte delle caspasi.

BIBLIOGRAFIA

5. Sarno S. et al J. Biol. Chem. 271, 10595-10601 (1996)
6. Sarno S. et al Mol. Cell. Biochem. 191, 13-19 (1999)
7. Sarno S. et al. J. Biol. Chem, Apr. 15, 2002 (e-pub ahead of print)
8. Battistutta R. et al. Protein Science 10, 2200-2206 (2001)
9. Sarno S. et al. Pharmacol. Ther. (2002) in press.
10. Ruzzene M. et al. Biochem. J. 364, 41-47 (2002)

STRATEGIE DI PROTEOMICA PER L'ANALISI CONFORMAZIONALE DI PROTEINE

Piero Pucci

*DIPARTIMENTO DI CHIMICA ORGANICA E BIOCHIMICA, UNIVERSITÀ DI NAPOLI FEDERICO II
COMPLESSO UNIVERSITARIO MONTE SANT'ANGELO, VIA CINTHIA, 80126 NAPOLI
pucci@unina.it*

La moderna ricerca in chimica delle proteine si è evoluta passando dall'analisi della singola molecola proteica in modalità essenzialmente statiche a problematiche più complesse che riguardano i processi dinamici che coinvolgono le proteine. Il processo di folding, le variazioni conformazionali associate alla formazione di complessi tra una proteina ed altre biomolecole o connesse con la genesi di intermedi transienti parzialmente strutturati dotati di peculiari attività biologiche e i meccanismi molecolari che portano all'aggregazione di proteine solubili in fibrille insolubili, spesso con gravi conseguenze patologiche, rappresentano solo alcuni esempi del comportamento dinamico delle macromolecole proteiche. Lo studio a livello molecolare di questi fenomeni rappresenta una sfida soprattutto per la difficoltà di ottenere dettagliate informazioni strutturali sul processo attraverso le tecniche convenzionalmente utilizzate per l'analisi strutturale delle proteine, quali la risonanza magnetica nucleare (NMR) e la cristallografia a raggi X.

Negli ultimi anni, sono state sviluppate strategie alternative per la definizione della topologia superficiale di proteine basate sulla combinazione di esperimenti di proteolisi limitata e scambio idrogeno-deuterio (H/D) con metodologie di spettrometria di massa. Sebbene queste strategie forniscano dati a bassa risoluzione, le procedure sono applicabili all'analisi delle variazioni conformazionali che avvengono nella struttura proteica in diverse condizioni sperimentali o in seguito alla formazione di complessi e consentono di caratterizzare specie transienti o aggregati fibrillari insolubili in condizioni para-fisiologiche.

L'approccio della proteolisi limitata si fonda sulla considerazione che la struttura tridimensionale di una proteina costituisce una barriera stereochimica all'azione delle proteasi, lasciando le regioni esposte e flessibili accessibili all'attacco enzimatico ed ostacolando i tagli proteolitici all'interno del nucleo strutturato della proteina. In queste condizioni l'attività degli enzimi proteolitici è diretta selettivamente verso specifici residui. L'identificazione dei legami peptidici sensibili all'idrolisi enzimatica permette quindi la definizione dei residui amminoacidici localizzati sulla superficie della proteina. Se tali esperimenti sono effettuati usando una serie di proteasi con diversa specificità, la distribuzione dei siti preferenziali di idrolisi rende possibile la definizione dell'intera topologia superficiale delle proteine. In seguito a cambiamenti nella conformazione proteica (formazione di complessi, unfolding parziale, aggregazioni), il pattern proteolitico risulterà alterato consentendo di individuare le regioni coinvolte nelle variazioni indotte dalle diverse condizioni sperimentali.

Alternativamente, lo studio delle variazioni conformazionali in proteine può essere condotto utilizzando una procedura basata su esperimenti di scambio idrogeno/deuterio accoppiati all'analisi con spettrometria di massa (HD/MS). I protoni ammidici sono scambiati con deuterio con cinetiche che essenzialmente dipendono sia dalla accessibilità al solvente che dalla stabilizzazione delle regioni dello scheletro proteico in cui sono localizzati; protoni ammidici presenti in zone altamente strutturate della proteina e coinvolti in legami idrogeno mostreranno una cinetica di scambio più lenta mentre quelli localizzati in regioni flessibili scambieranno più velocemente. Poiché l'analisi di massa è in grado di misurare l'incremento di massa associato allo scambio dei protoni ammidici, esperimenti comparativi di scambio H/D possono essere usati per valutare le modificazioni strutturali delle proteine in differenti condizioni sperimentali, nonché gli effetti dell'interazione o aggregazione con altre molecole.

Sessione di Biostrumentazione e Bioelettronica

FABBRICAZIONE DI STRUTTURE NANOELETTRONICHE MEDIANTE SUPERRETICOLI DI NANOPARTICELLE DI ORO TIOLATE

F. Sbrana, M.T. Parodi, D. Ricci, E. Di Zitti

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA BIOFISICA ED ELETTRONICA -D.I.B.E. – UNIVERSITÀ DI GENOVA
VIA OPERA PIA 11A, 16145 GENOVA, ITALIA

Nell'ambito dello sviluppo di nuovi paradigmi computazionali derivanti dall'impiego di strutture molecolari, appare molto promettente lo sfruttamento di architetture composte da matrici di nanoparticelle metalliche dotate di proprietà di confinamento della carica (punti quantici), in grado di interagire tra loro mediante giunzioni tunnel e di ricevere iniezioni di carica o lateralmente o dal substrato. In questo scenario, l'obiettivo di questo lavoro è la fabbricazione di strutture ordinate a superreticolo di nanoparticelle di oro tiolate opportunamente accoppiate a elettrodi di oro.

Volendo pertanto realizzare sperimentalmente tali classi di schiere bidimensionali, si è scelto di preparare ad hoc dei veri e propri "nanocristalli molecolari" di oro, ottenuti con procedure di sintesi chimica, i quali consentissero di poter variare in modo flessibile il diametro e la spaziatura tra le nanoparticelle, nonché di poter funzionalizzare le stesse in modo appropriato per consentire l'ottimizzazione delle schiere ottenibili.

Per quanto riguarda invece la deposizione su substrato, si è adottata una procedura analoga ad un "montaggio" sfruttando le proprietà di auto-ordinamento dei film di Langmuir-Blodgett (LB) di nanocristalli di oro su un substrato di "ancoraggio" costituito da un film autoassemblato (SAM) di ditioli su substrato di oro. Tale scelta scaturisce dal fatto che l'auto-ordinamento reticolare del film autoassemblato, indotto dall'assorbimento delle molecole organiche di tipo n-alcanetiole su substrato di oro <111>, lascia all'esterno un insieme ordinato di siti preferenziali (legami liberi di zolfo) sui quali i nanocristalli possono legarsi. Le molecole scelte per il SAM sono state quelle di benzenedimetanetiole le quali, a causa della presenza dell'anello benzenico, è noto che si dispongono in modo normale alla superficie.

La preparazione delle nanoparticelle di oro tiolate è stata effettuata seguendo il metodo di Brust descritto in letteratura, ed è avvenuta attraverso due reazioni redox in fase a partire da tetracloroaurato di idrogeno e da bromuro di tetraoctilammonio in presenza di dodecanetiole. Le operazioni di sintesi sono avvenute a temperatura ambiente.

Acquisendo immagini al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) dei nanocristalli così ottenuti e utilizzando un software di conteggio dei nanocristalli in funzione delle loro dimensioni laterali, si è osservato che la soluzione ottenuta aveva una distribuzione piuttosto larga. Al fine di rendere la soluzione di nanocristalli adatta alla realizzazione di un film di Langmuir (da trasferire in un secondo tempo sul substrato), si è proceduto, tramite tecnica tipo "vapor transfer", alla selezione dei nanocristalli in base alle dimensioni laterali, ripetendo il procedimento fino a ottenere una distribuzione delle nanoparticelle molto stretta e con picco sul valor medio di 2 nm. Il metodo è stato valutato depositando dopo ogni singolo processo selettivo una goccia della soluzione su opportuni substrati (griglia TEM) e acquisendo immagini TEM che successivamente sono state elaborate a calcolatore con il software di conteggio. Si sono così potute individuare le condizioni ottimali per ottenere adeguati nanocristalli unitamente ad una buona quantità di prodotto dopo nove trattamenti di selezione, ottenendo una frazione avente una distribuzione con un valor medio del raggio delle nanoparticelle di 0.78 nm e deviazione standard di 0.23 nm.

Sono stati preparati substrati SAM di 1-4 benzenedimetanetiole su oro eteroepitassiale su mica, sui quali inizialmente è stato impiegato il metodo "della goccia" per verificare che la molecola organica 1-4 benzenedimetanetiole, scelta come funzionalizzante, permettesse il legame tra i nanocristalli e il substrato di oro. La caratterizzazione mediante microscopia a forza atomica (AFM) ha confermato la bontà della scelta di tali substrati, sui quali si sono quindi depositati i film LB di nanocristalli. Tali film sono stati realizzati attraverso lenti passi successivi di compressione-espansione in modo da permettere ai nanocristalli di organizzarsi all'interfaccia aria-acqua. Il metodo consiste infatti in alcune serie di compressioni e di espansioni del film in opportune condizioni di temperatura di subfase e di pressione superficiale. Partendo da una situazione di film totalmente espanso si sono condotte due serie di compressioni e di espansioni, la prima delle quali comprende 5 cicli di compressioni ed espansioni fino al raggiungimento della pressione superficiale di 5 mN/m, mentre la seconda comprende 2 cicli portando la pressione superficiale a 10 mN/m. Il film formatosi è stato trasferito facendo sfiorare orizzontalmente il substrato al film. Tale procedura ha consentito di ottenere strutture bidimensionali compatte e stabili nel tempo di nanocristalli, come mostrato dalle immagini dei campioni su scala dell'ordine di 200 nm, ottenute mediante microscopia a effetto tunnel (STM). Inoltre le immagini STM ad alta risoluzione (ordine di 50 nm), hanno evidenziato quantitativamente che la separazione tra i nanocristalli adiacenti è compatibile con le barriere tunnel tra i core metallici: dall'analisi di linea lungo un gruppo di nanocristalli si è infatti trovato che il valore medio misurato del diametro di 5 nm è in buon accordo con il diametro totale calcolato di 5.4 nm per una particella avente un diametro del core di 1.6 nm e ricoperta dal monostrato di dodecanetiole.

NON LINEAR CIRCUITS FOR THE ANALYSIS OF DNA MICROARRAY

L. Fortuna ¹, M. Bucalo ¹, P. Arena ¹, L. Occhipinti ², S. Coffa ²

¹ *UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CATANIA*

² *ST- MICROELECTRONICS, CATANIA*

In this contribution a new methodology for real-time processing of DNA chip images is proposed. We use Cellular Nonlinear Networks (CNN) to analyze the DNA microarray. Due to its architecture a two dimensional CNN array is used for image processing and pattern recognition. The parallelism of the CNN systems and their supercomputing capabilities, make the whole DNA chip methodology faster and almost real-time as regard the data processing. We will discuss the results of testing an algorithm based on CNN Universal Machine that has been designed to classify the DNA microarray image data.

NANOBIOSCIENCE: FOUNDATIONS AND APPLICATIONS

Carmelina Ruggiero

DIST UNIVERSITY OF GENOA, ITALY

Nanobioscience relates to molecular systems, cellular systems and tissues. The invention of the atomic force microscope, the setting up of methods for the fabrication of nanostructures, together with the formulation of computer based methods aiming at the understanding of molecular aspects, has allowed to evidenciate the importance of phenomena at the nanoscale. Many aspects of cellular and tissue engineering, which focuses on the solution of problems relating to the construction, repair or replacement of damaged or missing tissue in humans and other animals, are deeply related to cell and molecule behaviour. Other relevant aims of nanobioscience relate to the fabrication of electronic devices of molecular dimensions, including those obtained from molecular components.

Molecular system knowledge has recently made considerable progress.

The main challenges in genomics are the prediction and annotation of the function of genes and the derivation of suitable abstractions to compare genomes at a higher than molecular level. These goals are being achieved by the integration of methods that rapidly and efficiently identify similar sequences from databases, improving function prediction. A key role in this respect is played by integrated database and software tools combined with expert knowledge. Protein structure and engineering has been recently advanced both as relates to knowledge of proteins structure and as relates to the design and manufacture of proteins. Advanced methods, such as x-ray cristallography, high resolution NMR spectroscopy and other spectroscopy methods, complemented by theoretical and computational methods for the study of molecular mechanics and dynamics and for protein structure determination, have achieved significant progress.

In parallel with advances which are taking place on the knowledge of molecular systems, a considerable decrease of component size in conventional electronics has taken place. A foreseeable development is the fabrication of electronic devices of molecular dimensions including those from molecular components, in which single molecules will perform the logic functions. Other related aspects, which can be often investigated in conjunction with molecular computing, are the control of electron transport by molecular structures, assembly technologies for functional molecular material, energy transfer at molecular level, molecular and biomolecular sensors. Molecular electronics, centered on functional molecular material and its assembly and on the design of computational sytems with life-like capabilities, obtained using biological information processing, has achieved promising results, especially relating to linear and nonlinear devices and memories, associative and neural architectures and high speed signal processing and communication.

The most relevant topics in cellular systems as relates to applications in tissue engineering are cell mechanics, cellular mechanotransduction, cell matrix interaction, and cell interaction with scaffolds, grafts or prostheses or devices inserted in the body. Some of these aspects, especially the ones relating to cellular interactions with surfaces and biochemical enviroments, closely relate to biomaterials, since a number of polymeric biomaterials show promising capabilities. Again, aspects in the nanometer range play a key role.

Specific different applications in nanobioscience are often based on the same principles, methods and techniques. For example, molecular structure and function studies can be applied in the role right in molecular system but also in relation to cellular function and tissue. Cell adhesion study made be applied to planning surfaces of biosensors and of devices to be inserted within the body, to scaffold and graft design, and to tissue formation and restoration problems. Langmuir Blodgett films are used in molecular electronics, for polymer surfaces and biological membranes and for manufacturing biosensors.

It is possible to identify a body of knowledge including aspects which are common to many diverse application in the nanoworld. This body of knowledge is highly interdisciplinary and relates to engineering, physics, mathematics, computer methods, biology, chemistry, medicine.

STRETCHING SINGLE MOLECULES WITH THE SCANNING FORCE MICROSCOPE

Bruno Samori

DIPARTIMENTO DI BIOCHIMICA. UNIVERSITÀ DI BOLOGNA - VIA IRNERIO 48, 40126 BOLOGNA (ITALY)

With the Single Molecule Force Spectroscopy approach (1) we are studying (i) the dynamics of the interactions between plasma proteins and living bacteria, (ii) the mechano-chemistry of cell adhesion proteins and of recombinant silk proteins, (iii) the desorption processes of macromolecules adsorbed on interfaces.

The binding and unbinding of fibronectin to a single living *Staphylococcus epidermidis* bacterium was reproduced in physiological conditions and at the level of single molecules. The specificity of this interaction was demonstrated. The energy landscape along the binding and unbinding pathway was mapped and the dynamic association and dissociation rate constants were determined. An inner potential well of the binding mode was identified. The dynamic features and the dependence of the binding probability on the contact time between fibronectin and a single bacterium were discussed and compared with those reported for other adhesion molecules that mediate different dynamic states of adhesion of a cell under a hydrodynamic flow (2).

Human Angiostatin 1-5 (Ang(1-5)) is a 57 kDa proteolytic fragment of human plasminogen, made up by five compact globular modules built around a hydrophobic core and exhibiting a triple-loop topology defined by three internal disulphide bonds. We demonstrated (i) how a redox environment can modulate the Angiostatin mechanical properties, (ii) how this modulation relies, at the level of a single molecule, on the extent of the reduction of its disulphide bonds, and (iii) how, at the level of a large sample of molecules, the distribution of the different thiol/disulphide intermediates, after different reducing conditions, can be estimated by a statistical analysis of the force curves (2).

The adsorption and desorption of macromolecules on interfaces are multifaceted phenomena, which play essential roles in many technologies, such as those based on lubrication, on material adhesion and coating, and also in medicine for the development of artificial organs. The conformations assumed by the polymer molecules at the interfaces (commonly described in terms of loops, trains and tails, as sketched in Figure 1), [1, 2] determine the configurational entropy and enthalpy of the adsorption processes and hence the structural organisation, the thickness and the physical properties of the resulting depositions. We demonstrated that the scanning force microscope (SFM) in the force spectroscopy mode makes it possible to monitor, at the level of single molecules, how the extent of their cross-linking affects the adhesion energy and their conformations upon adsorption at interfaces (4).

(1) B. Samori

"Stretching Single Molecules along unbinding and unfolding pathways with the Scanning Force Microscope"

Chemistry Eur. J. 2000, 23, 4249-4255

1) Y. Bustanji, C. R. Arciola, M. Conti, E. Mandello, L. Montanaro, B. Samori

"The dynamics of fibronectin binding to a living bacterium at a single molecule level (to be published)

2) Y. Bustanji, B. Samori

The Mechanical Properties of Human Angiostatin can be Modulated by its Disulphide Bonds: a Single Molecule Force Spectroscopy Study *Angew. Chem. Int. Ed.* 2002, 41, 1546-1548

3) M. Conti, Y. Bustanji, G. Falini, P. Ferruti, S. Stefoni, B. Samori

"The desorption process of macromolecules adsorbed on interfaces: the force spectroscopy approach"

ChemPhysChem 2, 610-613 (2001)

Sessione di Cellule

ATTIVITA' CITOPROTETTIVA DELLA OVOTRANSFERRINA

F. Giansanti, M. T. Massucci, G. Di Nino, M. Turacchio, M. F. Giardi, D. Botti, P. Valenti* and G. Antonini^o.

*DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA DI BASE ED APPLICATA, UNIVERSITA' DI L'AQUILA, * DIPARTIMENTO DI MEDICINA SPERIMENTALE, II UNIVERSITA' DI NAPOLI, ° DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA, UNIVERISTA' DI ROMA TRE.*

Scopo ultimo della ricerca in oggetto e' la identificazione di peptidi derivanti dalla lattoferrina e da proteine omologhe utilizzabili terapeuticamente in quanto caratterizzati da attivita' di protezione di cellule epiteliali verso infezioni intracellulari da virus e da batteri patogeni intracellulari facoltativi. La lattoferrina e' una proteina appartenente alla famiglia delle transferrine, ed e' coinvolta nei meccanismi aspecifici di difesa verso le infezioni virali e batteriche, inibendo la penetrazione di virus e batteri patogeni in cellule ospiti non fagocitiche (Ref). D'altra parte, la lattoferrina non ha funzione di trasporto del ferro. Nei mammiferi infatti, la funzione di trasporto del ferro alle cellule dell'organismo e' svolta dalla siero-transferrina, proteina simile alla lattoferrina ma priva di attivita' antivirale ed antibatterica. Negli uccelli esiste una sola proteina simile alla lattoferrina ed alla ovotransferrina: la ovotransferrina (gia' denominata conalbumina). La ovotransferrina e' una proteina che mostra circa il 50% di omologia sia con la lattoferrina che con la siero-transferrina; e' stato dimostrato che la ovotransferrina svolge funzioni di trasporto del ferro e possiede anche una attivita' antibatterica. Tuttavia, per la ovotransferrina non e' stata finora riportata attivita' di inibizione verso la penetrazione di virus e batteri in cellule ospiti e pertanto abbiamo rivolto la nostra attenzione verso tale attivita'. La attivita' antivirale della ovotransferrina e dei peptidi da essa derivati e' stata saggiata in un sistema omologo di infezione di culture primarie di fibroblasti di embrione di pollo da parte del virus MDV (Marek Disease Virus). Il morbo di Marek e' una patologia del pollo causata dal virus MDV che e' responsabile di infezioni epidemiche causa di grave danno economico, specie in paesi in via di sviluppo dove la profilassi vaccinica e la prevenzione non sono attuate. Inoltre, il virus MDV appartiene alla famiglia degli Herpesvirus di cui condivide il modello di infezione e pertanto puo' essere preso a modello anche per altri herpesvirus quali quelli umani. La attivita' antinvasiva della ovotransferrina e' stata valutata utilizzando il modello costituito da cellule epiteliali (HeLa) e *Streptococcus pyogenes* di gruppo A. Questo microorganismo e' un importante patogeno umano che puo' causare faringiti, scarlattina e infezioni profonde anche molto gravi quali la fascite necrotizzante. Tale microorganismo appartiene al gruppo dei batteri patogeni intracellulari facoltativi, capaci di entrare in cellule epiteliali non fagocitiche, trovando nel citoplasma delle cellule ospiti un ambiente favorevole alla loro moltiplicazione ed un riparo dalle difese immunitarie dell'ospite.

La attivita' antivirale e' stata saggiata su colture di Fibroblasti Embrionali di Pollo (CEF). Come virus e' stato utilizzato l'herpesvirus MDV, Virus Vaccinico Vivo [Sierotipo I, ceppo CVI 988 (Rispons)], ad una Molteplicita' di Infezione (m.o.i.)=1 (1 virione per cellula CEF). Le proteine od i peptidi alle diverse concentrazioni (da 0.001 a 1 mg/ml) sono state aggiunte prima dell'infezione virale. La stima dell'infettivita' e' stata effettuata dopo 5 h di infezione con anticorpi fluoresceinati diretti contro antigeni virali. La attivita' antinvasiva e' stata saggiata su colture di cellule HeLa S3. Come microorganismo invasivo e' stato utilizzato lo *Streptococcus Pyogenes* di gruppo A., ad una m.o.i.=100 (100 batteri per cellula HeLa). Le proteine od i peptidi alle diverse concentrazioni (da 0.001 a 1 mg/ml) sono stati aggiunti prima dell'infezione batterica. La stima dei microorganismi intracellulari e' stata effettuata mediante conta delle unita' formanti colonia su terreno selettivo dopo uccisione dei batteri extracellulari, lavaggio e lisi delle cellule ospiti.

La ovotransferrina in questi esperimenti ha mostrato una attivita' antivirale superiore a quella mostrata dalla lattoferrina, mentre i peptidi derivati dalla ovotransferrina, selezionati per una possibile attivita' antivirale, hanno mostrato solo una debole attivita' antivirale. Per quanto riguarda la attivita' antinvasiva, la ovotransferrina ha mostrato una attivita' simile a quella mostrata dalla lattoferrina. Proteine di controllo quali siero albumina bovina, citocromo c, lattoperoxidasi e gelatina di pollo non hanno mostrato attivita' antivirale ed antinvasiva alle concentrazioni utilizzate.

E' stata quindi messa in evidenza per la prima volta una attivita' antivirale della ovotransferrina che risulta molto significativa quando venga esaminata in un sistema omologo. E' stata anche messa in evidenza una attivita' antivirale significativa posseduta da peptidi derivati dalla ovotransferrina, anche se ancora insufficiente per uno scopo applicativo. Tuttavia, gli esperimenti qui riportati hanno dimostrato come la ovotransferrina possa avere negli uccelli un ruolo cruciale nella difesa aspecifica contro infezioni virali e batteriche. Inoltre e' possibile postulare che le attivita' difensive che caratterizzano alcune proteine della famiglia delle transferrine siano comparse relativamente presto nella evoluzione, nel periodo Jurassico, prima della diversificazione dei mammiferi dagli uccelli. Negli uccelli, la funzione di trasporto del ferro e le attivita' difensive sono rimaste unite nella ovotransferrina. Nei mammiferi, invece, la siero-transferrina si e' specializzata nella attivita' di trasporto del ferro, mentre le attivita' difensive sono state ottimizzate nella lattoferrina. Nel proseguimento della ricerca verra' continuato l'esame delle proprieta' biologiche della lattoferrina, di proteine omologhe e di peptidi da esse derivati.

Ref: Lactoferrin Special Issue of Biochemistry and Cell Biology, vol. 80 (1), 2002.

CICLO DI OSSIGENAZIONE-DEOSSIGENAZIONE DELL' HB E MODULAZIONE METABOLICA DELL' ERITROCITA: STUDI FUNZIONALI E COMPUTAZIONALI.

Bruno Giardina, Claudia Bertonati e M.Cristina De Rosa

ISTITUTO DI BIOCHIMICA E BIOCHIMICA CLINICA E CNR-ISTITUTO DI CHIMICA DEL RICONOSCIMENTO MOLECOLARE C/O UNIVERSITÀ CATTOLICA DEL S. CUORE L.GO F. VITO 1, 00168 ROMA

L'eritrocita rappresenta un utile modello per lo studio dei meccanismi molecolari che sono alla base dell' organizzazione biologica di un dato organismo. L'emoglobina (Hb), la più abbondante proteina citoplasmatica, è sottoposta a meccanismi di modulazione che non solo ottimizzano il suo comportamento relativamente alla funzione principale di trasporto dell' ossigeno, ma la rendono in grado di rivestire ruoli fisiologici differenti. L'energia coinvolta nella transizione conformazionale T→R dell' emoglobina viene infatti utilizzata dalla cellula per modulare una serie di differenti funzioni biologiche che vanno dalla regolazione del metabolismo eritrocitario al coinvolgimento nel processo di invecchiamento cellulare.

In questo studio dimostriamo che il metabolismo dell'eritrocita è modulato dallo stato di ossigenazione della cellula. Il meccanismo molecolare che è alla base di questo fenomeno risiede nell'interazione dell' Hb con la banda 3, proteina integrale di membrana deputata al trasporto degli anioni. Nello stato ossigenato l' Hb non interagisce con la banda 3 che invece lega alcuni enzimi della via glicolitica (quali ad esempio l' aldolasi e la fosfofruttochinasi) inattivandoli. La parziale inibizione della glicolisi va a vantaggio dello "shunt" dei pentosi che aumenta il potenziale ossido-riduttivo della cellula. Nello stato desossigenato l'Hb interagisce invece con la banda 3 favorendo in tal modo il rilascio degli enzimi glicolitici ed attivando la glicolisi.

Utilizzando tecniche avanzate di simulazione molecolare in grado di prevedere le interazioni proteina-proteina, abbiamo inoltre ipotizzato la struttura tridimensionale del complesso formato dall' emoglobina con il peptide corrispondente al frammento N-terminale della banda 3. Il modello teorico fornisce una serie di indicazioni relative ai cambiamenti conformazionali dovuti alla formazione del complesso e che possono avere un importante ruolo funzionale.

THE MITOCHONDRIAL PRODUCTION OF OXYGEN RADICAL SPECIES AND THE ROLE OF COENZYME Q AS AN ANTIOXIDANT

M. L. Genova, M. Merlo Pich, A. Biondi, A. Bernacchia and G. Lenaz

DIPARTIMENTO DI BIOCHIMICA, UNIVERSITA' DI BOLOGNA, VIA IRNERIO 48, 40126 BOLOGNA

The mitochondrial respiratory chain is a powerful source of reactive oxygen species (ROS), considered as the pathogenic agent of many diseases and of aging. According to the mitochondrial theory of aging, progressive damage to mitochondrial DNA decreases the efficiency of the oxidative phosphorylation system through damage to the proton translocating respiratory complexes. A vicious circle of oxidative stress and mitochondrial damage ensues from the alterations of the respiratory complexes. Evidence for alterations of Complex I in aging has accumulated in our and other laboratories. Complex I is rate-limiting for electron transfer in the respiratory chain, so that its decreased activity results in decrease of coupled respiration in liver mitochondria from aged rats.

We have investigated the role of Complex I in superoxide radical production in submitochondrial particles from bovine heart and rat liver, after inhibition of the chain with the specific Complex III inhibitor, mucidin. Contrary to antimycin, mucidin does not elicit superoxide production from Complex III. The role of endogenous Coenzyme Q (CoQ) in Complex I in ROS production was investigated by combined use of specific inhibitors of Complex I acting as CoQ antagonists and by CoQ extraction from the particles. The results of the study demonstrate that the one-electron donor in the Complex to oxygen is a redox center located prior to the binding sites of three different classes of CoQ antagonists, to be identified probably with the Fe-S cluster N2, on the basis of several known properties of this cluster. Short chain CoQ homologs and analogs enhance ROS formation, presumably by mediating electron transfer from N2 to oxygen. The enhanced superoxide formation is further increased by the hydrophobic CoQ antagonists. The clinically used CoQ analog, idebenone, is particularly effective in promoting superoxide formation. Contrary to short chain quinones, the natural CoQ10 does not appear to elicit superoxide production, as evidenced by the same superoxide yield in CoQ-depleted and –reconstituted mitochondria. Moreover, reduced CoQ behaves as a potent antioxidant, as shown in isolated rat hepatocytes and in human platelets from transfusional buffy coats subjected to oxidative stress. The reduced antioxidant state of CoQ is maintained by several cellular reducing systems, including a plasma membrane oxidoreductase and cytosolic and membrane-linked DT-diaphorase.

NMN ADENYLYLTRANSFERASE: A Key Enzyme in NAD Homeostasis

Giulio Magni, Adolfo Amici, Monica Emanuelli, Nadia Raffaelli

UNIVERSITÀ DI ANCONA, ANCONA, ITALY

NMNAT has been studied and characterized in eukaryotic and prokaryotic organisms¹. In eukaryotes it is the only enzyme of the pyridine nucleotide biosynthesis to be located in the nucleus and its pivotal role can be inferred by the observation that both salvage and de novo routes converge to the reactions catalyzed by NMNAT. This activity has been correlated with crucial cellular events and it is involved in the metabolism of potent antitumor agents². As part of an on-going study on the fluctuation of cellular NAD levels, we successfully isolated the cDNA encoding NMNAT from a human placenta cDNA library³. The sequence of 1329 bp contains a full-length 837-bp coding region, corresponding to a 31.9 kDa protein whose deduced primary structure exhibits a GXFXPX(T/H)XXH consensus sequence, as found by us in other NMNATs. Northern blots detected both a major 3.1-kilobase and a minor 4.1-kilobase mRNA transcripts in all human tissues examined, being most expressed in skeletal muscle and heart. Further experiments indicated that the protein is poorly expressed in tumors, in agreement with previous reports concerning reduced NMNAT activity after malignant transformation. NMNAT gene was mapped to chromosome band 1p32-35. The three-dimensional structure of the protein determined by X-ray crystallography⁴ revealed peculiar characteristics with respect to NMNAT from *Methanococcus jannaschii* (see details in a separate abstract). Kinetic parameters of recombinant enzyme are indistinguishable from those of the native protein. Substrate specificity showed that ATP can be replaced with various purine and pyrimidine nucleoside triphosphates, thus providing novel insights into metabolic pathways involving human NMNAT. Recently a cytoplasmic tissue specific form of human NMNAT (hNMNAT-2) has been identified and characterized in our laboratory . The major enzymatic properties of hNMNAT-2 are presented.

1. G. Magni et al., Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 1999, 73A: 135-182
2. H.N. Jayaram et al., Curr Med Chem.1999, 6: 561-574
3. M. Emanuelli et al., J. Biol. Chem. 2001, 276, 406-412
- 4 G. Garavaglia et al., J. Biol. Chem. 2002, 277, 8524-8530

Sessione di Unità Funzionali Biologiche Supramolecolari

FATTORI FISICI CHE MODULANO LA FUNZIONE DELLE AMMINO OSSIDASI

M. L. Di Paolo¹, Scarpa M.², Lunelli M.², Vianello F.¹, Stevanato R.³, A. Rigo¹.

¹DIP. CHIMICA BIOLOGICA, VIA G. COLOMBO 3, FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA, UNIVERSITÀ DI PADOVA, 35121-PADOVA, E-MAIL: marialuisa.dipaolo@unipd.it

²DIP. FISICA E INFIM-UNIVERSITÀ DI TRENTO, VIA SOMMARIE 14, 38051-POVO-TRENTO.

³DIP. CHIMICA FISICA, UNIVERSITÀ DI VENEZIA, 30100 VENEZIA.

Le ammino ossidasi contenenti rame, (Cu-AO) sono degli enzimi ubiquitari, presenti cioè in tutti i tessuti ed in tutti gli organismi, sia vegetali che animali. I loro substrati fisiologici, le poliammine, sono coinvolti nei fenomeni di crescita, proliferazione e degenerazione cellulare. Lo studio dei fattori fisici che modulano l'interazione substrato-sito attivo è quindi fondamentale ed indispensabile oltre che per chiarire la loro diversa specificità di substrato, anche per poter progettare, in futuro, degli inibitori specifici da utilizzare nel campo farmacologico. Oggetto di questo studio è stata l'ammino ossidasi purificata da plasma bovino (BSAO). Per "sondare" il sito attivo sono stati scelti ed utilizzati substrati caratterizzati da una diversa struttura chimica e distribuzione di carica. Quindi, dallo studio degli effetti del pH, forza ionica, temperatura e viscosità sulle costanti cinetiche degli enzimi, per le diverse tipologie substrato, è stato possibile ottenere informazioni sulla natura delle forze (elettrostatiche o/e idrofobiche) coinvolte nell'interazione fra substrato e sito attivo. In particolare è stato messo in luce il ruolo chiave delle interazioni elettrostatiche (fra le cariche positive delle poliammine e le cariche negative di alcuni residui del sito attivo) nella fase di riconoscimento e posizionamento dei substrati all'interno del sito attivo stesso. E' stato inoltre possibile determinare i pKa dei residui del sito attivo che controllando queste interazioni controllano l'efficienza catalitica per i diversi substrati. I risultati ottenuti hanno consentito l'elaborazione di un modello del sito attivo della BSAO che spiega le interazioni (elettrostatiche ed idrofobiche) che intercorrono fra i diversi tipi di substrato e l'enzima stesso.

INTERACTOMICA IN SILICO: PREDIZIONE DI INTERAZIONI TRA PROTEINE IN ETERO-COMPLESSI CON RETI NEURALI.

Piero Fariselli e Rita Casadio

CIRB/DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA, UNIVERSITA' DI BOLOGNA

VIA IRNERIO 42, 40126 BOLOGNA

E-MAIL: piero@lipid.biocomp.unibo.it

FAX: 051-242576

TEL:051-2094005

La nostra unita' operativa ha recentemente implementato una serie di predittori essenzialmente basati su reti neurali per l'analisi di sequenze proteiche e la predizione di varie caratteristiche strutturali inclusa la predizione delle mappe dei contatti di proteine a partire dalla sequenza aminoacidica. Recentemente il problema predittivo e' stato esteso allo studio della interazione tra proteine. L'interactomica (o studio della interazione tra proteine espresse da un dato genoma in determinate condizioni fisiologiche) consente di tracciare tutte le possibili interazioni alla base del funzionamento cellulare e quindi di fornire contributi significativi alla genomica funzionale.

Diventa pertanto interessante essere in grado di predire quale sia la probabilita' di interazione di una data struttura proteica con altre strutture proteiche e quindi di localizzare quali regioni della superficie proteica siano in grado di potere interagire con altre proteine. Studi statistici sui complessi proteici strutturalmente noti indicano che in realta' le superfici di interazione tra proteine non hanno caratteristiche chimico-fisiche spiccatamente diverse da quelle della superficie proteica esposta al solvente. Utilizzando un sistema di reti neurali opportunamente addestrate a riconoscere siti superficiali di interazione da siti esposti al solvente, abbiamo dimostrato che e' possibile associare ad ogni residuo superficiale di una proteina una probabilita' o meno di interagire con altri siti in altre proteine. Questi siti danno origine a patch superficiali che possono essere predetti. L'accuratezza e' pari al 73%, quando il predittore da noi implementato e' testato con una procedura di validazione incrociata su 226 esempi di monomeri estratti da eterodimeri noti con risoluzione atomica. Il predittore e' disponibile in rete al sito (www.biocomp.unibo.it)

UNA NUOVA DIMENSIONE DELLA BIOLOGIA STRUTTURALE: STUDI DELL'ACCESSIBILITÀ DELLE SUPERFICI PROTEICHE.

Neri Niccolai

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA MOLECOLARE
UNIVERSITÀ DI SIEN - SIENA.

Attualmente la biologia strutturale rappresenta una frontiera avanzata per una comprensione dettagliata dei processi della vita. Diversi progetti di genomica strutturale sono stati presentati in tutto il mondo, dal momento che strutture predette o derivate sperimentalmente, per la maggior parte proteine, rappresentano il punto di partenza per l'ingegnerizzazione di nuovi strumenti diagnostici o terapeutici. La cristallografia a raggi X ha aperto il campo della biologia strutturale e 16000 strutture tridimensionali di proteine sono state risolte con queste tecniche. Inoltre, per più di 2000 proteine l'NMR ha aggiunto informazioni sulla mobilità locale e generale alle strutture statiche ottenute con la cristallografia.

Comunque, esistono ancora alcuni dettagli mancanti poiché le funzioni biologiche risultano non essere semplicemente correlate alla forma ed alla flessibilità della proteina. La presenza di "hot spot" sulla superficie molecolare, includenti sempre i siti attivi proteici (1-4), e l'attività anomala di alcuni inibitori enzimatici non competitivi (5) suggeriscono che intorno alla superficie proteica ci sia un moto non uniforme di molecole di solvente o altro. Questo moto determina uno specifico modello di presentazione nei confronti dell'ambiente molecolare funzionale, che deve essere conosciuto per una piena comprensione dei meccanismi di attività proteica..

Tale accessibilità superficiale dinamica dovrebbe essere delineata per poter disegnare analoghi proteici di interesse biotecnologico con funzione e stabilità modulata. L' NMR sembra essere perfettamente adatta ad investigare su questa nuova dimensione della biologia strutturale, poiché due tecniche, cioè effetti Overhauser acqua-proteina (6) e profili di perturbazione paramagnetica (7), in modo indipendente o combinato, possono essere usate per valutare l'accessibilità della superficie proteica verso molecole di differente polarità.

I risultati ottenuti con entrambi i metodi NMR per una serie di piccole proteine, BPTI, tendamistat (8), MNEI (9), lisozima ed α bungarotoxin, suggeriscono che soltanto un limitato numero di molecole d'acqua risiede sulla superficie proteica per un tempo sufficientemente lungo da permettere di registrare NOE intermolecolari. Il sito attivo di queste proteine non ha mai mostrato di avere vicino molecole d'acqua fortemente legate. In concomitanza, il TEMPOLO, un nitrossido stabile, interagisce efficientemente con quest'ultima parte della proteina grazie alla ridotta idratatazione da parte delle molecole di solvente. Inoltre, ci sono regioni della superficie dove molecole d'acqua legate, organizzate in stabili siti d'idratazione, prevengono l'accesso del nitrossido.

L'uso combinato della spettroscopia ePHOGSY e dei profili di perturbazione paramagnetica indotti dal TEMPOLO possono essere, inoltre, fortemente utili per trovare, come nel caso del BPTI, molecole d'acqua interne.

Referenze

1. Krantz A. 1998. *TIBTECH* 16, 198-199.
2. Mattos C, Ringe D. 1996. *Nature Biotech* 14:595-599.
3. Scarselli M, Bernini A, Segoni C, Molinari H, Esposito G, Lesk AM, Laschi F, Temussi PA, Niccolai N. (1999). *J Biomol NMR* 15, 125-133.
4. Liepinsh E, Otting G. 1997. *Nature Biotech* 15:264-268.
5. Savvides SN, Karplus PA. 1996. *J Biol Chem* 271, 8101-8107.
6. Otting G. 1997. *Prog NMR Spectrosc.* 31, 259-285.
7. Esposito G, Lesk AM, Molinari H, Motta A, Niccolai N, Pastore A (1992) *J Mol Biol* 224, 659-70.
8. Niccolai N., Ciutti A., Spiga O., Scarselli M., Bernini A., Bracci L., Di Maro D., Dalvit C., Molinari H., Esposito G. and Temussi Piero A. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 276, 42455-42461 (2001).
9. Niccolai N., Spadaccini R., Scarselli M., Bernini A., Crescenzi O., Spiga O., Ciutti A., Temussi P.A. (2001) *Protein Sci*, 10, 1498-1507.

ENERGETICA DELLA FOTOTRASDUZIONE: ATTIVITÀ MIOCINASICA NEI DISCHI DEI BASTONCELLI DELLA RETINA

Isidoro M. Pepe

*FACOLTÀ DI MEDICINA
UNIVERSITÀ DI GENOVA.*

Durante la fototrasduzione una grande quantità di ATP è consumata per sintetizzare cGMP. Infatti, alla luce il consumo di ATP passa da un valore di circa 28 $\mu\text{M ATP} / \text{s}$ ad un valore di 126 $\mu\text{M ATP/s}$, che è più alto della quantità di ATP fornita dagli enzimi della glicolisi (circa 95 $\mu\text{M ATP/s}$). Inoltre l'energia che serve alla fototrasduzione deve essere fornita in tempi dell'ordine dei millisecondi. Per questa ragione la sorgente di energia deve essere localizzata sui dischi dove avvengono le reazioni della fototrasduzione, come l'attivazione della trasducina e la fosforilazione della rodopsina. Il nostro gruppo ha messo in evidenza nei bastoncelli della retina di bue l'attività dell'enzima adenilato cinasi (miocinasi) che si trova localizzato sulle membrane dei dischi del segmento esterno. L'attività dell'enzima dipende dalla concentrazione di ioni calcio ed è massima tra 10^{-6} and $10^{-7} \text{ M } [\text{Ca}^{2+}]$, che è l'intervallo di concentrazione del calcio effettivamente presente nel citoplasma del bastoncello. A concentrazioni di Ca^{2+} e ADP fisiologici, la miocinasi rigenera ATP alla velocità di 160 $\mu\text{M ATP/s}$, che è dell'ordine di grandezza della quantità di ATP necessaria per sostenere le reazioni di fototrasduzione nel fotorecettore.

Inoltre sembra che la miocinasi dei dischi appartenga alla famiglia delle proteine il cui N-terminale è miristoilato, come dimostra il riconoscimento su Western blot dell'anticorpo anti AK1.

ABSTRACT
DEI POSTER

IL TRAPIANTO DI PRECURSORI ENDOTELIALI PER IL TRATTAMENTO DELL'ISCHEMIA PERIFERICA: EFFETTO SINERGICO DELLA TERAPIA GENICA CON CALLICREINA UMANA.

Paolo Madeddu, Maria Bonaria Salis, Costanza Emanuelli, Gian Luigi Condorelli, Tiziana Stacca, Alessandra Pinna, Anna Franca Milia, Cesare Peschle.

ISTITUTO DI CLINICA MEDICA UNIVERSITÀ DI SASSARI, LABORATORIO NAZIONALE INBB, OSILO, UNIVERSITÀ LA SAPIENZA E ISTITUTO SUPERIORE SANITÀ. ROMA

Recenti progressi in medicina vascolare hanno portato alla proposta di angiogenesi e vasculogenesi terapeutica come rimedio per il trattamento di situazioni ischemiche non suscettibili di rivascularizzazione tradizionale. Gli approcci terapeutici volti a potenziare la neovascolarizzazione nativa mediante progenitori endoteliali (EPC) sono attualmente limitati dalla quantità di materiale (sangue periferico o midollo osseo) ottenibile da pazienti di per sé critici. Inoltre, le EPC ottenute da individui malati potrebbero presentare alterazioni funzionali tali da compromettere il successo di un auto-trapianto. Lo scopo del nostro studio è stato di valutare se sia possibile potenziare le proprietà curative di EPC combinando tale strategia al trasferimento genico di callicreina tessutale umana (hTK). Topi non-immunocompetenti Scid sono stati sottoposti ad asportazione chirurgica dell'arteria femorale sinistra. Nella stessa occasione, EPC umane CD34+/KDR+, purificate mediante citofluorimetria da sangue di cordone ombelicale, sono state iniettate (in quantità di 10^3 in 20 μ l PBS) nel muscolo adduttore ischemico da sole o in combinazione al trasferimento genico di hTK mediante vettore adenovirale (10^9 p.f.u). Gruppi di controllo ricevevano EPC CD34+/KDR- (10^4), hTK, o PBS (veicolo). A distanza di 24 giorni dall'induzione di ischemia, la densità capillare nei muscoli adduttori iniettati con PBS risultava 1264 (SE, 122) cap/mm². Questi valori risultavano simili a quelli osservati nei muscoli iniettati con CD34+/KDR-. L'iniezione di CD34+/KDR+ determinava un significativo aumento ($P<0.01$) della capillarizzazione del muscolo ischemico raggiungendo 1714 (142) cap/mm². Tale effetto persisteva dopo normalizzazione per il numero di miofibre. L'incorporazione delle EPC in foci di neovascolarizzazione è stata confermata mediante immunisto chimica per l'antigene nucleare umano. L'aumentata capillarizzazione da parte di CD34+/KDR+ portava ad un significativo miglioramento del recupero emodinamico (53 vs 23 e 6% nei topi iniettati con veicolo o CD34+/KDR-, rispettivamente, $P<0.02$). Anche il trattamento con hTK migliorava il recupero (45%), tuttavia il migliore risultato si registrava con la combinazione di CD34+/KDR+ e hTK (73%). In questo gruppo, nessun animale mostrava amputazione dell'estremità distale, mentre tale evento ricorreva nel 43 e 45% dei topi iniettati con hTK o CD34+/KDR+ singolarmente e nel 93% dei casi iniettati con CD34+/KDR-. In conclusione, i nostri dati documentano la possibilità di accelerare il processo di guarigione mediante trapianto di EPC a basso dosaggio. Inoltre, la combinazione con un fattore di crescita angiogenico ha effetti sinergici con le EPC. Tali risultati forniscono evidenza sperimentale della efficacia terapeutica della strategia basata sul potenziamento della angiogenesi e vasculogenesi terapeutica per il trattamento dell'ischemia periferica.

Argomento: Terapia genica
Biologia Vascolare

PREDICTION OF THE TRANSMEMBRANE REGIONS OF BETA BARREL MEMBRANE PROTEINS WITH PREDICTORS BASED ON HMM AND NEURAL NETWORKS

P.L.Martelli (1), P.Fariselli (1,3), A.Krogh (2) and R.Casadio (1,3)

1 LABORATORY OF BIOCOMPUTING, CENTRO INTERDIPARTIMENTALE PER LE RICERCHE BIOTECNOLOGICHE (CIRB), BOLOGNA, ITALY

2 CENTRE FOR BIOLOGICAL SEQUENCE ANALYSIS, THE TECHNICAL UNIVERSITY OF DENMARK, LYNGBY, DENMARK

3 LABORATORY OF BIOPHYSICS, DEPARTMENT OF BIOLOGY, UNIVERSITY OF BOLOGNA, BOLOGNA, ITALY.

Beta-barrel membrane proteins are inserted in the outer membranes of bacteria, mitochondria and chloroplasts by means of antiparallel beta strands(1). The prediction of the structure of these proteins consists in the prediction of the position of beta-strands along the sequence.

A method based on neural networks is trained and tested on a non-redundant set of beta-barrel membrane proteins known at atomic resolution with a jack-knife procedure (2). This method predicts the topography of transmembrane beta strands with residue accuracy as high as 78 % when evolutionary information is used as input to the network. The neural network results are improved with a post-processing procedure based on Hidden Markov Models (HMM).

The new algorithms we developed make possible to train HMMs on the basis of neural network outputs and to perform predictions that include the typical topological constraints of this class of proteins (e.g. segment lengths, even number of beta-strands).

HMMs based on evolutionary information can be trained by means of similar algorithms (4). After a jack knife procedure, the predictor assigns:

- the correct structure to 83 % of the residues;
- the correct topology for 7 out of the 12 examples of the training set;

We propose this as a general method to fill the gap of the prediction of the structure of beta-barrel membrane proteins. Furthermore, the HMM based on evolutionary information can filter beta-barrel membrane proteins out from a set containing globular and all-alfa membrane proteins.

(1) Schulz, GE (2000) -Beta-barrel membrane proteins- Curr Op Struct Biol 10: 443-447.

(2) Jacoboni I, Martelli PL, Fariselli P, De Pinto V e Casadio R (2001) -Prediction of the transmembrane regions of beta-barrel membrane proteins with a neural network-based- Protein Sci 10: 779-787

(3) Durbin R, Eddy S, Krogh A, Mitchinson G (1998) -Biological sequence analysis: probabilistic models of proteins and nucleic acids- Cambridge Univ Press, Cambridge.

(4) Martelli PL, Fariselli P, Krogh A, Casadio R (2002) -A sequence-profile-based HMM for predicting and discriminating beta barrel membrane proteins- Bioinformatics 18: S46-S53

IL LIVELLO DI ESPRESSIONE DI C-MYC CONTROLLA IL PROCESSO DI REMODELLING NEGATIVO NELLE CAROTIDI DI RATTO SOTTOPOSTE AD INSULTO CHIRURGICO

A. Forte*, S. Esposito^o, U. Galderisi*, M. De Feo[^], G. Di Micco[^], F. Esposito*, A. Renzulli[^], L. Berrino*, M. Cipollaro*, L. Agozzino^o, M. Cotrufo[^], F. Rossi*, A. Cascino*

*DIPARTIMENTO DI MEDICINA SPERIMENTALE, ^oDIPARTIMENTO DI MEDICINA PUBBLICA, [^]DIPARTIMENTO DI SCIENZE CARDIOTORACICHE, FACOLTÀ' DI MEDICINA E CHIRURGIA, SECONDA UNIVERSITÀ' DEGLI STUDI DI NAPOLI

Obiettivi

La stenosi arteriosa è un processo fisiopatologico che si verifica nel 30-50% dei pazienti sottoposti ad interventi di angioplastica, endoarterectomia o *by-pass*. La sua alta incidenza ha stimolato numerosi studi allo scopo di meglio definirne i meccanismi molecolari e per identificare terapie efficaci. I modelli animali più frequentemente utilizzati prevedono l'induzione della stenosi tramite angioplastica.

Lo studio da noi condotto è basato sull'induzione della stenosi arteriosa in carotide di ratto tramite un modello di insulto chirurgico che imita il danno subito da arterie sottoposte a *by-pass* artero-arteriosi. Tale modello è stato utilizzato per verificare l'efficacia di oligonucleotidi (ODN) antisenso (AS) fosforotioati diretti contro il proto-oncogene *c-myc* nella riduzione della stenosi arteriosa 30 giorni dopo l'intervento e per analizzare, nella fase acuta successiva all'intervento, il loro effetto sull'espressione di altri geni coinvolti nel differenziamento, nella proliferazione cellulare e nell'apoptosi.

Metodi

Il trauma alla carotide di ratto è stato eseguito con uno schiacciamento del vaso per 10'' con un *clamp* e seguito da un taglio omotetico di circa 0.5 mm attraverso l'intero spessore della parete arteriosa. L'emostasi è stata ottenuta con l'applicazione di un singolo punto con filo di polipropilene 8.0.

L'efficacia degli ODN AS rispetto agli ODN S di controllo è stata preliminarmente verificata *in vitro* su SMC. E' stato determinato sia il numero di cellule tramite saggi di proliferazione che il livello di mRNA codificante per *c-Myc*, tramite esperimenti di RT-PCR semi-quantitativa.

L'efficacia *in vivo* degli ODN AS è stata verificata 4 ore dopo l'insulto chirurgico e la successiva applicazione locale degli ODN, misurando il livello di *c-Myc* mRNA. L'analisi tramite RT-PCR semi-quantitativa è stata estesa per analizzare l'effetto dell'ODN AS sull'espressione anche di altri geni. L'effetto antisenso sui fenomeni di stenosi indotti da insulto chirurgico è stato infine analizzato tramite analisi morfologica e morfometrica 30 giorni dopo l'intervento.

Risultati

La somministrazione di ODN AS diretti contro *c-Myc* a colture di SMC ha indotto una riduzione del 35% del livello dell'mRNA bersaglio rispetto agli esperimenti di controllo, ed una riduzione dell'80% del numero di SMC 24 ore dopo il trattamento. L'applicazione degli ODN AS su carotidi di ratto sottoposte ad insulto chirurgico ha indotto una riduzione del 60% dell'mRNA bersaglio 4 ore dopo l'intervento. L'analisi morfometrica delle carotidi eseguita 30 giorni dopo l'insulto chirurgico ha rivelato che il trattamento con ODN AS ha contribuito a mantenere il lume vasale più ampio del 35% rispetto alle carotidi di controllo. Non è invece stato rilevato alcun effetto significativo degli ODN AS sull'area della media. Il rapporto media/lume ha mostrato una riduzione del 63% nelle carotidi trattate con ODN AS rispetto alle carotidi di controllo. La riduzione del livello di mRNA codificante per *c-Myc* provocata dagli ODN AS ha indotto una variazione significativa dei livelli di espressione dei geni *rb/p105* ed *rb2/p130*, mentre non ha avuto effetto sull'espressione dei geni *bcl-2*, *bax* e *bcl-x* correlati a fenomeni apoptici.

Conclusioni

I risultati ottenuti dimostrano che la riduzione del livello di mRNA codificante per *c-Myc* tramite l'applicazione locale di ODN AS fosforotioati è efficace nel limitare i fenomeni di *remodelling* negativo indotti dal nostro modello di insulto chirurgico.

Bibliografia:

- Forte A., Di Micco G., Galderisi U., Guarino F. M., Cipollaro M., De Feo M., Gregorio R., Bianco M. R., Vollono C., Esposito F., Berrino L., Angelini F., Renzulli A., Cotrufo M., Rossi F. and Cascino A.: "Molecular analysis of arterial stenosis in rat carotids". *J. Cellular Physiology*, 186(2), 307-313, (2001).
- Forte, G. Di Micco, U. Galderisi, M. De Feo, F. Esposito, S. Esposito, A. Renzulli, M. Agozzino, M. Cipollaro, L. Berrino, M. Cotrufo, F. Rossi and A. Cascino: "Characterization of surgically induced stenosis in spontaneously hypertensive rats". *J. Vascular Research* 143, (2002)
- G. Di Micco, A. Forte, M. Cipollaro, A. Renzulli, M. De Feo, F. Rossi, A. Cascino and M. Cotrufo: "Surgical Injury of Rat Arteries: Genetic Control of the Remodelling Process". *European Journal of Cardio-thoracic Surgery* (2002) (in press)

FABRICATION AND CHARACTERIZATIONS OF POLY(N-VINYL CARBAZOLE) (PVK) AND PVK-MULTI WALLED NANOTUBES (MWNTs) LANGMUIR-SCHAEFER FILMS

P. Bertoncello^{a,*}, C. Nicolini^a

^a DEPARTMENT OF BIOPHYSICAL, M&O SCIENCE AND TECHNOLOGIES, (DISTBIMO), UNIVERSITY OF GENOA, CORSO EUROPA 30, 16132 GENOA, ITALY - E-MAIL: p.bertoncello@tin.it

Poly(N-vinyl carbazole) (also as hole transporting material) is an attractive polymer owing to its photoconductive properties and its ability to form complex salt and composite with electron-donor compounds [1]. The photoconductivity of PVK film increases by doping with weak electron acceptor whereas doping with a strong acceptor produces a charge complex material. Fullerene has got higher affinity and excellent electron acceptor and can easily form charge transfer complex with PVK, means a better photoconducting materials. Recently, the carbon nanotubes (CNTs) molecules that show a great promise for engineering applications due to their high strength and stiffness, and unique physical and electrical characteristics and finds applications in various important fields [2]. So, recently, it has been envisioned that nanocomposites formation and functionalization in nanotube with resin, conducting polymer or polymeric materials would highlight the enhancement in physical properties of nanotube and resulting to a novel material. The electrochemical and chemical method for the synthesis of CNTs-polypyrrole, CNTs-polythiophene and CNTs-poly(phenylene vinylene), CNTs-poly(anilines) composites have been studied [4,5]. But no work has been shown with a hole transporting material such as as poly(N-vinyl carbazole).

This manuscript focuses on the use of a method of solubilizing carbon nanotubes with a approach: through the polymerization of N-vinyl carbazole into CNTs. Keeping in view the properties emanating in nanocomposite material, an attempt has been made to synthesize composite materials using CNTs-poly(N-vinyl carbazole) by oxidative polymerization technique. The addition of organic salt is observed as a necessary step to obtain a soluble composite as well as soluble PVK polymer. The materials have been characterized using HPLC, UV-visible and FTIR techniques. The processibility of the synthesized materials was exploited for engineering the supramolecular thin films by using Langmuir-Schaefer technique. UV-vis, Brewster Angle Microscopy (BAM), UV-vis spectroscopy and Quartz crystal microbalance (QCM) techniques were used to investigate the uniformity and quality of LS films. The surface morphological properties of such thin films were studied by using Scanning probe microscopy and Transmission Electrons microscopy (TEM), techniques, respectively. The optical, electrical, electrochemical and photoelectrochemical properties of MWNTs-PVK or PVK LS films have been investigated at length.

References.

1. L.-T. Weng, P.C.L. Wong, K. Ho, S.H. Wang, Z.H. Zeng, S.H. Yang, *Anal. Chem.* 72 (2000) 4908
2. M. S. Dresselhaus, G. Dresselhaus, P. C. Eklund, *Science of Fullerenes and Carbon Nanotubes* (Academic Press, San Diego, CA, 1996)
3. M.K. Ram and C. Nicolini, Thin conducting polymeric films and molecular electronics, in *Recent Research Developments in Physical Chemistry*, Vol. 4 (2000) Part II, 219-258
4. V. Bavastrello, M. K. Ram and C. Nicolini, *Langmuir*, 18, (2002), 1535
5. J.N. Coleman, S. Curran, A.B. Dalton, A.P. Davey, B. Mc. Carthy, W. Blau and R.C. Barklie, *Synth. Metals*, 102 (1999) 1174

THIN FILMS OF FERULIC ACID DERIVATIVES FOR COSMETIC APPLICATION STUDY

Cristina Paternolli¹, Mirco Antonini¹, Emy Pulsinelli² and Claudio Nicolini¹

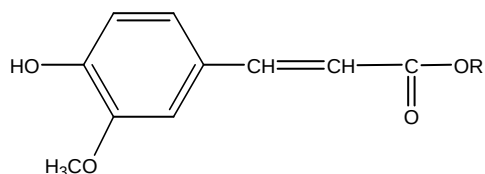
¹ DEPARTMENT OF BIOPHYSICAL M&O SCIENCES AND TECHNOLOGIES, UNIVERSITY OF GENOA, CORSO EUROPA 30, 16132 GENOA, ITALY TEL. +390103538541, FAX +390103537584, E-MAIL: cristina@ibf.unige.it

² DEPARTMENT OF PHARMACEUTICAL AND TECHNOLOGICAL SCIENCE, UNIVERSITY OF SIENA, VIA DELLA DIANA, 2, 53100 SIENA, ITALY

Sunscreens act by absorbing or scattering UV radiation and are widely available for public use as a consumer product. The protection achieved is often less than expected depends upon a number of factors: application thickness, type of sunscreen applied, resistance to water immersion and sand abrasion and when, where and how often sunscreen is re-applied.

The sunscreens can be subdivided into chemical UV filters and physical blockers. A Japanese patent introduce the use of ferulic acid derivatives as sunscreens and cancer chemopreventive agents.

The figure below shows this family of compounds:



where R=H, linear or branched alkyl chains (1).

In order to verify the dependence of the protection on the identified factors, thin films of ferulic acid and its derivatives were realized and characterized.

The thin films were realized utilizing Langmuir-Blodgett, spreading and spin coating techniques.

In particular the Langmuir-Blodgett technique permits to obtain well-organized structures and to control the single layer of molecules deposited. This offers a great advantage in order to verify the best conditions in which the ferulic acid and its derivatives work.

A preliminary study of the monolayer at air-water interface (Langmuir film) in order to find the best deposition conditions was performed. In particular π -A isotherms in function of pH, ionic strength and different subphases were done for each type of acid (2).

The characterization of the films was performed by means of surface potential, nanogravimetry, spectrophotometry, AFM and Brewster Angle Microscopy.

References

1. Tanigushi, H., Hosoda, A., Tsuno, T., Maruta, Y., Nomura, E., (1999) *Anticancer Res.* **19**, 3757
2. Roberts G., *Langmuir-Blodgett films*, (1990), Plenum Press, New York.

MALFORMAZIONI ASSOCIATE A DIFETTI DEL SISTEMA “CHAPERON”: IL KO DI MSJ-1 PER GENERARE “ANIMALI MODELLO” DI PATOLOGIA

Rosaria Meccariello, Gilda Cobellis, Giulia Fienga, Riccardo Pierantoni, Silvia Fasano

*DIPARTIMENTO DI MEDICINA SPERIMENTALE
II UNIVERSITÀ DI NAPOLI
VIA COSTANTINOPOLI 16 - 80138 NAPOLI.*

Il gene *msj-1* (mouse sperm cell specific DnaJ first homologue) è espresso ad elevati livelli nelle cellule germinali apolidi (spermatici e spermatozoi). Esso codifica una proteina “chaperon”, localizzata in sede acrosomale e centriolare, che interagisce direttamente con Hsp70-2. Una modesta espressione di *msj-1* si osserva anche nel midollo spinale, dove la proteina è localizzata nei motoneuroni delle corna ventrali. Il ritrovamento di *Msj-1* nel testicolo e nel midollo spinale di un basso vertebrato (l'anfibio *Rana esculenta*), nei medesimi tipi cellulari osservati nei roditori, suggerisce un suo alto grado di conservazione, nonché l'espletamento di una basilare funzione. La “down-regolazione” di *msj-1* nel topo wobbler, portatore di una mutazione autosomica responsabile di atrofia muscolare e sterilità maschile dovute rispettivamente alla degenerazione dei motoneuroni cervicali del midollo spinale ed alla spermiogenesi difettiva, fa ritenere il gene importante per la funzionalità del SNC e per la fertilità. Data la molteplicità di fattori coinvolti nella modulazione della spermatogenesi e dell'attività del SNC, nonché le numerose patologie imputabili a difetti del sistema degli “chaperon” molecolari, ci siamo proposti di disattivare il gene *msj-1* per chiarirne la funzione.

Per la caratterizzazione del gene abbiamo usato una genoteca fagica di tessuti di topo (129 Sv). Da un clone positivo abbiamo isolato un inserto (18000 bp) che è stato clonato in pBluescript II-KS. Mediante “colony hybridization”, usando come cellule competenti il ceppo Top F10 di *E.coli*, abbiamo isolato i cloni con l'inserto. Caratterizzata la mappa di restrizione dell'inserto, mediante Southern blot, abbiamo localizzato il gene e sequenziato i frammenti di DNA genomico che lo contengono.

La regione codificante *msj-1*, 70 basi di 5'UTR e 145 basi di 3'UTR sono contenute in un unico esone. Nelle 300 basi a monte della sequenza 5'UTR, con il programma “Promoter Scan”, è stata evidenziata la presenza di un promotore putativo. La sequenza così ottenuta è stata impiegata in GeneBank, sezione menoma umano, per ricercare un omologo putativo (programma “blast search”). La ricerca ha evidenziato sul cromosoma 11 un putativo omologo di *msj-1* (73% totale di omologia), funzionale a livello testicolare. Come nel topo, la regione codificante questo gene è contenuta in un unico esone ed ha il 79% di omologia con quella murina. Attualmente stiamo completando la caratterizzazione del gene murino per poter effettuare il “gene targeting” costruendo un vettore di sostituzione in cui una cassetta, contenente come marcatore il gene per la resistenza alla neomicina, sostituirà la regione codificante *msj-1*, interrompendo le due regioni fiancheggianti. Si procederà, poi, alla produzione di chimere e di un ceppo murino geneticamente definito a partire da cellule ES ricombinanti.

L'alto grado di omologia trovato fra il gene umano e quello murino, nonché la loro somiglianza strutturale, ci confermano l'alto grado di conservazione del gene facendo anche supporre che esso svolga un ruolo fisiologico chiave in tutti i vertebrati.

EFFECTS OF PAMIDRONATE AND OF A FARNESYL TRANSFERASE INHIBITOR ON THE APOPTOSIS OF HUMAN EPIDERMOID CANCER CELLS

Michele Caraglia*, Anna Maria D'Alessandro*, Monica Marra*, Gaia Giuberti*, Alberto Abbruzzese*

**DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS, II UNIVERSITY OF NAPLES, NAPLES;*

Pamidronate (PAM) affects the isoprenylation of intracellular proteins involved in signal transduction, such as small G proteins, through the inhibition of farnesyl-pyrophosphate synthase. This effect can induce apoptosis in cancer cells. Here we report that 48 h 25 μ M PAM induced 50% growth inhibition and apoptosis in human epidermoid cancer KB and H1355 cells and abolished the proliferative stimulus induced by epidermal growth factor (EGF) as evaluated with haemocytometric cell count and with gel ladder and FACS analysis after labelling for annexin V. In the same experimental conditions a strong decrease of ras activity and of its stimulation by EGF was recorded as evaluated with affinity precipitation assay. Also raf-1 expression was strongly reduced by PAM in KB cells. Therefore, we have evaluated if the reduced expression of raf-1 could be due to modification of its ubiquitination. We have indeed found that the exposure of cancer cells to the PAM induced an about 2-fold increase of the ubiquitination of raf-1. These effects were paralleled by a reduction of the activation of the key enzymes extracellular signal regulated kinase 1 and 2 by EGF. Moreover, we have used PAM in combination with R115777 farnesyltransferase inhibitor in order to increase the antitumor effect of aminobiphosphonate through the complete disruption of the ras-dependent signalling. The two drugs after 72 h had a synergistic effect on the growth inhibition of KB and H1355 cells as evaluated with spectrophotometric assay and subsequent analysis with a dedicated software (by Chou and Talalay). These effects occurred together with a strong synergism on the apoptosis as evaluated with FACS analysis after labelling for annexin V. In fact, when 0.07 nM R115777 and 0.07 μ M PAM were used alone they did not induce apoptosis while the two drugs together caused 36 % of apoptosis in cancer cells. These results could be useful in the design of new therapeutical strategies in the therapy of epidermoid head and neck and lung cancers.

CORRELATED EFFECTS OF NITROSOPROPOFOL AND OMOLOGUES ON MITOCHONDRIAL RESPIRATION AND PHOSPHOLIPID MEMBRANES

S. Fabris, F. Momo, A. Bindoli, G. Scutari, R. Stevanato

DIPARTIMENTO DI CHIMICA FISICA, UNIVERSITA' DI VENEZIA

Nitrosopropofol (2-6-diisopropyl-4-nitrosophenol) has dramatic consequences for respiration, ATP synthesis and transmembrane potential of isolated rat liver mitochondria at concentrations which, in the case of propofol (2-6-diisopropylphenol), do not cause any apparent effects.

The study was extended to a series of 2,6-X-phenol compounds, i.e. phenol (POH), 2,6-dimethylphenol (DMP), 2,6-diisopropylphenol (DPP) and 2,6-diterbutylphenol (DTP), and their 2,6-X-4-nitrosophenol derivatives, p-nitrosophenol (POHNO), 2,6-dimethyl-4-nitrosophenol (DMPNO), 2,6-diisopropyl-4-nitrosophenol (DPPNO) and 2,6-diterbutyl-4-nitrosophenol (DTPNO), in order to see if other molecules than DPPNO have relevant effects on mitochondrial respiratory chain, and whether they depend or not on the presence of the NO group. We investigated the interaction of these compounds, of different steric hindrances and polarities, with phospholipid membranes, to get information about their distribution inside the lipid bilayer and how they interfere with the ordered lipid organisation. The investigation was performed with different techniques, differential scanning calorimetry (DSC), spin labelling (ESR), which furnished useful elements to understand the mechanisms of interaction and a possible explanation of the peculiar role of the NO group.

The DSC profiles of the liposomes in the presence of all the 2,6-X-phenols are characterised by some decrease of transition temperature (T_c) and by a slight broadening of the profiles at increasing dopant concentrations; the results can be interpreted in terms of non specific interactions of small, weakly or non-polar molecules with the membrane producing a limited deterioration of the packing and the size, of the cooperative units undergoing the transition. On the basis of the calorimetric data, DMPNO has to be assigned to this group as well.

The behaviour of DPPNO and DTPNO is markedly different: they determine a stronger decrease of both the temperature and the cooperativity of the transition, as demonstrated by the large broadening of the profiles, and destroy any detectable transition in concentration even less than 10 mM, when, on the presence of all the other molecules, the transition is still clearly detectable.

ESR spectra have been collected for stearic acids, spin labeled at the 5th, 7th, 10th carbon position (nSASL), incorporated in DMPC liposomes. The spectra were collected at 20.0 °C, below the gel to fluid state transition temperature of DMPC and are interpreted in terms of the distance between the outer hyperfine lines (A_{max}). With the exception of DPPNO and DTPNO, the A_{max} values are all grouped around the same values, laying very near the unperturbed value of nSASL in pure DMPC. The results are coherent with those obtained by DSC and confirm that 2,6-X-phenols and DMPNO have very poor effectiveness on the lipid bilayer. In particular, spin labelling demonstrates that, at the concentrations of the experiments, the deepest region of the bilayer is scarcely affected by the presence of the dopants and that the major effects of DPPNO and DTPNO originate from the partitioning of these molecule into the interfacial region or the very near hydrocarbon moiety.

The data relative to oxygen consumption show that the molecules which are effective on the energetic system of mitochondria are DTPNO and DPPNO. These results on the mitochondrial respiration experiments, confirm a tight correlation between the action of these molecules on mitochondria and their perturbing effects on membranes, thus suggesting the hypothesis that the influence on the membrane properties may be responsible of the anaesthetic action of propofol, like it was already hypothesised for other classes of anaesthetics, narcotics and antidepressants.

OXIDATIVE STRESS INDUCED BY HOMOCYSTEINE IN HUMAN PLATELETS: THE ROLE OF CALCIUM AND ARACHIDONIC ACID

M.G. Signorello, R. Pascale and G. Leoncini.

DEPARTMENT OF EXPERIMENTAL MEDICINE – BIOCHEMISTRY SECTION, UNIVERSITY OF GENOA, VIALE BENEDETTO XV 1, 16132 GENOVA ITALY.

Introduction: Elevated concentrations of homocysteine are associated with an increased risk of atherosclerosis and thrombosis. Prolonged exposure to high concentrations of homocysteine affects endothelial cells and alters endothelial-platelet interactions. Nevertheless the pathogenic mechanism of homocysteine is unknown. The aminoacid could exert its pathogenicity through oxidative mechanisms and reactive oxygen species (ROS) could have a role. The present report shows that homocysteine in a dose and time-dependent manner induces ROS accumulation. Intracellular calcium elevation and arachidonic acid release are directly and/or indirectly involved in this effect.

Materials and methods: Washed platelets were prepared as previously described (1). ROS were measured by the intracellular formation of 2', 7'-dichlorofluorescein (DCF) (2) (Fluka Chemie AG). Arachidonic acid release and intracellular calcium concentration were determined as previously reported (3). TXB₂ was quantified by TXB₂ radio immunoassay (RIA) kit (NENTM Life Science Products Inc). All other chemicals were purchased from Sigma Chemical Co.

Results: The treatment of human platelets with homocysteine produces intracellular ROS elevation. The effect is dose-dependent, being homocysteine more effective at low concentrations (10-50 μ M). Cysteine is ineffective and trolox (a water soluble tocopherol) protects against ROS accumulation. Experiments carried out in platelets treated with 5,8,11,14-eicosatetraynoic acid (ETYA), which inhibits arachidonic acid release and metabolism or with diphenyleneiodonium (DPI), a known inhibitor of NAD(P)H oxidase and nitric oxide synthase (NOS), have shown that ETYA and DPI reduce ROS accumulation of about 45% and 25% respectively. Thus arachidonic acid could be directly and/or indirectly (through the NAD(P)H oxidase activation) involved in ROS accumulation. Homocysteine dose- and time-dependently increases arachidonic acid release and TXB₂ formation. The levels of these compounds are strictly correlated ($r^2=0.99$). In addition homocysteine in a dose- and time-dependent manner increases intracellular calcium levels. Likely homocysteine acts stimulating arachidonic acid release by the calcium-dependent c-phospholipase A₂ activation. Arachidonic acid through the cyclooxygenase and non cyclooxygenase enzymes can generate ROS and by itself can stimulate NAD(P)H oxidase to produce ROS. Moreover ROS amplify the response by stimulating the c-phospholipase A₂ and cyclooxygenase pathways. In conclusion data suggest that homocysteine induces oxidative stress in human platelets. The imbalance in redox state and the increased TXB₂ formation may produce hyperactivation, contributing to the various thrombogenic effects described in hyperhomocysteinemia (4).

References.

1. Leoncini G et al. (1990) *Eur. J. Haematol.* 44, 115-120
2. Leoncini G et al. (1991) *Biochem. Int.* 25, 647-655
3. Leoncini G et al (1999) *Biochem. Pharmacol.* 57, 785-791
4. Townsend J et al. (1998) *Blood Rev.* 12, 23-34

AN ALTERNATIVE CLUSTERIN (SGP-2, TRPM-2, APOJ) ISOFORM IS EXPRESSED IN SV40-IMMORTALIZED HUMAN PROSTATE EPITHELIAL CELLS (PNT1A) FOLLOWING APOPTOSIS INDUCTION

A. E. Caccamo³, M. Scaltriti¹, F. Scorcioni¹, M. Brausi² and S. Bettuzzi³

¹DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMEDICHE, UNIVERSITÀ DI MODENA E REGGIO EMILIA, MODENA, ITALY;

²OSPEDALE ESTENSE-S.AGOSTINO, DIVISIONE UROLOGIA, MODENA, ITALY;

³DIPARTIMENTO DI MEDICINA SPERIMENTALE, UNIVERSITÀ DI PARMA, VIA VOLTURNO 39, 43100 PARMA, ITALY. - E-MAIL: saverio.bettuzzi@unipr.it

Introduction

Clusterin is an heterodimeric glycoprotein, encoded by a single gene (1, 2), that is abundantly distributed in the body. Its translated product is internally cleaved to produce α - and β -chains, which are then linked by five inter-chain disulfide bonds (3). Many patho-physiological functions have been proposed for clusterin *in vivo*, including lipid transport, complement cascade regulation, membrane remodelling, tissue degeneration and apoptosis (4). However, the precise physiological role of clusterin *in vivo* has not been established yet. Its expression level is dependent on the proliferation state, since clusterin is up-regulated in quiescent human fibroblasts (5), but is down-regulated after induction of cell proliferation (6). Recently, we have demonstrated that clusterin transient over-expression caused slowing down cell cycle progression in SV40-immortalized human prostate epithelial cells (7). It was reported that in cells surviving death an alternative clusterin isoform is produced (8, 9). This isoform could inhibit apoptosis and induce cell survival. On the contrary, other studies suggested that another alternative clusterin isoform, obtained from post-translational modifications, could be targeted into the nucleus and trigger cell death (10). It is well known that cell suffering and apoptosis can be induced upon serum-starvation in many cell types, including SV40-immortalized human prostate epithelial cells PNT1A (11). In this experimental model, we studied the expression of clusterin gene with the aim to detect if different isoforms are eventually induced in association or not to induction of apoptosis.

Materials and Methods

Chemicals. RPMI 1640, Fetal Bovine Serum (FBS) and keratinocyte medium serum-free (KMSF) were purchased from GIBCO (Grand Island, NY). **Cell culturing.** Early passages (from 2 to 3) of primary culture of human prostate epithelial cells were obtained and cultured from normal human prostate specimen. PNT1A cells were cultured in standard condition as previously described (9). **Western blotting.** Cells were washed twice with cold PBS and directly lysed at 100°C for 10 min in SDS-PAGE loading buffer. The total protein extract, equivalent to 4×10^5 cells, was then loaded on each lane and resolved by electrophoresis on 10% polyacrylamide gel. Then, the whole protein extract was blotted on a PVDF-membrane and immunoreactive bands were detected with the BM Chemiluminescence Blotting Substrate (POD) using a monoclonal mouse anti-human clusterin antibody, clone 41D (UPSTATE biotechnology, Lake Placid, NY, USA), diluted to 1 μ g/ml.

Results

Starting the 2nd day of culturing in standard condition (serum-fed), PNT1A produce clusterin as an intracellular precursor of 75-80 KDa which is progressively down regulated until the 8th day, while the secreted form accumulated in the medium as a triplet of protein-bands apparently of about 45KDa. On the contrary, the same cells grown up to 8 days under serum-free condition (KMSF medium) exhibited a significant down-regulation of clusterin intracellular isoforms, which were instead associated to an up-regulation of secreted isoforms up to the 6th day. Interestingly, on the 8th day of culturing we detected an induction of an intracellular isoform of clusterin which was not secreted in the culture medium. Under these condition, only one of the three protein-bands of about 45KDa was clearly induced. The induction of this clusterin isoform was associated with induction of apoptosis, as demonstrated by the detection of the formation of apoptotic bodies by DAPI staining of the nuclei and the induction of DNA fragmentation (sub-diploid peak) when cells were subjected to cell cycle analysis by FACS. In the same experimental model, primary culture of epithelial cells obtained from human prostate specimen, after serum-fed treatment, did express clusterin in association to morphological changes and decreased proliferation, while under standard condition of culturing (KMSF medium) clusterin gene was strongly repressed.

Conclusions and Perspectives

These results support the hypothesis that, as a consequence of cell growth conditions (serum-fed or KMSF medium), clusterin is alternatively induced in normal human prostate epithelial cells or PNT1A cells, respectively. This seems to be a specific response to morphological changes and decreased proliferation in the first experimental model, or apoptosis induction in the second one. In suffering PNT1A cells, this leads to a progressive accumulation of an alternative isoform of the protein that apparently is confined to the intracellular level and not secreted any longer. This new intracellular isoform for clusterin could be a specific molecular signal activated by environmental stress. Taken together, these data

suggest a peculiar role played by clusterin in cell growth regulation of prostate epithelial cells, disclosing that an alternative isoform could act as a putative pro-apoptotic intracellular signal of cell suffering.

References

1. Bettuzzi, S. et al., *Biochem. J.*, 257: 293-296, 1989.
2. Purrello, M. et al., *Genomics*, 10: 151-156, 1991.
3. Poon, S. et al., *Biochemistry*, 39: 15953-15960, 2000.
4. Rosenberg, M.E. and Silkensen, J., *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 27: 633-645, 1995.
5. Bettuzzi, S. et al., *FEBS Lett.*, 448: 297-300, 1999.
6. Grassilli, E. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 180: 59-63, 1991.
7. Bettuzzi, S. et al., *Oncogene*, 21: 4328-4334, 2002.
8. Koch-Brandt, C. and Morgans, C., *Prog. Mol. Subcell. Biol.*, 16: 130-149, 1996.
9. Miyake, H. et al., *Cancer Res.*, 60: 2547-2554, 2000.
10. Leskov, K.S. et al., *Semin. Radiat. Oncol.*, 11: 352-372, 2001.
11. Berthon, P. et al., *Br. J. Cancer* 72: 946-951, 1995.

ADDRESSING THE ROLE OF CLUSTERIN (SGP-2, TRPM-2, APOJ) ON PROSTATE GROWTH CONTROL: ESTABLISHMENT OF THE PNT1A-PQUATTRO-tTA/CLU CELL LINE, A NEW EXPERIMENTAL MODEL FOR AUTO-REGULATED AND INDUCIBLE OVER-EXPRESSION OF CLUSTERIN.

M. Scaltriti¹, F. Scorcioni¹, A. E. Caccamo², A. Caporali², D. D'Arca¹, A. Corti¹ and S. Bettuzzi²

¹DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMEDICHE, UNIVERSITÀ DI MODENA E REGGIO EMILIA, MODENA (ITALY);

²DIPARTIMENTO DI MEDICINA SPERIMENTALE, UNIVERSITÀ DI PARMA, VIA VOLTURNO 39, 43100PARMA, ITALY. E-MAIL: saverio.bettuzzi@unipr.it

Introduction

Clusterin (SGP-2, TRPM-2, Apo J) is a puzzling gene whose role is still debated (1). Its over-expression is associated to involution of the prostate (2), activation of apoptosis (3) and induction of quiescence in human fibroblast (4), but is down-regulated when cell proliferation is induced (5). We found recently that transient over-expression of clusterin in SV40-immortalized human prostate epithelial cells (PNT2 and PNT1A) caused slowing down of cell cycle progression (6). The study here presented is aimed at investigating the biological role of clusterin in a new experimental model consisting of stable clones obtained from parental PNT1A cells using a tetracycline (TET) inducible multicistronic system. The multicistronic plasmid pQUATTRO-tTA (7-9) was used to establish the new PNT1A-pQUATTRO-tTA/Clusterin (PNT1A-clu) cell line, in which TET-off inducible expression of clusterin was achieved under the control of a single regulatable promoter in one step of genetic engineering.

Material and methods

pQUATTRO-tTA/CLU plasmid construction: the pQuattro-tTA vector is a TET-off system derived from the p-TRIDENT plasmid family based on the inducible transcription of a multicistronic mRNA capable to code simultaneously for four different proteins. The entire expression cassette, once integrated in recombinant clones, is regulated by the tTA transactivator, which undergoes conformational changes in the presence of TET causing reduced affinity for the operator DNA sequence and leading to the abrogation of the expression (switch-off). TET withdrawal causes a positive feedback regulation loop leading simultaneously to expression of tTA and all the cistrons of the vector, including the G418 resistance. Two IRES (internal ribosome entry site) and one CITE (mutated CAP-independent translation enhancer) elements produce specific secondary structure in the polycistronic RNA, directing the ribosomes to the first available AUG codons downstream in a cap-independent manner, thus allowing simultaneous translations of all four cistrons with similar efficiency. The pQuattro-tTA/CLU contains the full-length cDNA coding for human clusterin (SGP-2, APO-J, TRPM-2). **Cell culture, transfections and recombinant cell line establishment:** PNT1A cells were maintained in RPMI 1640 supplemented with 10% calf serum and 2mM L-glutamine. Transfections were performed with pQuattro-tTA/empty vector or pQuattro-tTA/CLU and FuGENE in into six-well plates. The selection procedure started 48h after transfection with 300µg/ml of G418 until single colonies were detected. **Recombinant cell lines characterization and cell growth analysis:** cell colonies were picked up and expanded. pQuattro-tTA-empty vector or pQuattro-tTA/CLU vector full integration in recombinant clones was studied by genomic PCR using different sets of primers to detect different segments of the expression cassette. Time-course analysis of clusterin over-expression under TET-off conditions was performed by means of Northern blot and Western blot analysis. The biological effect of clusterin over-expression on cell cycle progression of PNT1A-clu cells in comparison with mock controls (PNT1A-mock) was studied by means of fluorescence activated cell sorting (FACS) analysis.

Results

PCR amplification of a 1146bp cDNA-fragment of the IRES sequence and a 759bp region of human clusterin cDNA demonstrated genomic integration of pQuattro-tTA/CLU and pQuattro-tTA-empty vector in PNT1A-clu and PNT1A-mock control clones, respectively. Both clones were grown under TET-on (switch-off) or TET-off (switch-on) conditions. The inducible transcription of clusterin was confirmed by Northern blot analysis, showing that a high molecular weight mRNA (the long multicistronic mRNA of the pQuattro-tTA/CLU) was already efficiently transcribed under 3 day of switch-on conditions only in PNT1A-clu cells. Western blot analysis further confirmed that clusterin protein level was very high in PNT1A-clu cell extracts, but undetectable in the medium. As a result of processing and secretion, clusterin protein dropped down in the cell extract, but accumulated in the cell medium after 9 days of switch-on. Cell cycle progression of PNT1A-clu cells, in comparison to controls, was studied by FACS analysis after 3 days of switch-on, a time that was clearly sufficient to cause clusterin over-expression. Under these conditions, the S phase decreased to about 80% of controls, while G2-M phases dropped to about 30%, and G0/G1 phases did not change. Simultaneously Gas 1 mRNA level, a specific marker of the quiescence state, accumulated in PNT1A-clu cells under clusterin induction conditions, and the sub-diploid peak (indicative of cell death) reached a level that was twice the amount of control.

Conclusions and Perspectives

Taking advantage of the multicistronic vector pQUATTRO-tTA for inducible and auto-regulated expression of clusterin in PNT1A-clu recombinant clones, we demonstrated that clusterin over-expression indeed affected cell growth, causing cell cycle arrest in G2/M phases and induction of apoptosis, thus opposing the effect of SV40 large-T antigen. Considering that SV40 large-T constitutive expression in the prostate is sufficient to induce prostate cancer development (TRAMP mice model, 10) and considering also our previous findings that clusterin is transiently over-expressed in the epithelial cells undergoing apoptosis in regressing rat prostate (11,12) and that its down-regulation is among the earliest events in CaP progression (13), we propose here that clusterin gene is an anti-oncogene, and a potential new target for prostate cancer therapy. Evaluation of clusterin expression should be used as new marker of neoplastic transformation in the prostate. Further experiments aimed to elucidate the molecular interactions between clusterin and apoptotic pathway activation during switch-on conditions are currently ongoing in our laboratory.

References

- 1) Rosenberg, M.E., et al., J. Biochem. Cell Biol., 27: 633-645, 1995.
- 2) Bettuzzi, S., et al., Biochem. J., 257: 293-296, 1989.
- 3) Bettuzzi, S., et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 175: 810-815, 1991.
- 4) Bettuzzi, S., et al., FEBS Lett., 448: 297-300, 1999.
- 5) Grassilli, E., et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 180: 59-63, 1991.
- 6) Bettuzzi, S., et al., Oncogene, 21: 4328-4334, 2002.
- 7) Fussenegger M, et al., Biotech. Progr., 13: 733-740, 1997.
- 8) Fussenegger M, et al., Cytotechnology, 28: 111-125, 1998.
- 9) Gossen M and Bujard H, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 5547-5551, 1992.
- 10) Greenberg, N.M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 3439-3443, 1995.
- 11) Bettuzzi, S., et al., J. Endocrinol., 132: 361-367, 1992.
- 12) Astancolle S. et al., J. Endocrinol., 167: 199-206, 2000.
- 13) Bettuzzi, S., et al., Cancer Res., 60: 28-34, 2000.

VALUTAZIONE DELLE MODIFICHE STRUTTURALI INDOTTE DAL pH NELL'ENZIMA PECTINA METILESTERASI TRAMITE STUDI FLUORIMETRICI E DI DICROISMO CIRCOLARE

L. Servillo, A. Giovane, C. Balestrieri, L. Quagliuolo, R. D'Avino*, L. Camardella*

DIPARTIMENTO DI BIOCHIMICA E BIOFISICA, SECONDA UNIVERSITÀ DI NAPOLI, VIA COSTANTINOPOLI 16, 80138 NAPOLI

*INSTITUTE OF PROTEIN BIOCHEMISTRY, C.N.R., VIA MARCONI 10, 80125 NAPOLI, ITALY

La pectina metilesterasi (PME) è un enzima fondamentale nel metabolismo della cellula vegetale in quanto è coinvolto nei meccanismi di sviluppo della parete durante la crescita cellulare, oltre che nei processi di maturazione del frutto. In seguito all'azione della PME sulla pectina, che è un polimero dell'acido galatturonico metilesterificato a vari gradi di metilazione, viene prodotto alcol metilico e acido poligalatturonico a più basso grado di metilazione. Come conseguenza si verifica un aumento della concentrazione idrogenionica. La diminuzione di pH, che avviene per effetto dell'azione dell'enzima, sembra avere un importante ruolo fisiologico. Infatti, è stata avanzata l'ipotesi che la principale funzione della PME nel meccanismo di accrescimento della parete cellulare consista proprio nel generare un abbassamento localizzato del pH che, a sua volta, attiverebbe altri enzimi coinvolti nell'autolisi e nel successivo accrescimento della parete stessa. In effetti, il controllo di questo meccanismo di crescita risiederebbe in una diversa dipendenza dal pH dell'attività degli enzimi coinvolti: la PME, che presenta un ottimo di pH attorno alla neutralità, rallenta la propria attività come conseguenza della diminuzione di pH dovuta alla sua stessa azione, al contrario, il basso pH che si realizza localmente, attiva sia le glicosilidrolasi, che producono autolisi limitata della parete, che le glicosiltrasferasi, che contribuiscono al successivo accrescimento dei polimeri glicidici della parete. Infine, come conseguenza della ricostituzione della parete cellulare, si verifica un incremento del pH che attiva di nuovo la PME facendo ripartire il ciclo.

Noi abbiamo esaminato, tramite misure di fluorescenza e di dicroismo circolare, le variazioni indotte dal pH nella PME e mostriamo che nell'intervallo di pH tra 6 e 7.5, probabilmente si verifica un cambio conformazionale che coinvolge il sito attivo dell'enzima.

Metodi: La PME è stata purificata da pomodoro ed è stata utilizzata in questo studio la più abbondante delle tre isoforme presenti nel frutto. Le misure sia di dicroismo circolare che di fluorescenza sono state eseguite a 25.0 °C utilizzando un dicrografo Jasco mod. J-710 e un fluorimetro Perkin-Elmer mod. LS55. Per le misure di emissione della fluorescenza è stata utilizzata la lunghezza d'onda di eccitazione di 295 nm. Il quenching dell'emissione è stato studiato utilizzando come quenchers ioduro di potassio e cloruro di cesio. Sono state usate celle da 1 cm di cammino ottico e la fluorescenza dei residui triptofanilici analizzata per successive aggiunte di 10 µL di KI 2 M o 30 µL di CsCl 2 M a 1.2 mL della soluzione proteica, sotto agitazione continua nel corso delle misure. I dati di quenching sono stati corretti per la diluizione e analizzati secondo una equazione di Stern-Volmer modificata. Per quanto riguarda lo studio della dipendenza dell'attività dicroica nel vicino UV e della fluorescenza della PME in funzione del pH, questo è stato eseguito tramite titolazione in batch diluendo lo stesso volume di una soluzione madre della proteina nei vari tamponi che erano tutti 50 mM e contenevano 100 mM NaCl.

Risultati: Lo spettro CD nel vicino UV della PME mostra un notevole contributo, ascrivibile ai residui triptofanilici, nella regione tra 300 e 270 nm. In tale regione si osserva una modesta ma significativa variazione quando il pH della soluzione proteica passa da 7.4 a 6.0. Al di sotto di tale pH lo spettro CD si mantiene sostanzialmente immutato fino a pH 4.0. Lo spettro di emissione della fluorescenza della PME ha un massimo centrato a circa 340 nm che non varia nell'intervallo di pH 4.0-8.0. Invece, l'intensità di fluorescenza non cambia tra pH 8.0 e 7.4, quindi diminuisce gradualmente di circa il 10% tra pH 7.4 e 6.8, per poi rimanere costante tra 6.8 e 3.5. Gli esperimenti di quenching mostrano a qualsiasi pH un plot di Stern-Volmer curvo verso il basso, che è indicativo di un'esposizione eterogenea dei residui triptofanilici. È stato stimato che nell'intervallo di pH 7.4-8.0 circa la metà dei residui triptofanilici è accessibile al solvente. Tuttavia, al di sotto di pH 7.4, la frazione dei residui esposti diminuisce, raggiungendo il minimo a pH 6.5, e poi rimane costante fino a pH 4.0. Inoltre è stato osservato che l'efficienza del quenching dello ione ioduro e dello ione cesio cambia nel corso della titolazione. In effetti, al di sopra di pH 5.5, è stata osservata un'efficienza insolitamente alta per lo ione cesio, prossima a quella mostrata verso il triptofano libero in soluzione. Invece l'efficienza dello ione ioduro era piuttosto bassa rispetto a quella mostrata verso il triptofano libero in soluzione. Comunque, al diminuire del pH al di sotto di pH 5.0, si osservava una diminuzione dell'efficienze del quenching dello ione cesio e un simultaneo aumento di quella dello ione ioduro.

Conclusioni: I dati riportati mostrano che attorno a pH 6.5 è probabile che avvenga nella proteina un cambio conformazionale che coinvolge il sito attivo, nel quale sono presenti alcuni residui triptofanilici, e ciò spiegherebbe la variazione di attività enzimatica che si osserva attorno a questo valore di pH. In più, la variazione opposta dell'efficienza del quenching da parte degli ioni cesio e ioduro al di sotto di pH 5.0, sostiene l'ipotesi della presenza di gruppi carichi negativamente in prossimità di qualche residuo triptofanilico nel sito attivo dell'enzima.

EFFETTO INIBITORIO DEL RETINOLO SULLA CRESCITA DELLE CELLULE DEL MIDOLLO OSSEO

A. Oliva¹, B. Nobili², F. Rossi², M. Criscuolo¹, I. Passaro¹, R. Di Pasquali¹, F. Della Ragione¹, S. Perrotta²

¹DIPARTIMENTO DI BIOCHIMICA E BIOFISICA "F. CEDRANGOLO"

²DIPARTIMENTO DI PEDIATRIA, SECONDA UNIVERSITA' DI NAPOLI

La vitamina A svolge numerosi ruoli di rilevante importanza nell'organismo sia per la normale proliferazione e differenziazione cellulare che per funzioni specifiche, quali il meccanismo della visione. La RDA della vitamina A per gli adulti è di 5.000 UI (cioè circa 1 mg), mentre nel primo anno di vita è di 1.500 UI. Esistono due forme di intossicazione da ipervitaminosi A: una acuta, legata all'ingestione di alte dosi per un breve periodo di tempo, ed una cronica, causata dalla somministrazione di dosi minori per periodi di tempo prolungati. Negli ultimi anni sono stati riportati numerosi casi di intossicazione cronica da vitamina A, clinicamente caratterizzati da ipercheratosi, epato-splenomegalia ed alterazioni ossee.

In questa comunicazione, riportiamo il caso di un lattante di 3 mesi, al quale, per l'errata interpretazione di una prescrizione medica, erano stati somministrati per 80 giorni 62.000 UI/die di vitamina A. Il neonato presentava severi segni clinici di intossicazione da retinolo, quali ipercheratosi, allargamento della fontanella anteriore, epato-splenomegalia, ed inoltre una grave anemia ed una notevole piastrinopenia. L'ago aspirato midollare mostrava una marcata riduzione di cellule eritroidi e di megacariociti. La sospensione della somministrazione del preparato vitaminico fu seguita dal pieno recupero clinico del bambino nell'arco di qualche settimana.

Partendo da questo caso clinico, ci è sembrato interessante andare ad indagare *in vitro* l'effetto del retinolo (sia del farmaco come tale che della molecola pura), impiegando due diverse popolazioni cellulari umane. Poiché il midollo osseo è costituito sia da una componente ematopoietica che da una stromale, che sono strettamente interdipendenti, le popolazioni da noi selezionate sono rappresentate da una linea ematopoietica multipotente, K-562, e da colture primarie di cellule mesenchimali staminali derivate da midollo osseo. Tale scelta è ulteriormente giustificata dalla capacità delle K-562 di differenziare sia verso un fenotipo eritroide che megacariocitico, mentre per quanto riguarda l'altra popolazione cellulare, è noto il suo ruolo fondamentale di supporto all'emopoiesi umana e di riserva di cellule osteoprogenitrici.

I nostri risultati hanno dimostrato che la vitamina A inibisce direttamente la proliferazione di entrambe le popolazioni cellulari a concentrazioni simili a quelle raggiunte *in vivo* nel neonato. Una valutazione dettagliata dei meccanismi di regolazione del ciclo cellulare, ottenuta mediante analisi immunochimiche, ha messo in evidenza che l'effetto era mediato dall'*up-regulation* degli inibitori delle chinasi ciclina-dipendenti: p21^{Cip1} e p27^{Kip1}.

Tali dati dimostrano per la prima volta che l'ipervitaminosi A può essere causa di una grave anemia e trombocitopenia e che essa è dovuta, almeno in parte, all'effetto diretto della molecola sulla proliferazione delle cellule del midollo osseo.

ESPRESSIONE E DISTRIBUZIONE CELLULARE DELLE PARP 1 E 2 IN COLTURE CELLULARI ASTROGLIALI DI RATTO DOPO STRESS OSSIDATIVO.

V.G. Nicoletti, V Spina Purrello, D Patti, R Santangelo, A.M. Giuffrida Stella.

DIP. DI SCIENZE CHIMICHE, SEZ. DI BIOCHIMICA E BIOL. MOLECOLARE, UNIVERSITÀ DI CATANIA,
V.LE A. DORIA 6, 95125 CATANIA, ITALIA.

Obiettivi

Negli organismi pluricellulari le cellule attuano differenti meccanismi di difesa, in particolare attraverso l'induzione di specifici geni e/o l'attivazione di particolari proteine, per mantenere l'integrità del DNA, per regolare lo stato ossido-riduttivo o per compensare alterazioni degli enzimi della catena respiratoria (1). In seguito a stress ossidativo l'enzima Poli(ADP-ribosio)polimerasi (PARP) sembra avere un importante ruolo nel mantenere l'integrità del genoma. Paradossalmente la PARP è anche coinvolta nei primi eventi della morte cellulare programmata o apoptosi(2,3). Nella presente ricerca è stato valutato il ruolo della PARP nei meccanismi di protezione e/o morte cellulare in cellule astrogliali di ratto dopo trattamento con LPS ed INF- γ .

Metodi:

Le colture cellulari sono state trattate per 18 ore con concentrazioni crescenti di lipopolisaccaride (LPS) 0.1 μ g/ml, 1 μ g/ml, 2 μ g/ml, 4 μ g/ml e interferon-gamma (INF γ) 10U/ml, 100U/ml, 200U/ml, 400U/ml, ed inoltre per tempi differenti (1,2,4,8,18,24, e 48 ore). L'espressione della PARP 1 e del suo clivaggio e l'espressione della PARP 2 sono state misurate mediante Western blotting utilizzando sia anticorpi mono che policlonali. Altri anticorpi sono stati utilizzati per valutare l'espressione dei livelli di Bax, il rilascio del Citocromo-c nonché la sintesi del Poli-ADP-ribosio (PAR). L'attività della PARP è stata misurata incubando il pellet nucleare in presenza di 14 C-NAD. Per valutare l'entità del danno cellulare dopo trattamento con LPS e INF γ è stata eseguita la determinazione dell'attività della lattico deidrogenasi sia nelle cellule che nel terreno di coltura.

Risultati:

L'attività della PARP è stata misurata nel pellet nucleare ottenuto da cellule astrogliali in coltura; per valutare la presenza di eventuali contaminazioni citoplasmatiche oltre all'uso del noto inibitore della PARP, 3-aminobenzamide (ABA), specifico per l'attività nucleare, è stato aggiunto nel tampone di incubazione anche m-iodobenzilguanidina (MBG), specifico invece per l'attività citosolica. I risultati ottenuti dimostrano che l'attività misurata nelle nostre condizioni sperimentali è dovuta solo all'attività enzimatica nucleare. Nell'esperimento dose-dipendente, dopo trattamento per 18 ore con LPS (0.1 μ g/ml, 1 μ g/ml) e INF γ (10U/ml, 100U/ml), è stato osservato un'aumento dell'attività della PARP di circa il 50%. Nell'esperimento di "time-course" eseguito con le stesse concentrazioni di LPS e INF γ è stato riscontrato un incremento dell'attività enzimatica da un'ora sino a 18 ore dopo il trattamento. Nelle stesse condizioni sperimentali è stata valutata l'espressione, il clivaggio della PARP e la sintesi di Poli-ADP-Ribosio (PAR); i risultati ottenuti mostrano un evidente aumento dell'espressione della PARP e della sintesi di PAR ad un'ora, che diminuisce progressivamente a tempi più lunghi. Questo andamento sembra essere parallelo e speculare al pattern del clivaggio della PARP misurato sulla base del rapporto tra la proteina nativa (116kDa) e il frammento clivato (89kDa) ed espresso come valore di clivaggio. Allo scopo di valutare il possibile contributo di altre isoforme della PARP sull'attività totale, abbiamo voluto misurare l'espressione della PARP 2 utilizzando un anticorpo policlonale contro questa isoforma. È stato possibile osservare, dopo trattamento con LPS (1 μ g/ml) ed INF- γ . (100U/ml), un aumento significativo tempo-dipendente (1,2,4,8,18 ore) dell'espressione della PARP 2. Il rilascio di lattico deidrogenasi, misurato come indice di danno cellulare ha mostrato un incremento dose-dipendente dopo trattamento con LPS e INF γ , ma questo effetto diminuiva (indicando un incremento della protezione cellulare) quando la PARP era inibita con il 3-ABA. Lo stesso incremento veniva osservato quando alle cellule non stressate veniva aggiunto soltanto l'inibitore 3-ABA. L'utilizzazione dell'inibitore delle Caspasi-3 ha permesso di valutare il rapporto tra apoptosi e necrosi cellulare, mettendo in evidenza una riduzione del rilascio di LDH di circa il 50%. Gli esperimenti di time-course, hanno mostrato inoltre un aumento significativo sia di rilascio di citocromo-c, che dell'induzione di BAX, utilizzati come ulteriori marcatori di morte cellulare programmata.

Conclusioni

In conclusione, dai dati ottenuti sembra che l'ADP-ribosilazione abbia un duplice ruolo: proapoptotico o protettivo. Lo sviluppo di nuovi inibitori farmacologicamente attivi verso specifiche isoforme della PARP potrà essere di notevole ausilio per meglio comprendere lo specifico ruolo delle diverse forme di PARP.

1. Nicoletti V G et al. (1998) *Biochimie* 80, 871-881.
 2. Simbulan Rosenthal C M et al. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 13703-13712
 3. Chiarugi A (2002) *Trends in Pharmacological Sciences* 23 No.3
- Ringraziamenti : Ricerca eseguita mediante il finanziamento del MUR cofin 2000.

ESPRESSIONE DI PROTEINE MITOCONDRIALI CEREBRALI COINVOLTE NELLA TRASDUZIONE ENERGETICA NELL'INVECCHIAMENTO

V.G. Nicoletti, V.M. Marino, G.A. Meli, A.M. Giuffrida Stella.

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE, SEZIONE DI BIOCHIMICA E BIOLOGIA MOLECOLARE, UNIVERSITÀ DI CATANIA, V.LE A. DORIA 6, 95125 CATANIA

Obiettivi

In seguito alla ipotesi avanzata da Harman sulla importanza della disfunzione mitocondriale durante l'invecchiamento, un'intensa attività sperimentale è stata rivolta allo studio delle cause dell'accumulo di danni nella struttura e nella funzione mitocondriale. Lo stress ossidativo è stato proposto come maggiore responsabile dell'aumento del danno mitocondriale nelle cellule senescenti, soprattutto nei tessuti postmitotici che presentano un elevato consumo di ossigeno.

Molte malattie neurodegenerative e altre legate all'età sono correlate alla disfunzione della fosforilazione ossidativa (1). Tuttavia non è ancora chiaro se il danno primario avvenga a livello del DNA mitocondriale, delle proteine o delle membrane.

Diversi studi hanno mostrato che il Complesso I della catena respiratoria è il maggiore sito produttore di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e la sua attività è maggiormente modificata dallo stress ossidativo (2).

Per ampliare le conoscenze sui meccanismi dell'invecchiamento correlati alla disfunzione mitocondriale, nella presente ricerca abbiamo analizzato il pattern di espressione di alcune subunità della catena respiratoria, codificate dal genoma nucleare e da quello mitocondriale, e di proteine coinvolte nella trasduzione energetica, in diverse aree del cervello di ratti di 6, 12 e 28 mesi di età. E' stata eseguita l'analisi dell'espressione di proteine mediante Western blot e di mRNA con RT-PCR semi-quantitativa.

Metodi

Gli esperimenti sono stati eseguiti usando ratti maschi Wistar Kyoto di 6, 12, 28 mesi di età. Dopo il sacrificio degli animali mediante decapitazione è stata eseguita la dissezione delle varie aree cerebrali a 4°C. Le aree sono state congelate in azoto liquido e mantenute a -80°C prima dell'uso. L'RNA totale è stato estratto secondo il protocollo di Chomczynski e Sacchi. I livelli di mRNA sono stati determinati con RT-PCR semi-quantitativa dopo aver stabilito il numero di cicli e la concentrazione del template. Amplimeri di Ciclofillina A sono stati usati come standard interno.

L'espressione delle proteine mitocondriali è stata misurata mediante Western blot usando anticorpi monoclonali specifici (Molecular Probes) seguendo le procedure del kit SuperSignal (Pierce).

Risultati

Nelle varie aree della corteccia cerebrale da noi esaminate sono stati trovati in funzione dell'età differenti patterns di espressione di alcune subunità del Complesso I. E' stata osservata nella corteccia cerebrale in toto una down-regulation dei messaggeri delle subunità 24 kDa (codificata dal nucleo) e ND1 (codificata dal mitocondrio) del Complesso I. Parallelamente è stato riscontrato un decremento della proteina del Complesso I, 39 kDa (codificata dal nucleo) nella corteccia frontale, in contrasto ad un suo incremento nella corteccia parietale.

Sono stati anche messi in evidenza significative modificazioni dell'espressione della subunità alfa della FoF1-ATP sintasi e delle due isoforme di traslocatori di nucleotidi adenilici mitocondriali ANT-1 e ANT-2.

Conclusioni

Il decremento dell'espressione delle subunità del Complesso I è in accordo con il pattern di attività riscontrato da altri autori (3) sia nell'invecchiamento che nelle malattie neurodegenerative.

Dato il ruolo essenziale delle subunità del Complesso I nella traslocazione protonica e nell'interazione con il Coenzima Q, un'alterazione della loro sintesi potrebbe portare ad una disfunzione nella conservazione dell'energia e ad un aumento della produzione di radicali liberi dell'ossigeno (3). L'alterazione del pattern di espressione delle altre proteine prese in esame nella presente ricerca potrebbe contribuire a questo fenomeno. Tuttavia è da notare che cambiamenti nell'espressione degli enzimi della catena respiratoria potrebbero anche essere il risultato di una deafferentazione neuronale e quindi di una conseguente riduzione della richiesta di energia/attività neuronale.

Questi risultati potrebbero essere discussi e interpretati alla luce di precedenti studi i quali hanno messo in evidenza una up-regulation compensatoria dell'espressione dei messaggeri e delle proteine di alcune subunità della Citocromo c ossidasi, nel cervello di ratto durante l'invecchiamento e in condizioni di stress ossidativo (4,5,6).

Bibliografia

- 1 Cortopassi GA and Wong A (1999) Biochim. Biophys. Acta 1410, 183-193.
- 2 Liu Y. et al. (2002). J. Neurochem. 80, 780-787.
- 3 Ventura B. et al. (2002) Biochim. Biophys. Acta 1553, 249-260.
- 4 Nicoletti et al. (1995) Neurochem. Res. 20, 1465-1470.
- 5 Nicoletti et al. (1998) Biochimie 80, 871-881.
- 6 Nicoletti et al. (1998) Neurochem. Res. 23, 55-61.

Ringraziamenti: Questa ricerca è stata eseguita mediante il finanziamento del MIUR cofin 2000.

ANALISI STRUTTURALE E FUNZIONALE DELLA CONNESSINA 36

A Trovato-Salinaro*, G Mudo §, N Belluardo §, DF Condorelli*

DEP. OF CHEMICAL SCIENCES (*), SECTION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, UNIVERSITY OF CATANIA, ITALY

DEP. OF EXPERIMENTAL MEDICINE (§) DIV. OF HUMAN PHYSIOLOGY, UNIVERSITY OF PALERMO, ITALY

Obiettivi: le giunzioni comunicanti (gap junctions) sono composte da aggregati di canali transmembrana che mettono in connessione diretta il citoplasma di cellule adiacenti, realizzando un accoppiamento metabolico ed elettrico. Ogni canale intercellulare è formato dall'unione di due emicanali, o connessioni, situati nelle membrane adiacenti, e ogni connessione è composto da 6 subunità proteiche, chiamate connessine (Cx), disposte radialmente attorno ad un poro centrale. Le connessine sono codificate da una famiglia multigenica, i cui membri sono indicati con la sigla Cx seguita dal peso molecolare in kDa. Le gap junctions sono presenti in tutti i tessuti ed organi dei vertebrati, incluso il sistema nervoso, dove l'esistenza di una comunicazione intercellulare mediata da gap junctions è stata dimostrata sia in cellule gliali che in cellule neuronali con metodiche morfologiche e fisiologiche.

Nella presente comunicazione riportiamo i dati genomici e funzionali su una connessina (Cx36) del sistema nervoso centrale identificata nel nostro laboratorio.

Metodi: il clonaggio mediante RT-PCR degenerata e le altre tecniche standard di biologia molecolare sono state eseguite come descritte da Condorelli et al., 1998. L'ibridazione in situ per l'mRNA della Cx36 combinata con l'immunomarcatura per NeuN e parvalbumina sono state eseguite come descritte da Belluardo N et al., 2000.

Risultati: la Cx36 di topo, di ratto e di uomo è una proteina di 321 aminoacidi e mostra tutte le tipiche caratteristiche dei membri della famiglia delle connessine (Condorelli et al., 1998, Sohl et al., 1998, Belluardo N et al., 1999). E' caratterizzata da un lungo tratto citoplasmatico di 99 aminoacidi e da un dominio carbossi-terminale relativamente corto. Il tratto intracellulare della Cx36 dei roditori mostra un tratto di 18 aminoacidi ricco di glicine, che è assente nelle corrispondenti regioni proteiche del pesce e della razza. La Cx36 dei mammiferi è ortologa alla Cx35 della razza, una connessina clonata precedentemente ed espressa nella retina della Raja aerinacea, un vertebrato primitivo (O'Brien et al., 1996). A livello della struttura genomica le connessine Cx35/36 sono differenti dai gruppi alfa e beta delle connessine per la presenza di un singolo introne localizzato all'interno della regione codificante, 71 bp dopo il sito di inizio della traduzione (Condorelli et al., 1998, O'Brien et al., 1996, 1998, Sohl et al., 1998). Sulla base della struttura genica, dell'espressione a livello cerebrale o dalla retina e dall'analisi filogenetica, è stato proposto che le connessine Cx35/36 rappresentano un distinto sottogruppo della famiglia delle connessine (O'Brien et al., 1998, Sohl et al., 1998). La Cx36 è espressa in diverse aree cerebrali, nella retina ed in alcune ghiandole endocrine. Esperimenti con neurotossine ed ibridazione in situ suggeriscono che la Cx36 è localizzata in cellule neuronali e questa localizzazione è stata confermata combinando l'ibridazione in situ per Cx36 mRNA con l'immunocitochimica per marcatori neuronali. Il pattern di espressione della proteina Cx36 è stato analizzato nel cervello di ratto adulto e durante lo sviluppo, ed è stato correlato con il pattern di espressione del mRNA. L'analisi dello sviluppo del mRNA della Cx36 ed i livelli di proteina hanno rilevato una intensa espressione durante le prime settimane di vita postnatale. Esperimenti di co-localizzazione con marcatori specifici suggeriscono che la Cx36 è localizzata in cellule neuronali ed, in particolare, in interneuroni GABAergici di diverse regioni cerebrali (Condorelli et al., 2000, Belluardo et al., 2000).

Abbiamo, inoltre, eseguito il clonaggio ed il sequenziamento del gene umano, determinato la sua localizzazione cromosomica, ed analizzato il pattern di espressione nel cervello umano. Il gene umano per la Cx36 è stato localizzato nella banda 15q14 (Belluardo et al., 1999).

Conclusioni: la distribuzione dell'mRNA e della proteina della Cx36 nel sistema nervoso è in accordo con i primi studi morfologici e funzionali sulle giunzioni comunicanti neuronali e stimola nuove analisi funzionali in diverse altre regioni del cervello dei mammiferi. E' stato possibile per la prima volta valutare il pattern di espressione delle componenti delle giunzioni comunicanti neuronali nel cervello umano. Inoltre i dati riportati dimostrano l'espressione della Cx36 in neuroni identificati immunocitochimicamente in aree cerebrali, dove un'attività sincronizzante è stata attribuita a sinapsi elettriche.

PRODUZIONE DI MINICALPASTATINE, NUOVI REGOLATORI DELLA PROTEOLISI CALCIO-DIPENDENTE

Capini,P., Averna,M., De tTllio,R., Minafra,R., Stifanese,R., Salamino,F., Melloni,E.

DIPARTIMENTO DI MEDICINA SPERIMENTALE –SEZ. BIOCHIMICA UNIVERSITÀ DI GENOVA

Introduzione e Obiettivi Il sistema proteolitico calcio dipendente è regolato dall'interazione della proteasi calpaina con il suo inibitore naturale calpastatina che controlla il numero di molecole di calpaina effettivamente operanti. La formazione del complesso enzima-inibitore determina però la degradazione della calpastatina, da parte della calpaina, con la produzione di frammenti che conservano in un primo tempo la loro attività inibitoria. L'accumulo di questi frammenti è un marker di attivazione intracellulare della calpaina e può rappresentare contemporaneamente un aumento della potenzialità inibitoria a disposizione della cellula.

Alcune patologie, caratterizzate da aumento persistente della concentrazione di calcio intracellulare, come l'ipertensione essenziale, determinano un'indiscriminata attivazione della calpaina, degradazione di calpastatina, e quindi uno sbilanciamento del sistema calcio dipendente che diventa patogenico per eccesso di proteolisi su substrati intracellulari.

Il nostro obiettivo è di ottenere frammenti di calpastatina, il più piccolo possibile ma che conservino la proprietà biologica di inibire la calpaina attivata.

Metodi: la proteina calpastatina ricombinante RNCast104 è stata ottenuta e purificata come descritto (1). Il dosaggio dell'attività della calpastatina e dei peptici ottenuti è stato eseguito come descritto in (2). La proteina 104 è stata digerita con subtilisina in rapporto proteina/subtilisina di 1:250, in 0.1 M sodioacetato pH 6.5, a temperatura ambiente per 5 m. La digestione è stata bloccata per riscaldamento a 100 °C per 3 m. Il campione è stato liofilizzato, risospeso in 0.1% TFA e cromatografato per HPLC utilizzando una colonna µRPCC2C18 (Pharmacia) equilibrata in 0.1% TFA. I peptidi sono stati eluiti con gradiente 0.1% TFA-acetonitrile da 5 a 60%. Ciascuno dei peptidi è stato testato per attività calpastatinica. Il peptide ancora attivo è stato sequenziato usando un sequenziatore di proteine Beckman LF3000.

Risultati

Studiando ratti ipertesi del ceppo Milano abbiamo evidenziato un deficit di calpastatina. L'inibitore viene frammentato dalla calpaina stessa in peptidi che si accumulano sotto forma di frammenti con massa di circa di 15 kD. Questi peptidi non contengono la regione amminoterminale della molecola in quanto non sono riconosciuti da anticorpi monoclonali da noi prodotti contro questa regione della calpastatina. La persistenza di calpaina attivata distrugge anche questa forma di degradazione dell'inibitore. Partendo da questi risultati abbiamo cercato di costruire un frammento di calpastatina, il più piccolo possibile che, conservando attività inibitoria potesse essere utilizzato come regolatore dell'attività calpainica. Per fare questo, siamo partiti dalla forma RNCast104 ricombinante della calpastatina, digerita con varie proteasi e ne abbiamo analizzato i prodotti. I risultati migliori li abbiamo ottenuti utilizzando subtilisina, dalla cui azione sulla 104 sono stati prodotti molti peptidi di cui uno solo ancora attivo. Questo peptide, di 20 amminoacidi, è stato isolato e sequenziato. Dalla sequenza ottenuta risulta corrispondere ad una parte del primo dominio inibitorio della proteina integra, specificamente ai residui 166-195, e contiene la sequenza consenso per la calpaina e un'estesa regione C-terminale.

A conferma di ciò, abbiamo evidenziato che il peptide sintetizzato chimicamente è in grado di regolare l'attività della calpaina attivata. Questo peptide pur avendo proprietà funzionali comparabili a quelle della proteina nativa, ha ancora un numero di residui troppo elevato per postulare una funzione farmacologica. Attualmente stiamo studiando il ruolo dell'estensione C-terminale nel riconoscimento della calpaina in modo da produrre un peptide "limite" con inalterate proprietà funzionali e minore numero di residui.

Bibliografia

1. Properties of calpastatin forms in rat brain
Melloni,E., De Tullio,R., Averna,M., Tedesco,I., Salamino,F., Sparatore,B., Pontremoli,S
FEBS Lett. (1998) 431, 55-58
2. Age dependent degradation of calpastatin in kidney of hypertensive rats.
Averna M, De Tullio R, Salamino F., Minafra,R. Pontremoli S Melloni E. (2001) J. Biol. Chem. 276, 38426-432.

NOVEL BIOCOMPATIBLE HYBRID POLYMERS BASED ON PHEMA

C. Schiraldi , A. D'Agostino, F.Flamma, D. Apicella *, A. De Rosa, and M. De Rosa

DEPARTMENT OF EXPERIMENTAL MEDICINE, FACULTY OF MEDICINE, SECOND UNIVERSITY OF NAPLES, VIA COSTANTINOPOLI16, 80138 NAPLES, ITALY.

*DEPARTMENT OF MATERIALS AND PRODUCTION ENGINEERING, FACULTY OF ENGINEERING, UNIVERSITY OF NAPLES FEDERICO II, NAPLES, ITALY

There is growing scientific interest in developing innovative biomaterials for biomedical applications, especially related to tissue engineering. One possibility is modifying well characterized hydrogels by the addition of nanoparticles. It is well known that nanostructures based on silica improves general properties of composite materials such as visco-elastic behavior, abrasive and heat resistance; with this last regard, experimental data have shown that in most cases the addition of nanofiller leads to an increase of glass transition temperature of the material (1).

In this research project, we used Poly-Hydroxy Ethyl Methacrylate (pHEMA), a chemical hydrogel extensively studied in the past decades on its chemico-physical structure and mechanical properties. This gel have been used in a wide variety of biomedical applications, ranging from dentistry to ophthalmic and also orthopedic fields.

The hydrogel is synthesized by polymerization of HEMA monomers using as initiator, azoisobutyronitrile (AIBN) and as cross-linking agent, ethyleneglycol dimethacrylate (EGDMA) (2). PHEMA in dry state are hard and glassy. However when swollen, they are soft and flexible and have low surface friction. The degree of swelling PHEMA is greatly dependent on temperature and the pH and ionic strength of the solution. Final water content of pHEMA after swelling has been estimated about 50% when water is used, but it could be modulated by crosslinking concentrations and by adding appropriate amounts of hydrophobic or hydrophilic monomers (3).

Despite the broad use as dental adhesive, pHEMA application hides some drawbacks in relation to the shrinkage often reported during curing of restorative materials, that is responsible for fracture between the tooth surface and the polymer, opening a dangerous way in for bacterial attack. The use of nanofillers should contribute to diminish the contraction stress while maintaining a "good" biocompatibility.

In this context, our research interest is now focused on the development of a novel "hybrid systems" consisting in pHEMA hydrogels and nanoparticles. Two types of nanopartcles we have used as inorganic filler: hydrophilic nanosilica which has hydroxy groups spread over the surface and hydrophobic one that exposed methyl residues. Of course the interaction nanofiller -HEMA changes according to the chemical structure of nanosilica used, the hydrophilic nanoparticles link to the monomers through hydrogen bonds, while the hydrophobic ones network through weak Van der Waals interactions.

Studies on chemico-physical characterization and citocompatibility of these two systems have been performed. Mechanical characterization data showed that the elastic modulus increase with the increase in nanosilica concentration. Also polymerization's yield improved with the insert of nanoparticles, in fact no residual activity could be detected when 23 % w/w of filler was used (DSC measurements). The biological characterization comprised direct and indirect citocompatibility MTT tests. Once the optimal compatibility was demonstrated, Swiss fibroblasts 3T3 were cultivated showing a good cell adhesion, spreading over the matrix and monolayer assessment within 72-96 h similarly to the control on polystyrene petri dishes.

References:

- 1)Davidson C.L., Erickson R.L. and Glasspoole E.A. (1989) *J. Dent. Res* 68:489-490
- 2)Labella R., Davy K., Lambrechts P., Van Meerbeek B., Vanherle G., (1998) *Eur J Sci Sciences* 106:816-824
- 3)Davis P., Huang S.,Nicolais L., Ambrosio L. *Modified PHEMA Hydrogel* Pallav P., De Gee A.J.

PVA-HA HYDROGELS CHARACTERIZATION FOR BIOMEDICAL APPLICATION

Schiraldi C., Accone, M., Esposito A., Sannino A. *, E. Farina and M. De Rosa

DEPARTMENT OF EXPERIMENTAL MEDICINE, FACULTY OF MEDICINE, SECOND UNIVERSITY OF NAPLES, VIA COSTANTINOPOLI 16, 80138 NAPLES, ITALY.

**DEPARTMENT OF INNOVATION ENGINEERING, UNIVERSITY OF LECCE, VIA MONTERONI 73100, ITALY*

Polymeric materials intended to be used in biomedical applications should possess appropriate physico-chemical and mechanical properties, and be suitable for fabrication into biomedical devices. They are used in various areas of medicine, such as cardiovascular system, dentistry, orthopaedics, ophthalmology and drug delivery systems. Many synthetic polymers that are already commercially available show physicochemical and mechanical properties comparable to those of the biological tissue but are not sufficiently biocompatible (Cascone et al., 1995). In order to enhance the properties of these materials we have focused our attention on hydrogels based on poly(vinyl alcohol) (PVA), a water-soluble synthetic polymer (Stammen et al., 2001). With the aim of developing novel biomaterials able to induce cell adhesion and proliferation, a number of bioactive agents have been added to PVA hydrogels (Barbani et al., 1995). In particular this study is focused on the development of PVA based cryogels containing hyaluronic acid (HA). HA is a polysaccharide of the extracellular matrix and is able to influence cell adhesion, migration and proliferation (Campoccia et al., 1998). In this study we evaluated an hydrogel obtained mixing HA with PVA prior to cryo-structuration. The gels have been obtained through freeze-thawing cycles at different temperatures (-20°C and -80°C) and the resulting materials have been characterized on their swelling properties. In addition the release of HA in both water and PBS during swelling experiments was evaluated by carbazole assay (Dische Z., 1947). It was demonstrated that the duration of freeze-thawing cycles influenced the kinetic of HA release and also its final content into the hydrogel. Preliminary mechanical data showed that PVA alone was more resistant than the PVA-HA, the latter also showed an increased porosity when observed at scanning electron microscopy (SEM). Moreover, cell adhesion experiments were performed using 3T3 cells from a mouse fibroblast cell line showing a noticeable improvement in the adherence of the cells in PVA/HA hydrogels when compared to PVA-gels.

References

- Barbani N., Cascone M.G., Giusti P., Lazzeri L., Polacco G., Pizzirani G. (1995) *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* 7(6):471-484.
- Campoccia D., Doherty P., Radice M., Brun P., Abatangelo G., Williams D. F. (1998) *Biomaterials* 19: 2101-2127
- Cascone M. G., Sim B., Downes S. (1995) *Biomaterials* 16: 569-574
- Stammen J. A., Williams S., Ku D. N., Guldberg R. E. (2001) *Biomaterials* 22:799-806
- Dische Z., (1947) *Anal. Biochem.* 16: 189-196

SENSORI MICROMECCANICI PER LO STUDIO DELL'ESPRESSIONE GENICA

Roberto Raiteri¹, Lorena Tedeschi², Lorenzo Citti²

¹DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA BIOFISICA ED ELETTRONICA, UNIVERSITÀ DI GENOVA VIA OPERA PIA 11A, 16145 GENOVA

²ISTITUTO DI MUTAGENESI E DIFFERENZIAMENTO CELLULARE, CNR
AREA DELLA RICERCA DI PISA, 56100 SAN CATALDO, PISA

Obiettivo della ricerca è sviluppare un sistema in grado di determinare in maniera quantitativa e specifica RNA messaggeri (mRNA) cellulari di interesse. L'analisi dell'espressione genica di popolazioni cellulari risulta particolarmente significativa per lo studio e la comprensione di vari processi biologici ed è estremamente importante sia nell'ambito diagnostico che nello studio dell'efficacia di molecole farmacologicamente attive: per comprendere la relazione tra l'espressione di un gene la sua funzione ed una patologia, caratterizzare i fenotipi patologici e valutare gli effetti terapeutici.

Il sistema che si vuole sviluppare deve essere più semplice ed immediato delle tecniche attualmente usate (*Northern blot*, *RNase protection*) e permettere una misura diretta (*label free*) da effettuarsi riducendo drasticamente le manipolazioni del campione biologico.

Il metodo si basa sull'uso di sonde nucleotidiche sintetiche immobilizzate su trasduttori micro-meccanici. Le sonde sono state progettate e sintetizzate in modo da riconoscere e legarsi a sequenze complementari sul mRNA di interesse (target) e con lo scopo di ottimizzare l'accessibilità sia della sonda che della sequenza complementare del target, la specificità della sequenza del target, la stabilità chimica, ed il tipo di legame con il substrato solido. Tale legame è di tipo covalente e sfrutta la presenza un gruppo amminico legato alla sonda che, mediante un cross-linker etero-bifunzionale si lega ad un mercaptosilano immobilizzato sull'ossido di silicio della superficie del trasduttore.

Il trasduttore consiste in una trave di silicio lunga e sottile, vincolata da un lato ad un supporto e libera di muoversi al lato opposto (cantilever). Il principio di trasduzione è meccanico: una sola faccia del cantilever è ricoperta da uno strato uniforme di sonde. In presenza del target, quest'ultimo si lega in maniera prevalente e specifica alla faccia ricoperta dalle sonde generando una variazione dello stress superficiale che tende ad espandere o contrarre quella superficie a seconda delle interazioni sonda-target e target-target che nascono e delle eventuali riorganizzazioni superficiali. Tale stress non è bilanciato dalla faccia opposta e quindi deflette in maniera permanente tutto il cantilever. Misurando tale deflessione è quindi possibile rilevare e seguire nel tempo i processi di adsorbimento che avvengono. La deflessione è misurata otticamente: un raggio laser a bassa potenza è focalizzato sull'estremità libera del cantilever che lo riflette. Il raggio riflesso colpisce un fotodettore sensibile alla posizione (PSD). Quando il cantilever si deflette il raggio riflesso si sposta sulla superficie del PSD e tale spostamento è amplificato dalla distanza cantilever-PSD (leva ottica). In questo modo si è in grado di misurare deflessioni inferiori al nanometro (10^{-9} m).

I cantilevers utilizzati vengono fabbricati usando tecniche di microlavorazione del silicio sviluppate dall'industria della microelettronica. Queste permettono di creare strutture microscopiche altamente riproducibili, in serie (fabbricazione batch) e quindi a basso costo. Le dimensioni microscopiche permettono di ottenere travi molto flessibili (costanti elastiche dell'ordine di 0.05 N/m) e quindi molto sensibili a forze o stress applicati ed allo stesso tempo con frequenze di risonanza molto alte (dell'ordine di decine di KHz in aria) e quindi insensibili a rumori meccanici esterni. Un trasduttore microscopico permette anche di miniaturizzare tutto il sensore con numerosi vantaggi in termini di volumi di soluzione richiesti per l'analisi, velocità nel mescolare le varie soluzioni e quindi ridotti tempi di analisi.

Sono state effettuate misure con un set-up differenziale: la deflessione di due cantilevers immersi nella stessa cella a flusso è misurata in parallelo. I cantilevers sono entrambi ricoperti su una faccia da un sottile strato di oro ed un alcano-tiolo in modo da rendere quella superficie "inerte" al mRNA. Sulle facce opposte sono immobilizzati sonde differenti su ciascun cantilever. In questo modo, misurando la differenza nella deflessione dei due cantilevers si eliminano le variazioni dovute ad adsorbimento non specifico e a variazioni di temperatura nella cella di misura (che deflettono i cantilever per effetto bimetallico) e si mette in evidenza la deflessione dovuta all'interazione specifica. Introducendo nella cella di misura prima il target specifico per una sonda e poi quello per l'altra sonda si è in grado di seguire l'ibridizzazione in situ e senza la necessità di marcatori.

I risultati ottenuti usando sequenze *target* sintetiche dimostrano la validità del metodo proposto. I passi successivi consistono nell'ottimizzare la sensibilità del biosensore e nello sfruttare la possibilità di creare *array* di trasduttori, ciascuno funzionalizzato con diverse sonde oligonucleotidiche in modo da effettuare analisi in parallelo direttamente su mRNA trascritto *in vitro* ed anche direttamente su lisati cellulari.

UN BIOSENSORE A DUE ELETTRODI PER LA RILEVAZIONE DI SEQUENZE DI DNA

C. Guiducci, C. Stagni, G. Zuccheri, A. Bogliolo, L. Benini, B. Riccò, B. Samori

DEIS UNIVERSITÀ DI BOLOGNA, BOLOGNA;

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY UNIVERSITÀ DI BOLOGNA, VIA IRNERIO, 48 – BOLOGNA;

STI UNIVERSITÀ DI URBINO, URBINO;

Introduzione: L'ibridizzazione tra catene di DNA diverse è un processo altamente specifico e ad altissima resa che presenta grandi potenziali per l'utilizzo nelle tecniche analitiche. Si stanno già facendo strada applicazioni per la rapida identificazione di patogeni o per il monitoraggio ambientale. La grande richiesta di test genetici sempre più affidabili, economici e semplici da eseguire spinge verso lo sviluppo di sistemi automatizzabili ed integrabili per la rivelazione di sequenze di DNA. Il bisogno di sistemi di analisi che possano essere impiegati in maniera semplice ed affidabile direttamente sul luogo di raccolta del campione ("*point-of-care testing*") fa rivolgere l'attenzione dei ricercatori a dispositivi detti "labs-on-a-chip" in cui gli elementi sensori e trasduttori, la movimentazione microfluidica del campione, e la circuitistica di controllo sono integrati.

Il nostro contributo verte sullo sviluppo di un sensore a due elettrodi che permetta la rivelazione specifica di sequenze di DNA senza il bisogno di effettuare procedure di etichettamento delle molecole (ad esempio con marcanti radiattivi o fluorescenti). Il metodo impiega un circuito elettronico in grado di misurare la capacità elettrica dell'interfaccia tra elettrodo e soluzione e di rivelarne le alterazioni in seguito al legame specifico di sequenze di DNA.

Il nostro sistema risulta innovativo rispetto a sistemi già proposti [1], sia per la semplificazione del dispositivo sensibile, sia per la facile integrabilità.

Metodi sperimentali: Il sistema di misura impiegato nel corso dei nostri esperimenti si basa su due elettrodi di oro (strati di oro ultrapiatto *template-stripped* di 200 nm di spessore [2]) affacciati ed immersi in una soluzione elettrolitica (100 mM NaCl). Uno dei due elettrodi è funzionalizzato con un *self assembled monolayer* di oligonucleotidi che funziona da sensore per la presenza in soluzione di molecole di DNA contenenti catene complementari alla sequenza dell'oligonucleotide ancorato sulla superficie.

La variazione della capacità elettrica della cella, che avviene a seguito del legame dell'analita specifico allo strato di oligonucleotidi legati alla superficie dell'elettrodo, viene misurata grazie ad un circuito elettronico che converte un cambiamento di capacità in una variazione di corrente elettrica misurata [3].

Risultati: Una serie di misure effettuate con il sistema di sopra descritto hanno evidenziato una buona efficienza nella rivelazione di oligonucleotidi o molecole di DNA lunghi a doppia elica che contengano sequenze complementari a quella dell'oligonucleotide sensore, legato alla superficie dell'elettrodo. Abbiamo effettuato test sull'efficienza e la specificità del sensore ed anche sulla possibilità di resettare il sensore deibridizzando il DNA legato alla superficie nel corso di una misura. Abbiamo verificato come un sensore resettato possa essere riutilizzato in una misura successiva.

La caratterizzazione delle superfici sensibili è stata effettuata anche mediante tecniche AFM (*nanoshaving* [4])

Conclusioni: Abbiamo sviluppato e caratterizzato un biosensore a due elettrodi per la rivelazione della presenza di specifiche sequenze di DNA in soluzione grazie a misure di capacità elettrica. Il sistema utilizzato ha ottime potenzialità di integrazione in sistemi biofabbricati a basso costo, agevole trasportabilità e facile utilizzo.

Bibliografia:

[1] C. Berggren et al., *Electroanalysis*, vol. 3, 11, 1999.

[2] M. Hegner, P. Wagner, G. Semenza, *Surface Science*, vol. 291, pp. 39-46, 1993.

[3] A. Bogliolo et al., in corso di pubblicazione su *Proc. of IEEE Signal Propagation on Interconnects*, 2002.

[4] G.Y. Liu, S. Xu, Y. Quian, *Acc. Chem. Res.*, vol. 33, pp. 457-466, 2000.

RICONOSCIMENTO DELLA SEQUENZA DEL DNA DA PARTE DI UNA SUPERFICIE INORGANICA

Anna Bergia,^a Beatrice Sampaolese,^b Giampaolo Zuccheri,^a Anita Scipioni,^d Maria, Savino,^c Pasquale De Santis,^d Bruno Samorì^a

^A *DIPARTIMENTO DI BIOCHIMICA, UNIVERSITÀ DI BOLOGNA;*

^B *CENTRO PER LO STUDIO DEGLI ACIDI NUCLEICI, CNR, ROMA;*

^C *DIPARTIMENTO DI GENETICA E BIOLOGIA MOLECOLARE, UNIVERSITÀ DI ROMA "LA SAPIENZA";*

^D *DIPARTIMENTO DI CHIMICA, UNIVERSITÀ DI ROMA "LA SAPIENZA"*

Le interazioni tra molecole organiche e superfici cristalline inorganiche hanno giocato un ruolo essenziale negli stadi prebiotici dell'evoluzione chimica della vita.¹ Molti autori suggeriscono che la sintesi prebiotica dei biopolimeri sia avvenuta su una superficie solida inorganica e che i primi "organismi" viventi siano consistiti in molecole di RNA o di altri acidi nucleici legate alla superficie di particelle minerali.² Molto recentemente è stato riportato un processo di assorbimento differenziale delle basi degli acidi nucleici sulla superficie cristallina della grafite.³ Tuttavia, finora non sono state riportate evidenze dell'esistenza di processi di riconoscimento tra una superficie cristallina e la sequenza di un DNA a doppia elica. Abbiamo utilizzato la Microscopia a Scansione di Forza (SFM) per studiare l'interazione tra la superficie della mica e la sequenza che una molecola di DNA non intrinsecamente diritta espone a questa superficie durante la sua deposizione. Abbiamo così potuto dimostrare che la superficie di mica interagisce in modo differenziale con facce del DNA che espongono sequenze diverse.

Un tratto di DNA curvo ha una struttura quasi perfettamente planare: quando è deposto su una superficie, esso espone una delle due facce del tratto curvo. Le due facce espongono sequenze che sono complementari l'una all'altra. Dalla sequenza delle basi di un DNA a doppio filamento è possibile prevedere la sua curvatura nello spazio e la sequenza su ciascuna faccia della curva appiattita. Tuttavia, non è possibile identificare la faccia che un tratto di DNA curvo espone ad una superficie analizzando la sua immagine SFM, perché l'orientazione della sequenza nell'immagine non è conosciuta. L'incertezza nell'orientazione può essere eliminata impiegando molecole di DNA palindromiche la cui simmetria interna permette la correlazione tra forma di una molecola e sequenza. Abbiamo costruito molecole di DNA palindromiche in cui un tratto lineare centrale unisce due tratti ad elevata curvatura. In media, in seguito alla loro deposizione, queste molecole possono esporre alla superficie (e al solvente) due facce del tratto curvo uguali o diverse: questo può portare a due possibili forme che esse possono assumere sulla superficie, a S o a C (Figura 1).

Abbiamo mostrato che raccogliendo dati da un gruppo statisticamente rappresentativo di immagini SFM, si possono calcolare le curvature intrinseche locali lungo una molecola di DNA con le loro rispettive orientazioni.⁴ Seguendo questo metodo, abbiamo ottenuto un grafico di curvatura con andamento sigmoidale per le molecole palindromiche in studio (Figura 2). Come mostrato in Figura 1, una molecola di DNA a S è caratterizzata da una netta distinzione tra le sue due facce: possiamo chiamarle SA e S*T, poiché esse sono prochirali ed espongono sequenze complementari alla superficie (nei segmenti curvi una delle due facce è più ricca in A e l'altra più ricca in T). Nel caso di possibili forme a C, invece, le due facce della molecola sono equivalenti, perché all'interno di ogni faccia una metà espone una sequenza che è complementare a quella dell'altra metà.

Da queste considerazioni di simmetria, ci attendiamo che: 1) quando la curvatura lungo la sequenza è mediata su tutte le molecole dell'insieme, i contributi delle due facce delle molecole a C si cancellino, perché queste due facce sono fisicamente equivalenti; 2) i contributi delle forme a S si cancellino anch'esse se le molecole sono state assorbite equamente con la faccia SA o S*T, poiché la curvatura di ogni metà delle facce SA è compensata da una curvatura uguale e opposta nelle molecole S*T. Al contrario, se la superficie adsorbe preferenzialmente una delle due facce dei segmenti curvi, il grafico di curvatura media può direttamente evidenziare lo squilibrio tra le sottopopolazioni delle forme SA e S*T. È così possibile identificare quale faccia interagisce preferenzialmente con la superficie dallo studio dei segni dei grafici di curvatura locale: le molecole dimeriche palindromiche che abbiamo preparato espongono alla superficie preferenzialmente la faccia S*T.

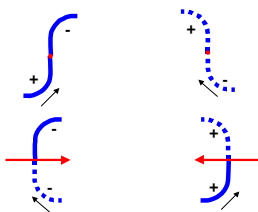


Figura 1: Le forme possibili per le molecole palindromiche deposte sulla superficie.

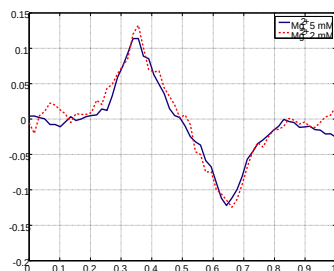


Figura 2: diagrammi di curvatura dei dimero (a due concentrazioni di magnesio diverse).

Bibliografia

1. Pontes-Buarque, M. et al. Surface charges and interfaces: implications for mineral roles in prebiotic chemistry. *An Acad Bras Cienc* **72**, 317-22. (2000).
2. Acevedo, OL. & Orgel, L. E. Template-directed oligonucleotide ligation on hydroxylapatite. *Nature* **321**, 790-792 (1986).
3. Sowerby, S.J., Cohn, C.A., Heckl, W.M. & Holm, N.G. Differential adsorption of nucleic acid bases: Relevance to the origin of life. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 820-2. (2001).
4. Zuccheri, G. et al. Mapping the intrinsic curvature and flexibility along the DNA chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 3074-3079. (2001).

MESSA A PUNTO UN SISTEMA DI DIAGNOSI MOLECOLARE PER MONITORARE L'ATTIVITÀ TOSSIGENA DI *ASPERGILLUS* SPP.

Scherm B.¹, Palomba M.², Serra D.², Balmas V.¹, Migheli Q.¹

¹DIPARTIMENTO DI PROTEZIONE DELLE PIANTE, UNIVERSITA' DI SASSARI, VIA E. DE NICOLA 9, 07100 SASSARI

²DIPARTIMENTO FARMACO-CHIMICO-TOSSICOLOGICO, UNIVERSITA' DI SASSARI, VIA A. MURONI 23, 07100 SASSARI

Il metabolismo secondario dei funghi filamentosi è poco conosciuto e porta alla formazione di composti che spesso, come nel caso degli antibiotici o delle micotossine, risultano benefici o dannosi per la salute umana e animale. Uno dei processi biosintetici più studiati è rappresentato da quello delle micotossine sterigmatocistina, prodotta da *Aspergillus nidulans*, e aflatossina, prodotta da *A. flavus* e *A. parasiticus*. Dalla loro scoperta negli anni '60 fino ad oggi molte forme di aflatossine sono state caratterizzate. Le quattro tossine più abbondanti in natura sono: AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂, tra cui AFB₁ è la più diffusa ed anche la più studiata. Mentre ceppi di *A. parasiticus* producono in generale aflatossine del tipo B e G, ceppi di *A. flavus* producono solo il tipo B. AFB₁ è uno degli agenti genotossici più potenti presenti in natura e può avere effetti gravissimi per la salute umana e animale, quali immunosoppressione, necrosi del fegato, edema polmonare, etc.

Fin ad oggi sono stati scoperti 17 geni responsabili della sintesi completa delle aflatossine. Il modello oggi più accettato del processo biosintetico dell'aflatossina B₁, a partire dal precursore poliketidico noranthrone, attraverso tutta una serie di composti intermedi, si articola in ben 12 passaggi. Tuttavia, occorre tener presente che l'effettiva capacità di produrre tali micotossine non è direttamente correlata alla presenza dei geni responsabili della biosintesi, in quanto in molti isolati di *Aspergillus* spp. si è osservata una ridotta o nulla attività tossigenica a fronte della presenza di tutti i determinanti genetici del processo biosintetico dell'aflatossina. Risulta quindi di primaria importanza mettere a punto sistemi di identificazione rapida dei ceppi realmente tossigeni tra tutti quelli presenti come contaminanti delle derrate alimentari.

Nell'ambito di un progetto di ricerca finanziato da MIUR e MIPA, l'U.R. attiva presso il Dipartimento di Protezione delle Pianta dell'Università di Sassari si propone di adattare la tecnica di RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) al monitoraggio dell'attività tossigena di *Aspergillus* spp. isolati da diversi prodotti di origine vegetale.

Scopo di questo lavoro era: (i) caratterizzazione dell'espressione di geni coinvolti nella sintesi delle aflatossine di *A. flavus* e *A. parasiticus* produttori e non produttori di aflatossine cresciuti su terreno YES (in condizioni di induzione) e YEP (in condizioni di non induzione) mediante RT-PCR; (ii) ricerca di primer specifici che amplifichino uno o più geni chiave nella produzione di aflatossine e, perciò, applicabili ad un approccio diagnostico; (iii) conferma dei risultati dell'analisi molecolare con metodi classici culturali e/o con l'analisi della produzione di aflatossine anche nel tempo mediante tecniche di HPLC/spettrometria di massa.

Il profilo e il livello di espressione di 11 geni coinvolti nella sintesi di aflatossine sono stati analizzati mediante RT-PCR con primer specifici. L'RNA totale è stato estratto da 16 ceppi di *A. flavus* e *A. parasiticus* caratterizzati da una diversa tossicità e coltivati in terreno liquido in condizioni induttive (YES) o non induttive (YEP) ed è stato trascritto in cDNA. Su questo template sono state impiegate 9 paia di primer specifici per geni della sintesi delle aflatossine (*nor1*, *adhA*, *avnA*, *avfA*, *vbs*, *omtB*, *omtA*, *ord1*, *ver1*) e 2 paia di primer specifici per geni regolatori (*aflR*, *aflJ*). Come gene di controllo della espressione di mRNA e della validità della retrotrascrizione è stato scelto il gene house-keeping *tub1* codificante la α -tubulina.

Per il controllo culturale classico i 16 ceppi di *A. flavus* e *A. parasiticus* sono stati coltivati su coconut agar, che permette l'analisi rapida di ceppi produttori e non produttori aflatossine mediante l'osservazione delle piastre esposte a raggi UV: i ceppi che producono aflatossine evidenziano una fluorescenza sotto l'effetto delle radiazioni ultraviolette.

L'analisi delle aflatossine mediante HPLC/MS è stata messa a punto con prelievi a diversi intervalli dopo l'inoculazione di un ceppo di *A. flavus* tossigeno in terreno liquido YES. Le aflatossine contenute nei campioni sono state estratte con cloroformio e sottoposte all'analisi specifica mediante HPLC/MS. Per tutti gli altri ceppi è stato effettuato un solo prelievo, coincidente con il picco della produzione di aflatossine, prima di essere trattati e sottoposti alla misurazione.

Lo screening dei ceppi mediante coltura su coconut agar non ha permesso la classificazione in maniera univoca di tutti i ceppi analizzati in base alla loro capacità di produrre aflatossine o meno (circa 20% degli isolati appartenenti a entrambe le categorie non erano classificabili in base alla rifrangenza). Tuttavia, lo screening su coconut agar rappresenta un controllo facile e veloce per una prima analisi generale.

Le ricerche intraprese su *Aspergillus* spp. hanno permesso di individuare alcuni geni (*nor1*, *ver1*, *omtA*, *omtB*) la cui espressione appare essenziale nel processo biosintetico dell'aflatossina, aprendo quindi la possibilità di applicare tecniche RT-PCR e microarray per la rapida identificazione degli isolati tossigeni.

STABILIZZAZIONE DI ENZIMI ALL'INTERNO DI UNA MATRICE AMFIFILICA

M. Turacchio, G. Di Nino, F. Giansanti, M. T. Massucci, A. D'Archivio *, S. Lora[#], B. Corain[§] and G. Antonini[°].

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA DI BASE ED APPLICATA, UNIVERSITÀ DI L'AQUILA.

** DIPARTIMENTO DI CHIMICA, INGEGNERIA CHIMICA E MATERIALI, UNIVERSITÀ DI L'AQUILA.*

[#] ISTITUTO FRAE, CNR, SEZIONE LEGNARO, LEGNARO.

[§] DIPARTIMENTO DI CHIMICA INORGANICA, METALLORGANICA ED ANALITICA, E CENTRO STUDIO STABILITÀ E REATTIVITÀ COMPOSTI COORDINAZIONE, CNR, UNIVERSITÀ DI PADOVA.

[°] DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA, UNIVERSITÀ DI ROMA TRE.

Scopo della ricerca è l'ottenimento di nuovi supporti per catalisi enzimatica caratterizzati da alta accessibilità molecolare ed elevata amfifilicità per produrre nanoemulsioni all'interno della matrice che aumentino la velocità di diffusione di reagenti e prodotti parzialmente idrofobici. Vengono qui presentati i risultati ottenuti immobilizzando lattoperossidasi (LPO) all'interno di una resina macroporosa. La LPO è un enzima estratto in grandi quantità ed a basso costo dal latte bovino come prodotto di scarto della lavorazione del formaggio; l'enzima è capace di catalizzare in presenza di acqua ossigenata l'ossidazione di composti xenobiotici. Il biocatalizzatore così ottenuto, oltre ad essere un modello per altre applicazioni, potrebbe trovare già un utilizzo nella detossificazione di reflui.

Sono stati dapprima prodotti polimeri amfifilici attraverso la irradiazione gamma di miscele omogenee di monomeri a diverso grado di idrofilità (idrossi-etil-metacrilato (HEMA); idrossi-propil-metacrilato (HPMA); trimetilol-propan-trimetacrilato (TMPTM) e glicidil-metacrilato (GMA)). I monomeri sono stati disciolti in acqua e la soluzione è stata irradiata dopo congelamento a -70°C per ottenere la formazione di cristalli di ghiaccio che lasciassero cavità dopo polimerizzazione allo scopo di ottenere una resina macroporosa che potesse facilitare la diffusione nella matrice di composti a basso peso molecolare.

I polimeri ottenuti sono stati così caratterizzati:

- 1) L'uso del microscopio elettronico a scansione ha permesso l'osservazione diretta di cavità macroporose all'interno della matrice che hanno diametro compreso tra 5 e 100 micron.
- 2) La cromatografia ad esclusione sterica inversa (ISEC) della resina rigonfiata in acqua od in solvente organico ha dimostrato la presenza di segmenti idrofili e lipofili il cui rapporto può essere modulato variando la quantità relativa dei diversi monomeri.
- 3) La tecnica di risonanza di spin elettronico ha permesso di determinare la nanostruttura della resina misurando l'accessibilità molecolare verso un radicale stabile (TEMPONE).

La resina ottenuta per polimerizzazione di idrossi-etil-metacrilato e glicidil-metacrilato (HEMA-GMA) si è rivelata la più adatta per legare covalentemente con alta resa la LPO e con tale resina è stato quindi allestito un biocatalizzatore di prima generazione. Dopo aver sminuzzato e vagliato la resina per ottenere particelle di diametro omogeneo, il legame della LPO alla resina è stato condotto mediante incubazione in agitazione di 300 mg di resina con 20 ml di una soluzione di LPO 10 mg/ml in acqua per 24 ore a 37°C . Per bloccare i siti epossidici non reagiti con la proteina e lavare la resina da enzima non legato covalentemente, sono stati fatti ripetuti lavaggi con tampone acetato 10 mM pH 5.6 per 24 ore. Dopo i lavaggi, la resina è stata filtrata e lasciata seccare a temperatura ambiente.

I risultati ottenuti su tale biocatalizzatore hanno mostrato che:

- 1) È stata ottenuta una resa di incorporazione paragonabile a quella ottenibile con resine commerciali (Eupergit) utilizzate industrialmente.
- 2) L'enzima mantiene la sua specifica attività catalitica verso i diversi substrati
- 3) L'enzima non mostra significative perdite di attività dopo 21 giorni di incubazione in tampone acetato.
- 4) L'enzima mostra una maggiore resistenza verso la denaturazione termica.
- 5) L'enzima mostra una maggiore resistenza verso la denaturazione chimica in urea
- 6) L'enzima mostra una maggiore resistenza all'etanolo fino all'80%
- 7) La incubazione della resina in iso-ottano non provoca inattivazione dell'enzima.

Tuttavia, nel biocatalizzatore così ottenuto l'enzima sembra legarsi soprattutto alla superficie delle particelle di resina, malgrado la presenza di macropori visibili al microscopio elettronico e con la tecnica ISEC non vengono messi in evidenza segmenti idrofili e lipofili all'interno della matrice. Pertanto nel proseguimento della ricerca si cercherà di aumentare sia l'amfifilicità che la efficienza di coniugazione della matrice.

ESPRESSIONE DELLA OSSIDO NITRICO SINTASI NEURONALE (nNOS) IN ASTROCITI REATTIVI *IN VITRO* E *IN VIVO*

Maria Vincenza Catania¹, Raffaella Giuffrida², Giovanna Seminara^{1,2}, Giuseppe Barbagallo², Eleonora Aronica³, Jan A. Gorter⁴, Paola Dell'Albani¹, Agrippino Ravagna², Vittorio Calabrese², Anna Maria Giuffrida Stella²

¹ISTITUTO DI SCIENZE NEUROLOGICHE-SEZIONE DI CATANIA, C.N.R., V.LE REGINA MARGHERITA 6, CATANIA; ²DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE, SEZIONE DI BIOCHIMICA E BIOLOGIA MOLECOLARE, UNIVERSITÀ DI CATANIA, CATANIA; ³DIPARTIMENTO DI NEUROPATOLOGIA, UNIVERSITÀ DI AMSTERDAM, ⁴ISTITUTO DI NEUROBIOLOGIA, AMSTERDAM, OLANDA.

Obiettivi

L'ossido nitrico (NO) è un radicale libero che svolge attività di messaggero diffusibile a livello del Sistema Nervoso Centrale. L'enzima che sintetizza NO esiste in tre diverse isoforme, NOS neuronale (nNOS) e NOS endoteliale (eNOS) che sono espresse costitutivamente e richiedono calcio per l'attivazione; e NOS inducibile (iNOS) che viene indotta da stimoli immunologici e non richiede Ca^{2+} per la sua attività. Nonostante la predominante localizzazione neuronale, l'enzima nNOS è stato trovato anche in cellule non neuronali. Inoltre, la nNOS è considerata una proteina espressa costitutivamente, ma alcuni risultati suggeriscono che potrebbe anche essere regolata dinamicamente. Recentemente abbiamo osservato che la nNOS è sovra-espressa negli astrociti reattivi del midollo spinale di pazienti affetti da Sclerosi Laterale Amiotrofica (1). Nella presente ricerca, abbiamo studiato la regolazione della espressione della nNOS in colture di astrociti di ratto mantenute in diverse condizioni sperimentali: con o senza aggiunta di siero nel medium di coltura. Inoltre, abbiamo studiato l'espressione cellulo-specifica della nNOS nell'ippocampo di ratto nel quale è stato indotto uno stato epilettico.

Metodi

Colture cellulari di astrociti sono state preparate da emisferi cerebrali di ratti neonati Wistar (PND 1-2) come descritto precedentemente (2). Le cellule sono state coltivate in MEM contenente 10% siero equino (HS). Il lisato cellulare è stato ottenuto da astrociti coltivati in MEM + 10% HS o da astrociti mantenuti per almeno tre giorni in un medium chimicamente definito (N-2 medium) non contenente siero. L'espressione della nNOS è stata valutata mediante analisi Western blot e immunocitochimica. Sono stati usati i seguenti anticorpi primari: anti-nNOS policlonale e monoclonale (Transduction Lab), anti-actina monoclonale (Pierce), anti-nitrotirosina monoclonale (Upstate), anti-proteina gliale fibrillare acida (GFAP; DAKO) e anti-vimentina monoclonale (DAKO). E' stata effettuata una doppia immunofluorescenza su sezioni fissate di ippocampo di ratto usando anticorpi secondari coniugati con cromofori fluorescenti, fluoresceina o CY3 (Jackson Lab), l'analisi è stata eseguita mediante microscopia confocale.

L'attività totale della NOS è stata valutata usando il saggio per l'emoglobina come descritto precedentemente (3). Il saggio è basato sulla ossidazione della ossiemoglobina con NO ed è eseguito spettrofotometricamente misurando la formazione di emoglobina. L'attività NOS calcio-dipendente è stata misurata eliminando il CaCl_2 e aggiungendo EGTA (concentrazione finale 1mM) nella miscela di reazione. La formazione di emoglobina è stata monitorata spettrofotometricamente sulla base del cambiamento dell'assorbanza fra i 411 e 401 nm.

Risultati

I dati ottenuti nella presente ricerca hanno messo in evidenza che la nNOS non è espressa negli astrociti di corteccia cerebrale coltivati in medium contenente siero e che la deprivazione del siero dal medium di coltura induce un significativo aumento dell'espressione di nNOS, rivelato sia mediante Western blotting che immunocitochimica. Il medesimo risultato è stato confermato in colture di astrociti ottenute sia da corteccia che da midollo spinale di ratto. In accordo con questi dati, gli astrociti privati del siero mostrano un incremento nella attività della NOS totale e calcio-dipendente. Inoltre, l'aggiunta di glutamato (100 μM) induce un aumento del contenuto intracellulare dei nitriti e dell'immunoreattività alla nitrotirosina nelle colture di glia corticale private del siero, ma non nelle cellule coltivate in medium contenente siero. La deprivazione del siero induce inoltre una modificazione nella morfologia delle cellule gliali: da una forma piatta e poligonale a una forma stellata tipica degli astrociti reattivi. La sovra-espressione della nNOS è stata osservata anche *in vivo* negli astrociti reattivi dell'ippocampo di ratto dopo induzione di uno stato epilettico.

Conclusioni

I risultati ottenuti nella presente ricerca dimostrano una elevata sovra-espressione dell'enzima NOS neuronale negli astrociti reattivi sia *in vitro* che *in vivo*. In conclusione, questi dati suggeriscono che la espressione della nNOS potrebbe essere regolata dinamicamente anche in cellule non neuronali. La presenza della nNOS negli astrociti reattivi è importante per il ruolo cruciale che l'ossido nitrico svolge nella nitrificazione delle proteine. La nitrificazione delle proteine, infatti, potrebbe essere responsabile della patogenesi del danno neuronale nelle malattie neurodegenerative. Un aberrante nitrificazione dei trasportatori del glutammato nella glia, dovuta alla produzione di NO gliale, potrebbe contribuire all'incremento dei livelli di glutammato, che porterebbe alla morte neuronale attraverso un meccanismo eccitotossico. Inoltre, la produzione di NO altamente diffusibile negli astrociti potrebbe causare danni diretti alla catena respiratoria mitocondriale dei neuroni vicini e potrebbe partecipare alla nitrificazione e conseguente inattivazione di diverse proteine neuronali.

(1) Catania MV et al. (2001) *J Neurosci* 21, RC 148, 1-5.

(2) McCarthy KD and De Vellis J (1980) *J Cell Biol.* 85; 890-902.

(3) Hevel JH and Marletta M (1994). *Methods in Enzymology.* 233, 250-255.

SVILUPPO DI NANOTECNOLOGIE APPLICATE ALLO SVILUPPO DI BIOSENSORI INNOVATIVI

S.Carrara, V.Erokhin, C.Paternolli, R.Narizzano, C.Nicolini

UNIVERSITÀ DI GENOVA, DIPARTIMENTO DISTBIMO, CORSO EUROPA 30, 16132 GENOVA

Lo scopo del seguente progetto di ricerca è quello di sviluppare e validare nuove metodiche per la progettazione dei sensori innovativi di nuova concezione che utilizzino matrici organiche e biologica per la rivelazione, con elevata sensibilità, di analiti di interesse ambientale in fase gassosa. I sensori proposti si basano sull'impiego di materiali avanzati che attualmente sono, per lo più, oggetto di studio nella ricerca tecnologica più d'avanguardia inerente ad aree come la bioelettronica o l'elettronica molecolare e quantistica. I materiali selezionati nell'ambito del progetto sono biopolimeri, come ad esempio le proteine, o polimeri organici sintetici, come i polimeri conduttori. In particolare i materiali che si intende studiare sono i seguenti

- la Batteriorodopsina (una proteina fotosensibile)
- i polimeri conduttori coniugati (in particolare i polipirroli e le polianiline)
- i sali di acidi grassi con metalli bivalenti (quali l'arachidato di cadmio)

Questi materiali sono attualmente oggetto di interesse ricerca applicata e sono molto promettenti per le loro potenziali ricadute tecnologiche/applicative.

Nell'ambito del presente progetto, si intende utilizzare la Br a causa delle sue proprietà intrinseche di fotocromismo (ossia il cambiamento reversibile del colore) e/o di fotoelettricità (processi di separazione di carica in presenza di una opportuna sorgente radiativa). Uno dei sensori che si intende sviluppare (DIMOSTRATORE A) è un dispositivo di tipo ottico in cui l'elemento sensibile è una matrice organica costituita da un film di Batteriorodopsina opportunamente immobilizzato. Allo stato attuale della ricerca (stato dell'arte) la trasduzione ottica sembra essere quella più promettente, tuttavia durante lo studio dell'interazione proteina/anestetico sarà condotta una serie di attività sperimentali mirate a valutare o a combinare altri tipi di trasduzione elettro/ottica, come la misura di fotopotenziali.

L'uso dei polimeri conduttori, una particolare classe di polimeri organici, sta prendendo sempre più campo, grazie alle peculiari caratteristiche chimico-fisiche di tali materiali, nella messa a punto di dispositivi per la rivelazione di gas o vapori. Un secondo sensore che si intende sviluppare (DIMOSTRATORE B), quindi, sarà basato su una matrice di polimero conduttore, selezionato in particolare tra le classi delle polianiline o dei polipirroli, fabbricata per mezzo di una delle tecniche di film sottili (Langmuir-Blodgett, spin coating, elettrodeposizione, ecc.) ed immobilizzata su un opportuno supporto e/o direttamente sul trasduttore. I sistemi di trasduzione che verranno considerati sono di tipo ottico (variazione dello spettro di assorbimento) e/o elettrico (variazione della conducibilità).

I sensori per gas sono molto importanti per tutta una serie di applicazioni, quali quelle in campo medico, industriale, ambientale, etc. Tra i gas che necessitano di essere rivelati e monitorati, l' H_2S è importante per applicazioni nell'analisi degli odori o per i controlli sulla corrosione, sulla salute, sulle perdite industriali attraverso il controllo delle acque, degli olii o dei gas di scarico di origine industriale.

Nel presente progetto si intende anche sviluppare un sensore per H_2S (DIMOSTRATORE C) estremamente innovativo. Il sensore proposto si basa sulla possibilità di avere reazioni chimiche negli acidi grassi depositati in film sottili secondo la tecnologia di Langmuir-Blodgett.

Quando tali film (ad esempio, arachidato di cadmio) sono posti in atmosfera di H_2S , piccole particelle di materiale semiconduttore si formano in tale matrice organica (CdS nel caso di solfuro di cadmio). Le dimensioni di tali particelle ed il loro fattore di crescita dipendono dalla concentrazione dell' H_2S . Il sistema di trasduzione che verrà preso in considerazione per lo sviluppo di questo tipo di sensore si baserà sulla misura, per via nanogravimetrica, del cambiamento di massa avvenuto nel film, dovuto alla formazione di tali particelle o aggregati.

I risultati del seguente progetto saranno almeno due dimostratori tecnologici di sistemi sensoristici innovativi per gas basati sull'impiego dei nuovi materiali appena indicati ed in grado di essere utilizzati in diverse aree applicative. In particolare, verranno realizzati due dimostratori scegliendoli, in funzione dei risultati di ricerca, tra:

- monitoraggio e rivelazione di anestetici in fase gassosa in sale operatorie e in ambienti medici (DIMOSTRATORE A)
- monitoraggio e rivelazione ambientale di alcune specie di gas prodotti e/o inerenti a processi industriali e civili, in particolare Cl_2 , HCl , NO_x , SO_2 , NH_3 , analiti appartenenti alla classe delle Idrazine, degli Alcoli, dei Chetoni e degli Aldeidi (DIMOSTRATORE B).
- monitoraggio e rivelazione ambientale di acido solfidrico (H_2S) (DIMOSTRATORE C).

L'utilizzo di questi nuovi materiali si pone quindi l'obiettivo finale di sviluppare dispositivi sensoristici, a livello di dimostratori tecnologici (ovvero dei sistemi da laboratorio), in grado di competere e/o integrare le attuali metodiche di monitoraggio ambientale. L'attività di ricerca sperimentale mirerà quindi alla acquisizione di nuova conoscenza per la messa a punto di prodotti/processi innovativi e potenzialmente competitivi nell'ambito dei sensori per gas.

MODELLI MATEMATICI DI ADESIONE E FUSIONE TRA MEMBRANE LIPIDICHE: SIMILITUDINI ED ECLATANTI DIVERSITA' CON LE CONVENZIONALI CINETICHE DI FLOCCULAZIONE DEI SISTEMI COLLOIDALI.

Antonio Raudino

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE, UNIVERSITA' DI CATANIA, VIALE A. DORIA 6, 95125, CATANIA.

Esiste in letteratura una vasta area di ricerca sulle cinetiche di adesione tra vescicole lipidiche (spesso seguita da fusione), un sistema frequentemente usato come modello sperimentale biomimetico. L'interpretazione di tale fenomeno è generalmente basata su concetti tipici della chimica colloidale quali il bilancio tra forze di repulsione a lungo raggio (elettrostatiche) e forze di attrazione a corto raggio (forze di van der Waals, bridging indotto da ioni bivalenti o proteine ecc.). Da questo bilancio si originano due minimi: uno a più lunga distanza (adesione debole e reversibile) ed uno molto più profondo a corta distanza che può eventualmente portare alla fusione delle vescicole. Un massimo separa i due minimi determinando con la sua altezza l'intera cinetica di adesione. Un attento esame dei dati sperimentali mostra come l'uso acritico di tali concetti porti a previsioni errate, quali, ad esempio, la drastica riduzione della velocità di adesione col raggio delle vescicole interagenti. L'introduzione di un nuovo ed importante parametro, la deformazione elastica di bending del bilayer lipidico (un dato ora sperimentalmente accessibile e/o calcolabile) all'interno dei convenzionali modelli matematici di adesione tra corpi rigidi rende molto più stringente l'accordo con i dati sperimentali. Il modello qui sviluppato considera la probabilità di formazione di locali siti di adesione (protuberanze) stabilizzati dalle forze di adesione a corto raggio ma destabilizzati dall'energia elastica richiesta per la loro formazione. E' facile mostrare che al di sotto di certe dimensioni critiche queste deformazioni decadono fino a scomparire, mentre al di sopra delle dimensioni critiche esse crescono indefinitamente sino a portare al completo stretto contatto le due membrane adiacenti. La probabilità che si formi una deformazione elastica di dimensioni maggiori di quelle critiche è quindi il rate-determining step dell'intero processo, dalla cui conoscenza si può quindi calcolare, tramite la teoria dello stato di transizione, la velocità di adesione tra membrane lipidiche. L'applicazione di tale modello porta a prevedere il corretto livellamento asintotico della cinetica di adesione col raggio delle vescicole (la velocità decresce esponenzialmente in un classico modello a sfere rigide). Inoltre, il calcolo prevede l'esistenza di una concentrazione critica di "stickers" (ioni bivalenti, proteine) per innescare il processo di adesione (fenomeno generalmente osservato) come pure la dipendenza della cinetica dalla costante elastica di bending del bilayer lipidico. L'estensione del precedente modello a vescicole lipidiche a più componenti (lipidi e proteine, ad esempio) da origine ad una nuova ed imprevista fenomenologia, ad esempio, la formazione di micro-dominii nella regione di contatto tra vescicole e l'insorgere di irregolarità ed ondulazioni dei bilayers nei siti di adesione. Tali fenomeni sono stati spesso osservati in sistemi modello e nelle interazioni tra membrane cellulari. Essi traggono origine dalla correlazione tra la dinamica di crescita dei siti di contatto con i fenomeni di trasporto dei componenti la membrana durante il processo di adesione.

NMDA RECEPTOR AND NITRIC OXIDE PROMOTE NEURONAL SURVIVAL THROUGH THE ACTIVATION OF THE TRANSCRIPTION FACTOR CREB

Antonio Contestabile, Elisabetta Ciani, Barbara Monti, Marco Virgili and Giuliano Della Valle

DEPARTMENT OF BIOLOGY, UNIVERSITY OF BOLOGNA, BOLOGNA, ITALY

Our research has been targeted to the identification of cellular pathways accounting for the survival role of glutamate, acting through the NMDA receptor, as well as of nitric oxide on neuronal cells. We have focused on the transcriptional factor, CREB, as its activity has been implicated in several models of neuronal survival and plasticity.

We have used both *in vivo* (development of cerebellum in neonatal rats) and *in vitro* (primary cultures of cerebellar granule neurons and lines of neuroblastoma cells) models and a variety of experimental approaches. NMDA receptor has been blocked through specific competitive or non competitive antagonists and its reduced activity has been mimicked *in vitro* by lowering potassium concentration in the medium of cerebellar granule neurons. Cell death and transcriptional activity of CREB have been monitored through different techniques. Nitric oxide production has been hampered in cerebellar granule neurons by exposure to nitric oxide synthase inhibitors and CREB transcriptional activity has been monitored in relation to consequent cell death. Other pharmacological manipulations have been performed by blocking a widespread target of nitric oxide biological activity, the cyclic GMP/protein kinase G system. In neuroblastoma, wild-type cells have been subjected to nitric oxide deprivation or to nitric oxide supplementation by exogenous agents. Clones overexpressing the human neuronal isoform of nitric oxide synthase have been created and tested for their resistance to deprivation of trophic factors.

We have determined that the chronic blockade of the NMDA receptor during a critical period of cerebellar development *in vivo*, is accompanied by a decreased expression of the phosphorylated, active form of CREB. Similar results have been obtained in *in vitro* cultures of cerebellar granule cells, where non trophic culture conditions bring to cell death and decreased CREB activity, effects that are largely reversed by the stimulation of the NMDA receptor. Deprivation of nitric oxide brings differentiated cerebellar granule neurons to apoptotic death and downregulates CREB activity, an effect mediated through the pathway regulated by cyclic GMP and its kinase. In neuroblastoma cells, overproduction of exogenous NO or supplementation of exogenous NO favor resistance to apoptosis induced by trophic factor deprivation. Nitric oxide, concomitantly, attenuates the downregulation of CREB activity related to these death-favoring conditions. The effect of nitric oxide is largely mimicked by ectopic expression in these cells of CREB and/or of its related kinase, protein kinase A. Also in this model, the action of nitric oxide appears to be mainly mediated through cyclic GMP as a second messenger. In neuroblastoma cells, nitric oxide also appears to speed up the differentiation process elicited by a well known morphogen, retinoic acid.

Taken together, these data point at CREB transcriptional activity, mediated by the cyclic GMP/protein kinase G system, as a primary target of the survival action promoted by NMDA receptor stimulation and nitric oxide activity in neuronal cells.

ANTIPROTEASI IMMOBILIZZATE PER LA RIDUZIONE DEL DANNO PROTEOLITICO INDOTTO DURANTE LA CIRCOLAZIONE EXTRACORPOREA: IL COMPLESSO α_1 -ANTITRYPSINA/ELASTASI COME MODELLO SPERIMENTALE.

V. Grano^{1,2}, N. Diano², M. Portaccio¹, U. Bencivenga², A. De Maio¹, N. De Santo³, A. Perna³, F. Salamino⁴, D.G. Mita^{1,2,*}.

¹ *DIPARTIMENTO DI MEDICINA SPERIMENTALE, FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA, SECONDA UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI, VIA S. M. DI COSTANTINOPOLI 16-80138 NAPOLI, ITALIA.*

² *ISTITUTO DI GENETICA E BIOFISICA "A. BUZZATI TRAVERSO"- CNR, VIA G. MARCONI 12-80125 NAPOLI, ITALIA.*

³ *CATTEDRA DI NEFROLOGIA, SECONDA UNIVERSITÀ DI NAPOLI.*

⁴ *DIPARTIMENTO DI MEDICINA SPERIMENTALE, SEZIONE DI BIOCHIMICA, UNIVERSITÀ DI GENOVA, VIALE BENEDETTO XV, 1-16132 GENOVA, ITALIA.*

Obiettivo della ricerca è stato la realizzazione e la caratterizzazione di una membrana di polietere sulfone modificato su cui era stata immobilizzata α_1 -antitripsina allo scopo di ridurre, attraverso l'interazione proteasi/antiproteasi, la concentrazione ematica di proteasi attive rilasciate durante l'emodialisi o durante le operazioni di bypass cardiopolmonare.

Antiproteasi α_1 -antitripsina da plasma umano è stata immobilizzata sulla membrana "Supor" R della *Pall*. Sulla membrana, 150 μm di spessore e con pori di diametro 0.2 μm , era copolimerizzato chimicamente Glicidil Metacrilato. Fenilendiammina è stata utilizzata come spaziatore tra il supporto attivato e l'inibitore di proteasi. L'immobilizzazione dell'antiproteasi ha luogo attraverso i residui di tirosina (via diazotizzazione), non coinvolti nell'interazione con la proteasi in quanto localizzati in una porzione della molecola lontana dal sito di legame.

Come sistema modello dell'interazione proteasi/antiproteasi è stato utilizzato quello dell'elastasi/ α_1 -antitripsina.

L'efficienza della membrana, cioè il suo potere inibente nei confronti dell'attività dell'elastasi in circolo, è stata determinata misurando la concentrazione di elastasi attiva in funzione del tempo di contatto della soluzione con la membrana attivata. Abbiamo trovato che la concentrazione di elastasi attiva in soluzioni acquose diminuisce in funzione del tempo di contatto con la membrana, fino a raggiungere un livello di saturazione. A pH 7.4, quello del sangue, è stata ottenuta una diminuzione della concentrazione di elastasi pari al 40%. La diminuzione di elastasi raggiunge il livello di saturazione dopo circa 50 minuti. Questo tempo è congruo coll'analisi diffusiva del processo effettuata mediante l'equazione di Einstein. Tale tempo può essere ridotto o aumentando la concentrazione di antiproteasi immobilizzate o incrementando la velocità di diffusione dell'elastasi attraverso la membrana mediante opportuni gradienti idraulici, osmotici o di temperatura.

Abbiamo dimostrato che tale diminuzione non è dovuta né ad autolisi, che da sola determina una perdita di attività pari al 5%, né a riduzione di proteasi attive in circolo per interazioni differenti da quelle con l' α_1 -antitripsina.

**ATTIVITA', IN CONDIZIONI ISOTERME E NON-ISOTERME, DELLA α -GALATTOSIDASI
IMMOBILIZZATA SU MEMBRANE DI NYLON TRATTATE CON GLICIDIL METACRILATO:
DIPENDENZA DAL TIPO DI RESIDUI AMINOACIDICI COINVOLTI NELL'IMMOBILIZZAZIONE.**

A. De Maio¹, M. Portaccio¹, S. Di Martino², P.L. Martelli^{3,4}, R. Casadio^{3,4}, N. Diano², V. Grano², S. Rossi², U. Bencivenga², D.G. Mita^{1,2}.

¹DIPARTIMENTO DI MEDICINA SPERIMENTALE, FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA, SECONDA UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI, VIA S. M. DI COSTANTINOPOLI 16-80138 NAPOLI, ITALIA.

²ISTITUTO DI GENETICA E BIOFISICA "A. BUZZATI TRAVERSO" - CNR, VIA G. MARCONI 12-80125 NAPOLI, ITALIA.

³LABORATORIO DI BIOFISICA, DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA, UNIVERSITÀ DI BOLOGNA, BOLOGNA, ITALIA.

⁴LABORATORIO DI BIOCOMPUTING, CENTRO INTERDIPARTIMENTALE PER LE RICERCHE BIOTECNOLOGICHE (CIRB), BOLOGNA, ITALIA.

L'enzima α -galattosidasi da *Aspergillus oryzae* è stato immobilizzato via diazotizzazione o via condensazione su membrane di Nylon modificate chimicamente con glicidil metacrilato tramite la tecnica del grafting. Scopo del lavoro è stato mettere a confronto l'attività enzimatica, in condizioni isoterme e non-isoterme, delle membrane catalitiche ottenute con i due metodi di immobilizzazione che si differenziano per i residui aminoacidici coinvolti nel legame covalente tra l'enzima ed il supporto attivato. Nella immobilizzazione per diazotizzazione sono coinvolte le tirosine, mentre nell'immobilizzazione per condensazione sono interessate le arginine.

Per una migliore interpretazione dei risultati ottenuti, mediante simulazione computazionale, si è costruito, a partire dalla sequenza degli aminoacidi che compongono la proteina, il modello 3D del sito catalitico, evidenziando la densità delle tirosine e delle arginine presenti intorno ad esso.

Entrambi i tipi di membrana presentano le stesse proprietà di trasporto fisico, come la permeabilità idraulica e termoosmotica, ed inoltre la stessa quantità di enzima immobilizzato.

In condizioni isoterme, è stata studiata la dipendenza dell'attività catalitica delle membrane dal pH delle soluzioni di substrato, dalla temperatura di esercizio e dalla concentrazione del substrato. Il confronto con il comportamento, nelle stesse condizioni sperimentali, dell'enzima in fase libera, ha evidenziato per la forma immobilizzata una maggiore resistenza a soluzioni acide ed ad elevate temperature. In particolare le membrane ottenute con la procedura per condensazione sono risultate le più resistenti.

Entrambi i tipi di membrane presentano valori della costante di Michaelis-Menten K_m più alti rispetto al valore dell'enzima libero, evidenziando una minore affinità per il substrato da parte dell'enzima immobilizzato. Tale svantaggio, in vista dell'utilizzo in un processo industriale, è parzialmente superato operando in condizioni non-isoterme. Infatti, in queste condizioni i valori della K_m sono più prossimi a quelli dell'enzima libero.

Quando poste in un bioreattore non-isotermo, le membrane ottenute via diazotizzazione risultano più efficienti di quelle ottenute via condensazione, mostrando un più alto incremento percentuale dell'attività catalitica a parità di differenza di temperatura attraverso la membrana.

UN SENSORE AMPEROMETRICO CON GLUCOSIO OSSIDASI IMMOBILIZZATA SU MEMBRANE DI NYLON AVENTI DIFFERENTI DIAMETRI DEI PORI E MODIFICATE CON DUE DIVERSI MONOMERI.

M. Portaccio¹, A. De Maio¹, S. Rossi², N. Diano², V. Grano², M. Lepore¹, P. De Luca¹, U. Bencivenga², D.G. Mita^{1,2}.

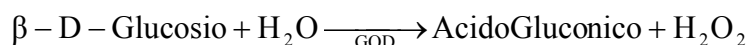
¹ DIPARTIMENTO DI MEDICINA SPERIMENTALE, FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA, SECONDA UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI, VIA S. M. DI COSTANTINOPOLI 16-80138 NAPOLI, ITALIA.

² ISTITUTO DI GENETICA E BIOFISICA "A. BUZZATI TRAVERSO" - CNR, VIA G. MARCONI 12-80125 NAPOLI, ITALIA.

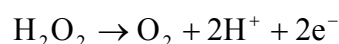
Obiettivo della ricerca è stato la realizzazione e la caratterizzare di un sensore amperometrico per il glucosio in grado di fornire risposte lineari in differenti intervalli di concentrazione.

La Glucosio Ossidasi (GOD) è stata immobilizzata su membrane di nylon con diametri dei pori da 0.2µm, 1.2µm e 3µm e modificate chimicamente con Glicidil Metacrilato (GMA) o Butil Metacrilato (BMA).

Le membrane ottenute sono state usate separatamente in un biosensore amperometrico a flusso. Le membrane catalitiche sono posizionate sulla superficie dell'anodo di platino. L'elettrodo di riferimento è di Ag/AgCl. Tra i due elettrodi è applicata una differenza di potenziale di 700 mV. In queste condizioni il perossido di idrogeno prodotto:



è ossidato all'anodo secondo la reazione:



La corrente elettrica, che rappresenta il segnale di uscita del biosensore, è proporzionale alla concentrazione di glucosio presente in soluzione.

Abbiamo studiato la dipendenza della risposta biochimica ed elettrochimica dalla natura del monomero utilizzato e dal diametro dei pori della membrana.

Per gli aspetti biochimici, il confronto con il comportamento dell'enzima libero ha evidenziato l'effetto stabilizzante sull'enzima dovuto all'immobilizzazione. Sono infatti stati trovati ampi range di temperatura e di pH in cui sia l'attività dell'enzima sia il segnale elettrico si mantengono costanti ed ai valori massimi.

Per quel che riguarda gli aspetti elettrochimici, usando separatamente le sei diverse membrane abbiamo caratterizzato il biosensore in funzione della concentrazione di glucosio misurando le diverse sensibilità ed il range in cui la risposta del sensore è linearmente proporzionale alla concentrazione di glucosio. Per ciascun monomero usato all'aumentare del diametro dei pori si osserva una diminuzione del range lineare ed un aumento della sensibilità. Inoltre le membrane trattate con BMA presentano, a parità di diametro dei pori, range lineari più ampi e sensibilità più basse rispetto alle membrane trattate con GMA.

I risultati indicano che è possibile modulare il range di linearità del biosensore cambiando o il diametro dei pori della membrana o il monomero usato. Una membrana con grande diametro dei pori (3µm) e trattata con il monomero che presenta maggiore idrofobicità (BMA) è equivalente, dal punto di vista della risposta elettrica, ad una membrana con piccolo diametro dei pori (0.2 µm) e trattata con un monomero a minore idrofobicità (GMA).

Le membrane modificate con BMA sono utili per misurare ampi range di glucosio (0-20 mM) anche se la sensibilità è bassa ed il tempo di risposta è grande. Al contrario, membrane modificate con GMA sono utili per misurare piccole concentrazioni di glucosio (fino a 5mM) ma offrono una grande sensibilità e piccoli tempi di risposta.

Tutte le membrane catalitiche realizzate sono utilizzabili per la misurazione della concentrazione di glucosio nel sangue

MICROFABBRICAZIONE DI STRUTTURE POLIMERICHE FRATTALICHE PER LA MORFOGENESI CAPILLARE: APPLICAZIONI NELL'ANGIOGENESI TERAPEUTICA E NELL'INGEGNERIA DEI TESSUTI VASCOLARI.

G.Ciaravella¹, G.Vozzi^{1,3}, F. Bianchi^{1,3}, M. Rosi¹, C. Emanuelli², P. Madeddu², A. Ahluwalia^{1,3}

¹ CENTRO INTERDIPARTIMENTALE DI RICERCA "E.PIAGGIO", UNIVERSITÀ DI PISA, PISA, ² UNITÀ DI MEDICINA CARDIOVASCOLARE E TERAPIA GENICA, INBB LABORATORIO NAZIONALE, SASSARI,

³ ISTITUTO DI FISIOLOGIA CLINICA CNR, PISA,

Obiettivi:

L'obiettivo di questo studio consiste nell'indagare la possibilità di ricostruire nuove strutture organiche al fine di sostituire tessuti danneggiati o affetti da patologie. A tale scopo sono state combinate tecniche di microfabbricazione e algoritmi frattali per realizzare scaffolds polimerici, in grado di simulare la struttura dei capillari sanguigni. Su tali substrati sono state seminate cellule endoteliali primarie, le quali, al fine di promuovere il processo angiogenico, sono state precedentemente trasfettate con un vettore adenovirale, che porta il gene per la kallikreina umana. Questo tipo di strutture offrono possibili applicazioni nel campo dell'ingegneria dei tessuti vascolari e dell'angiogenesi terapeutica.

E' ormai un fatto comunemente accettato che esiste all'interno di un tessuto biologico una stretta relazione tra struttura e funzione. Per questo motivo, al fine di promuovere la formazione di strutture capillari in tessuti ingegnerizzati o danneggiati, è sicuramente utile creare uno scaffold a geometria predefinita, sul quale le cellule endoteliali siano in grado di organizzarsi in micro-vasi sanguigni.

Quindi l'impiego di substrati microstrutturati, insieme all'utilizzo di un potente promotore angiogenico come la kallikreina, un enzima che induce la produzione di peptici chininici, i quali sono coinvolti nella formazione dei vasi sanguigni, possono rappresentare un nuovo strumento per la riparazione di tessuti danneggiati o per l'ingegnerizzazione di organi e tessuti complessi.

Metodi :

Sebbene appaia disorganizzata, è noto che la struttura ramificata dei vasi sanguigni segue una geometria frattale. Partendo da questo presupposto è stato sviluppato e integrato nel software di un sistema di microfabbricazione, ideato presso il Centro di Ricerca interdipartimentale "E.Piaggio", un algoritmo frattale per costruire strutture simili a quelle dei capillari. Con questa tecnica sono state quindi realizzate strutture arboreiformi, con diverse dimensioni frattali, utilizzando il (polilattide-co-glicolide. Le cellule endoteliali primarie (huvec) sono state trasfettate con un adenovirus (Ad-CMV-cHk), che porta il gene per la kallikreina umana. Le cellule trasfettate vengono lasciate per 48 ore in incubatore, per consentire l'espressione della proteina e successivamente vengono tripsinizzate e seminate sugli scaffolds, opportunamente trattati e sterilizzati.

Gli esperimenti di controllo sono stati condotti sia con huvec trasfettate con un adenovirus (Ad-CMV-Luc) che porta il gene per la luciferasi, sia con cellule endoteliali non trasfettate. La densità cellulare è stata misurata utilizzando la tecnica del "visual counting" e per mezzo di una camera di Burkert. L'attività metabolica delle cellule è stata valutata mediante l'impiego di un MTT assay.

Risultati e discussione.

In primo luogo è stata studiata la relazione tra densità cellulare e agente di trasfezione su scaffolds a struttura arboreiforme, per un periodo di 48 ore. In questo caso il livello di ramificazione del substrato impiegato, che è correlato alla dimensione frattale, è di 4; questo significa che, partendo dal braccio progenitore, ci sono 4 livelli di biforcazione. I risultati ottenuti hanno evidenziato che la densità cellulare è maggiore, quando sugli scaffolds sono state seminate huvec trasfettate con il gene per la kallikreina, poiché è noto che tale enzima è un potente promotore dell'angiogenesi.

A questo punto è stato valutato l'effetto del livello di ramificazione dello scaffold sulla formazione delle strutture capillari in vitro. Dagli esperimenti condotti è possibile dedurre che la densità cellulare aumenta all'aumentare del numero frattale. Inoltre sembra che un maggior livello frattale permetta un maggior grado di organizzazione degli elementi cellulari; in particolare alle estremità dei rami della struttura polimerica le cellule endoteliali appaiono quasi tutte orientate longitudinalmente, rispetto alla ramificazione.

Infine è stato studiato il metabolismo delle huvec sui substrati polimerici, sia in monocultura che in co-cultura con fibroblasti umani primari. I risultati ottenuti mostrano, prima di tutto, che la presenza dello scaffold non altera lo stato metabolico delle cellule, almeno dopo le prime 32 ore dalla semina, rispetto a una normale coltura realizzata su substrati di gelatina. Inoltre la presenza dei fibroblasti determina un incremento dell'attività metabolica rispetto alla monocultura, sia sugli scaffold che nei pozzetti di riferimento ingelatinati.

Conclusioni.

Dai risultati ottenuti è possibile concludere che le microstrutture polimeriche con struttura arboreiforme, che simulano la ramificazione dei vasi sanguigni, possono essere utilizzate come supporto per la realizzazione di strutture capillari in vitro. La densità cellulare e il grado di organizzazione sono maggiori all'aumentare del livello di ramificazione degli scaffolds. Inoltre il potenziale angiogenico delle cellule endoteliali sulle strutture polimeriche viene incrementato dalla trasfezione con il gene per la kallikreina umana.

Quindi questo tipo di approccio può rappresentare un nuovo strumento sia nell'ingegnerizzazione di tessuti vascolari, sia nell'angiogenesi terapeutica, per esempio nella riparazione di un tessuto ischemico.

STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF HEXAFLUOROISOPROPANOL AND ACID DESTABILIZED FORMS OF MYOGLOBIN

M. Casillo*, I. Sirangelo*, C. Malmo*, L. Birolo[^], F. Dal Piaz[^], P. Pucci[^], G. Marino[^] and G. Irace*

*DIPARTIMENTO DI BIOCHIMICA E BIOFISICA, SECONDA UNIVERSITÀ DI NAPOLI, VIA L. DE CRECCHIO 7, 80138 NAPOLI, ITALY

[^]DIPARTIMENTO DI CHIMICA ORGANICA E BIOCHIMICA, UNIVERSITÀ DI NAPOLI "FEDERICO II", COMPLESSO MONTE S. ANGELO, NAPOLI, ITALY

Introduction: Myoglobin is one of the best models for studying the structure of partly folded states. The folding of this protein occurs through compact intermediates detected both in equilibrium and kinetic experiments. At least three different partly folded intermediates, having a different amount of secondary structure, have been detected at low pH in the presence of different anions. Similar results have been obtained examining alcohol induced conformational transitions.

In this communication, we performed a conformational characterization of molten globules of myoglobin obtained under different experimental conditions examining the fluorescence emission of the ANS fluorescent probe bound to the protein and using hydrogen deuterium exchange experiments monitored by mass spectrometry. In particular, we examined: i) myoglobin at pH 4.2 in 4% v/v hexafluoroisopropanol, (HFIP-MG_N); ii) acid unfolded myoglobin at pH 2.0 in 4% v/v hexafluoroisopropanol, (HFIP-MG_U); iii) myoglobin at pH 3.8 in the presence of very low salt concentration, (I-1 state); iiiii) acid unfolded myoglobin at pH 2.0 in 0.2 M NaCl, (A state).

Materials and methods: Horse myoglobin (Sigma) was used after a further purification step performed by fast liquid chromatography using a Superdex 75 column. The fluorescence measurements were performed at equilibrium; the protein concentration was 20 µM. Amide hydrogen exchange experiments and proteolytic digestion of the exchanged protein was combined with mass spectrometric techniques. Mass spectrometry data were obtained and elaborated using the Biomultiviewer (Applied Biosystems) program.

Results: The addition of hexafluoroisopropanol to native myoglobin disrupts the tertiary structure; in fact, the aromatic side chain CD signals in the near UV as well as the visible and near UV absorption bands arising from the interaction of the heme with the protein matrix is completely lost. By the converse, the amount of secondary structure is much less affected, i.e., 80% of secondary structure survives the fluoroalcohol induced conformational transition. The fluorescence emission data of the investigated complexes indicate that the energy transfer via Förster mechanism from tryptophans to ANS is much less efficient in the case of the molten globule state obtained by adding 4% v/v hexafluoroisopropanol to native myoglobin, i.e., HFIP-MG_N state. The transfer efficiency is related to distance between the two fluorophores and to the mutual orientation between the emission dipole of the donor and the excitation dipole of the acceptor. Thus, an efficiency reduction can be ascribed to an increase of distance or to change in the angle between the two dipole moments. ANS fluorescence polarization measurements suggests that the volume of HFIP-MG_N state is larger than that of the molten states formed by myoglobin under the other experimental conditions and, therefore, supports the hypothesis that the distance between the two fluorophores is increased. To better investigate structural differences in HFIP and acid induced intermediate states, we carried out a conformational characterization on HFIP-MG_N and I-1 by amide hydrogen/deuterium exchange analyzed by ES mass spectrometry. The results indicate that the intermediate states undergo isotopic exchange with a kinetic faster than native apomyoglobin, thus indicating that these species share a less structured conformation. Although both the intermediates exchange, at longer reaction time, approximately the same number of NH, I-1 shows a faster kinetic. This observation suggests that the two states are comparable in terms of overall flexibility, but they possess a sensibly different conformation. Further analysis on proteolytic digested fragments show that, in the I-1 state, the F and G helices are unordered and the N-terminal region possesses an increased flexibility, whereas in the case of HFIP-MG_N the entire protein conformation seems less compact.

In conclusion, the results indicate that the conformational state HFIP-MG_N differs from the other examined states possessing structural features much more typical of the so-called molten globule state, i.e., a native-like secondary structure and a fluctuating tertiary organization.

MYOGLOBIN MISFOLDING AND AGGREGATION INDUCED BY AMMINOACID SUBSTITUTIONS

Clorinda Malmo, Ivana Sirangelo, Mariateresa Casillo & Gaetano Irace

DIPARTIMENTO DI BIOCHIMICA E BIOFISICA "F. CEDRANGOLO" SECONDA UNIVERSITA' DI NAPOLI - VIA L. DE CRECCHIO 7 80138 NAPOLI, ITALY

Sperm whale myoglobin is an alfa-helical globular protein that has been widely used as a model system for studying protein folding and structure-function relationships in heme proteins. The folding pathway of myoglobin occurs through an intermediate, partly-structured state in which only the A, G and H helices are folded and stabilized as in the native state. Recently, an increasing attention has been devoted to the intermediate states for their implication in the protein aggregation from which amyloid formation develops. Protein aggregation is today considered as a process acting in competition with the normal folding pathway. The native protein and the amyloid aggregates can be seen as originating from a common population of partially folded, interconverting molecules.

In this communication, we present data on a variant myoglobin in which the two conserved tryptophanyl residues have been substituted. The replacement of both indole residues with phenylalanine residues results in the expression of an instable protein unable to bind the prosthetic group. Molecular dynamic simulation data indicates that the simultaneous replacement of tryptophanyl residues introduces distortions in the compact AGH subdomain of the intermediate partly folded state, which influence the subsequent steps of the folding pathway.

The far ultraviolet circular dichroism spectra obtained on the purified form of the mutated protein show that the polypeptide chain is in a beta-sheet conformation under experimental conditions in which the wild type protein is fully alpha-helical folded. Moreover, this protein showed an increased aggregation propensity which resulted in the formation of precipitates. This result, together with Congo red binding assay and birifragence test, indicates that the protein mutant undergoes an aggregation process similar to that causing the formation of disease-related amyloid fibrils. Moreover, the mutated protein is able to bind the specific dye thioflavine T that is typical of ordered protein aggregates. Thus, amyloid formation does not appear to be restricted to a small number of protein sequences but rather it is a property common to many, if not all, polypeptide chains.

In conclusion, the results provide strong evidence that protein aggregation and amyloid diseases result when normal protein folding goes awry, allowing incompletely folded protein molecule to associate each other forming insoluble fibril aggregates.

LA PROTEINA PCF DEL FITOPATOGENO OOMICETE *P. CACTORUM* : IPERESPRESSIONE IN *P. PASTORIS* ED ATTIVITÀ ELICITANTE DELLA RISPOSTA DI DIFESA IN PLANTA

G. Orsomando, M. Lorenzi, E. Ferrari^a, C. de Chiara^a, A. Spisni^a and S. Ruggieri

DIPARTIMENTO DI BIOTECNOLOGIE AGRARIE ED AMBIENTALI, UNIVERSITÀ DI ANCONA, ANCONA, ITALY

^aDIPARTIMENTO DI MEDICINA SPERIMENTALE, SEZIONE CHIMICA E STRUTTURISTICA BIOCHIMICA, UNIVERSITÀ DI PARMA, PARMA, ITALY

Obiettivi. Il presente studio si inquadra in un progetto volto allo sviluppo di strategie biotecnologiche a basso impatto chimico per la difesa contro i fitopatogeni delle piante, per la diminuzione della contaminazione da pesticidi dell'ambiente e degli alimenti di origine vegetale. Tra le "proteine di avirulenza" (AVR), prodotto genico dei geni di avirulenza (*avr*) dei patogeni delle piante, isolati sulla base dell'osservazione che alla loro presenza corrisponde il carattere di avirulenza del patogeno nei confronti della pianta ospite, vengono ricomprese anche le elicotine, proteine bifunzionali di 10 kDa di *Phytophthora*, un oomicete fitopatogeno (1), isolate invece sulla base della loro attività di stimolo della risposta di difesa in piante ospiti, e che sono inoltre dotate di attività di trasporto di steroli essenziali, quale attività "intrinseca" nella fisiologia del patogeno. La struttura 3D di tali proteine, e non la sequenza, offre indizi sulla funzione intrinseca e sul meccanismo d'azione. Recentemente in *Phytophthora cactorum* (PC) è stata da noi isolata una nuova proteina di 5,622 kDa, denominata PcF, che non presenta omologie di sequenza con le classi sopradescritte (2). La proteina PcF nativa è tossica su pianta, tuttavia non sono noti il meccanismo biochimico alla base della tossicità né la funzione intrinseca nella fisiologia del patogeno PC. La proteina PcF matura (52 amminoacidi) comprende una prolina-49 idrossilata, 6 cisteine e 3 ponti S-S. La sequenza del cDNA determinata codifica una preproteina di 73aa. In questo studio è stata focalizzata l'attenzione sul biosistema PcF-pomodoro, esaminando la capacità di PcF di indurre *in planta* attività Fenilalanina Ammoniac Liasi (PAL) (EC 4.3.1.5), enzima chiave nella biosintesi di fitoalessine di difesa (3-5). Per studiare la struttura 3D di PcF, al fine di ricavare indizi sul meccanismo di azione e sulla funzione intrinseca, abbiamo espresso la proteina in *P. pastoris*, grazie alla capacità di questo lievito di iperesprimere proteine di secrezione correttamente foldate, e dopo purificazione della proteina eterologa, ne abbiamo esaminato l'omologia funzionale e strutturale con la proteina PcF autentica mediante opportuni biosaggi e studi di CD.

Metodi La iperespressione della proteina PcF è stata condotta nel ceppo *P. pastoris* GS115 (*his*⁻) (6). Per ottenere la secrezione della proteina ricombinante, il frammento codificante per PcF, privo del segnale nativo di secrezione, è stato legato nel vettore pPIC9, nel sito EcoRI, downstream al segnale di secrezione α -mating factor di *S. cerevisiae*. La cassetta di espressione di PcF nel vettore risultante veniva quindi integrata mediante elettroporazione nel genoma di *Pichia* nel locus *AOXI*, permettendo così l'espressione per induzione con metanolo nel mezzo di coltura. La proteina eterologa secreta veniva purificata ad omogeneità direttamente dal mezzo di coltura, mediante un singolo step cromatografico su C18 HPLC (gradiente TFA/acetonitrile). Per esaminare l'attività biologica, piantine di pomodoro venivano trattate con la proteina PcF autentica o PcF ricombinante, e successivamente negli omogenati (estratti grezzi) delle piantine veniva saggiata l'attività PAL indotta a differenti tempi di trattamento. Veniva inoltre registrato lo spettro CD delle due proteine.

Risultati La strategia di iperespressione fornisce 150 mg di proteina ricombinante biologicamente attiva per litro di coltura: tale resa è mille volte superiore rispetto a quella ottenibile da *P. cactorum*. Nonostante la presenza di 4 residui N-terminali addizionali (YVEF..) e l'assenza di idrossilazione della prolina-49, lo spettro CD è interamente sovrapponibile a quello della proteina PcF autentica, dimostrando un corretto folding. Inoltre, il saggio dell'attività PAL rivela che la proteina ricombinante è in grado di indurre lo stesso livello di attivazione dell'enzima PAL rispetto alla proteina PcF autentica, con lo stesso time course. Il time course rivela altresì che l'attivazione precede largamente la comparsa dei sintomi morfologici di tossicità. Questo comportamento costituisce il primo indizio sulla cascata di trasduzione elicitata da PcF *in planta*.

Conclusioni La proteina PcF si comporta in pianta come un elicitore, inducendo il metabolismo di difesa, come la proteina ricombinante, denominata N4-rPcF per denotare la presenza dei quattro residui aggiuntivi N-terminali. I risultati dimostrano che N4-rPcF è strutturalmente e funzionalmente indistinguibile dalla PcF autentica e pertanto appare utilizzabile, in sostituzione di questa, per la risoluzione della struttura 3D e per ulteriori indagini funzionali, in corso nel nostro laboratorio.

1. Ponchet M. et al. (1999) *Cell. Mol. Life Sci.* 56, 1020-1047.
2. Orsomando G. et al. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 21578-21584.
3. Dorey S. et al. (1999) *Plant Physiol.* 121, 163-171.
4. Sasabe M. et al. (2000) *Eur. J. Biochem.* 267, 5005-5013
5. Yang K.Y. et al. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 741-746.
6. *Pichia* Expression Manual (Invitrogen).

ATTIVAZIONE DELLA VIA DI TRASDUZIONE DEL SEGNALE PI3-K INDOTTA DAL PDGF NELLA PROLIFERAZIONE DEI GLIOMI

Torrisi L.¹, Dell'Albani P.², and Giuffrida Stella A.M.¹

¹DiP. DI SCIENZE CHIMICHE, SEZIONE DI BIOCHIMICA E BIOLOGIA MOLECOLARE, UNIVERSITÀ DI CATANIA, VIALE A.DORIA 6, 95125 CATANIA

²IST. DI SCIENZE NEUROLOGICHE – SEZIONE DI CATANIA DEL CNR(ISN-CNR), V.LE R. MARGHERITA 6, CATANIA.

I gliomi, tumori del Sistema Nervoso Centrale (SNC), hanno la tendenza ad infiltrarsi nel tessuto circostante data la loro caratteristica peculiare di una notevole proliferazione cellulare. I meccanismi attraverso cui le cellule gliali vanno verso la proliferazione piuttosto che verso la morte cellulare non sono ancora stati completamente chiariti. Il "Platelet Derived Growth Factor" (PDGF) è uno dei fattori di crescita che modula la proliferazione, la migrazione, il differenziamento e la sopravvivenza cellulare (Richardson et al. 1988, Dell'Albani et al. 1998). Il PDGF ed i suoi recettori (PDGFR- α , - β) sono frequentemente co-espressi nei gliomi umani ed in linee cellulari dei gliomi umani; inoltre una sovra-espressione dei recettori di tipo α è stata osservata nei gliomi umani ad alto grado di malignità. Attualmente non è ancora noto se esiste un legame tra la sovra-espressione dei recettori del PDGF e la proliferazione tumorale. Il PDGF attiva la via di trasduzione del segnale mediata dall'enzima fosfatidilinositolo 3-chinasi (PI3-K) e del suo bersaglio a valle la proteina Akt, una serina-treonina chinasi. L'attivazione della PI3-K/Akt culmina nella fosforilazione di una proteina della famiglia BCL-2, denominata BAD, promuovendo così la sopravvivenza cellulare. (Datta et al. 1997). Nella presente ricerca abbiamo analizzato in due differenti linee cellulari, C6 e 9L, rispettivamente di glioma e di glioblastoma di ratto, trattate con il PDGF-AA, l'attivazione della via di trasduzione del segnale PI3-K. Inoltre, per valutare la sopravvivenza e la proliferazione cellulare indotta dal PDGF, le cellule sono state pre-trattate con LY294002, uno specifico inibitore della PI3-K (Vlahos et al. 1994) e/o trattate con il PDGF.

Materiali e metodi

Le cellule C6 (glioma di ratto) e le 9L (glioblastoma di ratto) sono state mantenute in coltura con RPMI 1640 (GIBCO) e 10% di siero fetale bovino (FBS), a 37 °C in ambiente di aria umidificata e CO₂ (5%). Le cellule, raggiunta la confluenza per l'80%, sono state pretrattate con 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002) 50 μ M, uno specifico inibitore della PI3-K e/o trattate con PDGF-AA 20 ng/ml per tempi diversi (5, 15, 30, 60, 90 e 120 minuti). 80 μ g di proteine sono state caricate su SDS-PAGE al 7.5% ed analizzate con i seguenti anticorpi primari: PDGFR- α policlonale (Santa Cruz), phosho-Akt (Ser 473) policlonale (Cell Signaling NEB). La proliferazione e/o sopravvivenza cellulare a diversi giorni in vitro (DIV) è stata studiata mediante la metodica descritta da Mosmann (1983).

Risultati

L'analisi dei livelli di espressione del recettore per il PDGF di tipo α ha evidenziato un aumento di circa 7 volte nelle C6 e di circa 3 volte nelle 9L rispetto al livello osservato nelle colture primarie astrogliali di ratto. Il trattamento con PDGF ha determinato un aumento nel livello di fosforilazione della proteina Akt rispettivamente a 60 min per le C6 (pari a 4,5 volte rispetto al controllo), ed a 5 min per le 9L (pari a 4 volte rispetto al controllo). Il pretrattamento con LY294002 ha determinato una riduzione di circa 60-80% dei livelli di Akt fosforilata nelle C6 e del 250% nelle 9L. Inoltre il trattamento con PDGF ha determinato un aumento significativo della proliferazione cellulare per entrambe le linee, mentre il trattamento con LY294002 ha ridotto significativamente la sopravvivenza cellulare del 50-70% nelle due linee. Il pretrattamento con LY294002 seguito dal trattamento con PDGF ha determinato un aumento della sopravvivenza cellulare di circa il 20-35% nelle C6 e dell'80% nelle 9L rispetto ai campioni nei quali era stato fatto solo il pretrattamento.

Conclusioni

I risultati ottenuti nella presente ricerca dimostrano che il PDGF è un importante fattore per la sopravvivenza e la proliferazione cellulare. L'attivazione della PI3-K dipendente dal PDGF-AA nelle cellule C6 e nelle 9L è stata evidenziata dalla fosforilazione della proteina Akt sulla Serina 473. L'effetto inibitorio del LY294002 ha causato una riduzione della sopravvivenza/proliferazione cellulare. I nostri risultati dimostrano una possibile correlazione tra la sovraespressione del recettore di tipo α del PDGF in cellule tumorali ed il mantenimento della sopravvivenza cellulare. La sovraespressione del recettore α potrebbe essere uno dei meccanismi che le cellule tumorali utilizzano per sfuggire alla morte cellulare. L'identificazione di proteine chiave coinvolte nella sopravvivenza e/o proliferazione cellulare potrebbe avere un importante ruolo per l'attuazione di possibili strategie terapeutiche.

Ringraziamenti:

Le ricerche sono state eseguite con il finanziamento del MIUR Cluster 04 Biomedicina

Referenze

1. Datta S.R., et al.(1997) Cell 91:231-241.
2. Dell'Albani P et al.(1998) J. of Neuroscience Research 54:191-205.
3. Mosmann T. (1983). J. of Immunol. Meth., 65: 55-63
4. Richardson W.D., et al (1988). Cell 53: 309-319.
5. Vlahos C.J. et al. J. Biol. Chem. 269 (7): 5241-5248.

SISTEMI ENDORFINICI E CARDIOMIOGENESI

Carlo Ventura, Yolande Asara, Francesco Galimi, Margherita Maioli

UNITÀ DI RICERCA DELL'ISTITUTO NAZIONALE BIOSTRUTTURE E BIOSISTEMI. DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMEDICHE, UNIVERSITÀ DI SASSARI, 07100 SASSARI

Lo sviluppo del cuore rappresenta uno dei primi eventi morfogenetici che si verificano nell'embrione ed è un processo complesso comprendente la proliferazione e il differenziamento cellulare nonché l'organizzazione del tessuto in una specifica architettura. La recente identificazione di cellule staminali a livello cardiaco e la disponibilità di linee di cellule staminali embrionali totipotenti consentono un approccio molecolare allo studio della cardiogenesi e aprono nuove prospettive terapeutiche nella riparazione del danno miocardico. In un lavoro precedente abbiamo dimostrato che il gene della prodinorfina ed il suo prodotto peptidico biologicamente attivo, la dinorfina B, agonista naturale dei recettori κ per gli oppioidi erano in grado di orchestrare il processo di cardiogenesi in cellule P19, linea murina di cellule embrionali. L'effetto cardiogenico del peptide oppioide era associato all'espressione dei geni GATA-4 ed Nkx-2.5, codificanti per un fattore di trascrizione contenente "zinc fingers", e per un "homeodomain protein" rispettivamente. Questi fattori di trascrizione si sono dimostrati essenziali durante il processo di cardiogenesi in diverse specie animali, compreso l'uomo. Sono al momento sconosciuti i meccanismi di trasduzione del segnale attivati dal sistema endorfinergico durante il processo di cardiogenesi in cellule P19.

Nel presente studio abbiamo voluto valutare se l'espressione del gene della prodinorfina potesse essere connessa al processo di differenziamento cardiaco di cellule R1. Tali cellule sono una linea murina di cellule staminali totipotenti, in grado di dare origine ad un topo fertile e normale. Rappresentano quindi un valido modello per lo studio della cardiogenesi in vitro. In particolare per i nostri scopi abbiamo utilizzato le cellule GTR1, linea di cellule staminali totipotenti, contenenti un transgene in cui il promotore per "alpha-myosin heavy chain" (MHC) guida l'espressione di una proteina in grado di conferire resistenza alla puomicina. Questa strategia consente di selezionare una popolazione pura di elementi cellulari orientati verso la cardiogenesi. Tali cellule, coltivate in un medium opportuno sono in grado di dare luogo a corpi embrioidi dotati di attività contrattile spontanea.

Nel presente lavoro mediante una sensibile tecnica di "RNase protection" è stato osservato che il differenziamento miocardico delle GTR1 era associato alla sovraespressione del gene della prodinorfina. E' emerso inoltre un aumento della sintesi e secrezione della dinorfina B, suo prodotto peptidico biologicamente attivo. A tali eventi molecolari era associata l'induzione dell'espressione di GATA-4 ed Nkx-2.5, geni codificanti per due fattori di trascrizione essenziali per la cardiogenesi. L'orientamento verso il fenotipo miocardico era in parte mediato dalla capacità della dinorfina B secreta di agire in maniera autocrina su specifici recettori per gli oppioidi identificati sulla superficie cellulare mediante saggio di "binding". Tecniche di microscopia confocale hanno consentito di rilevare la presenza di dinorfina B a livello perinucleare, suggerendo che il peptide potrebbe aver agito anche a livello intracellulare. Tale ipotesi è stata confermata dalla capacità della dinorfina B di indurre la trascrizione dei geni GATA-4 ed Nkx-2.5 quando somministrata direttamente a nuclei isolati da cellule GTR1 indifferenziate. In tali cellule esperimenti successivi hanno poi permesso di identificare la presenza di specifici recettori per gli oppioidi, sia a livello della membrana plasmatica, che a livello nucleare. E' stato inoltre identificato un incremento significativo nei valori di Bmax sia della frazione della membrana plasmatica, che in quella nucleare, ottenute da cellule GTR1 che andavano incontro a differenziamento miocardico. La capacità della dinorfina di indurre il processo di cardiogenesi in cellule GTR1 era inoltre associata alla redistribuzione di diversi isoenzimi della protein chinasi C (PKC) nell'ambito di diversi compartimenti subcellulari, e ad un aumento dell'attività della PKC a livello nucleare.

Diventa oramai sempre più evidente la possibilità di utilizzare cellule embrionali staminali, opportunamente differenziate in vitro, come fonte di nuove cellule dotate di attività contrattile per il trapianto nel miocardio.

In questo contesto assume una notevole importanza l'identificazione di geni che possono essere manipolati per controllare l'espressione di fattori di trascrizione responsabili dell'orientamento di cellule pluripotenti verso il fenotipo miocardico.

Nel presente lavoro per la prima volta si prospetta la possibilità di modulare l'espressione di un gene delle endorfine per controllare il differenziamento miocardico in vitro di una linea di cellule staminali e si offrono evidenze circa il coinvolgimento di un sistema endorfinergico nucleare per l'induzione di un programma genico di cardiogenesi.

CONJUGATED POLYMER'S MONOLAYERS ENGINEERING: A NEW ROUTE TOWARD NANO ELECTRONIC.

Narizzano Riccardo¹, Erokhin Victor² and Nicolini Claudio^{1,2}.

¹ DEPARTMENT OF BIOPHYSICAL M & O SCIENCES AND TECHNOLOGIES, UNIVERSITY OF GENOA, CORSO EUROPA 30, 16132 GENOA, ITALY

² POLO NAZIONALE DI BIOELETTRONICA, CORSO EUROPA N. 30 16132 GENOVA

Molecular structure and organization play important roles in electrical and optical properties of conjugated polymers. For this purpose Langmuir technique is the most suitable methods, as it allows to control film thickness and molecular organization [1]. Polythiophenes (PTs) usually do not form stable monolayers at the air-water interface because they are not sufficiently amphiphilic. Recently, an amphiphilic PT was synthesized via McCullough method in order to obtain a stable monolayer at the air-water interface [2]. Our approach is to synthesize an amphiphilic PT using a simple chemical oxidative polymerization of 3-acetic acid thiophene and 3-hexylthiophene monomers. The amphiphilic nature of the polymer allows it to assemble in solution and at the air-water interface forming a densely packed monolayer with highly ordered domains, obtaining electronic properties comparable to the regioregular PTs. The final structure of copolymer was determined by NMR and FTIR spectroscopies. The film formation was followed by pressure-area isotherm and the film morphology on different solid substrates, is investigated by Brewster Angle and fluorescence microscopies. The electronic properties of the polymer are studied by UV-vis spectroscopy and electrochemical techniques. The 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.

Literature:

- [1] A. Ulman, An introduction to ultrathin organic films from Langmuir –Blodgett to self assembly, 1st ed., Academic press, Boston, 1991
- [2] 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

PROTEINA BASICA DELLA MIELINA: RITORNO A CASA

P. Riccio¹, A. Fasano², E. Polverini³, A. Relini⁴, G. Carlone², G.M.Liuzzi², R. Ranieri⁴, S. Gliozzi⁴, P. Cavatorta³

¹DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA D.B.A.F., UNIVERSITA' DELLA BASILICATA, CAMPUS MACCHIA ROMANA, 85100 POTENZA;

²DIPARTIMENTO DI BIOCHIMICA E BIOLOGIA MOLECOLARE, UNIVERSITA' DI BARI, VIA ORABONA 4, 70126 BARI;

³DIPARTIMENTO DI FISICA & INFN, UNIVERSITA' DI PARMA;

⁴DIPARTIMENTO DI FISICA & INFN, UNIVERSITA' DI GENOVA.

Introduzione

Lo studio della struttura delle membrane biologiche richiede l'uso di tecniche e di procedimenti che modifichino il meno possibile l'ambiente originario. Per una conoscenza approfondita della loro struttura, le proteine devono essere estratte e purificate utilizzando detergenti non denaturanti. Ma anche il detergente meno denaturante può influire sulla conformazione delle proteine. Quindi per conoscere la struttura nativa delle proteine di membrana, il detergente dovrà essere allontanato e la proteina dovrà essere incorporata in liposomi costituiti dai lipidi originari della membrana. Noi abbiamo applicato questo principio alla proteina basica della mielina (MBP), una piccola proteina cationica che ha probabilmente un ruolo importante nella formazione e nella compattazione della mielina ed è uno dei possibili autoantigeni nella sclerosi multipla. La mielina è una membrana interessante per la sua struttura multilamellare, per l'elevata presenza di lipidi, e per l'esistenza di specifiche malattie demielinizzanti. La struttura delle principali proteine mieliniche, fra cui la MBP, non è ancora nota. Questo può essere dovuto al fatto che i procedimenti di purificazione attualmente utilizzati prevedono l'uso di solventi organici, acidi forti e agenti caotropici come l'urea: La MBP così purificata ha una struttura generalmente aperta e sembra essere denaturata.(1). Nel 1984 noi abbiamo trovato un nuovo procedimento per l'estrazione e la purificazione della MBP nella forma "lipid-bound", associata a tutti i lipidi della mielina (2-4). E' probabile che la "lipid-bound" MBP sia in una forma vicina a quella nativa, perché più strutturata e più compatta della MBP "lipid-free". Nel presente studio dimostriamo che è possibile la sostituzione del detergente con liposomi costituiti dai lipidi mielinici e riavere la MBP nel suo ambiente originario.

Risultati

La MBP è stata estratta dalla mielina ottenuta dal cervello bovino utilizzando il detergente zwitterionico CHAPS e quindi purificata come descritto in precedenza mediante cromatografia negativa su idrossiapatite (4). La cromatografia su strato sottile mostrava la presenza di tutti i lipidi mielinici nel complesso MBP-CHAPS, ma in proporzioni diverse che nella membrana. La "lipid-bound" MBP purificata veniva mescolata con liposomi di acido L-alfa-dimiristoilfosfatidico (DMPA) e dializzata per 16-20 ore a temperatura ambiente verso acqua deionizzata. La dialisi permetteva la rimozione del detergente e l'incorporazione della MBP nei liposomi con tutti i suoi lipidi. Indipendentemente, dalla sequenza e dalla modalità delle aggiunte (p.es. aggiunta di DMPA in polvere o in forma di liposomi alla MBP liofilizzata o alla MBP in soluzione) la resa era di circa il 33% di MBP incorporata. Studi di dicroismo circolare indicavano un ulteriore aumento di struttura secondaria della "lipid-bound MBP, dopo la rimozione del detergente e l'incorporazione nei liposomi. Successivamente, la MBP veniva reincorporata con successo in liposomi costituiti dai lipidi estratti dalla membrana mielinica. Nel suo microambiente originario, la MBP sembrava essere più stabile che nel detergente. Studi di microscopia elettronica hanno dimostrato che in presenza di zinco o di zinco e fosfato, la MBP ricostituita nella sua membrana nativa, è in grado di formare rispettivamente strutture multilamellari o globulari.

Conclusioni

Studi di ricostituzione di proteine purificate in membrane artificiali simili a quello presentato in questo lavoro sono stati effettuati molto spesso per riottenere l'attività di enzimi di membrana, come le translocasi. Tuttavia, è la prima volta che si dimostra che una proteina estratta dalla membrana con il suo microambiente lipidico attraverso una scelta accurata del detergente e della concentrazione di quest'ultimo, può rilasciare il detergente e conservare il legame ai lipidi ricostituendosi in una membrana artificiale. Una volta reincorporata nei liposomi la proteina purificata dovrebbe essere nella forma la più vicina possibile alla sua forma nativa e la sua struttura può essere determinata. Per quanto riguarda la MBP e la guaina mielinica, questo protocollo rappresenta un metodo promettente per lo studio della struttura delle proteine mieliniche, per lo studio delle interazioni proteina-proteina, e per lo studio della vulnerabilità della guaina mielinica a fattori mielinotossici.

Riferimenti

1. Polverini E et al. (1999) *Eur. Biophysics J.* **28**, 351-355.
2. Riccio P et al. (1984) *FEBS Lett.* **177**, 236-240.
3. Riccio P. and Quagliariello E. (1993) *J. Neurochem.* **61**, 787-788.
4. Riccio P et al. (1994) *NeuroReport* **5**, 689-692.

STUDIO DI ALCUNI ASPETTI DELL'ATTIVITA' ANTIOSSIDANTE DELLE ANTOCIANINE MEDIANTE METODICHE COMPUTAZIONALI

Michele Lunelli^{a)}, Monica Rossetto^{b)}, Paola Vanzani^{b)}, Adelio Rigo^{b)}, Marina Scarpa^{a)}

^{a)}DIPARTIMENTO DI FISICA, VIA SOMMARIE 14, 38050 POVO-TRENTO, ^{b)}DIPARTIMENTO DI CHIMICA BIOLOGICA, VIA G. COLOMBO 3, 35121 PADOVA

Obiettivi:

Esperimenti condotti nei nostri laboratori hanno permesso di ottenere dati molto attendibili relativamente all'efficienza dei polifenoli nel controllo dei fenomeni di perossidazione. Inoltre è stato possibile evidenziare che, all'interno della famiglia delle antocianine, composti molto simili presentano meccanismi diversi di cattura dei radicali perossidici e successivo trasferimento dell'elettrone.

L'obiettivo del nostro lavoro è di comprendere gli effetti delle variazioni strutturali sulla formazione e reattività dei radicali nel caso delle antocianine.

Metodi:

Sono state usate metodiche computazionali per:

- ottimizzare la geometria degli antiossidanti di partenza (composti genitori) e dei loro prodotti radicalici. In questo modo sono stati individuati i conformeri che si trovano a un minimo di energia.
- Calcolare i calori di formazioni dei conformeri più stabili
- Calcolare le distribuzioni di spin nei conformeri più stabili dei radicali

Per i calcoli sono state utilizzate metodiche semiempiriche (AM1) e basate sulla Density Functional Theory (B3LYP/6-31G(d)).

Risultati:

Risultati preliminari mostrano che le distribuzioni di spin dei radicali delle antocianine presentano notevoli differenze. In particolare sono individuabili due sottoclassi di antocianine. Le differenze in termini di densità di spin tra le due sottoclassi sono ben correlabili ai diversi meccanismi antiossidanti osservati sperimentalmente.

Conclusioni:

I nostri risultati, anche se preliminari, indicano la possibilità di trovare una correlazione tra la struttura (e i parametri dipendenti dalla struttura, quali la densità di spin) e l'attività antiossidante dei polifenoli.

PHOTOTOXIC EFFECT OF SOME PHOTSENSITIZERS ON NATURAL AND ARTIFICIAL MEMBRANES: DEPENDENCE ON PHOSPHOLIPID COMPOSITION.

Cambria A., Ragusa S., Cambria M.T., Catalfo, A., and De Guidi, G.

DEPARTMENT OF CHEMICAL SCIENCES, UNIVERSITY OF CATANIA, V.LE A. DORIA 6, 95125 CATANIA, ITALY

Introduction

In previous works we have studied the molecular mechanism of photohemolysis induced by some non-steroidal anti-inflammatory drug (Naproxen, NAP, Ketoprofen, KPF, Diflunisal, DFN) on red blood cell suspensions irradiated by UV-A rays. The results obtained suggest that, in the process of photosensitized hemolysis, photodegradation products, free radicals and superoxide anion, are involved (1-3). The purpose of the present work is to investigate the photohemolytic process using red blood cells of various mammalian species, having a different membrane phospholipid composition. Moreover, the phototoxic effect is assayed on liposomes with different phospholipids ratio.

Methods

Irradiation was performed with a Rayonet Photochemical reactor equipped with 2-8 "black light" lamps emitting in the 310-390 nm range. Red blood cells were prepared by washing a sample of erythrocytes with phosphate buffered saline (pH 7.4). Cells were re-suspended in the drug solution and the hemolysis rate was determined by measuring the decrease in absorbance at 650 nm, which is linearly proportional to the number of intact cells. Unilamellar liposomes were prepared with the solvent injection method by adding aliquots of phospholipid solution in absolute ethanol in the buffer solution containing glucose-6-phosphate. The formed vesicles were separated from entrapped marker *via* elution in a column of Dowex 50W. The lysis of liposomes was measured by efflux of the trapped marker, which was determined spectrophotometrically at 340 nm after addition of glucose-6-phosphate dehydrogenase and NADP.

Results

Photohemolysis induced by sensitizers in red blood cells of various mammalian species is quite different. Horse and dog show the high photohemolysis damage, while cow, sheep and goat are more resistant. Man, pig and cat have an intermediate behaviour. The greater effect is obtained by DFN. Comparing the percent of photohemolysis with phospholipids composition of erythrocyte membrane, it can be observed that the mammalian species as sheep, cow and goat, having the higher content of sphingomyelin (about 50 %), are more resistant to hemolysis. Phosphatidyl choline was not found in erythrocyte membranes of these species but represented almost 50 % of the phospholipid of red blood cells from rats and dogs, which show the greater extent of photohemolysis. Therefore, it can be suggested a structure-function relationship of erythrocyte membranes phospholipid composition and the photohemolytic process induced by sensitizers. The higher content of sphingomyelin, its asymmetric disposition at outer surface of membranes bilayers, the high level of saturated acyl fatty chains, the presence of trans double bond in the hydrophilic region, greatly decrease the fluidity of bilayers and could enhance the resistance of membrane to phototoxic damage.

This hypothesis is strongly supported by experiments carried out with unilamellar liposomes. The resistance of these models to the release of entrapped glucose 6-phosphate photoinduced by sensitising drugs is directly correlated to the sphingomyelin content. Moreover, a comparison among the different photosensitising activity of two different drugs, DFN and NAP, towards either RBC and liposomes in aerobic and anaerobic conditions provides useful information about the correlation among the photochemistry of the two drugs and their photosensitising action. Some considerations about the role of the protein and the lipid target are proposed.

Experiments are in progress to examine the effect on photohemolysis of selectively changing the phospholipid content in red blood cells of various animal species, previously incubated with liposome suspension enriched with specific phospholipids.

References

1. Costanzo L. L., De Guidi G., Condorelli G., Cambria A., Famà M. (1989) *Photochem. Photobiol.*, 50, 359-365.
2. L.L.Costanzo, G.De Guidi, G.Condorelli, A.Cambria and M.Famà, *Photochem. Photobiol.* 50 (1989) 359-365.
3. G.De Guidi, R.Chillemi, S.Giuffrida, G.Condorelli and M.Cambria Famà, *J.Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 10 (1991), 221-237.

POTENTIAL OF THE HYDROPHOBIC SIMILARITY INDEX IN DRUG DESIGN: MAPPING THE BINDING OF 5,6-DIPHENYLPYRIDAZINONE ACYL-COA:CHOLESTEROL O-ACYL TRANSFERASE (ACAT) INHIBITORS.

Jordi Muñoz^a, F. Javier Luque^a, Glen E. Kellogg^b, Daniela Barlocco^c, Rosa Poidomani^d and Salvatore Guccione^{d*}

^aDEPARTAMENT DE FÍSICOQUÍMICA, FACULTAT DE FARMÀCIA, UNIVERSITAT DE BARCELONA, AV. DIAGONAL S/N, S-08028, BARCELONA, SPAIN; ^bDEPARTMENT OF MEDICINAL CHEMISTRY & INSTITUTE FOR STRUCTURAL BIOLOGY AND DRUG DISCOVERY, VIRGINIA COMMONWEALTH UNIVERSITY, RICHMOND, VA 23298-0540, USA; ^cISTITUTO DI CHIMICA FARMACEUTICA E TOSSICOLOGICA, VIALE ABRUZZI, 42, I-20131, MILANO, ITALY ^dDIPARTIMENTO DI SCIENZE FARMACEUTICHE, UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA, V.LE. A. DORIA 6, ED.2, CITTÀ UNIVERSITARIA, I-95125, CATANIA, ITALY.

Hypercholesterolemia is now well known as a major risk factor for the development or exacerbation of atherosclerosis, and the therapeutic reduction of the serum cholesterol levels has been proven to be an effective treatment for atherosclerotic disease. Acyl-CoA:cholesterol O-acyltransferase (ACAT) is an intracellular enzyme that plays an important role in the absorption of dietary cholesterol, the secretion of hepatic very low density lipoprotein (VLDL), and the accumulation of cholesteryl esters in arterial lesions. Much of the cholesterol absorbed by intestinal mucosal cells is esterified by acyl-CoA: cholesterol acyltransferase (ACAT) prior to its incorporation and secretion into the bloodstream¹⁻³. Recently, the sequence of a second form of ACAT (termed ACAT 2) has been reported. Type 2 ACAT seems to complement the widely distributed type 1 ACAT by providing cholesteryl esters for lipoprotein secretion from hepatocytes and intestinal mucosa⁴.

In addition to the role of cholesterol ester in cholesterol absorption, the deposition of cholesterol ester in the arterial wall is believed to be an important process in the development of atherosclerosis. Much of the accumulation is in lipid rich macrophages (foam cells) formed through increased ACAT esterification in infiltrating macrophages. The identification of new therapeutic targets and new lipid modifying agents will expand treatment options^{5,6}.

Elucidation of the details of the structure and catalytic mechanism of ACAT and of the regulation of its activity have been thwarted by the difficulty in isolating, purifying and preparing crystals for x-ray diffraction of an active form of this multi-helix transmembrane enzyme. In fact, even the development of a consistent 3D-QSAR is difficult due to the lack of structural guidance. Thus, the rational design of inhibitors has been heretofore nearly impossible. Inhibitors of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase (ACAT) might work against atherosclerosis in three different ways: inhibiting cholesteryl ester accumulation in arterial walls may be a direct antiatherosclerotic effect, while inhibiting cholesteryl absorption in the intestines and accelerating cholesterol excretion by the liver may also reduce blood pressure cholesterol levels¹⁻⁶.

We will report progress to date on our current research to combine the information from a variety of 3D-QSAR methodologies to derive 3D models of the active site⁷ and to analyze the binding of a set of diphenylpyridazinones (a new *chemotype* of ACAT inhibitor with promising properties)⁸. In particular, the potential application of the hydrophobic similarity index in drug design has been examined⁹. Fractional contributions to the octanol/water partition coefficient were derived from MST/AM1 calculations in 1-octanol and water, and were subsequently used to maximize similarity of compounds based on their hydrophobic/hydrophilic distribution¹⁰. The results are used to explain qualitatively the differences in activity of the compounds included in the diphenylpyridazinones series⁸.

The obtained alignment has been tested for 3D-QSAR such as CoMFA (Comparative Molecular Field Analysis.)^{11,12} and HASL (Hypothetical Active Site Lattice)^{13,14}.

References

- 1) Buhman K.K., Chen H.C., and Farese R.V., Jr., (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 40369-40372 and references therein.
- 2) Wu, J., Doshi R. and Rodriguez A., (2001) *Curr. Med. Chem.* 1, 141-150 and references therein.
- 3) Maduskuie T.P., Jr., Wilde R.G., Billheimer J.T., Cromley D.A., Germain S., Gillies, P.J. Higley, C.A., Johnson A.L., Pennex P., Shimshick E.J., and Wexler R.R., (1995) *J. Med. Chem.* 38, 1067-1083 and references therein.
- 4) Anderson R.A., Joyces C., Davis M., Reagan, J.W., Clark M., Shelness G.S., Rudel L.L., (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 26747-26754.
- 5) Badimon J.J., Fuster V., Chesebro J.H., Badimon L., (1993) *Circulation* 87 (suppl. II), 3-16.
- 6) Sliskovic D.R., White A.D., (1991) *Trends Pharmacol. Sci* 12, 194-199.
- 7) Burnett J.C., Kellogg G.E., Abraham D.J., (2000) *Biochemistry* 39, 1622-1633 and references therein.
- 8) Giovannoni M.P., Dal Piaz V., Kwon B.M., Kim M.K., Kim Y.K., Toma L., Barlocco D., Bernini F., Canavesi M., (2001) *J. Med. Chem.* 44, 4292-4295.
- 9) Muñoz J., Barril X., Hernandez B., Orozco M., Luque F.J., (2002) *J. Comput. Chem.* 24, 554-563.
- 10) Curutchet C., Orozco M., Luque F.J., (2001) *J. Comput. Chem* 22, 1180-1193.
- 11) Cramer III R. D., Patterson D. E., Bunce J. D., (1988) *J. Am. Chem Soc.* 110, 5959-5967.
- 12) SYBYL Molecular Modelling Software version 6.8, Tripos Inc., 1699 S-Hanley Rd, Suite 303, St.Louis, MO 63144-2913, USA.
- 13) Guccione S., Doweyko A., Chen H. M., Uccello Barretta G., Balzano F., (2000) *J. Comput-Aided Mol. Des.* 14, 647 657 and references therein.
- 14) <http://www.eslc.vabiotech.com>

FREE ENERGY PREDICTIONS OF CARBOHYDRATE-LIGAND COMPLEX BINDING

Glen E. Kellogg^a, Rosa Poidomani^b Samantha Perspicace^b and Salvatore Guccione^{b*}

^aDEPARTMENT OF MEDICINAL CHEMISTRY & INSTITUTE FOR STRUCTURAL BIOLOGY AND DRUG DISCOVERY, VIRGINIA COMMONWEALTH UNIVERSITY, RICHMOND, VA 23298-0540, USA; ^bDIPARTIMENTO DI SCIENZE FARMACEUTICHE, UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA, V.LE. A. DORIA 6, ED.2, CITTÀ' UNIVERSITARIA, I-95125, CATANIA, ITALY.

Glycobiology is the branch of science that studies carbohydrates and their effects in the body. Designing carbohydrate-based drugs has long been avoided by chemists and biologists because of their structural complexity, which makes them difficult to analyze and extremely difficult to synthesize. While successes with synthetic carbohydrate compounds have been few and far between, recent advances in the study of carbohydrate chemistry and biology have put sugar-based drugs on medicine's menu [1]. Carbohydrates are currently in clinical trials for treatment of everything from inflammation and tissue rejection to hepatitis and cancer. The number of major pharmaceutical companies trying to develop carbohydrate-based cancer drugs is evidence for the health importance of these sugars [1].

Cyclodextrins are a matter of interest since these compounds can spontaneously form inclusion complexes with a variety of guest molecules in aqueous media [2]. They are obtained through enzymatic degradation of starch by particular types of amylases known as glucoamylases. Inclusion complexes of cyclodextrins are highly relevant to the pharmaceutical [3], medical, cosmetic and food chemistry and they have also application in agriculture [2]. The particular structures of the cyclodextrins and their capacity to form inclusion complexes, mainly based on Van der Waals and hydrophobic interactions, make them unique as solubilizing and stabilizing agents [2]. Cyclodextrin complexes in which aromatic amino acids are involved are of interest as chiral selectors [4,5] and models for enzyme-substrate specific binding [2].

We have recently reported that a simple empirical force field based on the solvent partitioning of small molecules between two solvents, e.g., water and 1-octanol, can model the free energy of binding between ligands and proteins [6-8], between protein subunits [9,10], and between ligands and nucleotides [11,12]. In each of these cases, the forcefield model *HINT* (for Hydropathic INTERactions; <http://www.edusoft-lc.com/hint/>) was able to estimate free energy of binding for these systems in a very small fraction of the time that computational dynamics approaches such as Free Energy Perturbation [13-15] etc. consume. The key factor is that solvent partitioning is a free energy experiment taking place in a mixed solvent system not unlike the interior of a biomacromolecule. The result of the experiment, $\text{Log}P_{o/w}$, is directly related to $\Delta G_{\text{interaction}}$, as we have shown.[15].

We are now interested in extending this model to carbohydrate systems, i.e., biomacromolecules composed of covalently linked sugars. The first step, now underway, is to build a library of sugar monomers that can be then analyzed with *HINT* to assess the relative free energy contribution of each sugar component. With this in place, complex carbohydrates and their intermolecular and intramolecular interactions can be evaluated with *HINT*. Our first goal is to apply this dictionary to model and analyze cyclodextrins [2-5] and a wide variety of inclusion complexes. The ultimate goal is to develop a detailed understanding of complex carbohydrates and their interactions with other biological molecules in support of the growing interest in them as pharmaceutical targets or potential drugs [1].

References

1. J. Alper, *Science Magazine* 291, 2338, 2001.
2. J. R. Grigera, E. R. Caffarena, S. de Rosa, *Carbohydrate Research* 310, 253-259, 1998.
3. C.A. Ventura, M. Fresta, D. Paolino, S. Pedotti, A. Corsaro and G. Puglisi, *J. Drug Targeting* 9, 379-393, 2001 and references cited therein.
4. V. Cucinotta, F. D'Alessandro, G. Impellizzeri and G. Vecchio, *J.Chem. Soc.,Chemical Communications*,**23**, 1743-1745,1992
5. V. Cucinotta, A. Giuffrida, G. Grasso, G. Maccarrone, G. Vecchio, *J. Chromatography A*, 916, 61-64, 2001.
6. F.C. Wireko, G.E. Kellogg, and D.J. Abraham, *J. Med. Chem.* 34, 758-767, 1991.
7. P. Cozzini, M. Fornabai, A. Marabotti, D.J. Abraham, G.E. Kellogg and A. Mozzarelli, *J. Med. Chem.*, 45, 2469-2483, 2002.
8. R. Gussio, D.W. Zaharevitz, C.F. McGrath, N. Pattabiraman, G.E. Kellogg, C. Schultz, A. Linke, C. Kunick, M. Loest, L. Meijer and E.A. Sausville, *Anti-Cancer Drug Des.*, 15, 53-66, 2000.
9. J.C. Burnett, G.E. Kellogg and D.J. Abraham, *Biochemistry* 39, 1622-1633, 2000.
10. J.C. Burnett, P. Botti, D.J. Abraham and G.E. Kellogg, *Proteins: Str. Funct. Genet.* 42, 355-377, 2001.
11. G.E. Kellogg, J.N. Scarsdale, and F.A. Fornari, Jr., *Nucl. Acids Res* 26, 4721-4732, 1998.
12. D.J. Cashman, J.P. Rife and G.E. Kellogg, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11, 119-122, 2001.
13. W. Wang, O. Donini, C.M. Reyes, and P.A. Kollman, *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Simul.* 30, 211-243, 2001.
14. M.R. Reddy, V.N. Vishwanadhan and T.N. Weinstein, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 88, 10287-10291, 1991.
15. G.E. Kellogg and D.J. Abraham, *Eur. J. Med. Chem.* 35, 651-661, 2000.

MOLECULAR MODELLING OF LIPOPHILIC CONJUGATES OF METHOTREXATE WITH LIPOAMINO ACIDS.

Antonina Puleo^{a*}, Rosario Pignatello^a, Rosa Poidomani^a, Samantha Perspicace^a, Giovanni Puglisi^a, Salvatore Guccione^a, and Istvan Toth^b

^bDIPARTIMENTO DI SCIENZE FARMACEUTICHE, UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA V.LE. A. DORIA 6, ED.2, CITTÀ UNIVERSITARIA, I-95125, CATANIA, ITALY; ^bSCHOOL OF PHARMACY, UNIVERSITY OF QUEENSLAND, STEELE BUILDING, BRISBANE, QLD 4072, AUSTRALIA..

All chemical compounds are characterized by their form (i.e., the structure in a narrow sense), their functions (the physicochemical properties), and their fluctuation (e.g., flexibility, tautomerism). Form, function, and fluctuation are mutually interdependent, and together they define the molecular states in which a chemical compound can exist. In turn, the ensemble of all chemical possible molecular states delineates the property space of a chemical compound [1].

Metotrexate (MTX) has been conjugated to lipoamino acids (LAAs), in order to achieve compounds able to penetrate passively into tumor cells. LAAs (α -aminoacids with an alkyl side-chain) are useful pro-moieties for enhancing the lipophilicity of drug molecules, while keeping a 'membrane-like character' which enhances or allows their interaction with and/or penetration into cells and barriers in the body [2].

One form of resistance shown by many tumor cell lines toward MTX is in fact due to a defective efficiency of the active carrier (RFC) required for the cellular uptake of reduced folate cofactors and antifolate drugs (*transport resistance*). A reduction in the polarity of MTX molecule reasonably helps in enhancing its passive internalization into transport defective cell clones. The modification of the carboxyl groups in the glutamate moiety of MTX molecule appeared as an ideal target, since the binding of MTX to its target enzymes (dihydrofolate reductase and thymidilate synthetase), is mainly due to the pteridine ring.

Among the previously described lipophilic MTX α,γ -bis-conjugates [3], some derivatives showed interesting *in vitro* growth inhibitory activity, compared to free MTX, against a human lymphoblastoid CCRF-CEM line. Furthermore, using an MTX transport-resistant cell subline, which shows an impaired RFC system activity and a reduced MTX uptake, these conjugates maintained a cell growth inhibitory activity with respect to the parent drug. Such findings confirm the possibility of bypassing the cell defective RFC transport system.

The subject of this paper is to examine how the property space of methotrexate is altered upon its transformation into long- as well as short-chain LAA aminoacyl residues using different computational methodologies (conformational analysis, docking and GRID mapping) [4-13] supported as an ideal complement by x-ray crystallography of the co-crystals with Dihydrofolate Reductase (DHFR; pdb code:1BOZ) and, finally, by Surface Plasmon Resonance (SPR) [14].

Conformation –dependent lipophilicity[1] was chosen as the main metric to assess chances in property spaces. MTX-LAA conjugates were first submitted to a conformational search strategy using simulated annealing in order to obtain an efficient sampling of a conformation space. This search was also performed for the anionic form in the case of carboxyl derivatives.

Our search strategy has been shown to explore efficiently the conformational space.

A better grasp of spaces and their evolution as an object, integrated into a higher system, may, therefore, be of some interest in understanding molecular complementarity. The value of such a concept will depend on its potential to open new directions of research[1].

References

1. Testa B., I. Raynaud and Kier L., *Helvetica Chimica Acta* 82, 657, 1999.
2. Toth I., *J. Drug Targeting* 2, 217, 1994.
3. Pignatello R., Jansen G., Kathmann I., Puglisi G., Toth I., *J. Pharm. Sci.* 87, 367, 1998.
4. SPARTAN 5.03. Wavefunction, Inc., 18041 Von Karman Avenue, Suite 370 Irvine, CA 92612, USA.
5. SYBYL Molecular Modelling Software version 6.8, Tripos Inc., 1699 S-Hanley Rd, Suite 303, St.Louis, MO 63144-2913, USA.
6. MacroModel V6.5. Schrödinger, Inc. 1500 S.W. First Avenue, Suite 1180 Portland OR 97201, USA.
7. MacroModel V6.5: F. Mohamadi, N.G.J. Richards, W.C. Guida, R. Liskamp, M. Lipton, C. Caufield, G. Chang, T. Hendrickson, W.C. Still, *J. Comput. Chem.* 11, 440, 1990.
8. McMartin, C., Bohacek, R. S. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* 11, 333, 1997.
9. QXP is the molecular mechanics module in FLOO1, a molecular design program commercially available from Colin McMartin, ThistleSoft, P.O. Box 227, Colebrook, CT 06021, USA.
10. CONQUEST, version 1.3; CSD (Cambridge Structural Database) version 5.23, April 2002.
11. Goodford, P. J. *J. Med Chem.* 28, 849, 1985.
12. Goodford, P. J. *J. Chemometrics* 10, 107, 1996.
13. Molecular Discovery Ltd., West Way House, Elms Parade, Oxford, 1998, 2001 software.
14. Schuck P., *Annu Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26, 541, 1997.

MAPPING THE 5-HT₃ RECEPTOR AGONIST BINDING BY MOLECULAR HYDROPHOBIC INDEX, ELECTROSTATIC AND VAN DER WAALS INTERACTION ENERGY.

Nuria Bech^a, F. Javier Luque^a, Samantha Perspicace^b, Maria Modica and Salvatore Guccione^{b*}

^aDEPARTAMENT DE FÍSICOQUÍMICA, FACULTAT DE FARMÀCIA, UNIVERSITAT DE BARCELONA, AV. DIAGONAL S/N, S-08028, BARCELONA, SPAIN.

^bDIPARTIMENTO DI SCIENZE FARMACEUTICHE, UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA, V.LE. A. DORIA 6, ED.2, CITTÀ' UNIVERSITARIA, I-95125, CATANIA, ITALY.

The neurotransmitter serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) mediates a wide range of physiological functions by interacting with multiple receptors, and these receptors have been implicated as playing important roles in certain pathological and psychopathological conditions. In the past 16 years, seven distinct families of 5-HT receptors have been identified (5-HT₁–5-HT₇), and subpopulations have been described for several of these. Considerable attention has been paid to the identification of agents, which act selectively on each of these receptor subtypes[1-4].

The 5-HT₃ receptor differs from the other 5-HT receptors which are G-Protein coupled being a member of the large family of ligand-gated ion channels of which the nicotinic cholinergic receptor is the prototype, i.e. it forms an ion channel that regulates ion flux. 5-HT₃ receptors were first found on peripheral autonomic, sensory, and enteric neurons, where they mediate excitation. 5-HT₃ receptors in brain are primarily localized on nerve terminals, where they function in the regulation of the release of neurotransmitters, including 5-HT[3,4].

Many diseases, i.e. cognitive, anxiety, and alcohol addiction might be treatable with 5-HT₃ receptor antagonists, while the role of agonists is much less defined, probably due in part to the lack of selective agonists[5]. It was previously thought that 5-HT₃ agonists share a common aryl binding site[5]. Whereas many successes have occurred suggesting that superimposition of the aryl groups may seem likely, at the same time it excludes a consistent overlay of other auxiliary pharmacophoric structures. Up to now no unifying pharmacophore exists for 5-HT₃ agonist activity[5]. A very potent and selective 5-HT₃ ligand (rat cortex,[³H]Zacopride: Ki: 3.92 nM), with a full agonist profile in the Bezold-Jarisch reflex functional assay was recently reported by us[6].

Starting from this result[6] a dual computational strategy is being carried out to examine the molecular determinants that mediate the 5-HT₃ receptor agonist activity. First, the molecular structures of a series of 5-HT₃ agonists comprising a variety of structural motifs[5,6] have been superimposed based on the recently proposed molecular hydrophobic index. This index is based on the partitioning of the free energy of transfer between water and octanol into atomic contributions and it allows us to maximize molecular similarity based on the superposition of hydrophobic/hydrophilic regions[7]. Second, the reactivity pattern of the superimposed structures is further analyzed in terms of the molecular interaction potential, which provides a description of the electrostatic and van der Waals interaction energy with suitable probes in the space surrounding the compound[7]. This information is used to discuss the basic pharmacophore requirements that mediate the 5-HT₃ agonist binding with the aim to build an unifying pharmacophore model of general application to different *chemotypes*[5,6], overcoming the limitation due to the *single aryl* interaction[5].

The piperazine ring (*ambiguous* character) is commonly assumed as charged at a physiological pH but this might be not a prerequisite or an “at all” condition and equilibria may exist[6]. *In vacuo* and *aqueous* conformational analysis[8,9] of both the charged and uncharged forms of the above mentioned previously full agonist[6] compared with some structurally related *inactives* will be also presented.

References

1. S.P.H. Alexander, A. Mathie & J. A. Peters, *Trends Pharmacol. Sci.*, Nomenclature Supplement (2001).
2. R. A. Glennon, M. Dukat, and R. B. Westkaemper. *Serotonin Receptor Subtypes and Ligands*. In: *Psychopharmacology - The Fourth Generation of Progress*. F. E. Bloom, D. J. Kupfer, Eds. Raven Press, New York, 2000, and references cited therein.
3. E. Sanders-Bush and H. Canton. *Serotonin Receptors: Signal Transduction Pathways*. In: *Psychopharmacology - The Fourth Generation of Progress*. F. E. Bloom, D. J. Kupfer, Eds. Raven Press, New York, 2000 and references cited therein.
4. S. Guccione, A. Doweyko, H. M. Chen, G. Uccello Barretta, F. Balzano, *J. Comput-Aided Mol. Des.* **14**, 647-657 (2000) and references cited therein.
5. H. S. Parihar, K. S. Kirschbaum, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, *in press* (2002) and references cited therein.
6. M. Modica, M. Santagati, S. Guccione, A. Santagati, F. Russo, A. Cagnotto, M. Goegan, T. Mennini, *Eur. J. Med. Chem.* **36**, 287-301 (2001) and references cited therein.
7. J. Muñoz, X. Barril, B. Hernández, M. Orozco, F.J. Luque., *J. Comput. Chem.* **24**, 554-563 (2002).
8. MacroModel V6.5: F. Mohamadi, N.G.J. Richards, W.C. Guida, R. Liskamp, M. Lipton, C. Caufield, G. Chang, T. Hendrickson, W.C. Still, *J. Comput. Chem.* **11**, 440-467 (1990).
9. MacroModel V6.5: Schrödinger, Inc. 1500 S.W. First Avenue, Suite 1180 Portland OR 97201.

Acknowledgments:

Prof. Karen S. Kirschbaum is gratefully acknowledged for the helpful discussion and the *pre-print* copy of ref. 5 .

MOLECULAR MODELLING OF NON-STEROIDAL ANTIINFLAMMATORY DRUGS IN EUDRAGIT *RETARD* POLYMERS SOLID DISPERSIONS.

Rosario Pignatello^a, Gabriele Cruciani^b, Rosa Poidomani^a, Antonina Puleo^{a*}, Giovanni Puglisi^a, Samantha Perspicace^{a§} and Salvatore Guccione^a

^aDIPARTIMENTO DI SCIENZE FARMACEUTICHE, UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA, V.LE. A. DORIA 6, ED.2, CITTÀ' UNIVERSITARIA, I-95125, CATANIA, ITALY; ^bUNIVERSITY OF PERUGIA, DEPARTMENT OF CHEMISTRY, VIA ELCE DI SOTTO, 8, I-06123 PERUGIA, ITALY.

Solid dispersions of solid drug particles within an inert polymer matrix are widely used in the modern pharmaceutical technology to increase the dissolution rate and absorption of poorly water-soluble drugs, or to achieve a controlled drug release [1].

Interesting chances are offered by acrylic polymers, such as Eudragit Retard[®], used for tablet coating and preparing solid dosage forms (e.g., micro- or nanoparticles) for oral drug delivery. In particular, Eudragit RS100 and RL100 polymers have a great role, by virtue of their physicochemical features, in oral dosage forms. They are copolymers of partial esters of acrylic and methacrylic acids with alcohols containing a low amount of quaternary ammonium groups; they are insoluble but permeable to water, thus representing a suitable material for controlled and sustained drug release.

Previous and current research projects in our group aimed at the preparation, characterization and biological assessment of solid dispersions and microparticles made from Eudragit RS100 and RL100 with several non-steroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) [2,3].

For their acidic nature, these drugs can interact with the polymer not only by mechanical forces, but also by creating chemical links (e.g., electrostatic, zwitterionic) including the less usual but now well documented cation π -interactions [4], for the presence in the polymer of the cationic ammonium groups. Such interactions will influence not only the drug loading in the dispersions, but mainly the following release in the biological environments (blood, gastro-intestinal tract).

An iterating cycle combining experimental methodologies (powder X-ray diffractometry (PXRD), FT-IR analysis, differential scanning calorimetry (DSC), solid-state NMR) and molecular modelling (*in vacuo* and water simulated annealing, GRID mapping) [5-10] with the Surface Plasmon Resonance (SPR) [11] as a "junction" are carried out to gain more insight into the mechanisms of interaction among carboxylic NSAID agents and these Eudragit polymers. A successful computational procedure, specifically designed to produce descriptors related to *pharmacokinetic*, has been recently reported by Cruciani *et al.* [12,13]. An additional aim of this study was to test how molecular modeling/computational techniques can integrate into and complement experimental techniques such as DSC in investigating dynamic aspects of drug action [14], e.g. membrane permeation and drug delivery, i.e. how multidisciplinary approaches can be applied to deal with pharmaceutical technology and drug delivery problems so extending the area of the molecular modeling traditionally linked to the more *static* 3D-QSAR applications [10-14].

References

1. Ford J.L., *Pharm. Acta Helv.* 61, 69, 1986.
2. Pignatello R., Ferro M., De Guidi G., Salemi .G, Vandelli M.A., Guccione S., Geppi M., Forte C., Puglisi G., *Int. J. Pharm.* 218, 27, 2001.
3. Pignatello R., Amico D., Chiechio S., Giunchedi P., Spadaro C., Puglisi G., *Drug Delivery*, 8, 35, 2001.
4. Dougherty D.A., *Science* 271, 163, 1996.
5. SYBYL Molecular Modelling Software version 6.8, Tripos Inc., 1699 S-Hanley Rd, Suite 303, St.Louis, MO 63144-2913, USA
6. MacroModel V6.5: Schrödinger, Inc. 1500 S.W. First Avenue, Suite 1180 Portland OR 97201.
7. MacroModel V6.5: Mohamadi F , Richards N.G.J., Guida W.C., Liskamp R. , Lipton M. , Caufield C., Chang G. , Hendrickson T. , Still W.C. , *J. Comput. Chem.* 11, 440, 1990.
8. Goodford, P. J., *J. Med Chem.*, 28, 849, 1985.
9. Goodford, P. J., *J. Chemometrics*, 10, 107, 1996.
10. Molecular Discovery Ltd., West Way House, Elms Parade, Oxford, 1998, 2001 software. <http://www.moldiscovery.com>
11. Schuck P., *Annu Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 26, 541, 1997.
12. Cruciani G., Pastor M., Clementi S. *Molecular Modeling and Prediction of Bioactivity*. Gundertofte K. and Jørgensen F.E. (eds.). Kluwer Academic/ Plenum Publishers, New York 2000, 73.
13. Cruciani G., Crivori P., Carrupt P.-A. and Testa B. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* 503, 17, 2000.
14. Fresta M., Guccione S., Beccari A.R., Furneri P.M. and Puglisi G., *Bioorg. Med. Chem.*, in press, 2002.

Acknowledgments[§]:

Dr. Walter Huber, Head Optical Spectroscopy Laboratory, F.Hoffmann-La Roche Basel (Switzerland), is gratefully acknowledged for allowing Dr. Samantha Perspicace a stage in the SPR technique (ROCHE and StudEx grants).

HYBRID ORGANIC-INORGANIC ELECTROLYTIC CAPACITOR

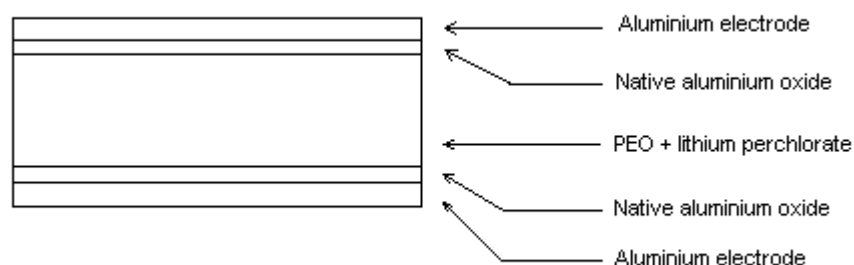
Enrico Stura¹, Victor Erokhin², Riccardo Narizzano¹ and Claudio Nicolini¹

¹ DEPARTMENT OF BIOPHYSICAL M&O SCIENCES AND TECHNOLOGIES, UNIVERSITY OF GENOA, CORSO EUROPA 30, 16132 GENOA, ITALY TEL. +390103538541, FAX +390103537429, email: enrico@hotmail.com

² POLO NAZIONALE DI BIOLETTRONICA, CORSO EUROPA 30, 16132 GENOA, ITALY TEL. +390103538541, email: erokhin@ibf.unige.it

Technical applications require capacitors of high value, so the aim of this research is to obtain a dispositive based on electrolyte with sufficient characteristics of breakdown voltage and capacity.

An alternative way to the silicon technology is to realize circuital elements with organic materials and low cost technologies, allowing to produce light weight, thin, cheap, flexible dispositives. Our research is based on the development of a sandwich constructed by two electrodes, anode and cathode realized with aluminium foils, a thin layer of native aluminium oxide, insulating the electrodes from the electrolyte, the electrolyte itself, organic material with some salt dissolved in it, providing charge carriers.



The organic electrolyte is realized with polyethilene-oxycle (PEO), dissolved in acetonitrile (CH_3CN) or water. The charge carriers are the ions of lithium, obtained from lithium perchlorate (LiClO_4).

Our challenge is to develop a capacitor with high values of breakdown voltage and contemporary maintain a sufficient capacity. To achieve this target, an hypothesis is to build a multi-layered capacitor, so that we have more capacitors connected in series, allowing higher difference of electric potential between the first alluminium electrode and the last one.

When we apply a voltage between the anode and the cathode, electric double layers are formed. The effective capacitor is between the ions at the frontier of the organic material and the charges on the alluminium electrode, separated by the native oxyde of alluminium.

Composition of the capacitor was varied, namely water was used instead of acetonitrile, iron chlorhide (FeCl_3) instead of lithium perchlorate (LiClO_4). The best results, however, remain the first ones.

The tests to identify and characterize our dispositive will concern on:

- Capacity value measurement
- DC voltage breakdown (quasi-stationary)
- AC voltage breakdown (from low to high frequency)
- ESR (Equivalent Series Resistance)
- Q (quality factor)

MICROSTRUCTURE ORIGIN OF THE CONDUCTIVITY DIFFERENCES IN AGGREGATED CuS FILMS OF DIFFERENT THICKNESS

Svetlana Erokhina^{1,2}, Francesca Sbrana³, Davide Ricci³, Victor Erokhin² and Claudio Nicolini¹

1. DISTBIMO, UNIVERSITY OF GENOA, CORSO EUROPA 30, 15132 GENOA, ITALY

tel. +39 010 353 85 41, fax. +39 010 353 74 29, e-mail: svetla@ibf.unige.it

2. POLO NAZIONALE BIOELETRONICA, CORSO EUROPA 30, 15132 GENOA, ITALY

3. DIBE, UNIVERSITY OF GENOA

Structure of thin aggregated layers of CuS nanoparticles, grown in Langmuir-Blodgett film precursors, was investigated with AFM along with the study of their electrical conductivity [1,2] (Fig. 1). Very thin layers revealed practically insulating behavior. The layer was composed from isolated particle aggregate with a thickness, corresponding to the particle diameter (Fig. 2).

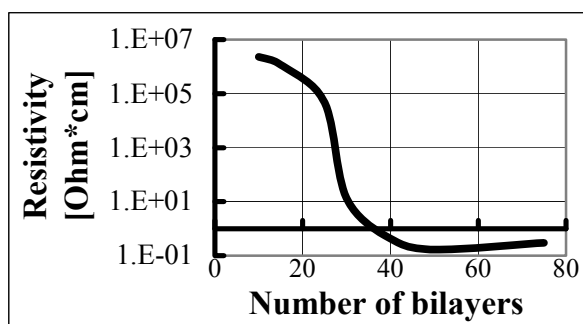


Fig. 1. Resistivity of aggregated layers on thickness

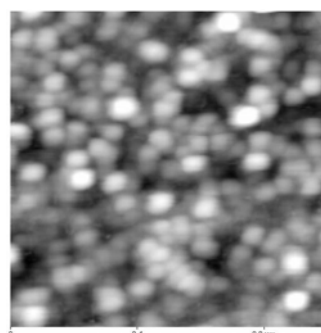


Fig. 2. AFM image of thin CuS layer.

Increase of the film thickness resulted in the formation of conducting pathways formed from aggregates (Fig. 3). Such samples revealed improved conductivity. Finally, when the thickness of the initial precursor layer was more than 25 bilayers, resulting aggregated films were rather uniform (Fig. 4) and their electrical conductivity was rather high.

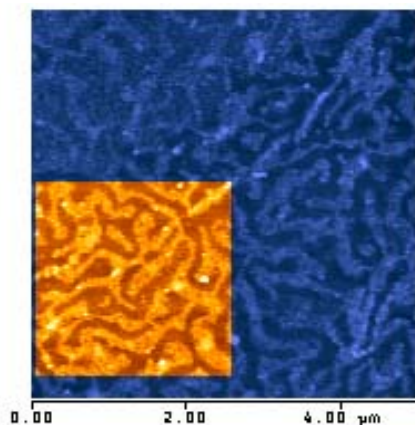


Fig. 3 AFM image of medium-thick CuS layer

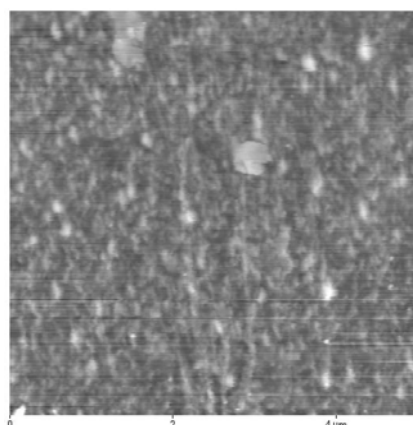


Fig. 4 AFM image of rather thick CuS layer

1. S. Erokhina, V. Erokhin, and C. Nicolini, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 198-200, 645-650 (2002).

2. V. Erokhin, V. Troitsky, S. Erokhina, G. Mascetti, and C. Nicolini, *Langmuir*, 18, 3185-3190 (2002).

CYTOCHROME P4501A2 NANOSTRUCTURING FOR SENSOR APPLICATIONS

Mirco Antonini, Paola Ghisellini, Cristina Paternolli and Claudio Nicolini

*DEPARTMENT OF BIOPHYSICAL M&O SCIENCES AND TECHNOLOGIES, UNIVERSITY OF GENOVA,
CORSO EUROPA, 30 16132 - GENOVA (ITALY) Tel. +390103538541, Fax +390103537584
e-mail: mirco@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 cytochrome P450 monooxygenase system has a fundamental role in the metabolism of a large variety of exogenous and endogenous hydrophobic compounds, including drugs, chemical carcinogens and co-carcinogens.

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

This enzyme plays a critical role in the metabolism of the sex hormone estradiol, aromatic amines, caffeine and certain drugs. 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 different techniques: Langmuir-Schaefer (LS) immobilization and spreading on screen printed rhodium-graphite electrodes. The characterization of the LS films was performed by means of 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.

Cyclic voltammetry was performed in order to test the interaction between the immobilized cytochrome and its substrate (clozapine).

The aim of the work is to compare the different techniques of deposition utilized to obtain cytochrome P4501A2 nanostructuring and to employ the realized samples 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 Colloids and Surfaces B*, 23, 305-311, 2002.
- (2) C. Nicolini, V. Erokhin, P. Ghisellini, C. Paternolli, M.K. Ram and V. Sivozelhezov, "P450scc engineering and nanostructuring for cholesterol sensing", *Langmuir*, 17, 3719-3726 2001.

DISTRIBUZIONE DEL GANGLIOSIDE GM1 IN UN MONOSTRATO LIPIDICO.

Teglia I¹, Coluzza C², Bordi F², Rufini S¹, Cambria A³, Desideri A¹.

¹DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA UNIVERSITA' DI ROMA TOR VERGATA, ²DIPARTIMENTO DI FISICA, UNIVERSITA' LA SAPIENZA ROMA, ³DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE, UNIVERSITA' DI CATANIA.

Obiettivo del lavoro è lo studio dal punto di vista termodinamico e strutturale di microdomini lipidici (Rafts) nelle membrane biologiche. Tali domini sembrano giocare un ruolo fondamentale nei processi di trasduzione del segnale, si tratta di porzioni di plasma-membrana arricchite in fosfolipidi con residui saturi (sfingomieline e fosfatidilcolina), colesterolo e glicosfingolipidi nelle quali sono presenti specifiche proteine.

Per seguire i meccanismi di formazione dei microdomini in membrane artificiali abbiamo utilizzato un microscopio a forza atomica Needle Sensor (NSAFM), studiando la distribuzione del ganglioside GM1 in un monostrato di dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC). I monostrati sono stati preparati utilizzando la tecnica del Langmuir-Blodgett, che permette la deposizione del campione per l'osservazione a diverse tensioni superficiali. L'organizzazione dei lipidi nel campione è stata quindi valutata in monostrati depositi a 7 mN/m e a 35 mN/m: due condizioni nelle quali il lipide si trova rispettivamente in fase liquida condensata e in monostrati misti di fase liquida condensata e liquida espansa.

In campioni depositi a 35 mN/m l'osservazione in NSAFM ha mostrato uno strato compatto, con poche discontinuità, interpretabile come un monostrato di DPPC in fase condensata. L'aggiunta di GM1 alla DPPC ha causato la formazione di piccoli microdomini, che protrudono di 1-2 nm sopra la matrice lipidica. Nei monostrati di DPPC depositi a 7 mN/m, abbiamo osservato due fasi differenti rappresentate da domini sferici che protrudono di 0,8 nm all'interno di una matrice omogenea. In seguito all'aggiunta di GM1, abbiamo osservato la formazione di una terza fase rappresentata da microdomini di altezza 1,2 nm sulla matrice. Questi ultimi microdomini, sono principalmente localizzati al bordo o nell'interno dei domini sferici e solo raramente nella matrice lipidica omogenea. L'analisi delle altezze dei differenti domini osservati, con riferimento a dati presenti in letteratura, suggerisce che i domini con altezze di 0,8 nm siano la fase condensata della DPPC e che i domini di 1,2 nm siano invece i gangliosidi.

ATTIVITA' NERVOSA EVOCATA SINCRONA O ASINCRONA E COMPETIZIONE SINAPTICA

Carlo Bidoia, Morgana Favero, Giuseppe Busetto, Alberto Cangiano

DIPARTIMENTO DI SCIENZE NEUROLOGICHE E DELLA VISIONE, SEZIONE DI FISILOGIA, UNIVERSITA' DI VERONA

La competizione ed eliminazione sinaptica sono processi basilari nel corso dello sviluppo delle connessioni nervose e sono fortemente influenzati dall'attività elettrica. Abbiamo recentemente dimostrato che contano nell'attività non solo l'entità ma anche le caratteristiche temporali dei potenziali d'azione negli input sinaptici in competizione tra di loro. Infatti la sostituzione dell'attività naturale asincrona dei motoneuroni con una sincrona evocata mediante stimolazione elettrica, promuove la ritenzione degli input polineuronali in fibre muscolari reinnervate nel ratto adulto (Busetto et al., *Journal of Neuroscience* 20:685-95,2000). Stiamo ora sviluppando un nuovo preparato che possa consentire di determinare: 1) se l'attivazione asincrona degli input in competizione porta ad eliminazione sinaptica, 2) il grado di asincronismo necessario per attivare il processo eliminatorio, 3) se gli input attivi sono favoriti rispetto a quelli inattivi. La strategia principale è quella di ottenere la suddivisione in 2 branche dell'input che reinnerva il muscolo soleo, in modo che esse possano essere attivate cronicamente in vivo con treni di stimoli temporalmente indipendenti. A tale scopo viene sezionato il nervo peroneo comune ed i due monconi centrale e periferico così ottenuti vengono inseriti in un corto manicotto di silicone, contenente al suo interno un setto longitudinale della lunghezza di circa 5 mm. Gli assoni del moncone centrale rigenerano all'interno dei due semi-tunnel (ciascuno dei quali contiene una coppia di elettrodi, catodo e anodo, per attuare una futura stimolazione) e, crescendo poi lungo il moncone distale in degenerazione, vanno infine a reinnervare la periferia muscolare. All'interno dei due semi-tunnel viene inserita colla di fibrina contenente cellule di Schwann (precedentemente da noi isolate da altri ratti) e neurotrofine (GDNF, BDNF), per facilitare la rigenerazione. Quando la reinnervazione è completata (30-45 giorni), viene trapiantato il nervo fibulare, branca del peroneo comune, sulla superficie del muscolo soleo; contemporaneamente viene sezionato il nervo soleo originale e posto un blocco di conduzione cronico mediante TTX a livello del nervo sciatico. Viene infine iniziata la stimolazione elettrica cronica in vivo, mediante treni di impulsi applicati alle due branche del nervo peroneo comune rigenerato, potendosi variare a piacere il grado di asincronismo tra le due branche. I risultati preliminari fin qui ottenuti riguardano l'aspetto, peraltro fondamentale, della efficienza della rigenerazione, ed indicano una buona reinnervazione muscolare con una soddisfacente distribuzione degli assoni provenienti dalle due branche del peroneo comune. Sono in corso esperimenti di determinazione sia elettrofisiologica (eseguita in vitro) che mediante microscopia confocale a fluorescenza, del grado di innervazione polineuronale delle fibre muscolari, dopo periodi di diversa durata (15-30 giorni) di stimolazione elettrica asincrona o sincrona delle due branche del peroneo comune.

Col sostegno di Telethon-Italia (Grant 1002)

DEVELOPMENT OF AN AMPEROMETRIC ENZYME BIOSENSOR USING LACCASE AS BIORECOGNITION ELEMENT

Cambria M. T.^a, Ragusa S.^a, Rigo A.^b, Vianello F.^b.

^{A)} DEPARTMENT OF CHEMICAL SCIENCES, UNIVERSITY OF CATANIA, V.LE A. DORIA 6, 95125 CATANIA, ITALY.

^{B)} DEPARTMENT OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, UNIVERSITY OF PADOVA, 35100 PADOVA, ITALY.

The aim of the present work is to develop an efficient laccase immobilization procedure and to study the kinetic properties of the immobilised enzyme under flow conditions, to optimise the use of this enzyme in biosensors.

Laccases (benzendiol: oxygen oxidoreductase, EC 1.10.3.2) are multi-copper oxidases, which couple the one-electron oxidation of a large variety of phenolic compounds with the four-electron reduction of dioxygen to water. In previous studies we extracted and purified laccase from the Basidiomycete *Rigidoporus Lignosus*. The enzyme was purified to apparent homogeneity and some of its structural and kinetic parameters were determined (1). Fungal laccase exhibits a low substrate specificity and its intrinsic stability under various pH and temperature conditions (2) suggests that it could be efficiently used in immobilized systems as biorecognition element in biosensor for monitoring phenolic pollutants in wastewater.

Laccase, extracted and purified from *Rigidoporus Lignosus*, was immobilized by carbodiimide chemistry, on a self-assembled mono-layer of 3-mercaptopropionic acid deposited on a polycrystalline gold surface. The gold surface was positioned inside an electrochemical flow cell equipped by a working electrode, a reference electrode and a platinum counter electrode. The kinetic parameters of the enzyme in solution were determined by spectrophotometric assay, using as substrates some phenolic compounds that could be present in olive mill wastewater.

The catalytic properties of the immobilized enzyme were studied using hydroquinone as substrate and were compared to those of the free enzyme.

The current response of the system containing the immobilized laccase was linear in the hydroquinone concentration range 2-50 μM , with a sensitivity of 3.0 nA/ μM 1,4-hydroquinone.

The enzyme activity was tested over different phenolic compounds that can be present in olive mill wastewater. The highest response of the biosensor was obtained with gallic acid, caffeic acid and quercetin, which are typical polyphenolic antioxidants. Since wastewater may contain variable concentrations of oxidized polyphenols, which can generate an interfering signal at the working electrode, a minimal sample preparation procedure, consisting of sample incubation with a reducing agent, was carried out. By this procedure a low detection limit was achieved permitting the monitoring of phenolic substances in wastewater at concentration lower than 1 μM , that is below the UE law limits.

1. Cambria M.T. et al. (2000) Prot. Express. Purif. 18, 141-147.
2. Ragusa S. et al (2002) Biochem. Biophys. Acta In press

COMPLEX CATALYTIC COLLOIDS ON THE BASIS OF FIREFLY LUCIFERASE AS OPTICAL NANOSENSOR PLATFORM

L. Pastorino¹, S. Disawal², Y. Lvov², V. Erokhin¹, C. Nicolini¹

¹ INSTITUTE OF BIOPHYSICS, UNIVERSITY OF GENOA, ITALY

² INSTITUTE FOR MICROMANUFACTURING, LOUISIANA TECH UNIVERSITY, USA

Firefly luciferase (E.C. 1.13.12.7) from *Photinus pyralis* (FL) is a bioluminescent enzyme that catalyses the oxidation of d-luciferin in the presence of adenosinetriphosphate (ATP), Mg^{2+} and molecular oxygen. The product oxyluciferin is generated in an excited state, which then decays to the ground state emitting light. Due to its high sensitivity and narrow specificity for ATP, the bioluminescent reaction is widely utilized to determine the amount of ATP in environmental and biological samples.

In present work the layer-by-layer (LbL) nano-assembly technique has been utilized for the development of complex catalytic microparticles on the basis of FL. This technique offers the possibility of depositing organized multilayered structures of predetermined composition, precision of 1 nm, and thickness in the range of 5-1000 nm onto the surface of charged templates (flat supports or tiny cores).

FL films containing 1, 2, 3 and 4 monolayers were assembled on silver electrode QCM-resonators and on 520-nm diameter sulfonated polystyrene latex by alternate adsorption of FL and polycations utilizing electrostatic interactions for the layer interaction. The assembly process was studied with Quartz Crystal Microbalance (QCM) and Microelectrophoresis (surface potential). A stepwise growing of the multilayer by alternation of FL and PDDA-poly(dimethyldiallyl ammonium chloride) with the bilayer thickness of 14 nm and changing of the surface potential from +40 mV for PDD to -15 mV for FL outermost were established. The functionality and stability of the biocolloids were demonstrated by monitoring the intensity of the light emission in dependence on the number of FL layer in the film.

CORRELATION BETWEEN TROPHIC FACTOR EXPRESSION, RETINAL SENSITIVITY AND PROTECTION IN NERVE-SECTIONED RETINA

Maccarone R.¹, Bisti S.¹, Valter K.², Gargini C.³, Di Loreto S.⁴, Cervetto L.³, Stone J.²

¹DEPT. STB, UNIVERSITY OF L'AQUILA, ITALY, ² NSW RETINAL DYSTROPHY RESEARCH CENTRE, UNIVERSITY OF SYDNEY, ³DEPARTMENT PNFVB, UNIVERSITY OF PISA, ITALY, ⁴CNR, ISTITUTO TIPIZZAZIONE TISSUTALE, L'AQUILA, ITALY.

Introduction: We reported previously (IOVS 42: S632, 2001) that nerve section induces an upregulation of both CNTF and FGF2 in the retina, with different timecourse of expression and cellular localization. The present study tests for a relationship between FGF2 and CNTF levels in the retina, retinal function assessed by the ERG and photoreceptor protection against light damage.

Methods: The right optic nerve was sectioned intraorbitally in adult albino and Long Evans rats and the animals maintained in normal cyclic light conditions for 1-90 d. An other group of 30 animals was exposed to bright (1500 lux) continuous light (BCL) for 48 h.

Following previously described protocols, cryosections were labelled with the TUNEL technique and with antibodies against FGF2, CNTF and against receptors CNTFR α and FGFR1. In addition starting 1 hour after nerve section, retinæ have been collected to monitor mRNA expression for both FGF2 and CNTF through RT-PCR technique.

Results: Nerve section was followed by a suppression of both a- and b- waves.

Suppression of a-wave was maximal at 7 d and recovered to control levels by 35 d. Suppression of the b-wave was maximal at 21 d and remained significant at 90 d. The expression of both CNTF and FGF2 is up-regulated starting at 2 hours after the surgery, with CNTF reaching a maximum faster than FGF2. CNTF levels in the retina increased by 7 d and fell to control levels by 14 d. .

Upregulation of FGF2 was not evident until 21 d after nerve section, and levels remained high thereafter.

Protection of photoreceptors from light damage, assessed by a reduction of TUNEL-labelling after BCL exposure was prominent at 1d, 3d, and 7d post-section and some level of protection remained evident at 21d. In both control and nerve-sectioned retina, CNTFR α was concentrated along photoreceptor outer segments. FGFR1 labelling concentrated in the cytoplasm of photoreceptors in the ONL (outer nuclear layer).

Conclusions: Present findings suggest that the protection of photoreceptors from light damage correlates most closely the early upregulation of CNTF, but remains detectable after P21, when CNTF levels have fallen but FGF-2 upregulation persists. CNTF acts at the photoreceptor outer segment while FGF-2 acts at the photoreceptor cytoplasm, and on the photoreceptor-bipolar synapse.

IPEROMOCISTEINEMIA, IPOMETILAZIONE DEL DNA E ALTERAZIONI EPIGENETICHE

Ingrosso D^{*}; Cimmino A^{*}; Perna AF[°]; D'Esposito M[^]; D'Urso M[^]; De Santo NG[°]; Zappia V; Galletti P^{*}.

^{*}DIP. DI BIOCHIMICA E BIOFISICA "F. CEDRANGOLO", S. ANDREA DELLE DAME,

[°]DIV. DI NEFROLOGIA DIP. DI PEDIATRIA, FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA, SUN, ISTITUTO DI GENETICA E BIOFISICA, C.N.R., NAPOLI

Obiettivi: L'omocisteina (Hcy) è un amminoacido solforato il cui incremento di concentrazione plasmatica (iperomocisteinemia) è un potente fattore di rischio cardiovascolare. Una delle principali alterazioni biochimiche, nell'iperomocisteinemia, è l'inibizione delle metiltransferasi (MT) S-adenosilmetionina (AdoMet)-dipendenti, mediata dalla S-adenosilomocisteina (AdoHcy), derivato attivo dell'Hcy e inibitore competitivo delle MT. Dati precedenti dimostrano che: a) l'iperomocisteinemia è associata ad una diminuzione del rapporto [AdoMet]/[AdoHcy], a cui consegue l'inibizione di una MT implicata in processi di metilazione/riparazione di proteine danneggiate (1, 2); b) tale anomalia può essere parzialmente corretta dalla somministrazione di folati (3-6).

L'ipotesi di lavoro del presente studio è che le DNA MT siano anch'esse soggette, in vivo, a tale inibizione, nel paziente iperomocisteinemico, con conseguenti alterazioni della regolazione dell'espressione genica, di possibile significato fisiopatologico.

Scopo di questo studio, in pazienti iperomocisteinemici, è: I) identificare e quantificare le alterazioni della metilazione del DNA; II) caratterizzare i relativi geni-bersaglio; III) identificare nuovi, più accurati marcatori di rischio cardiovascolare legati a ipometilazione del DNA; IV) verificare le condizioni per un loro vasto impiego in campo clinico.

Metodi: Le principali metodiche utilizzate sono descritte in ref. 7-9. Pazienti uremici iperomocisteinemici sono stati selezionati come descritto precedentemente. Hcy e derivati sono stati misurati mediante metodica immunometrica (FPIA) o HPLC. La metilazione totale del DNA è stata valutata mediante sia saggio di estensione della citosina sia Southern blotting, in campioni di DNA da mononucleati dal sangue periferico. L'espressione allelica dei geni selezionati (imprantati e pseudoautosomici) è stata valutata mediante analisi del polimorfismo dei frammenti di restrizione (RFLP) in campioni di DNA e cDNA digeriti con opportuni enzimi. Il profilo di metilazione dei promotori è stato studiato mediante analisi di sequenza dopo trattamento con sodio bisulfito.

Risultati: I dati dimostrano: I) Una ipometilazione totale del DNA che correla in maniera altamente significativa con l'incremento di Hcy nel plasma; II) una espressione biallelica di tipici geni pseudoautosomici o imprantati, controllati dalla metilazione; III) il passaggio dall'espressione monoallelica a quella biallelica, dipendente dai livelli di Hcy, con un *threshold* che varia da gene a gene. IV) il ristabilimento del *pattern* di espressione monoallelico in seguito alla terapia con folati.

Conclusioni: I risultati confermano l'ipotesi che una inibizione delle reazioni di metilazione sia uno dei principali meccanismi dell'azione tossica dell'Hcy. Alcune delle metodiche messe a punto sono suscettibili di immediato trasferimento al campo clinico. I risultati, nell'insieme, sostengono il ruolo di alterazioni epigenetiche in un modello meccanicistico di azione dell'Hcy. Inoltre per la prima volta è stata dimostrata la possibilità di ristabilimento dell'*imprinting*, in cellule somatiche, utilizzando una strategia di azione dietetico-farmacologica.

Bibliografia

- 1) Perna AF, Ingrosso D, Galletti P, Zappia V, De Santo NG. *J Clin Invest* 91:2497, 1993.
- 2) Perna AF, Ingrosso D, De Santo NG, Galletti P, Zappia V. *Kidney Int* 47:247, 1995.
- 3) Perna AF, Antimo D'Aniello A, Lowenson JD, Clarke S, De Santo NG, Ingrosso D. *J Am Soc Nephrol* 8:1, 1997.
- 4) Perna AF, Ingrosso D, De Santo NG, Galletti P, Brunone M, Zappia V. *J Am Soc Nephrol* 8:1899, 1997.
- 5) Perna AF., Castaldo P., De Santo NG., di Carlo E., Cimmino A., Galletti P., Zappia V., Ingrosso D. *Kidney Int* 59:2299, 2001
- 6) Perna AF, Ingrosso D, Satta E, Romano M, Cimmino A, Galletti P, Zappia V, De Santo NG., *Am J Kidney Dis*;38: 85, 2001.
- 7) Alfinito F, Cimmino A, Ferraro F, Cubellis MV, Vitagliano L, Francese M, Zagari A, Rotoli B, Filosa S, Martini G. *Br J Haematol.* 98:41, 1997.
- 8) Notaro R, Cimmino A, Tabarini D, Rotoli B, Luzzatto L. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:13782, 1997.
- 9) Ingrosso D, Cimmino A, D'Angelo S, Alfinito F, Zappia V, Galletti P. *Eur J Biochem*, 269:2032, 2002.

UNITÀ DI RICERCA

DEL

CONSORZIO INTERUNIVERSITARIO

“ISTITUTO NAZIONALE BIOSTRUTTURE E BIOSISTEMI”

(in ordine alfabetico del nome del Responsabile Scientifico)

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

UNITA' DI RICERCA INBB
Napoli

Responsabile scientifico:

Alberto ABBRUZZESE SACCARDI

Linea di Ricerca

VIE DI TRASDUZIONE E FATTORI TRADUZIONALI E POST-TRADUZIONALI COME BERSAGLI PER IL DISEGNO DI NUOVE STRATEGIE TERAPEUTICHE ANTITUMORALI BASATE SUL POTENZIAMENTO DELLA MORTE CELLULARE.

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Alberto ABBRUZZESE	PO	alberto.abbruzzese@unina2.it
Michele CARAGLIA	DR	michele.caraglia@unina2.it

Non Aderenti INBB

Gaia GIUBERTI	DR	gaia.giuberti@unina2.it
Monica MARRA	DR	monica.marra@unina2.it
Anna Maria D'ALESSANDRO	DR	annamaria.dalessandro@unina2.it

Sede Unità di Ricerca

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

Indirizzo Via Costantinopoli, 16 80138 Napoli.

Tel. 081/5665871-74.

Fax 081/5665863.

E-Mail: Alberto.Abbruzzo@unina2.it

Sezione INBB di appartenenza

Napoli

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Storicamente il nostro gruppo ha avuto come oggetto di ricerca il fattore eucariotico di inizio della sintesi proteica 5A (eIF-5A). L'eIF-5A è una proteina di peso molecolare 18 kDa. La sua forma nativa subisce una serie di modifiche post-traduzionali poliamino-dipendenti che coinvolgono il residuo di lisina 50. Solo la proteina contenente ipusina si è dimostrata biologicamente attiva ed i livelli di ipusina sono strettamente correlati alla proliferazione cellulare. Nostri studi hanno dimostrato che sia la deossipusina che l'ipusina possono trovarsi covalentemente legate ad altre proteine o peptidi in seguito ad una ulteriore modifica post-traduzionale catalizzata dalla transglutaminasi tissutale (t-Tgasi), enzima anch'esso coinvolto nell'insorgere dell'apoptosi. In particolare abbiamo rilevato che l'eIF-5A è un substrato della t-Tgasi in cellule BALB C 3T3 di topo e che le cellule transfettate con la t-Tgasi contengono livelli inferiori di ipusina e un incremento dei γ -glutammi coniugati. Tali modifiche biochimiche correlano con un rallentamento della proliferazione cellulare e con l'induzione dell'apoptosi.

Abbiamo anche dimostrato che 48 h di esposizione a 1.000 UI/ml di interferone alfa (IFNa) determinano inibizione della proliferazione ed incremento dell'espressione e della funzione del recettore per l'Epidermal Growth Factor (EGF-R) su cellule di carcinoma epidermoide umano KB. Abbiamo inoltre rilevato che l'inibizione proliferativa indotta dall'IFNa avviene in parallelo all'induzione di apoptosi che invece è antagonizzata dall'EGF. Abbiamo pertanto verificato se l'incremento dell'espressione dell'EGF-R fosse da inquadrarsi in una risposta da stress di difesa delle cellule neoplastiche dall'apoptosi indotta dall'IFNa. Abbiamo rilevato un incremento dell'espressione di heat shock protein 70 (HSP-70), 27 (HSP-27) e 90 (HSP-90) nelle cellule esposte ad IFNa ed ancora l'EGF è in grado di antagonizzare tale aumento. L'IFNa determina inoltre incremento della fosforilazione e dell'attività di Jun kinase-1 (JNK-1) e di p38 kinase, gli enzimi "terminali" di un pathway attivato da stress nelle cellule eucariotiche. Abbiamo anche osservato un netto decremento della fosforilazione e della attività enzimatica di tali proteine quando si espongono all'EGF cellule previamente trattate con l'IFNa. Inoltre la transfezione di un plasmide codificante per un dominante positivo di JNK-1 potenzia l'apoptosi indotta dall'IFNa. Pertanto l'attivazione di JNK-1 e di p38 kinase è almeno in parte responsabile dell'insorgere degli effetti anti-proliferativi e dell'apoptosi indotta da IFNa. Infine abbiamo verificato se l'interazione fra l'IFNa e l'EGF coinvolgesse anche i meccanismi di inizio della sintesi proteica. Abbiamo, infatti, osservato che la sintesi di ipusina (modifica post-traduzionale che accende l'attività di eIF-5A) è fortemente ridotta nelle cellule esposte all'IFNa ed incrementata dalla successiva aggiunta di EGF. Tale effetto potrebbe tradursi in una riduzione dell'attività dell'eIF-5A con un susseguente decremento dell'efficienza dei meccanismi della sintesi proteica. Sulla base di tali osservazioni abbiamo impiegato in combinazione con l'IFNa la proteina di fusione ricombinante TP-40, costituita dal transforming growth factor α , in grado di veicolare la TP-40 sull'EGF-R, e dalla tossina di *Pseudomonas Aeruginosa* che inibisce la sintesi proteica a livello dell'Elongation Factor-2 (EF-2). Abbiamo in effetti

rilevato un sinergismo tra la TP-40 e l'IFNa sulla citotossicità delle cellule KB. In conclusione, l'IFNa induce nelle cellule di carcinoma epidermoide una risposta protettiva anti-apoptotica che si esplica attraverso l'attivazione della via di trasduzione del segnale EGF-dipendente rasà erk-1. Inoltre l'IFNa induce apoptosi attraverso l'attivazione di JNK-1 e p38 kinase. Tali eventi avvengono in parallelo alla riduzione della sintesi di ipusina e presumibilmente dell'attività di eIF-5A.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

1. P. Stiuso, G. Colonna, R. Ragone, M. Caraglia, J.W.B. Hershey, S. Beninati, and A. Abbruzzese "Structural organization of the human eukaryotic initiation factor 5A precursor and its site-directed variant LYS 50→ARG" *Amino Acids*, 16: 91-106, 1999.
2. G. Lupoli, G. Vitale, M. Caraglia, M.R. Fittipaldi, A. Abbruzzese, P. Tagliaferri, A.R. Bianco "Familial non medullary thyroid carcinoma: a new clinical entity" *The Lancet*, 20: 637-639I, 1999.
3. M. Caraglia, E. Di Gennaro, D. Barbarulo, M. Marra, P. Tagliaferri, A. Abbruzzese, A. Budillon "Upregulated EGF receptors undergo to rapid internalization and ubiquitin-dependent degradation in human cancer cells exposed to 8-Cl-cAMP" *FEBS Letters*, 447: 203- 209, 1999
4. A. Budillon, E. Di Gennaro, M. Caraglia, D. Barbarulo, A. Abbruzzese and P. Tagliaferri "8-Cl-cAMP antagonizes mitogen-activated protein kinase activation and cell growth stimulation induced by epidermal growth factor" *Brit. J. Cancer* 81: 1134-1141, 1999.
5. M. Caraglia, A. Abbruzzese, A. Leardi, S. Pepe, A. Budillon, G. Baldassarre, C. Selleri, S. De Lorenzo, A. Fabbrocini, G. Giuberti, G. Vitale, G. Lupoli, A. R. Bianco, and P. Tagliaferri "Interferon- α induces apoptosis in human KB cells through a stress-dependent mitogen activated protein kinase pathway that is antagonized by epidermal growth factor" *Cell Death and Diff.*, 6: 773-780, 1999.
6. G. Vitale, P. Tagliaferri, M. Caraglia, E. Rampone, A.Ciccarelli, A.R.Bianco, A. Abbruzzese, G. Lupoli "Slow release lanreotide in combination with *interferon- α -2b* in the treatment of symptomatic advanced medullary thyroid carcinoma: an algorithmic approach to the definition of response" *J. Clin. Endocrinol. Met.*, 85, 983-988, 2000.
7. A. Lentini, F. Autuori, P. Mattioli, M. Caraglia, A. Abbruzzese, S. Beninati "Evaluation of the efficacy of potential antineoplastic drugs on tumour metastasis by computer-assisted image analysis" *Eur. J. Cancer*, 36(12):1572-1577, 2000.
8. A. Lentini, F.Vidal-Vanaclocha, F. Facchiano, M. Caraglia, A.Abruzzese and S. Beninati "Theophylline administration markedly reduces hepatic and pulmonary implantation of B16-F10 melanoma cells in mice" *Melanoma Res.* 10: 435-443, 2000.
9. M. Caraglia, A. Budillon, G. Vitale, G. Lupoli, P. Tagliaferri and A. Abbruzzese "Modulation of molecular mechanisms involved in protein synthesis machinery as a new tool for the control of cell proliferation" *Eur. J. Biochem.* 267: 3919-3936, 2000
10. A. M. Facchiano, P. Stiuso, M. L. Chiusano, M. Caraglia, G. Giuberti, M. Marra, A. Abruzzese, G. Colonna "Homology modelling of the human eukaryotic initiation factor 5A (eIF-5A)". *Protein Engin.* 14, 881-890, 2001 IF 3.8
11. G. Vitale, A. Ciccarelli, M. Caraglia, M. Galderisi, R. Rossi, S. Del Prete, A. Abbruzzese, G. Lupoli "Comparison of two provocative tests for calcitonin in medullary thyroid carcinoma: omeprazole versus pentagastrin" *Clin. Chem. in press* 48: 2002 IF 4.5
12. M. Caraglia, M. Marra, G. Giuberti, A.M. D'alessandro, S. Beninati, A. Lentini, S. Pepe, M. Boccellino And A. Abbruzzese "Theophylline-induced apoptosis is paralleled by Protein Kinase A-dependent tissue transglutaminase activation in cancer cells." *J. Biochem.* 131, 2002

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Il nostro gruppo studierà:

- a) La possibilità di potenziare l'attività antiproliferativa e l'apoptosi indotta dall'IFNa con inibitori della sintesi di ipusina. Inoltre selezionerà degli inibitori specifici dell'eIF-5A legantisi al sito contenente l'ipusina attraverso screening computerizzato farmacologico.
- b) I meccanismi di induzione di apoptosi indotta dall'IFNa. In particolare verranno valutati I livelli di espressione e di attività delle caspasi, il rilascio citoplasmatico di citocromo c, I livelli delle proteine bcl-correlate. Inoltre verrà verificata l'attività e l'espressione della Tgasi tissutale e verrà studiato il livello di regolazione di tale enzima, coinvolto nell'innescare dell'apoptosi, da parte dell'IFNa. Infine verrà studiato lo stesso pathway di traduzione del segnale dell'IFNa con l'eventuale possibilità di modularlo.

Collaborazioni internazionali in atto

1. M.H. Park, National Institute for Dental Research, NIH, Bethesda, MD
2. C. Richard Boland, Department of Medicine and Comprehensive Cancer Center, University of California, San Diego, La Jolla, CA

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

1. Cromatografo liquido ad alta pressione (Beckman)
2. Cappa a flusso laminare per colture cellulari (Flow)
3. Citofluorimetro (Beckton Dickinson)
4. Camere per corsa gel verticali per proteine con generatore elettrico ed apparato per blotting (mini e maxi BIORAD).
5. Camera per corsa orizzontale di gel di agarosio
6. Microscopio ad inversione di fase ed a fluorescenza (Leitz)

Parole Chiave

Trasduzione del segnale ; sintesi proteica ; apoptosi ; agenti antitumorali ; interferone alfa ; egf ; eif-5a

UNITA' DI RICERCA INBB
Roma

Responsabile Scientifico

Giovanni ANTONINI

Linea di Ricerca

STUDIO DELLA ATTIVITA' ANTIVIRALE ED ANTIVASIVA DI LATTOFERRINA E DI PROTEINE OMOLOGHE

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Giovanni ANTONINI	PO	giovanni.antonini@uniroma3.it
-------------------	----	--

Non Aderenti INBB

Dario BOTTI	PA	botti@univaq.it
Francesco GIANANTI	BC	biomol@univaq.it
Maria Teresa MASSUCCI	DR	
Maria Federica GIARDI	BC	

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Biologia, Università di Roma TRE
e Dipartimento di Biologia di Base ed Applicata, Università di L'Aquila.

Indirizzo Dipartimento di Biologia, Università di Roma TRE, Vle. Marconi 446, 00146 Roma

Telefono 06 55 17 63 29

Fax 06 55 17 63 21

E-mail giovanni.antonini@uniroma3.it

Sezione INBB di appartenenza

Roma "Tor Vergata"

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

La lattoferrina (Lf) è una proteina legante il ferro con una massa di circa 80 kDa, sintetizzata da neutrofili e cellule epiteliali di ghiandole esocrine. La Lf può legare due atomi di ferro in due differenti siti ed il suo ruolo nella difesa dell'uomo contro infezioni batteriche e virali è stato ben dimostrato anche se differenti regioni della proteina esplicano differenti attività biologiche e non sono ancora noti i meccanismi molecolari responsabili di tali attività. Scopo ultimo della ricerca in oggetto è la identificazione di peptidi derivanti dalla lattoferrina e da proteine omologhe utilizzabili terapeuticamente in quanto caratterizzati da attività di protezione di cellule epiteliali verso infezioni intracellulari da virus e da batteri patogeni intracellulari facoltativi.

Risultati ottenuti

Per quanto riguarda la attività antivirale, è stata valutata la importanza della componente glucidica e della saturazione con metalli verso differenti tipi di virus quali gli herpesvirus tipo 1 e 2, l'HIV, il rotavirus SA-11 ed il poliovirus tipo 1. È stata anche messa in evidenza una attività antivirale significativa posseduta da peptidi derivati dalla lattoferrina, anche se ancora insufficiente per uno scopo applicativo. Per quanto riguarda la attività antinvasiva, è stato dimostrato dimostrato l'effetto protettivo di Lf contro l'invasività di *Listeria monocytogenes* e di *Streptococcus pyogenes* di gruppo A verso linee cellulari epiteliali. Inoltre, è stato dimostrato che Lf è in grado di aumentare la percentuale di cellule che vanno incontro ad apoptosi in seguito a invasione da batteri patogeni intracellulari facoltativi, amplificando i segnali pro-apoptotici provenienti da cellule infette e modificando l'equilibrio tra apoptosi e necrosi verso la morte cellulare programmata.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

Piera Valenti, Rita Greco, Giuseppina Pitari, Paola Rossi, Maria Ajello, Gerry Melino and Giovanni Antonini
Apoptosis of Caco-2 intestinal cells invaded by *Listeria monocytogenes*: Protective effect of lactoferrin
Experimental Cell Research, 250,197-202,1999

Rosa Siciliano, Barbara Rega, Magda Marchetti, Lucilla Seganti, Giovanni Antonini and Piera Valenti
Bovine lactoferrin peptidic fragments involved in inhibition of Herpes Simplex Virus type 1 infection.
Biochemical and Biophysical Research Communications 264, 19-23, 1999

Lucilla Seganti, Anna Maria Di Biase, Barbara Rega, Benedetta De Giulio, Mauro Nicoletti, Giovanni Antonini and Piera Valenti

Involvement of bovine lactoferrin moieties in the inhibition of herpes simplex virus type 1 infection

International Journal of Immunopathology and Pharmacology 14: 71-79, 2001

Fabiana Superti, Rosa Siciliano, Barbara Rega, Francesco Giansanti, Piera Valenti and Giovanni Antonini

Involvement of bovine lactoferrin metal saturation, sialic acid and protein fragments in the inhibition of rotavirus infection

Biochimica Biophysica Acta 1528: 107-115, 2001

Francesco Giansanti, Paola Rossi, Maria Teresa Massucci, Dario Botti, Giovanni Antonini, Piera Valenti and Lucilla Seganti

Antiviral activity of ovotransferrin discloses an evolutionary strategy for the defensive activities of lactoferrin.

Biochemistry and Cell Biology 80: 125-130, 2002

Paola Rossi, Francesco Giansanti, Alberto Boffi, Maria Ajello, Piera Valenti, Emilia Chiancone and Giovanni Antonini

Ca²⁺-binding to bovine lactoferrin enhances protein stability and influences the release of bacterial lipopolysaccharide

Biochemistry and Cell Biology 80: 41-48, 2002

Maria Ajello, Rita Greco, Francesco Giansanti, Maria Teresa Massucci, Giovanni Antonini and Piera Valenti

Anti-invasive activity of bovine lactoferrin towards Group A Streptococci

Biochemistry and Cell Biology 80: 119-124, 2002

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Si cercherà di identificare i meccanismi molecolari alla base della attività antivirale ed antinvasiva e si cercheranno eventuali sinergie della lattoferrina con altre molecole coinvolte nei processi di difesa aspecifica dalle infezioni. Saranno inoltre cercati altri peptidi derivanti da lattoferrina e proteine omologhe ad attività antivirale ed antinvasiva allo scopo di stabilire delle relazioni struttura-funzione nella proteina intatta.

Collaborazioni internazionali in atto

J. Mazurier. Unité Mixte de Recherche du CNRS n°8576, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Normale attrezzatura di un laboratorio di Biochimica e di Biologia Cellulare e Molecolare

Citofluorimetro a flusso

Microscopi ottici, a fluorescenza, confocale ed elettronico

Parole Chiave

Lattoferrina, Ovotransferrina, infezioni intracellulari, virus, batteri patogeni intracellulari facoltativi, modificazioni chimiche delle proteine, peptidi.

UNITA' DI RICERCA INBB
Roma

Responsabile Scientifico
Giovanni ANTONINI

Linea di Ricerca

STUDIO DELLA CORRELAZIONE STRUTTURA-FUNZIONE DI ENZIMI CON POTENZIALI APPLICAZIONI IN BIOTECNOLOGIA

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Giovanni ANTONINI	PO	giovanni.antonini@uniroma3.it
-------------------	----	--

Non Aderenti INBB

Angelo D'ARCHIO	RC	darchivio@univaq.it
Giovanna DI NINO	DR	biomol@univaq.it
Manola TURACCHIO	BC	

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Biologia, Università di Roma TRE
e Dipartimento di Biologia di Base ed Applicata, Università di L'Aquila.

Indirizzo Dipartimento di Biologia, Università di Roma TRE, V.le. Marconi 446, 00146 Roma

Telefono 06 55 17 63 29

Fax 06 55 17 63 21

E-mail giovanni.antonini@uniroma3.it

Sezione INBB di appartenenza

Roma "Tor Vergata"

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Caratterizzazione con microscopia elettronica a scansione, con tecniche ISEC ed EPR della accessibilità molecolare e della micro e macro morfologia di nuovi supporti per biocatalizzatori. Studio delle relazioni struttura-funzione dell'enzima glutathione-S-transferasi per l'ottenimento di mutanti ad elevata attività aspecifica e stabilità alla denaturazione.

Risultati ottenuti

Polimeri anfifilici sono stati prodotti con irraggiamento gamma di miscele omogenee di comonomeri idrofilici (idrossi-etil-metacrilato -HEMA) e lipofili (idrossi-propil-metacrilato-HPMA). La irradiazione è stata effettuata dopo avere dissolto i monomeri in acqua e dopo avere raffreddato la soluzione a -70°C per indurre nella matrice la formazione di cavità dovute alla formazione di cristalli di ghiaccio. La cromatografia ISEC (inverse steric exclusion chromatography) della resina rigonfiata in acqua o solvente organico ha dimostrato la presenza di segmenti idrofilici e lipofili nella resina ed ha permesso una determinazione della nano-morfologia e della accessibilità molecolare della resina stessa. Tali dati sono stati confermati con tecniche EPR utilizzando un composto contenente un radicale stabile dell'azoto (2,2,6,6-tetrametil-4-ossido-1-piperidina - TEMPONE). È stato quindi inserito l'enzima lattoperossidasi tramite legame covalente alla matrice. L'enzima ha dimostrato di mantenere la propria attività catalitica e di avere una maggiore resistenza alla denaturazione termica. Inoltre il biocatalizzatore così ottenuto si è dimostrato capace di attività catalitica anche dopo permanenza prolungata in solventi organici. In parallelo sono stati intrapresi studi sulla correlazione struttura funzione dell'enzima glutathione S transferasi. Attraverso lo studio dettagliato della sua attività catalitica e l'uso di mutanti sito-specifici delle diverse isoforme dell'enzima, si sta ottenendo un quadro dettagliato della capacità di catalisi enzimatica e di resistenza alla denaturazione dell'enzima.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

Anna Maria Caccuri, Giovanni Antonini, Paolo Ascenzi, Maria Nicotra, Marzia Nuccetelli, Anna Paola Mazzetti, Giorgio Federici and Giorgio Ricci

Temperature adaptation of Glutathione S Transferase: A case for homotropic regulation of substrate binding
Journal of Biological Chemistry, 274, 19276-19280, 1999

Giuseppina Pitari, Angelo D'Archivio, Luana Di Leandro, Giovanni Antonini, Alberto Panatta, Enzo Tettamanti, Silvestro Dupre' and Francesco Malatesta.

Conformational changes at the active site of pantetheine hydrolase during denaturation by guanidine hydrochloride
Journal of Protein Chemistry, 18, 785-789, 1999

Anna Maria Caccuri, Giovanni Antonini, Philip G. Boards, Michael W. Parker, Maria Nicotra, Mario Lo Bello, Giorgio Federici and Giorgio Ricci
Proton release on binding of glutathione to alpha, mu and delta class glutathione transferases.
Biochemical Journal, 344, 419-425, 1999

Chiara Micaloni, Anna P. Mazzetti, Marzia Nuccetelli, Jamie Rossjohn, William J. McKinstry, Giovanni Antonini, Anna Maria Caccuri, Aaron J. Oakley, Giorgio Federici, Giorgio Ricci, Michael W. Parker and Mario Lo Bello.
Valine 10 may act as driver for product release from the active site of human glutathione transferase P1-1.
Biochemistry. 39:15961-70, 2000

Anna Maria Caccuri, Giovanni Antonini, Philip G. Board, Jack Flanagan, Michael W. Parker, Roberto Paolesse, Paola Turella, Giorgio Federici, Mario Lo Bello and Giorgio Ricci
Human glutathione transferase T2-2 discloses some evolutionary strategy for optimization of substrate binding to the active site of glutathione transferases.
Journal of Biological Chemistry. 276:5427-5431, 2001.

Anna Maria Caccuri, Giovanni Antonini, Philip G. Board, Jack Flanagan, Michael W. Parker, Roberto Paolesse, Paola Turella, Gareth Chelvanayagam and Giorgio Ricci.
Human glutathione transferase T2-2 discloses some evolutionary strategies for optimization of the catalytic activity of glutathione transferases.
Journal of Biological Chemistry. 276:5432-5437, 2001

Anna Maria Caccuri, Giovanni Antonini, Nerino Allocati, Carmine Di Ilio, Francesca De Maria, Federica Innocenti, Michael W. Parker, Michele Masulli, Mario Lo Bello, Paola Turella, Giorgio Federici, Giorgio Ricci.
GSTB1-1 from *Proteus mirabilis*. A snapshot of an enzyme in the evolutionary pathway from a redox enzyme to a conjugating enzyme.
J Biol Chem.;277:18777-18784, 2002

Anna Maria Caccuri, Giovanni Antonini, Nerino Allocati, Carmine Di Ilio, Francesca De Maria, Federica Innocenti, Michael W. Parker, Michele Masulli, Francesca Polizio, Giorgio Federici, Giorgio Ricci.
Properties and utility of the peculiar mixed disulfide in the bacterial glutathione transferase B1-1.
Biochemistry.;41: 4686-93, 2002

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Nei prossimi anni si studieranno modifiche alla matrice per aumentare il suo carattere anfifilico e si valuteranno le possibili applicazioni del biocatalizzatore di I generazione contenente lattoperossidasi nella depurazione biologica di reflui provenienti da industrie. Si procederà inoltre alla realizzazione ed alla caratterizzazione di altri mutanti di glutathione S transferasi che permetta la progettazione di altri mutanti con caratteristiche che ne permettano l'utilizzo in biocatalizzatori per la detossificazione di soluzioni per l'industria farmaceutica.

Collaborazioni internazionali in atto

K. Jerabek, dept. of Chemistry, University of Prague, Czech Republic

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Normale attrezzatura di un laboratorio di Biochimica e di Biologia Molecolare
ISEC
EPR
NMR
Microscopio Elettronico

Parole Chiave

Catalisi enzimatica, catalisi supportata, stabilizzazione di enzimi, lattoperossidasi, Glutathione-S-transferasi, correlazione struttura-funzione di enzimi.

UNITA' DI RICERCA INBB
Pavia

Responsabile Scientifico
Cesare BALDUINI

Linea di Ricerca
MECCANISMI BIOCHIMICI DI CONTROLLO DELLA FUNZIONALITÀ PIASTRINICA

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Cesare BALDUINI	PO	balduini@unipv.it
Mauro TORTI	PA	mtorti@unipv.it

Non Aderenti INBB

Alessandra BERTONI	DR	bioscipa@unipv.it
Ilaria CANOBBIO	BC	ilaria.canobbio@unipv.it
Paolo LOVA	BC	paolo.lova@unipv.it
Simona PAGANINI	DR	simona.paganini@unipv.it
Gianni GUIDETTI	DR	gianni.guidetti@unipv.it
Fabio GRECO	DR	fgreco@unipv.it

Sede Unità di Ricerca

Università degli Studi di Pavia - Dipartimento di Biochimica, Sezione Scienze

Indirizzo Via Bassi n 21 cap 27100-Pavia

Telefono 0382-507236

Fax 0382-507240

E-mail balduini@unipv.it

Sezione INBB di appartenenza

Milano

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

La nostra ricerca attuale è distinta in tre progetti. Il primo studia la trasduzione del segnale in piastrine stimulate con fattore von Willebrand (vWF) ed in particolare focalizza la sua attenzione sul ruolo delle tirosin chinasi durante l'attivazione piastrinica indotta da questo agonista. Il secondo progetto studia le caratteristiche dell'attivazione delle proteine G a basso peso molecolare rap1 e rap2 nelle piastrine, indagando in particolare il ruolo del citoscheletro nell'attivazione. Recentemente abbiamo approfondito l'attivazione della proteina rap1B nelle piastrine umane stimulate mediante diversi agonisti, allo scopo di definirne il pathway di attivazione e analizzarne la funzione cellulare. Il terzo studio è mirato alla comprensione dei meccanismi di adesione delle piastrine alla matrice collagenica ed al piccolo proteoglicano del sottoendotelio decorina ed alla conseguente attivazione piastrinica.

Risultati ottenuti

Il lavoro svolto in questi ultimi anni ha permesso di chiarire i meccanismi di attivazione piastrinica indotti dal vWF. Il legame del vWF al suo recettore è in grado di promuovere l'attivazione piastrinica con conseguente fosforilazione in tirosina di numerose proteine, tra cui il recettore per il frammento cristallizzabile delle IgG (FcγRIIA), le tirosin chinasi Syk, FAK e Pyk2 e l'enzima PLCγ2. Il vWF promuove inoltre la traslocazione al citoscheletro delle proteine G a basso peso molecolare rap1B e rap2B.

La traslocazione delle proteine rap al citoscheletro è stata anche indagata in piastrine stimulate con trombina. Rap2 associa in modo specifico ai filamenti di actina di piastrine aggregate. L'attivazione della proteina rap1B è stata analizzata in piastrine umane stimulate con differenti agonisti utilizzando un saggio di attivazione *in vitro*. Abbiamo dimostrato che l'attivazione di rap1B è mediata dall'attivazione di Gi in modo necessario e sufficiente.

Infine abbiamo studiato il legame tra le piastrine ed il collagene di tipo II, ed utilizzando peptidi ottenuti mediante digestione con CNBr della molecole collagenica, abbiamo identificato le regioni responsabili del legame (peptidi CB8, CB11). Utilizzando un approccio analogo abbiamo dimostrato che le piastrine aderiscono a decorina attraverso il legame con GPIIb/IIIa e con un meccanismo dipendente dagli ioni Mg^{++} . Il legame piastrine-decorina inoltre induce la fosforilazione in tirosina di Syk e PLCγ2.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

- 1) Torti M., Tolnai Festetics E., Bertoni A., Sinigaglia F., Balduini C.
Clustering of Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ Differently Regulates Tyrosine Phosphorylation of pp72syk, PLC γ 2 and pp125FAK in Concanavalin A-stimulated Platelets.
Thromb.Haemost. 81, 124-130, 1999.
- 2) Torti M., Bertoni A., Canobbio I., Sinigaglia F., Balduini C.
Hydrolysis of NADP⁺ by platelet CD38 in the absence of synthesis and degradation of cyclic ADP-ribose 2'-phosphate.
FEBS Lett. 455, 359-363, 1999.
- 3) Torti M., Bertoni A., Canobbio I., Sinigaglia F., Lapetina E.G., Balduini C.
Rap1B and Rap2B Translocation to the Cytoskeleton by von Willebrand Factor Involves Fc γ RII Receptor-mediated Protein Tyrosine Phosphorylation.
J.Biol.Chem. 274 (19), 13690-13697, 1999.
- 4) Torti M., Bertoni A., Canobbio I., Sinigaglia F., Lapetina E.G., Balduini C.
Interaction of the low molecular weight GTP-binding protein Rap2 with the platelet cytoskeleton is mediated by direct binding to the actin filaments.
J.Cell.Biochem. 75, 675-685, 1999.
- 5) Canobbio I., Bertoni A., Lova P., Paganini S., Sinigaglia F., Hirsch E., Balduini C., Torti M.
Platelet activation by von Willebrand Factor requires coordinated signaling through thromboxane A₂ and Fc γ RIIA receptor.
J. Biol.Chem., 276 (28): 26022-9, 2001.
- 6) P. Lova, S. Paganini, F. Sinigaglia, C. Balduini, M. Torti
A G_i dependent pathway is required for activation of the small GTPase Rap1B in human platelets.
J. Biol. Chem. 277 (14): 12009-15, 2002.
- 7) I. Canobbio, P. Lova, F. Sinigaglia, C. Balduini, M. Torti
Proline-rich tyrosine kinase 2 and focal adhesion kinase are involved in different phases of platelet activation by von Willebrand factor
Thrombosis and Haemostasis 87 (3): 509-517, 2002.
- 8) G. Guidetti, A. Bertoni, M. Viola, E. Tira, C. Balduini, M. Torti
The small proteoglycan decorin supports adhesion and activation of human platelets
Blood; 1 Sept 2002, paper in press

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

La ricerca nei prossimi anni continuerà ed amplierà le tre linee guida già descritte. Verrà indagata l'attivazione piastrinica da vWF, si cercherà di definire meglio il ruolo di alcune chinasi nell'attivazione cellulare, in particolare delle MAP chinasi. Verrà inoltre studiato il legame tra il vWF e i componenti della matrice sottoendoteliale, tra cui decorina. L'attivazione delle proteine G rap1B e rap2B verrà studiata sia utilizzando saggi di attivazione in vitro in piastrine stimulate con diversi agonisti, sia utilizzando altri modelli cellulari, tra cui cellule Jurkat e HEL.

Collaborazioni internazionali in atto

Prof. Shattil, Departement of Cell Biology, the Scripps Research Institute, La Jolla, California

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Ultracentrifuga, sfettrorfluorimetro, spettrofotometro, HPLC, FPLC, aggregometro

Parole Chiave

Piastrine - tirosin chinasi - G protein - decorina

UNITA' DI RICERCA INBB
Sassari

Responsabile Scientifico

C. Ombretta BECCIU MAMELI

Linea di Ricerca

STUDIO SULLA POSSIBILITÀ DI APPLICAZIONE DI METODICHE QUANTITATIVE PER LA VALUTAZIONE POSTURALE DEI MUSCOLI DEL TRONCO NELL'UOMO

titolo

Valutazione dell'output vestibolo-spinale attraverso il "sistema per immagini di Moirè".

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

C. Ombretta BECCIU MAMELI	PO	fisiou@ssmain.uniss.it
Marcello A. CARIA	PA	mcaria@ssmain.uniss.it
Francesco MELIS	RU	melis@ssmain.uniss.it

Non Aderenti INBB

Claudio TAVERA	BC	fisiou@ssmain.uniss.it
Giancarlo SANNA	PT	fisiou@ssmain.uniss.it
Andrea MONTI	PT	fisiou@ssmain.uniss.it
Candido F. TAVERA	PT	fisiou@ssmain.uniss.it

Sede Unità di Ricerca

Università degli Studi di Sassari, Facoltà di Medicina e Chirurgia; Dipartimento di Scienze Biomediche, Sezione di Fisiologia Umana

Indirizzo Viale San Pietro 43/B

Telefono 079.228286

Fax 079.228298

E-mail fisiou@ssmain.uniss.it

Sezione INBB di appartenenza

Sassari (GE)

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi e Risultati

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

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

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

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

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

assenza di disturbi di tipo comportamentale durante il trattamento con la sostanza intossicante. Gli esperimenti effettuati consentono di suggerire che l'esplorazione del VOR potrebbe rappresentare un test efficace per la valutazione funzionale del sistema nervoso centrale esposto a bassi livelli di piombo ematico e tessutale.

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

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

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

01. Mameli O., Melis F., Caria M.A., Solinas A., Mameli S., De Riu P.L. - Epileptic discharge of cortical, subcortical and spinal neurons in penicillin induced experimental epilepsy. - Arch. Ital. Biol., 137, 29-46, 1999.
02. Mameli O., Caria M.A., Melis F., Severino C., Solinas A., Mameli P., Mameli S., Padua G., Massarelli G., Pintus A. - Pathological changes in cardio-pulmonary system during experimental epilepsy. - Pflugers Archiv Eur. J. Physiol., 437, R35 (com. 70), 1999.
03. Melis F., Caria M.A., Stanzani S., Russo A., Cataudella T., Palmieri G., Lai L., Milia M., Solinas A., Severino C., Mameli O. - The interpeduncular nucleus as a putative link of olfactory inputs to the hypoglossal nucleus. - Pflugers Archiv Eur. J., Physiol., 438, R20 (com. 70), 1999.
04. Melis F., Caria M.A., Mameli S., Mameli P., Massarelli G., Pintus A., Lai L., Milia M., Solinas A., Severino C., Mameli O. - Autonomic dysfunction as a possible complication in sudden epileptic death. - Physiol. Res., 48, S95, 1999.
05. Caria M.A., Melis F., Stanzani S., Russo A., Cataudella T., Palmieri G., Lai L., Milia M., Solinas A., Severino C., Mameli O. - Electrophysiological and neuroanatomical findings in olfactory-hypoglossal connections. - Physiol. Res., 48, S60, 1999.
06. Mameli O., Melis F., Caria M.A., Solinas A., Milia M., De Riu P.L., Tocco M.G., Ibba A. - A test for early detection of heavy metal neurotoxicity. - 20th Journées Internationales Méditerranéennes (Médecine du Travail), 135, Il Cairo (Egypt) 1999.
07. Mameli O., Melis F., Caria M.A., Solinas A., Severino C., Sanna Randaccio F. - Functional evaluation of CNS activity during exposition at low lead concentrations. - 1st International Conference on "Metals and Brain", from Neurochemistry to Neurodegeneration, 138 (com. P.29), Padova 2000.
08. De Riu P.L., De Riu G., Testa C., Mulas M., Caria M.A., Mameli S., Mameli O. - Disposition of propofol between red blood cells, plasma, brain, and cerebrospinal fluid in rabbits. - Eur. J. Anaesthesiol., 17, 18-22, 2000.
09. Caria M.A., Melis F., Solinas A., Tavera C., Mameli O. - Frequency-dependent LTP/LTD in guinea pig Deiter's nucleus. NeuroReport, 12, 2353-2358, 2001.
10. Mameli O., Caria M.A., Melis F., Mameli P., De Riu P.L., Yahyaoui M., Ouazzani R., Lahjouji F., Ould Cheikh B. - Impairment of cardiac activity during epileptic seizures: a relation to sudden death in epilepsy? - Eur. J. Neurol., vol. 8 (suppl. n.2), 48 (com. 160), Istanbul (Turkey) 2001.
11. Mameli O., Caria M.A., Melis F., Severino C., Tavera C., Mameli P., Mameli S. - Autonomic nervous system activity and life threatening arrhythmias in experimental epilepsy. - Seizure, 4, 269-278, 2001.
12. Mameli O., Caria M.A., Melis F., Solinas A., Tavera C., Ibba A., Tocco M., Flore C., Sanna Randaccio F. - Neurotoxic effect of lead at low concentrations. - Brain Res. Bull., 55, 269-275, 2001.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

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

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

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

Recentissimi esperimenti stanno intanto estendendo all'alluminio le osservazioni precedentemente effettuate sugli effetti dei metalli pesanti a carico del sistema nervoso centrale, in particolare focalizzando l'attenzione sulle modificazioni indotte sulla attività elettrica dei circuiti neuronali del tronco dell'encefalo. Risultati preliminari sembrano correlare le osservazioni elettrofisiologiche alle concentrazioni tessutali encefaliche del metallo.

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

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

Infine, è allo studio nell'uomo la possibilità di applicazione di una nuova tecnica di elaborazione digitale, la quale, per mezzo di un apposito "software", è capace di analizzare le simmetrie posturali dell'individuo. Questa metodica, definita "sistema per immagini di Moirè", è stata recentemente praticata in pazienti scoliotici, ed ha permesso di fornire una valutazione dei differenti gradi di curvatura della colonna vertebrale. In particolare, questa ricerca vorrebbe utilizzare il "sistema di Moirè" per la quantificazione delle variazioni posturali dei muscoli del tronco in seguito alla stimolazione calorica del labirinto. I risultati ottenuti evidenziano la validità del metodo nel fornire una valutazione degli effetti indotti dal riflesso vestibolo-spinale sulla postura dei muscoli del tronco, suggerendo allo stesso tempo una più larga possibilità di impiego in ambito clinico.

Collaborazioni internazionali in atto

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

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

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

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

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

- sistema di registrazione e di stimolazione delle strutture nervose (microelettrodi, microdrive ad avanzamento elettronico, preamplificatori, oscilloscopi, microelettrodi, stimolatori, isolatori di stimolo);

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

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

- un tavolino vestibolare;

- set-up completo di registrazione da fette isolate;

- un laboratorio di Fisiologia Applicata.

Parole Chiave

Riflesso vestibolo-spinale, muscoli del tronco, valutazione posturale, sistema di Moirè, uomo

UNITA' DI RICERCA INBB
Bologna

Responsabile Scientifico
Ferdinando BERSANI

Linea di Ricerca

1. BIOFISICA DELLA MEMORIA E DELL'APPRENDIMENTO
2. BIOELETTROMAGNETISMO

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Ferdinando BERSANI	PA *	bersani@df.unibo.it
Gastone CASTELLANI	RU	gasto@alma.unibo.it

Non Aderenti INBB

Chiara MORANDI	A	
Daniel REMONDINI	BC (post doct)	remondini@df.unibo.it
Pietro MESIRCA	BC *	mesirca@df.unibo.it

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Fisica

Indirizzo, Viale Berti Pichat 6/2-40127 Bologna

Telefono 051 2095122

Fax 051 2095050

E-mail bersani@df.unibo.it

Sezione INBB di appartenenza

Bologna

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

1 - Biofisica della memoria e dell'apprendimento in alcuni sistemi biologici.

Due sistemi che esibiscono in maniera macroscopica caratteristiche di memoria e apprendimento sono il Sistema Nervoso (S.N) e il Sistema Immunitario (S.I.). La capacità, di questi sistemi, di memorizzare ed elaborare informazioni è fondata su meccanismi e molecole in larga misura condivisi ed evolutisi da ancestrali comuni. L'obiettivo principale della ricerca è di convalidare attraverso misure di correnti ioniche la validità di un nostro modello teorico che prevede il ruolo cruciale delle correnti calcio nei fenomeni di plasticità sinaptica neurale e che verosimilmente può estendersi alla memoria immunitaria.

2 - Studio degli effetti biologici dei campi elettromagnetici sia a bassa frequenza (ELF) che ad alta frequenza (RF).

L'attività di ricerca si focalizza soprattutto sugli effetti in vitro in diversi tipi cellulari, in particolare linfociti umani, cardiomiociti di ratto, cellule staminali, neuroni e cellule batteriche. Per ognuno di questi tipi cellulari vengono presi in considerazione diversi target biologici: proliferazione cellulare, ciclo cellulare, fenomeni apoptotici e genotossici, potenziale mitocondriale, analisi dell'espressione di markers di membrana, espressione genica e attività elettrica. Questa ricerca, che richiede competenze diversificate viene attuata un efficace network di collaborazioni.

Risultati ottenuti

1. Modelli matematici e biofisici dell' induzione della memoria nei sistemi immunitario e nervoso.

2. Con le basse frequenze sono stati ottenuti significativi risultati sulla proliferazione cellulare, sulla produzione di citochine e su effetti genotossici utilizzando campi magnetici pulsati a differenti frequenze. Inoltre, utilizzando cellule di cardiomiociti di ratto sono stati osservati effetti sull'espressione genica in particolare sull'espressione del gene della prodinorfina. Per quanto riguarda i campi alternati a 50 Hz non sono stati trovati significativi effetti sugli end-points sopra citati. Riguardo alle alte frequenze gli studi sono in corso (partecipazione a tre progetti europei più un progetto nazionale MURST 5%).

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

1- Ventura C, Maioli M, Pintus G, Gottardi G, Bersani F. Elf-pulsed magnetic fields modulate opioid peptide gene expression in myocardial cells Cardiovasc Res. 2000 Mar;45(4):1054-64

2- Scarfi MR, Lioi MB, Zeni O, Della Noce M, Franceschi C, Bersani F Micronucleus frequency and cell proliferation in human lymphocytes exposed to 50 Hz sinusoidal magnetic fields. Health Phys. 1999 Mar;76(3):244-50

3- G.C.Castellani, N.Intrator, H.Shouval and L.N.Cooper "Solutions of the BCM learning rule in a network of lateral interacting non-linear neurons" Networks :Comput. Neur. Syst. 10 (1999) 111-121

- 4- Castellani GC, Quinlan EM, Cooper LN, Shouval HZ. A biophysical model of bidirectional synaptic plasticity: dependence on AMPA and NMDA receptors. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Oct 23;98(22):12772-7.
- 5- Harel Z. Shouval, Gastone C. Castellani, Brian B. Blais, Luc C. Yeung and Leon N Cooper Converging evidence for a simplified biophysical model of synaptic plasticity accepted on Biological Cybernetics 2002
- 6- D.Remondini, A.Bazzani, C.Franceschi, F.Bersani, E.Verondini, G.C.Castellani Memory and connectivity in immune and neural network models accettato su Advances in Psychology
- 7- D. Remondini, N. Intrator, G. Castellani, F. Bersani, LN Cooper. "Optimal Spontaneous Activity In Neural Network Modeling", accepted on Neurocomputing

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Verificare ed estendere la teoria di cui sopra a tipi cellulari diversi. Analisi delle proprietà dei canali ionici tramite tecniche di Patch Clamp

Proseguire gli studi sugli effetti dei campi elettromagnetici. In particolare, portare a termine i progetti europei REFLEX e CEMFEC e proseguire il progetto europeo da poco iniziato RAMP. Quest'ultimo è un progetto particolarmente impegnativo focalizzato sopra gli effetti dei campi elettromagnetici sulle cellule neuronali.

Collaborazioni internazionali in atto

Collaborazione con Brown University Providence, RI, USA (gruppo del Prof L.N. Cooper) e York University (gruppo del Prof. R. Pearlman) Toronto Canada

Collaborazioni instaurate con i progetti europei

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Setup completo per Patch Clamp e risorse di calcolo.

Dispositivi elettronici per la misura di campi elettromagnetici e per la progettazione e produzione di sistemi espositivi

Parole Chiave

Campi elettromagnetici, effetti biologici, modelli di interazione, memoria, apprendimento, reti neurali

UNITA' DI RICERCA INBB
Parma

Responsabile Scientifico

Saverio BETTUZZI

Linea di Ricerca

RUOLO DELLA CLUSTERINA (SGP-2, TRPM-2, APOJ) E DEI GENI REGOLATORI DEL METABOLISMO DELLE POLIAMMINE NELLA TRASFORMAZIONE NEOPLASTICA E NELLA PROGRESSIONE DEL CANCRO PROSTATICO

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Saverio BETTUZZI	PA	saverio.bettuzzi@unipr.it
Aderenti INBB		
Maria Giovanna TROGLIO	PT	mariagiovanna.troglio@unipr.it
Maurizio SCALTRITI	DR	scaltriti@hotmail.com
Andrea CAPORALI	DR	andrecap72@yahoo.com
Francesca SCORCIONI	DR	cesca71@hotmail.com
Alessandro CACCAMO	BC	stmed19@nemo.cce.unipr.it
Domenico D'ARCA	BC	domdarc@hotmail.com
Giordano PULA	A	G.Pula@bristol.ac.uk

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Medicina Sperimentale,
Sezione di Biochimica, Biochimica Clinica e Biochimica dell'Esercizio Fisico

Indirizzo Via Volturno, 39- 43100 PARMA

Telefono 0521-903803

Fax 0521-903802

E-mail: saverio.bettuzzi@unipr.it

Sezione INBB di appartenenza

Milano

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Comprensione del ruolo biologico della clusterina e delle sue isoforme nel controllo della proliferazione normale e patologica dell'epitelio prostatico. Verifica del ruolo di queste isoforme nel processo di apoptosi. Il modello biologico: la prostata normale o patologica, umana o animale. Gli studi sono condotti comparando in modelli sperimentali *in vitro* (linee cellulari neoplastiche e colture primarie di cellule epiteliali prostatiche umane), *in vivo* (prostata di ratto e topo), transgenici (topi TRAMP che spontaneamente sviluppano il cancro prostatico) e clinici (campioni biotipici di cancro prostatico umano e tessuto benigno provenienti dalla sala chirurgica). I dati sulla clusterina sono integrati e confrontati con lo studio dell'espressione di geni come istone H3 (marcatore specifico della fase S del ciclo cellulare), Gas1 (marcatore specifico della fase di quiescenza cellulare) e dei geni regolatori del metabolismo delle poliammine (ODC, AdoMetDC, SSAT, OAZ). Gli effetti biologici sulla proliferazione, quiescenza o morte cellulare vengono studiati anche in seguito a trasfezione con vettori di espressione o RNA antisense, sia utilizzando modelli di trasfezione transiente che la selezione di cloni ricombinanti stabili.

Risultati ottenuti

In fibroblasti normali umani in coltura primaria sincronizzati la clusterina si accumula nelle cellule quiescenti e diminuisce dopo stimolazione proliferativa. Tutti i geni di regolazione del metabolismo delle poliammine sono soggetti a variazioni coordinate nei livelli di espressione durante il ciclo proliferativo, provocando variazioni della concentrazione intracellulare delle poliammine. Nel cancro prostatico umano gli eventi molecolari precoci che portano alla trasformazione neoplastica coinvolgono l'aumento della biosintesi delle poliammine e dei livelli di mRNA dell'istone H3 e la contemporanea repressione dei geni che controllano negativamente la duplicazione cellulare. Tra questi la clusterina, la cui repressione è indipendente dal grado di differenziamento ed è uno tra gli eventi più precoci nello sviluppo del tumore prostatico.

La sovraespressione di clusterina in cellule epiteliali prostatiche umane immortalizzate con SV-40 induce un rallentamento della progressione nel ciclo cellulare, una diminuita sintesi del DNA, una diminuzione dei livelli di mRNA per l'istone H3, un'aumento dell'mRNA per il Gas1 ed un'inibizione dell'attività ODC, considerato un proto-oncogene coinvolto nei processi di proliferazione e trasformazione neoplastica. Nello stesso modello la manipolazione dell'espressione di ODC, SSAT e OAZ provoca, in funzione del gene la cui espressione viene alterata, modifiche

specifiche della progressione del ciclo cellulare. La simultanea repressione di ODC e induzione di SSAT e OAZ comporta arresto replicativo causato da deplezione di poliammine e modificazione della struttura della cromatina, dimostrando che questi policationi sono richiesti nella proliferazione per il mantenimento della corretta struttura della cromatina nelle varie fasi del ciclo cellulare.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

1. "Coordinate changes of polyamine metabolism regulatory proteins during the cell cycle of normal human dermal fibroblasts" S. Bettuzzi, P. Davalli, S. Astancolle, C. Pinna, R. Roncaglia, F. Boraldi, R. Tiozzo, M. Sharrard and A. Corti FEBS Lett. 446, 18 - 22, 1999 IF 3,720
2. "Clusterin (SGP-2) gene expression is cell cycle dependent in normal human dermal fibroblasts" S. Bettuzzi, S. Astancolle, G. Guidetti, M. Moretti, R. Tiozzo and A. Corti FEBS Lett. 448, 297- 300, 1999 IF 3,720
3. "Tumor progression is accompanied by significant changes in the levels of expression of polyamine metabolism regulatory genes and clusterin (SGP-2) in human prostate cancer specimens" S. Bettuzzi, P. Davalli, S. Astancolle, C. Carani, B. Madeo, A. Tampieri and A. Corti Cancer Research 60, 28-34, 2000 IF 8,460
4. "Increased levels of clusterin (SGP-2) mRNA and protein accompany rat ventral prostate involution following finasteride treatment" S. Astancolle, G. Guidetti, C. Pinna, A. Corti and S. Bettuzzi J. Endocrinol. 167, 199-206, 2000. IF 2,663
5. "Differential induction of spermidine/spermine N1-acetyltransferase activity in cisplatin-sensitive and -resistant ovarian cancer cells in response to N1,N12-bis(ethyl)spermine involves transcriptional and post-transcriptional regulation" G. Marverti, S. Bettuzzi, S. Astancolle, C. Pinna, M.G. Monti and M.S. Moruzzi Eur. J. of Cancer 37, 281-289, 2001 IF 2,537
6. "Manipulation of the expression of regulatory proteins of polyamine metabolism results in specific alterations of the cell cycle progression" F. Scorcioni, A. Corti, P. Davalli, S. Astancolle and S. Bettuzzi. Biochem. J. 354, 217-223, 2001 IF 4,349
7. "Androgen responsiveness and intrarenal localization of transcripts coding for the enzymes of polyamine metabolism in the mouse" S. Bettuzzi, P. Stocchi, P. Davalli, M. Marinelli, L. Furci and A. Corti. Biochem. Cell Biol. 79, 133-140, 2001 IF 1,268
8. "Clusterin (SGP-2) transient overexpression decreases proliferation rate of sv40-immortalised human prostate epithelial cells by slowing down cell cycle progression" S. Bettuzzi, F. Scorcioni, S. Astancolle, P. Davalli, M. Scaltriti and A. Corti. Oncogene 21, 4328-4334, 2002 IF 6,490
9. "Estrogens, but not androgens, regulate expression and functional activity of oxytocin receptor in rabbit epididymis" S. Filippi, M. Luconi, S. Granchi, L. Vignozzi, S. Bettuzzi, P. Tozzi, F. Ledda, G. Forti and M. Maggi. Endocrinology, in press IF 4,790

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Definizione del ruolo biologico della clusterina (SGP-2) sul controllo della proliferazione nella prostata a confronto con altri marcatori noti implicati nella progressione della malattia e con i geni che regolano il metabolismo delle poliammine. Individuazione della cascata molecolare di attivazione genica prodotta dalla clusterina. Studio del suo ruolo biologico nel controllo della proliferazione e nella trasformazione delle cellule epiteliali prostatiche. Caratterizzazione delle isoforme della clusterina mediante anticorpi policlonali purificati diretti contro epitopi specifici e contro domini funzionali putativi. Definizione del profilo di espressione che caratterizza l'inizio e la progressione del cancro prostatico, la sua prognosi e la risposta terapeutica.

Collaborazioni internazionali in atto

Prof. Norman J. Maitland - YCR Cancer Research Unit, Department of Biology, University of York, PO Box 373, York YO1 5YW, U.K. E-mail: njm9@york.ac.uk - Keywords: prostate cancer; microsatellite markers; LOH; androgen receptor; prostate epithelial cell lines.

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Laboratorio di Culture Cellulari, Culture Primarie
Laboratorio di Biologia Molecolare
Laboratorio di Biochimica
Accesso a Citofluorimetro
Accesso a Microscopio Confocale
Accesso a Microscopio a Fluorescenza

Parole Chiave

Clusterin; Poliammine; Ornithine Decarboxylase; Prostate Cancer; Gene Expression; Transfection; prostate epithelial cells; cell cycle.

UNITA' DI RICERCA INBB
Napoli

Responsabile Scientifico

Ettore BISMUTO

Linea di Ricerca

EFFETTI DI FATTORI CHIMICO-FISICI QUALI PH, MEZZO DI SOLVATAZIONE E/O DI IMMOBILIZZAZIONE E CAMPI ELETTROMAGNETICI SULLA DINAMICA MOLECOLARE DI STRUTTURE PROTEICHE E CONSEGUENTI IMPLICAZIONI FUNZIONALI

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Ettore BISMUTO

PA*

ettore.bismuto@unina2.it

Non Aderenti INBB

Fabrizio MANCINELLI

DR*

fabrizio_mancinelli@libero.it

Roberto NUCCI

Dirigente Ricerca C.N.R.*

nucci@dafne.ibpe.na.cnr.it

Ferdinando FEBBRAIO

Ricercatore I livello C.N.R.*

febbraio@dafne.ibpe.na.cnr.it

Sede Unità di Ricerca

Seconda Università degli Studi di Napoli - Dipartimento di Biochimica e Biofisica "F. Cedrangolo"

Indirizzo: Via Costantinopoli, 16 – 80138 Napoli

Tel. 081 5667635 – 5667584 - 0815665855

Fax 081 5665863

Sezione INBB di appartenenza

Napoli

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

L'attività svolta ha riguardato la dipendenza della dinamica conformazionale di proteine da perturbazioni indotte mediante alterazioni delle proprietà del solvente o dopo immobilizzazione in gel di agarosio. Nell'ultimo anno è stato svolto un esteso studio sperimentale rivolto alla ricerca di effetti non termici indotti da radiazioni nella regione delle microne sulla struttura della mioglobina di tonno, quale modello di struttura proteica. Infatti, l'enorme espansione della telefonia mobile ha stimolato un ampio dibattito nella comunità scientifica circa potenziali danni indotti dalle radiazioni nella regione delle microne. La nostra investigazione sperimentale si è avvalsa oltre che di tecniche spettroscopiche classiche di assorbimento e di ciroismo circolare anche di tecniche avanzate quali la fluorescenza risolta nel dominio della frequenza, risonanza elettronica paramagnetica (EPR) e la spettroscopia correlativa di fluorescenza (FCS) in grado di fornire indicazioni strutturali e funzionali di proteine al livello di singola molecola.

Risultati :

I principali risultati ottenuti sono così schematizzabili:

- L'esame del decadimento emissivo e dei dati EPR della b-glicosidasi da *S. solfataricus*, un enzima ipertermofilo ha consentito di evidenziare le regioni strutturali a valenza funzionale da quelle con compiti più di termostabilizzazione. E' stato definito, inoltre, un modello, generalizzabile ad altre proteine multitriptofaniche, per predire il tipo di decadimento emissivo dei triptofani nella b-glicosidasi da *S. solfataricus* da dati di simulazione dinamica.
- Lo studio della funzione di autocorrelazione del complesso dell' apomioglobina con una sonda fluorescente del sito emineico quale l'1, 8- anilino naftalene solforato (ANS) ha consentito di valutare le costanti cinetiche di ingresso e di uscita dell' ANS dalla tasca emineica al livello di singola molecola di proteina.
- La ridotta mobilità conformazionale osservata in proteine immobilizzate in gel di agarosio, sia in condizioni native sia in condizioni di pH acido in cui prevale la presenza di stati strutturali intermedi, è stata messa in relazione con gli ambienti altamente confinati esistenti nell'interno cellulare.
- misure di ciroismo circolare e di assorbimento su campioni di mioglobina (solubilizzati in tampone fisiologico) esposti e non all'azione del campo EM non mostrano sostanziali differenze. Inoltre, le caratteristiche spettroscopiche del complesso carbossimioglobinico non appaiono essere influenzate dalla presenza del campo a microonde. La dinamica conformazionale della apomioglobina, dedotta dall'esame del decadimento emissivo della fluorescenza intrinseca, non appare essere influenzato dalla presenza del campo a microonde come dedotto dal confronto con un campione proteico analogo non esposto e nelle stesse condizioni di temperatura.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

Bismuto E, D'Ambrosio G, Mancinelli F, Massa R. (2002). *Molecular Investigation on wireless microwave systems*. 2th International Workshop on Biological Effects of Electromagnetic Fields. Rhodes Island, Greece

Lozinsky E, Febbraio F, Shames A I, Likhtenshtein G I, Bismuto E and Nucci R (2002). *Heterogeneity in the structural dynamics of *Sulfolobus solfataricus* β -glycosidase revealed by electron paramagnetic resonance and frequency domain fluorometry*. **PROTEIN SCIENCE**, in press.

Briante R, Patumi M, Terenziani S, Bismuto E, Febbraio F, Nucci R. (2002) *Olea europea L. Leaf Extract and derivatives: antioxidant properties*. **J. AGRIC. FOOD CHEM.** In press.

Bismuto E, Martelli P L, De Maio A, Mita D, Irace G, Casadio R (2002). *The effect of molecular confinement on internal enzyme dynamics: frequency domain fluorometry and molecular dynamics simulation studies*. **BIOPOLYMERS** **63**: 310-315.

Bismuto E, Irace G (2001). *The effect of molecular confinement on the conformational dynamics of the native and partly folded states of apomyoglobin*. **FEBS LETTERS** **509**: 476-480.

Bismuto E, Gratton E, Lamb D (2001). *The dynamics of ANS binding to tuna apomyoglobin measured with fluorescence correlation spectroscopy*. **BIOPHYSICAL JOURNAL** **81**: 3510-3521.

Bismuto E, Sirangelo I, Irace G (2001). *Fluorescence studies on partly folded apomyoglobin intermediates by the extrinsic fluorescent probe 1-anilino-8-naphthalene sulfonate (ANS)*. **RECENT RES DEVEL PHOTOCHEM & PHOTOBIOLOG** **5**: 29-39.

Bismuto E, Martelli P L, Casadio R, Irace G (2000). *Tryptophanyl fluorescence lifetime distribution of hyperthermophilic β -glycosidase from molecular dynamics simulation: a comparison with the experimental data*. **PROTEIN SCIENCE** **9** : 1730-1742.

Bismuto E, Nucci R, Rossi M, Irace G (1999). *Structural and dynamic aspects of β -glycosidase from mesophilic and thermophilic bacteria by multi-tryptophanyl emission decay studies*. **PROTEINS** **35**: 161-172.

Bismuto E, Irace G (1999). *Structural and dynamical properties of the folded state of apomyoglobin under denaturing conditions*. In: **Current topics in peptides proteins research**, ed. Research Trends. Press Trivandrum India.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Proseguiranno le ricerche in corso riguardanti possibili effetti di campi EM, in particolare nella regione di frequenze caratteristica della telefonia mobile, sulle proprietà di dinamica conformazionale e funzionali di proteine. Sarà inoltre investigato l'effetto dei campi EM sul processo di folding e sui processi aggregativi che si verificano nelle proteine in stati strutturali intermedi e che competono con il processo di folding. Tali fenomeni aggregativi che possono verificarsi tra catene polipeptidiche in substati conformazionali che espongono superfici idrofobiche o che posseggono particolari proprietà di affinità potrebbero essere causa di patologie da "misfolding".

Collaborazioni internazionali in atto

Physics Department, University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, Illinois 61801

Department of Biophysics, Universität ULM, D-89081, Germany

Departments of Chemistry and Physics. Ben-Gurion University of the Negev, 84105 Beer- Sheva, Israel.

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Fluorimetro a multifrequenza GREG 200 della ISS (IL, USA)

Fluorimetro statico Perkin-Elmer mod. LS55

Spettrofotometro di assorbimento Jasco mod. V550

Strumentazione di laboratorio di elettronica

Apparecchiature generali del Dipartimento di Biochimica e Biofisica della Seconda Università di Napoli

Parole Chiave

Campi elettromagnetici, microonde, dinamica conformazionale di proteine, fluorimetria nel dominio della frequenza, protein folding, relazione struttura-funzione di proteine.

UNITA' DI RICERCA INBB
Roma

Responsabile Scientifico
Francesco BOSSA

Linea di Ricerca
VERSATILITÀ CATALITICA DI ENZIMI PIRIDOSSAL FOSFATO-DIPENDENTI

Composizione del Gruppo
Non Aderenti INBB

Stefano PASCARELLA	PO	stefano.pascarella@uniroma1.it
Daniela DE BIASE	PA	debiase@caspur.it
Sebastiana ANGELACCIO	RU	sebastiana.angelaccio@uniroma1.it
Roberto CONTESTABILE	RU	roberto.contestabile@uniroma1.it
Martino DI SALVO	RU	martino.disalvo@uniroma1.it
Angela TRAMONTI	R CNR	angela.tramonti@uniroma1.it
Giulio GIANESE	BC	giulio.gianese@uniroma1.it
Simona D'AGUANNO	DR	simona.daguanno@uniroma1.it
Alessandro PAIARDINI	DR	paiardin@haydn.bio.uniroma1.it

Sede Unità di Ricerca
Dipartimento di Scienze Biochimiche - Università La Sapienza

Indirizzo: Piazzale Aldo Moro 5, 00185 Roma
Telefono 06 4456663
Fax 06 4440062
E-mail francesco.bossa@uniroma1.it

Sezione INBB di appartenenza
Roma Tor Vergata

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Sviluppo di un modello sperimentale per lo studio del meccanismo di deamidazione dei residui di asparagina. A corollario di questo obiettivo, il nostro gruppo di ricerca si è proposto di acquisire, mantenere e sviluppare metodologie e apparecchiature avanzate per la chimica delle proteine.

Sviluppo di metodologie bioinformatiche.

Studio del meccanismo catalitico dell'SHMT e della glutamato decarbossilasi (GAD) tramite analisi della struttura cristallografica e mutagenesi sito-specifica.

Progettazione e sperimentazione di inibitori suicidi della glutamato 1-semialdeide aminomutasi (GSAM), un potenziale bersaglio di composti ad azione antibatterica.

Espressione ricombinante della GABA-aminotrasferasi (GABA-AT) umana e analisi cristallografica della GABA-AT di maiale.

Risultati ottenuti

E' stato determinato il meccanismo di deamidazione dell'SHMT da fegato di coniglio, espressa come proteina ricombinante in *E. coli*.

Sono stati sviluppati metodi per la determinazione della chiralità di residui aminoacidici all'interno di catene polipeptidiche.

E' stato descritto un metodo per la predizione dello stato di accessibilità al solvente di un sito in un allineamento multiplo di sequenze proteiche. La tecnica, resa disponibile per la comunità scientifica, raggiunge la stessa accuratezza di metodi molto più complessi, ed è utile per i ricercatori interessati alla progettazione di proteine.

E' stato costruito un modello per la struttura tridimensionale della SHMT, basandosi sulle omologie di sequenza con altri enzimi PLP-dipendenti.

E' stato determinato il ruolo di alcuni residui nel meccanismo catalitico dell'SHMT e della GAD di *E. coli*.

Sono stati progettati potenziali inibitori suicidi della GSAM. Le reazioni di entrambi gli enantiomeri del 2,3-diaminopropanolo solfato sono state caratterizzate in modo soddisfacente; solo l'enantiomero R inattiva l'enzima.

La GABA-AT umana è stata espressa e purificata utilizzando colture di cellule d'insetto trasfettate con baculovirus contenente il gene dell'enzima.

La risoluzione della struttura della GABA-AT di fegato di maiale ha permesso di evidenziare la presenza di un centro 2Fe-2S all'interfaccia del dimero. L'evidenza cristallografica è stata da noi confermata con saggi chimici e misurazioni di assorbimento atomico.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

- 1) di Salvo, M.L., Delle Fratte, S., Maras, B., Bossa, F., Wright, H.T. and Schirch, V. (1999) Deamidation of asparagine residues in a recombinant serine hydroxymethyltransferase. *Arch. Biochem. Biophys.* 372, 271-279.
- 2) De Biase, D., Tramonti, A., Bossa, F. and Visca, P. (1999) The response to stationary-phase stress conditions in *Escherichia coli*: role and regulation of the glutamic acid decarboxylase system. *Mol. Microbiol.* 32, 1198-1211.
- 3) Storici, P., Capitani, G., De Biase, D., Moser, M., John, R.A., Jansonius, J.N. and Schirmer, T. (1999) Crystal structure of GABA-aminotransferase, a target for antiepileptic drug therapy. *Biochemistry* 38, 8628-8634.
- 4) Musayev, F.N., Safo, M.K., Di Salvo, M.L., Schirch, V. and Abraham, D.J. (1999) Crystallization and preliminary x-ray crystallographic analysis of pyridoxine 5'-phosphate oxidase complexed with flavin mononucleotide. *Struct. Biol.* 127, 88-91.
- 5) Contestabile, R., Angelaccio, S., Maytum, R., Bossa, F. and John, R.A. (2000) The contribution of a conformationally mobile active site loop to the reaction catalyzed by glutamate semialdehyde aminomutase. *J. Biol. Chem.* 275, 3879-3886.
- 6) Tramonti, A., Visca, P., Bossa, F. and De Biase, D. (2000) Environmental stimuli and regulatory factors affecting the expression of the glutamic acid decarboxylase system in *Escherichia coli*. In *Biochemistry of Vitamin B6 and PQQ* (A. Iriarte, H.M. Kagan and M. Martinez-Carrion, eds.) Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 41-46.
- 7) Contestabile, R., Jenn, T., Akhtar, M., Gani, D. and John, R.A. (2000) Reaction of glutamate 1-semialdehyde aminomutase with R- and S-enantiomers of a novel, mechanism-based inhibitor, 2,3-diaminopropyl sulphate. *Biochemistry* 39, 3091-3096.
- 8) Contestabile, R., Angelaccio, S., Bossa, F., Wright, H.T., Scarsdale, N., Kazanina, G. and Schirch, V. (2000) Role of tyrosine 65 in the mechanism of serine hydroxymethyl transferase. *Biochemistry* 39, 7492-7500.
- 9) Marabotti, A., De Biase, D., Tramonti, A., Bettati, S. and Mozzarelli A. (2001) Allosteric communication of tryptophan synthase. Functional and regulatory properties of the beta S178P mutant. *J. Biol. Chem.* 276 17747-17753.
- 10) Gianese, G., Argos, P. and Pascarella, P. (2001) Structural adaptation of enzymes to low temperatures. *Protein Eng.* 14, 141-148.
- 11) Contestabile, R., Paiardini, A., Pascarella, S., di Salvo, M.L., D'Aguzzo, S. and Bossa, F. (2001) L-threonine aldolase, serine hydroxymethyltransferase and fungal alanine racemase. A subgroup of strictly related enzymes specialized for different functions. *Eur. J. Biochem.* 268, 6508-6525.
- 12) Scaloni, A., Simmaco, M. and Bossa, F. (2002) D-amino acid analysis. *Methods in Molecular Biology* 211, in corso di stampa.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Lo scopo delle ricerche future è quello di confrontarsi con alcune problematiche generali che riguardano la catalisi enzimatica e la struttura delle proteine, attraverso lo studio di vari enzimi dipendenti dal piridossale 5'-fosfato ed aventi distinte specificità catalitiche. Particolare attenzione verrà rivolta alle relazioni evolutive ed alle basi strutturali dell'adattamento a condizioni estreme. In particolare, l'enorme massa di dati strutturali resa recentemente disponibile dalla risoluzione di numerose strutture cristallografiche e dal sequenziamento di interi genomi verrà utilizzata, sfruttando la sinergia tra l'approccio bioinformatico/ computazionale e quello sperimentale, per affrontare le problematiche proposte.

Collaborazioni internazionali in atto

Prof. Robert A. John
Cardiff School of Biosciences
University of Wales
Cardiff
UK

Prof. Verne Schirch
Department of Biochemistry and Molecular Biophysics
and Institute for Structural Biology and Drug Discovery
Virginia Commonwealth University
Richmond, Virginia 23298
USA

Prof. Tilman Schirmer
Division of Structural Biology
Biozentrum
University of Basel
CH-4056, Basel
Switzerland

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Sequenziatore di proteine perkin-elmer ab476a
Spettrofotometro a fotodiodi hewlett-packard 8452 diode array
Spettrometro di massa finnigan lcq
Spettrometro di massa maldi-tof
Tre stazioni grafiche silicon graphics corredate di software per il modellamento e la simulazione di macromolecole

Parole Chiave

piridossale-5'-fosfato, catalisi enzimatica, evoluzione molecolare, mutagenesi sito-specifica, bioinformatica, modellamento molecolare, inibizione enzimatica, interazioni tra macromolecole

UNITA' DI RICERCA INBB
Bari

Responsabile Scientifico
Giuseppe CALAMITA

Linea di Ricerca
CANALI PER L'ACQUA TRANSMEMBRANALI (ACQUAPORINE)

titolo

Definizione della distribuzione tissutale, regolazione e ruolo fisiologico e fisiopatologico dei canali per l'acqua acquaporine

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Calamita Giuseppe	PA	Calamita@biologia.uniba.it
Svelto Maria	PO	Svelto@biologia.uniba.it

Non Aderenti INBB

Mazzone Amelia	DR	Mazzone@biologia.uniba.it
Cassano Grazia	DR	Gr.cassano@biologia.uniba.it
Anna Patrizia Gena	BC	Genapa@libero.it

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Fisiologia Generale e Ambientale, Università degli Studi di Bari

Indirizzo via Amendola, 165/A

Telefono 0805442928/2453

Fax 0805443388

E-mail calamita@biologia.uniba.it

Sezione INBB di appartenenza

Bari

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

- 1) Definizione della distribuzione tissutale del canale per l'acqua acquaporina-8 (AQP8) nei mammiferi
- 2) Definizione dei meccanismi di regolazione di AQP8 a livello genico e di proteina
- 3) Definizione del ruolo fisiologico e fisio-patologico di AQP8 negli apparati gastroenterico e riproduttivo maschile
- 4) Definizione del percorso filogenetico della famiglia delle acquaporine

Risultati ottenuti

- 1) Caratterizzazione della localizzazione cellulare e subcellulare di AQP8 negli apparati gastroenterico e riproduttivo maschile
- 2) Caratterizzazione genomica e proteica di AQP8
- 3) Caratterizzazione del percorso filogenetico di AQP8 nell'ambito della superfamiglia delle MIP e nella famiglia delle acquaporine

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

- 1) Portincasa P., A. Moschetta, G. Calamita, A. Margari and G. Palasciano. Visualization of AqpZ-mediated water permeability in *Escherichia coli* by cryoelectron microscopy. *Current Drug Target- Immune, Endocrine & Metabolic Disorders*, in press, 2002.
- 2) Gouraud S., A. Laera, G. Calamita, M. Carmosino, O. Rossetto, W. Rosenthal, M. Svelto, G. Valenti. Requirement for VAMP/synaptobrevin-2 in cAMP-stimulated aquaporin 2 translocation in renal collecting duct cells. *J. Cell Sciences*, accepted for publication, 2002.
- 3) Calamita G., A. Mazzone, A. Bizzoca, A. and M. Svelto. Possible involvement of aquaporin-7 and 8 in rat testis development and spermatogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 288: 619-625, 2001.
- 4) Calamita G., A. Mazzone, A. Bizzoca, A. Cavalier, G. Cassano, D. Thomas and M. Svelto. Expression and immunolocalization of the aquaporin-8 water channel in rat gastrointestinal tract. *Eur. J. Cell Biol.*, 80: 711-719, 2001.
- 5) Calamita G., A. Mazzone, Y.S. Cho, G. Valenti and M. Svelto. Expression and localization of the aquaporin-8 water channel in rat testis. *Biology of Reproduction*, 64: 1660-1666, 2001.

- 6) Calamita G.. The microbial *Escherichia coli* Aquaporin-Z water channel. Structural, functional and physiological properties. In “*Molecular Biology and Physiology of Water and Solute Transport*” Edited by S. Nielsen and S. Hohmann. Kluwer Ed., 375-382, 2000. (book chapter)
- 7) Calamita G.. The *Escherichia coli* Aquaporin-Z water channel. *Mol. Microbiol.*, 37(2): 254-262, 2000.
- 8) Kayingo G., R. Bill, G. Calamita, S. Hohmann and B. Prior. Microbial water and glycerol channels. In “*Aquaporins*” Edited by P. Agre, S. Nielsen and S. Hohmann, Academic Press, 51: 335-370, 2000. (book chapter)
- 9) Calamita G.. Understanding microbial MIP channels *Trends in Microbiology*, 8(3): 104-105, 2000.
- 10) Calamita G., C. Spalluto, A. Mazzone, M. Rocchi and M. Svelto. Cloning, structural organization and chromosomal localization of the mouse *Aquaporin-8* water channel gene. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 84: 237-241, 1999.
- 11) Viggiano L., M. Rocchi, M. Svelto and G. Calamita. Assignment of the *Aquaporin-8* (AQP8) water channel gene to human chromosome 16p12. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 84: 208-210, 1999.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

- 1) generazione di topi transgenici knockout AQP8-
- 2) definizione del ruolo fisiologico e fisio-patologico di AQP8
- 3) definizione della regolazione genica e post-traduzionale di AQP8

Collaborazioni internazionali in atto

- 1) Prof. Nicholas F. LaRusso, The Center for Basic Research in Digestive Diseases, Div. Gastroenterology and Hepatology, Mayo Medical School, Rochester, MN, USA
- 2) Prof. Christian Delamarche, Service Canaux et Récepteurs Membranaires, Université de Rennes I, Rennes, France
- 3) Prof. Rex A. Hess, Dept. Veterinary Biosciences, University of Illinois, Urbana, IL, USA

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

- 1) Microscopio a fluorescenza con sistema a telecamera digitale;
- 2) Fluorimetro;
- 3) Stopped-flow device
- 4) Termociclatore

Parole Chiave

Trasporto d'acqua; canali per l'acqua; acquaporine; apparato gastroenterico, apparato riproduttivo maschile; tratto epatobiliare; spermatogenesi; filogenesi.

UNITA' DI RICERCA INBB
Catania

Responsabile Scientifico

Antonio CAMBRIA

Linea di Ricerca

- 1) ESTRAZIONE E PURIFICAZIONE DI ENZIMI PER POSSIBILI APPLICAZIONI BIOTECNOLOGICHE
- 2) MECCANISMO DI AZIONE DI ALCUNI INIBITORI DELLE MONOAMMINOOSSIDASI (MAO)

titolo

- 1) Costruzione di un biosensore amperometrico enzimatico per l'ambiente utilizzando l'enzima laccasi.
- 2) Relazione tra struttura e funzione di alcuni inibitori reversibili delle MAO

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Cambria Antonio	PO	cambrian@mbox.unict.it
-----------------	----	------------------------

Cambria Maria Teresa	RU	cambrimt@mbox.unict.it
----------------------	----	------------------------

Non Aderenti INBB

Ragusa Santa	Post Doc	sragusa@dipchi.unict.it
--------------	----------	-------------------------

Pontorno Valentina	DR	
--------------------	----	--

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Scienze Chimiche – Sezione di Biochimica – Università di Catania

Indirizzo: Viale A. Doria n° 6, 95125 Catania

Telefono: 095-7384242 e 095-337195

Fax: 095-337036

E-mail cambrian@mbox.unict.it

Sezione INBB di appartenenza

Catania

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

- 1) Azione di alcuni tiazolo derivati come inibitori della monoaminossidasi
- 2) Struttura e funzione di superossidodismutasi vegetali e batteriche
- 3) Interazioni molecolari in modelli di vescicole fosfolipidiche
- 4) Meccanismo di inibizione e sito di legame di alcuni antagonisti del recettore metabotropico del glutammato
- 5) Interazione del glucosio con l'insulina
- 6) Purificazione e caratterizzazione di una laccasi fungina

Risultati ottenuti

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

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

- 1) Cambria A., Raudino A., Geronikaki A., Buemi G., Raciti G., Mazzone P., Guccione S., Ragusa S. Thiazole derivatives as inhibitors of purified bovine liver mitochondrial monoamine oxidase-B: structure-activity relationships and theoretical study. *J. Enzyme Inhibition*, 14, 307-321, 1999.
- 2) Cambria M.T., Cambria A., Ragusa S., Rizzarelli E. Production, purification and properties of an extracellular laccase from *Rigidoporus Lignosus*. *Protein Expression and purification*, 29, 141-147, 2000.
- 3) Pagano A., Ruegg D., Litschig S., Stoher N., Stierlin C., Heinrich M., Floersheim P., Prezeau L., Carroll F., Pin JP., Cambria A., Vranesic I., Flor Pj., Gasparini F., Kuhn R. The non-competitive antagonist 2-methyl-6-(phenylethynil) pyridine and 7-hydroxyiminocyclopropan [b] chromen-1a-carboxylic acid ethyl ester interact with overlapping binding pockets in the transmembrane region of group I metabotropic glutamate receptors. *J.Biol.Chem.* 275, 33750-33758, 2000.
- 4) Raudino A., Cambria A., Sarpietro M.G., Satriano C. Binding of lipid vesicles to protein-coated solid polymer surface: a model for cell adhesion to artificial biocompatible materials. *J.Colloid Interface Sci.*, 231, 66-73, 2000.
- 5) Falconi M., Bozzi M., Paci M., Raudino A., Purrello R., Cambria A., Sette M., Cambria M.T. Insulin monomer-glucose interaction : spectroscopic investigation and molecular modelling studies. *Int.J.Biol.Macromol.*, 29, 161-168, 2001.
- 6) Falconi M., Cambria M.T., Cambria A., Desideri A. Structure and stability of the insulin dimer investigated by molecular dynamics simulation. *J.Biomol.Struct.& Dinamics*, 18, 761-772, 2001.

- 7) Ragusa S., Cambria M.T., Scarpa M., Di Paolo M.L., Falconi M., Rigo A., Cambria A. Properties of purified cytosolic isoenzyme I of Cu,Zn-superoxide dismutase from *Nicotiana Plumbaginifolia* leaves. *Protein Expression and Purification*, 23, 261-269, 2001.
- 8) Scirè A., Saccucci F., Bertoli E., Cambria M.T., Principato Giovanni, D'auria S., Tanfani F. Effect of acidic Phospholipids on the structural properties of recombinant cytosolic human glioxalase II. *Proteins*, 48(1), 126-133, 2002.
- 9) Ragusa S., Cambria M.T., Pierfederici F., Scirè A., Bertoli E., Tanfani F., Cambria A. Structure-activity relationship on fungal laccase from *Rigidoporus Lignosus*: a Fourier Transform infrared spectroscopic study. Submitted (2002).

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Il programma di ricerca per i prossimi tre anni, sarà indirizzato:

- a) allo studio del meccanismo di azione di alcuni inibitori delle MAO;
- b) alla utilizzazione della laccasi purificata per possibili applicazioni biotecnologiche

Collaborazioni internazionali in atto

University of St. Andrews, School of Biology.

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

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

Parole Chiave

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

UNITA' DI RICERCA INBB
Verona

Responsabile Scientifico

Alberto CANGIANO

Linea di Ricerca

NEUROBIOLOGIA DELLO SVILUPPO. INTERAZIONI TROFICHE NEL SISTEMA-NEUROMUSCOLARE. DEGENERAZIONE E RIGENERAZIONE NEL SISTEMA NERVOSO.

titolo

Plasticita' sinaptica attivita'-dipendente durante lo sviluppo delle connessioni nervose.

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Alberto CANGIANO	PO	alberto.cangiano@univr.it
------------------	----	---------------------------

Non Aderenti INBB

Mario BUFFELLI	RU	mario.buffelli@univr.it
Giuseppe BUSETTO	RU	giuseppe.busetto@univr.it
Morgana. FAVERO	DR	morgana.favero@univr.it
Carlo BIDOIA	DR	carlo.bidoia@univr.it

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Scienze Neurologiche e della Visione, Sezione di Fisiologia

Indirizzo Strada Le Grazie 8, 37134 VERONA

Telefono 045-8027150

Fax 045-580881

E-mail alberto.cangiano@univr.it

Sezione INBB di appartenenza

Udine

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Gli obiettivi perseguiti dall'Unità consistono nel chiarire i meccanismi della competizione ed eliminazione sinaptica durante lo sviluppo delle connessioni neuromuscolari ed in particolare il ruolo che gioca l'attività di potenziali d'azione dei motoneuroni. E' noto infatti che l'eliminazione sinaptica, scoperta negli anni 70' proprio nella giunzione neuromuscolare e poi trovata essere un fenomeno diffuso in tutto il sistema nervoso inclusa la corteccia cerebrale, e' uno dei piu' importanti processi di rimodellamento e raffinamento delle connessioni nervose durante lo sviluppo non solo embrionario ma anche post-natale. Non e' chiaro tuttavia il ruolo giocato dall'attività di potenziali d'azione e quello dovuto a meccanismi chimici quali ad esempio le neurotrofine.

Risultati ottenuti

Abbiamo dimostrato l'importanza dell'attività elettrica dei motoneuroni nel controllo della competizione ed eliminazione sinaptica nel sistema neuromuscolare, attraverso esperimenti di sostituzione dell'attività normalmente asincrona, con una sincrona, mediante stimolazione elettrica degli assoni motori durante la neosinaptogenesi nel muscolo scheletrico di ratto adulto. I nostri risultati dimostrano che l'attività sincrona degli input in competizione tra di loro su ogni data fibra muscolare, inibiscono profondamente l'eliminazione sinaptica.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

- Busetto G., Buffelli M., Tognana E., Bellico F., Cangiano A. (2000). Hebbian mechanisms revealed by electrical stimulation at developing rat neuromuscular junctions. JOURNAL OF NEUROSCIENCE, 20, 685-695.
- Buffelli M., Pasino E., Cangiano A. (2001). In vivo acetylcholine receptor expression induced by calcitonin gene-related peptide in rat soleus muscle. NEUROSCIENCE, 104: 561-567.
- Buffelli M., Busetto G., Cangiano A. (2001). The use of in vivo direct drug application to assess neural regulation of muscle properties. JOURNAL OF NEUROSCIENCE METHODS, 106: 113-120.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

L'obiettivo principale e' quello di sviluppare preparati sperimentali nel ratto in vivo, che consentano di studiare il ruolo dell'attività asincrona dei motoneuroni nell'attivare il processo di competizione sinaptica, e quindi quello di eliminazione, durante la formazione delle sinapsi, in particolare di determinare il valore della finestra temporale critica tra potenziali d'azione di input diversi convergenti su una stessa cellula bersaglio muscolare.

Collaborazioni internazionali in atto

- Prof. Ellis Cooper, Department of Physiology, McGill University, Montreal, Canada

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

2 Unità elettrofisiologiche complete, per lo studio extra-, intra-cellulare e mediante patch clamp delle cellule eccitabili, neuroni e fibre muscolari.

Apparati microscopici per lo studio e la quantificazione mediante fluorescenza, anche confocale, delle sinapsi in corso di sviluppo.

Parole Chiave

Plasticità sinaptica, neurobiologia dello sviluppo, competizione sinaptica, eliminazione sinaptica, sinaptogenesi, rigenerazione nervosa, sistema neuromuscolare, interazioni trofiche

UNITA' DI RICERCA INBB
Sassari

Responsabile Scientifico

Marcello A. CARIA

Linea di Ricerca

CONTROLLO POSTURALE DEI MUSCOLI DORSALI NELL'UOMO

titolo

Risultanze elettromiografiche a "lungo-termine" dei muscoli paraspinali dell'uomo in seguito a stimolazione calorica del labirinto

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Marcello A. CARIA	PA	mcaria@ssmain.uniss.it
Francesco MELIS	RU	melis@ssmain.uniss.it
C. Ombretta BECCIU MAMELI	PO	fisiou@ssmain.uniss.it

Non Aderenti INBB

Claudio TAVERA	BC	fisiou@ssmain.uniss.it
Giancarlo SANNA	PT	fisiou@ssmain.uniss.it
Andrea MONTI	PT	fisiou@ssmain.uniss.it
Candido F. TAVERA	PT	fisiou@ssmain.uniss.it

Sede Unità di Ricerca

Università degli Studi di Sassari, Facoltà di Medicina e Chirurgia; Dipartimento di Scienze Biomediche, Sezione di Fisiologia Umana

Indirizzo Viale San Pietro 43/B

Telefono 079.228286

Fax 079.228298

E-mail fisiou@ssmain.uniss.it

Sezione INBB di appartenenza

Sassari (GE)

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi e Risultati

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

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

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

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

Influenza dei metalli pesanti sulla attività delle aree cerebrali e del tronco dell'encefalo: i risultati ottenuti hanno dimostrato che la somministrazione di acetato di piombo è capace di indurre sicuri effetti neurotossici a livello del sistema nervoso centrale, come testimoniano le alterazioni del riflesso vestibolo-oculare (VOR), riscontrate anche a bassissime concentrazioni della sostanza a livello sia plasmatico che cerebrale. Queste osservazioni, che hanno consentito di individuare il tronco dell'encefalo come un possibile "target" dell'azione del piombo, rendono meno

probabile una possibile influenza del metallo sulle aree del lobo frontale corticale, soprattutto in considerazione della assenza di disturbi di tipo comportamentale durante il trattamento con la sostanza intossicante. Gli esperimenti effettuati consentono di suggerire che l'esplorazione del VOR potrebbe rappresentare un test efficace per la valutazione funzionale del sistema nervoso centrale esposto a bassi livelli di piombo ematico e tessutale.

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

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

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

01. Mameli O., Melis F., Caria M.A., Solinas A., Mameli S., De Riu P.L. - Epileptic discharge of cortical, subcortical and spinal neurons in penicillin induced experimental epilepsy. - Arch. Ital. Biol., 137, 29-46, 1999.
02. Mameli O., Caria M.A., Melis F., Severino C., Solinas A., Mameli P., Mameli S., Padua G., Massarelli G., Pintus A. - Pathological changes in cardio-pulmonary system during experimental epilepsy. - Pflugers Archiv Eur. J. Physiol., 437, R35 (com. 70), 1999.
03. Melis F., Caria M.A., Stanzani S., Russo A., Cataudella T., Palmieri G., Lai L., Milia M., Solinas A., Severino C., Mameli O. - The interpeduncular nucleus as a putative link of olfactory inputs to the hypoglossal nucleus. - Pflugers Archiv Eur. J., Physiol., 438, R20 (com. 70), 1999.
04. Melis F., Caria M.A., Mameli S., Mameli P., Massarelli G., Pintus A., Lai L., Milia M., Solinas A., Severino C., Mameli O. - Autonomic dysfunction as a possible complication in sudden epileptic death. - Physiol. Res., 48, S95, 1999.
05. Caria M.A., Melis F., Stanzani S., Russo A., Cataudella T., Palmieri G., Lai L., Milia M., Solinas A., Severino C., Mameli O. - Electrophysiological and neuroanatomical findings in olfactory-hypoglossal connections. - Physiol. Res., 48, S60, 1999.
06. Mameli O., Melis F., Caria M.A., Solinas A., Milia M., De Riu P.L., Tocco M.G., Ibba A. - A test for early detection of heavy metal neurotoxicity. - 20th Journées Internationales Méditerranéennes (Médecine du Travail), 135, Il Cairo (Egypt) 1999.
07. Mameli O., Melis F., Caria M.A., Solinas A., Severino C., Sanna Randaccio F. - Functional evaluation of CNS activity during exposition at low lead concentrations. - 1st International Conference on "Metals and Brain", from Neurochemistry to Neurodegeneration, 138 (com. P.29), Padova 2000.
08. Melis F., Caria M.A., Solinas A., Severino C., Tavera C., Mameli O. - Electrophysiological features during alcoholic intoxication. - INBB, 4th Convegno Nazionale, p.56, Roma 2000.
09. De Riu P.L., De Riu G., Testa C., Mulas M., Caria M.A., Mameli S., Mameli O. - Disposition of propofol between red blood cells, plasma, brain, and cerebrospinal fluid in rabbits. - Eur. J. Anaesthesiol., 17, 18-22, 2000.
10. Caria M.A., Melis F., Solinas A., Tavera C., Mameli O. - Frequency-dependent LTP/LTD in guinea pig Deiter's nucleus. NeuroReport, 12, 2353-2358, 2001.
11. Mameli O., Caria M.A., Melis F., Severino C., Tavera C., Mameli P., Mameli S. - Autonomic nervous system activity and life threatening arrhythmias in experimental epilepsy. - Seizure, 4, 269-278, 2001.
12. Mameli O., Caria M.A., Melis F., Solinas A., Tavera C., Ibba A., Tocco M., Flore C., Sanna Randaccio F. - Neurotoxic effect of lead at low concentrations. - Brain Res. Bull., 55, 269-275, 2001.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

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

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

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

Recentissimi esperimenti stanno intanto estendendo all'alluminio le osservazioni precedentemente effettuate sugli effetti dei metalli pesanti a carico del sistema nervoso centrale, in particolare focalizzando l'attenzione sulle modificazioni indotte sulla attività elettrica dei circuiti neuronali del tronco dell'encefalo. Risultati preliminari sembrano correlare le osservazioni elettrofisiologiche alle concentrazioni tessutali encefaliche del metallo.

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

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

Infine, è allo studio nell'uomo la possibilità di applicazione di una nuova tecnica di elaborazione digitale, la quale, per mezzo di un apposito "software", è capace di analizzare le simmetrie posturali dell'individuo. Questa metodica, definita "sistema per immagini di Moirè", è stata recentemente praticata in pazienti scoliotici, ed ha permesso di fornire una valutazione dei differenti gradi di curvatura della colonna vertebrale. In particolare, questa ricerca vorrebbe utilizzare il "sistema di Moirè" per la quantificazione delle variazioni posturali dei muscoli del tronco in seguito alla stimolazione calorica del labirinto. I risultati ottenuti evidenziano la validità del metodo nel fornire una valutazione degli effetti indotti dal riflesso vestibolo-spinale sulla postura dei muscoli del tronco, suggerendo allo stesso tempo una più larga possibilità di impiego in ambito clinico.

Collaborazioni internazionali in atto

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

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

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

sistema di registrazione e di stimolazione delle strutture nervose (microelettrodi, microdrive ad avanzamento elettronico, preamplificatori, oscilloscopi, microelettrodi, stimolatori, isolatori di stimolo);

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

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

un tavolino vestibolare;

set-up completo di registrazione da fette isolate;

un laboratorio di Fisiologia Applicata

Parole Chiave

Labirinto, riflesso vestibolo-spinale, muscoli del tronco, valutazione elettromiografica, uomo

UNITA' DI RICERCA INBB
Bari

Responsabile Scientifico
Rosa CAROPPO

Linea di Ricerca

RUOLO FISIOLÓGICO DEI "SEGNALI " EXTRACELLULARI DI CALCIO IN EPITELI POLARIZZATI

Composizione del Gruppo

Non Aderenti INBB

Lucantonio DEBELLIS	RU	ldebellis@biologia.uniba.it
Matilde COLELLA	PT	colella@biologia.uniba.it
Angela COLASUONNO	DR	colasuonno@biologia.uniba.it
Gregorio FISTETTO	DR	fistetto@biologia.uniba.it
Andrea GERBINO	DR	gerbino@biologia.uniba.it
Rossella SANSONE	DR	sansone@biologia.uniba.it

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Fisiologia Generale ed Ambientale - Università di Bari

Indirizzo Via Amendola 165/a - 70126 Bari

Telefono 080-5443331

Fax 080-5443388

E-mail caroppo@biologia.uniba.it

Sezione INBB di appartenenza

Bari

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Misura delle variazioni dinamiche della $[Ca^{2+}]$ extracellulare in un epitelio polarizzato.

Negli ultimi anni è emerso un aspetto del tutto nuovo sulla funzione dello ione Ca^{2+} nel controllo delle comunicazioni intercellulari. Studi recenti indicano che questo ione, accanto al suo classico ruolo di secondo messaggero intracellulare, potrebbe essere coinvolto nella mediazione di messaggi extracellulari in qualità di "primo messaggero", agendo su un recettore di membrana, il Calcium-sensing receptor (CaR), in grado di "sentire" le variazioni della $[Ca^{2+}]$ nel mezzo extracellulare. Questa ipotesi si basa sul presupposto che in condizioni fisiologiche, le $[Ca^{2+}]_{extr}$ possano subire oscillazioni localizzate. Hofer ha infatti ipotizzato che le variazioni nella concentrazione intracellulare di Ca^{2+} in risposta ad un agonista Ca^{2+} -mediato, possono influenzare le concentrazioni extracellulari, grazie alla presenza di vie di ingresso ed uscita per lo ione che si attivano durante gli eventi di trasduzione del segnale (Hofer et al, *Nature Cell Biol*, 2:392, 2000).

Per avvalorare tale ipotesi e rivelare i meccanismi d'azione del Ca^{2+} in questa nuova forma di comunicazione, è essenziale poter disporre in tempo reale di misure dirette ed in "situ" delle variazioni della $[Ca^{2+}]$ nel microambiente che circonda le cellule non eccitabili, parametro finora 'tralasciato' dagli studi pubblicati sull'argomento.

Risultati ottenuti

Abbiamo perciò messo a punto una tecnica di tipo elettrofisiologico che permette di monitorare l'ampiezza e le caratteristiche dinamiche delle variazioni della $[Ca^{2+}]_{ext}$ in un modello sperimentale strutturalmente integro, l'epitelio gastrico di anfibio isolato e perfuso "in vitro" (Caroppo et al., *EMBO J* 20:6316,2001).

Le variazioni dinamiche di Ca^{2+} extracellulare nel microambiente extracellulare dell'epitelio gastrico sono state misurate utilizzando microelettrodi selettivi al Ca^{2+} .

La stimolazione con un agonista Ca^{2+} -mediato, determina variazioni polarizzate di $[Ca^{2+}]_{ext}$ (un decremento a ridosso della membrana basolaterale delle cellule acido-secernenti ed un incremento nel lume della ghiandola gastrica). Tali variazioni sono abbastanza ampie da modulare diversi processi biologici fondamentali e possono rappresentare un "messaggio" extracellulare per le cellule vicine dotate di CaR.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

Caroppo R, Gerbino A, Debellis L, Kifor O, Soybel DI, Brown EM, Hofer AM, Curci S

Asymmetrical, agonist-induced fluctuations in local extracellular $[Ca^{2+}]$ in intact polarized epithelia

EMBO J.;20: 6316-26, 2001

Geibel J.P., Wagner C.A., Caroppo R., Qureshi I., Gloeckner J., Manuelidis L., Kirchhoff P., Radebold K.
The stomach divalent ion sensing receptor (SCAR) is a modulator of gastric acid secretion,
J Biol Chem, 276: 9549-52, 2001

Debellis L., Papini E., Caroppo R., Montecucco C., Curci S.
Helicobacter pylori cytotoxin VacA increases alkaline secretion in gastric epithelial cells.
Am J Physiol, 281: G1440-8, 2001.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Approfondire l'analisi del possibile ruolo fisiopatologico del Ca^{2+} come “messaggero extracellulare” in epiteli polarizzati.

In particolare ci proponiamo di indagare se variazioni fisiologiche di calcio extracellulare possano modulare l'attività e la funzione dell'epitelio gastrico, e se in tale modulazione venga svolto un ruolo chiave dal CaR (calcium-sensing receptor).

Tale studio sarà condotto utilizzando sia tecniche elettrofisiologiche, che prevedono l'uso di microelettrodi selettivi per diverse specie ioniche (Ca^{2+} , H^+ , Cl^-), sia tecniche microspettrofluorimetriche o di video-imaging basate sull'uso di indicatori fluorescenti specifici per il Ca^{2+}

Collaborazioni internazionali in atto

Prof. Emanuele Papini
Dip. di Scienze Biomediche -Università di Padova

Dr Aldebaran M. Hofer
Dept. of Surgery - Harvard University – Boston, USA

Prof. John P. Geibel
Dept. of Surgery - Medical School - Yale University - New Haven , USA

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Set-up per misure elettrofisiologiche con microelettrodi
video-imaging
microspettrofluorimetro

Parole Chiave

Fisiologia gastrica, trasduzione del segnale, recettore sensibile al calcio, comunicazione intra e intercellulare, trasporti ionici

UNITA' DI RICERCA INBB
Bologna

Responsabile Scientifico

Rita CASADIO

Linea di Ricerca

BIOFISICA MOLECOLARE E TEORICA E BIOLOGIA COMPUTAZIONALE

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Rita CASADIO	Professore straordinario	Casadio@kaiser.alma.unibo.it
Piero FARISELLI	Ricercatore	Piero@lipid.biocomp.unibo.it
Pier Luigi MARTELLI	Borsista CNR	Gigi@lipid.biocomp.unibo.it
Mario COMPIANI	Ricercatore Confermato	Mario.Compiani@unicam.it

Non Aderenti INBB

Gianluca TASCO	Dottorando	gluca@lipid.biocomp.unibo.it
Emidio CAPRIOTTI	Dottorando	Emidio@lipid.biocomp.unibo.it
Ivan ROSSI	Professore a Contratto	Ivan@lipid.biocomp.unibo.it

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Biologia Evoluzionistica Sperimentale.
Università degli Studi di Bologna

Indirizzo Via Irnerio 42, 40126 Bologna

Telefono 051 2094005

Fax 051 242576

E-mail casadio@kaiser.alma.unibo.it

Sezione INBB di appartenenza

Bologna

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Il risultato del sequenziamento genomico su larga scala e' caratterizzato da milioni di sequenze proteiche che vengono depositate nelle banche dati in attesa di annotazione funzionale e caratterizzazione strutturale. Il nostro gruppo di ricerca si occupa dello sviluppo ed implementazione di tools computazionali atti a trovare soluzioni euristiche al problema del folding in un ambito di genomica strutturale e funzionale.

Risultati ottenuti

Il risultato del nostro lavoro di ricerca si e' esplicato essenzialmente nello sviluppo ed implementazione di predittori disponibili al nostro sito web: www.biocomp.unibo.it, in grado di fornire predizione relativamente a caratteristiche strutturali di sequenze proteiche. Tutti i predittori basati essenzialmente su reti neurali sono top score tra i predittori del genere. In particolare il predittore CORNET ha fornito le migliori predizioni di contatti tra residui nell'ambito del recente Critical Assessment of Techniques for Protein Structure Prediction (CASP4, Proteins 2002).

B2TMPRED- Predictor of Beta Strand TransMembrane segments in proteins

CORNET- Predictor of Residue Contacts in Proteins

CYSPRED- Predictor of Bonding State of Cysteines in Proteins

DCON- Predictor of Disulfide Connectivity in Proteins

IRENE- Predictor of Helical TransMembrane segments in proteins

ISPRED- Protein interaction site prediction

RCNPRED- Predictor residue coordination numbers in proteins

SECPRED- Predictor of Secondary Structures of Proteins

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

1. Compiani M, Fariselli P, Martelli P, Casadio R - Neural networks to study invariant features of protein folding- Theor Chem Acc 101:21-26 (1999)
2. Fariselli P, Casadio R - A neural network based predictor of residue contacts in proteins - Prot Engng 12:15-21 (1999)
3. Fariselli P, Bottoni A, Bernardi F, Casadio R - Quantum mechanical analysis of oxygenated and deoxygenated states of hemocyanin: theoretical clues for a plausible allosteric model of oxygen binding- Protein Science 8:1546-1550 (1999)

4. Fariselli P, Riccobelli P, Casadio R - Role of evolutionary information in predicting the disulfide-bonding state of cysteine in proteins - *Proteins* 36:340-346 (1999)
5. Casadio R, Polverini E, Mariani P, Spinozzi F, Carsughi F, Fontana A, Polverino de Laureto P, Matteucci G, Bergamini C - The structural basis for the regulation of tissue transglutaminase by calcium ions- *Eur J Biochem* 262:672-679(1999)
6. Jacoboni I, Martelli PL, Fariselli P, Compiani M, Casadio R - Predictions of protein segments with the same amino acid sequence and different secondary structure: a benchmark for predictive methods. *Proteins* 41:535-544 (2000)
7. Jacoboni I, Martelli PL, Fariselli P, De Pinto V, Casadio R -Prediction of the transmembrane regions of beta barrel membrane proteins with a neural network based predictor- *Protein Science* 10:779-787 (2001)
8. Casadio R, Frigimelica E, Bossu' P, Neumann D, Martin MU, Tagliabue A, Boraschi D. Model of interaction of the IL-1 receptor accessory protein IL-1RAcP with the IL-1B/IL-1RI complex. *FEBS Letters* 499:65-68 (2001)
9. Fariselli P, Olmea O, Valencia A, Casadio R -Prediction of contact maps with neural networks and correlated mutations- *Protein Eng* 14:835-843 (2001)
10. Fariselli P, Olmea O, Valencia A, Casadio R -Progress in predicting inter-residue contacts of proteins with neural networks and correlated mutations- *Proteins, Suppl* 5:157-162 (2001)
11. Pollastri G, Baldi P, Fariselli P, Casadio R.- Prediction of coordination number and relative solvent accessibility in proteins. -*Proteins* 47:142-53 (2002).
12. Casadio R, Martelli PL, Giordano A, Rossi M, Raia CA. -A low-resolution 3D model of the tetrameric alcohol dehydrogenase from *Sulfolobus solfataricus*.- *Protein Eng* 15:215-223 (2002).

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Generazione di predettori adatti alla analisi di proteomi interi ed alla annotazione funzionale di proteine su basi strutturali

Collaborazioni internazionali in atto

- 1) Anders Krogh, Center for Biological Sequence Analysis (CBS), University of Denmark, 208-2800 Lyngby, Denmark, e-mail:krogh@cbs.dtu.dk
- 2) Pierre Baldi, Dept. of Information and Computer Science, Institute for Genomics and Bioinformatics, University of California, Irvine Ca 92697-3425; pfbaldi@ics.uci.edu
- 3) Alfonso Valencia, Protein Design Group, Centro Nacional de Biotecnologia (C.N.B. - C.S.I.C.) Campus Universidad Autonoma. Cantoblanco. 28049 Madrid.
Tlf: +34-91-5854570. Fax: +34-91-5854506.e-mail: valencia@cnb.uam.es

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

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

Parole Chiave

Biocomputing, Protein modelling, Protein structure prediction, Protein-ligand interaction, Quantum mechanics computation, Contact map prediction, ab initio protein folding, Machine learning

UNITA' DI RICERCA INBB
Bari

Responsabile Scientifico
Valeria CASAVOLA

Linea di Ricerca

ANALISI DELLA INTERAZIONE CFTR NHE3 IN CELLULE RENALI

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Stephan Joel RESHKIN	RU	reshkin@biologia.uniba.it
----------------------	----	---------------------------

Non Aderenti INBB

Lorenzo GUERRA	PT	l.guerra@biologia.uniba.it
Teresa FANELLI	DR	t.fanelli@biologia.uniba.it
Anna. BAGORDA	BC	a.bagorda@biologia.uniba.it

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Fisiologia Generale ed Ambientale...Università di BARI

Indirizzo Via Amendola 165/A 70126 BARI

Telefono 0805443332.

Fax 0805443388

E-mail casavola@biologia.uniba.it

Sezione INBB di appartenenza

Bari

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

‘Analisi della interazione proteina proteina CFTR-NHE3

I La proteina CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) è una proteina canale per il cloro espressa sulla membrana apicale di diversi epiteli e regolata dal sistema cAMP/PKA. Nei pazienti affetti da fibrosi cistica la proteina CFTR non è più funzionale a causa di mutazioni puntiformi del gene CFTR e ciò provoca non solo un deficit nella secrezione di cloro ma anche un'alterato riassorbimento di acqua e sali con una conseguente drastica modificazione della composizione ionica del mezzo extracellulare

L'obiettivo principale di questo studio è quello di analizzare i meccanismi cellulari e la dinamica di interazione fra CFTR, e lo scambiatore Na^+/H^+ (isoforma NHE3) in seguito alla stimolazione della protein chinasi AMPc -dipendente.

Mediante esperimenti di coimmunoprecipitazione ed esperimenti di pull-down utilizzando il GST-NHERF fusion protein abbiamo evidenziato che, nel nostro substrato cellulare, CFTR e NHE3 interagiscono reciprocamente mediante la proteina subapicale NHERF2 (NHE regulatory factor). L'NHERF2, pertanto, interagendo con entrambe le proteine di membrana CFTR e NHE3 formerebbe una impalcatura citoplasmatica attraverso cui i mediatori intracellulari sarebbero convogliati verso la giusta proteina bersaglio.

Risultati ottenuti

Sono stati, pertanto, messi a punto i modelli cellulari su cui studiare l'interazione reciproca dei due trasportatori ionici CFTR e NHE3: 1) A6 wild type in cui è espresso CFTR ma non NHE3; 2) A6-NHE3, ottenute trasfettando stabilmente cellule A6 con il cDNA che codifica per l'isoforma NHE3 di ratto;; 3) A6-NHE3 in cui è soppressa l'espressione di CFTR trattando le cellule con oligonucleotidi antisense specifici per l'mRNA del CFTR. 4) A6-NHE3 in cui sono stati mutati i siti consenso per la PKA della NHE3 (serina 552 o serina 605 mutate in alanina) . Gli esperimenti condotti sui suddetti modelli cellulari hanno dimostrato che:

A) L'attivazione di CFTR da parte della PKA nelle A6-NHE3 è significativamente minore nelle che A6. La mutazione dei siti consenso per la PKA della NHE3 (serina 552 o serina 605) riportano il trasporto di cloro a valori non significativamente differenti da quelli ottenuti in cellule A6. Questi risultati indicano che la fosforilazione di NHE3 da parte della PKA è un prerequisito per la diversa modulazione di CFTR e, avvalorano l'ipotesi che ci sia una competizione fra le due proteine di membrana CFTR ed NHE3 per la regolazione da parte del sistema cAMP/PKA. **B)** La proteina subapicale NHERF (NHE regulatory factor). è un possibile candidato della interazione reciproca tra CFTR e NHE3.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

- 1) Di Sole F., Casavola V., Mastroberardino L., Verrey F., Moe O.W., Burckhard G., Helmle Kolb C.
Adenosine inhibits the transfected Na/H exchanger NHE3 in renal epithelial cells (A₆/C1).
J.Physiol. (London) 515 (3): 829-842, 1999

- 2) Reshkin S.J., Tedone T., Correale M., Mangia A., Casavola V., Paradiso A.
Association of pS2 (TFF1) release with breast tumor proliferative rate: in vitro studies.
Cell Prol. 32:107-118, 1999
- 3) Reshkin S.J., Bellizzi A., Albarani V., Guerra L., Tommasino M., Paradiso A., Casavola V.
Phosphoinositide 3-Kinase is involved in the Tumor-specific activation of human breast cancer cell
Na/H⁺ exchange, motility and invasion induced by serum deprivation.
J. Biol. Chem. 275: 5361-5369, 2000
11. Perlino E. Tommasi S., Moro L., Bellizzi A., Marra E., Casavola V., Reshkin S.J.
TGF b1 and IGF-1 expression are differently regulated by serum in metastatic and non metastatic human
breast cancer cells.
Int. J. Oncol. 16:15-160, 2000.
12. Carmosino M., Procino G/, Casavola V., Svelto M., Valenti G.
The cultured human gastric cells HGT-1 express the principal transporters involved in acid secretion.
Pflugers Arch 440: 871-880, 2000
13. Reshkin S.J. Guerra L., Bagorda A., Debellis L., Cardone R., Li A.H., Jacobson K.A., Casavola V.
Activation of A3 adenosine receptor induces calcium entry and chloride secretion in renal A6 cells.
J Membrane Biology 178(2): 103-113, 2000
- 7) Reshkin SJ, Bellizzi A, Caldiera S, Albarani V, Malanchi I, Poignee M, Alunni-Fabbroni M, Casavola V. and
Tommasino M.
Na⁺/H⁺ exchanger-dependent intracellular alkalinization is an early event in malignant transformation and plays
an essential role in the development of subsequent transformation-associated phenotypes.
FASEB J. 14: 2185-2197, 2000.
- 8) Di Sole F., Guerra L., Bagorda A., Reshkin S.J., Albrizio M., Minoia P., Casavola V. Naloxone inhibits A6 cell
Na⁺/H⁺ exchange by activating protein kinase C via the mobilization of intracellular calcium.
Experimental Nephrology 9: 341-348, 2001
- 9) Di Sole F., Cerulli R., Casavola V., Moe W.O., Burckardt G., Hemle Kolb C.
Molecular aspects of acute inhibition of Na/H exchanger NHE3 by A2 adenosine receptor agonists.
J. Physiol. 541: 529-543, 2002
- 10) Bagorda A., Guerra L., Di Sole F., Hemle Kolb C., Jacobson K.A., Casavola V. and Reshkin SJ.
Extracellular adenine nucleotides regulate Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 activity in A6-NHE3 transfectants by a
cAMP/PKA-dependent mechanism.
J. Membr. Biol. In Press
- 11) Bagorda A., Guerra L., Di Sole F., Hemle-Kolb C., Cardone R. A., Reshkin S.J., Gisler S.M., Murer H. and
Casavola V. Reciprocal PKA regulatory interactions between CFTR and NHE3 in a renal polarized epithelial
cell model. J. Biol. Chem. 277: 21480-21488, 2002

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Mediante tecniche biochimiche (coimmunoprecipitazione, pulldown) e morfologiche (Confocale FRET) e fisiologiche (misure microspettrofluorimetriche ed elettrofisiologiche) analizzeremo l'interazione esistente tra i trasportatori di membrana apicali NHE3 e CFTR e la proteina sub apicale NHERF e l'importanza della interazione proteina nella trasduzione del segnale in epitelii polarizzati.

Collaborazioni internazionali in atto

Prof. H. Murer

Institute of Physiology - University of Zurich . Winterturerstrasse 197

CH 8057 Zurich Switzerland

Prof. Dr. Gerhard Burckhardt

Universitaet Goettingen - Zentrum Physiologie und Pathophysiologie - Abteilung Vegetative Physiologie

Humboldtallee 23 - 37073 Goettingen

Dr. Kenneth A. Jacobson, Ph.D.

Chief, Molecular Recognition Section - Bldg. 8A, Rm. B1A-19 - NIDDK, National Inst. of Health

Bethesda, MD 20892-0810 USA

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Microspettrofluorimetro, Apparato FRET

Parole Chiave

CFTR, NHE3, polarized cells

UNITA' DI RICERCA INBB
Napoli

Responsabile Scientifico

Antonino CASCINO

Linea di Ricerca

UTILIZZAZIONE DI ACIDI NUCLEICI PER LO SVILUPPO DI NUOVI FARMACI E PER LA TRACCIABILITÀ MOLECOLARE DEGLI OGM E LA LORO PRESENZA NEGLI ALIMENTI.

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Antonino CASCINO	PO	antonino.cascino@unina2.it
Marilena CIPOLLARO	PA	marilena.cipollarounina2.it

Non Aderenti INBB

Umberto GALDERISI	RU	umberto.galderis@unina2.it
Giovanni DI BERNARDO	DR	gianni.dibernardo@unina2.it
Amalia FORTE	Assegnista di Ricerca	
Elena PIEGARI	DR	

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sezione di Biotecnologie e Biologia Molecolare, II Università di Napoli.

Indirizzo: Via Costantinopoli 16

Telefono ++39 081 5665879

Fax ++ 39 081 5667547

E-mail antonino.cascino@unina2.it

Sezione INBB di appartenenza

Napoli

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi:

A) Prevenzione del processo della restenosi arteriosa, conseguenza di interventi di cardiocirurgia (trapianti d'organo), tramite l'utilizzo di molecole di DNA sintetico (DNA antisense) la cui sequenza nucleotidica riduca la sintesi della proteina corrispondente all'RNA messaggero scelto come bersaglio dell'antisense. B) Controllo dell'ipertensione arteriosa in ratti geneticamente ipertesi tramite iniezione intracranica di oligonucleotidi antisense diretti contro il recettore AT₁ dell'angiotensina. C) La metodica RAPD-PCR è stata utilizzata per distinguere cultivar di particolare interesse agroalimentare.

Risultati ottenuti:

A) Stenosi. L'applicazione degli ODN su carotidi di ratto sottoposte ad insulto chirurgico riduce del 60% l'mRNA bersaglio c-Myc 4 ore dopo l'intervento. L'analisi morfometrica delle carotidi eseguita 30 giorni dopo l'insulto chirurgico ha rivelato che il trattamento con ODN AS ha contribuito a mantenere il lume vasale più ampio del 35% rispetto alle carotidi di controllo. Non è invece stato rilevato alcun effetto significativo degli ODN AS sull'area della media. Il rapporto media/lume ha mostrato una riduzione del 63% nelle carotidi trattate con ODN AS rispetto alle carotidi di controllo. B) Ipertensione: effetto di ODN antisense nel controllo dell'ipertensione del ratto. E' stata dimostrata una significativa riduzione della pressione arteriosa nei ratti SHR utilizzando ODN diretti contro l'mRNA del recettore AT₁ dell'angiotensina II. Gli oligo anti-AT₁ hanno effetto antiipertensivo e non ipotensivo, pur riducendo sempre il livello endogeno di mRNA di AT₁. C) Tra le cultivar analizzate tramite RAPD più rappresentative sono il fico (*Ficus carica*), castagno (*Castanea sativa*), nocciolo (*Corylus avellana*), olivo del Sannio, pera spadana. Per ciascuna cultivar analizzata si sono avuti profili di amplificazione specifici che ne hanno permesso l'identificazione in maniera univoca.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

1. U. Galderisi, M. Cipollaro, G. Di Bernardo, L. De Masi, G. Galano and A. Cascino: "Identification of hazelnut (*Corylus avellana*) cultivars by RAPD analysis". *Plant Cell Reports*, 18: 652-655, (1999). IF=1,076
2. U. Galderisi, G. Di Bernardo, M. Cipollaro, G. Peluso, A. Cascino, R. Cotrufo and M.A.B. Melone. "Differentiation and apoptosis of neuroblastoma cells: role of N-myc gene product". *J. Cell. Biochem.* 73(1), 97-105, (1999). IF=2,817
3. U. Galderisi, M.A.B. Melone, G. Di Bernardo, G. Galano, A. Cascino and M. Cipollaro: "Antisense inhibitory effect: a comparison between 3'-partial and full phosphorothioate antisense oligonucleotides", *J. Cell.*

- Biochem.* 74(1), 31-37, (1999). IF=2,817
4. U. Galderisi, G. Di Bernardo, M. Cipollaro, F. P. Jori, E. Piegari, A. Cascino, G. Peluso and M.A.B. Melone: "Induction of apoptosis and differentiation in neuroblastoma and astrocytoma cells by the overexpression of Bin1, a novel Myc interacting protein", *J. Cell. Biochem.* 74(3), 313-322, (1999). IF=2,817
 5. U. Galderisi, M. Cipollaro, G. Di Bernardo, L. De Masi, G. Iacomino, G. Galano and A. Cascino: "Identification of *Ficus carica* cultivars by Random Amplified Polymorphic DNA Analysis", *HortScience*, 34(7): 1263-1265, (1999). IF=0,514
 6. U. Galderisi, A. Cascino and A. Giordano: "Oligonucleotides as therapeutic agents" *J. Cellular Physiology*, 181, 251-257, (1999). IF=2,827
 7. E. Piegari, U. Galderisi, L. Berrino, G. Di Bernardo, G. Galano M. Cipollaro, F. Esposito, F. Rossi and A. Cascino: "In Vivo Effects of Partial Phosphorothioated AT1 Receptor Antisense Oligonucleotides in Spontaneously Hypertensive and Normotensive Rats", *Life Sciences*, 66 (21), 2091-2099, (2000). IF=1,774
 8. F. M. Guarino, F. Angelini, G. Odierna, M. R. Bianco, G. Di Bernardo, A. Forte, A. Cascino and M. Cipollaro: "Detection of DNA in ancient bones by histochemical methods", *Biotechnic & Histochemistry* 75 (2) 110-117 (2000). IF=0,714
 9. Forte A., Di Micco G., Galderisi U., Guarino F. M., Cipollaro M., De Feo M., Gregorio R., Bianco M. R., Vollono C., Esposito F., Berrino L., Angelini F., Renzulli A., Cotrufo M., Rossi F. and Cascino A.: "Molecular analysis of arterial stenosis in rat carotids". *J. Cellular Physiology*, 186(2), 307-313, (2001). IF=2,827
 10. U. Galderisi, F.P. Jori, G. Di Bernardo, M. Cipollaro, E. Piegari, A. Cascino, M.A.B. Melone, P.P. Claudio and A. Giordano "Specific role of pRb2/p130 gene in neurogenesis: its overexpression induces astrocyte and not neuronal differentiation" *Molecular and Cell. Neurosc.* 17, 415-425 (2001). IF=5,654
 11. U. Galderisi, M. Cipollaro and A. Cascino: "Antisense oligonucleotides as drugs for HIV treatment", *Expert Opinion Ther. Patents* 11(10), 1605-1611, (2001). IF=1,188
 12. F. P. Jori, U. Galderisi, E. Piegari, G. Peluso, A. Cascino, M. Cipollaro, A. Giordano and M.A.B. Melone: "RB2/p130 ectopic gene expression in neuroblastoma stem cells: evidences of cell fate restriction and induction of differentiation" *Biochem. J.* 360:569-577, (2001). IF=4,349
 13. A. Forte, G. Di Micco, U. Galderisi, M. De Feo, F. Esposito, S. Esposito, A. Renzulli, M. Agozzino, M. Cipollaro, L. Berrino, M. Cotrufo, F. Rossi and A. Cascino: "Characterization of surgically induced stenosis in spontaneously hypertensive rats" *J. Vascular Research* (2002), . IF=3,576
 14. S. Maione, D. Siniscalco, U. Galderisi, V. De Novellis, R. Uliano, G. Di Bernardo, L. Berrino, A. Cascino and F. Rossi: "Apoptotic genes expression in the lumbar dorsal horn in a model of neuropathic pain in rat" *Neuroreport*, 13,1, 101-106, (2002). IF=2,682
 15. G. Di Bernardo, S. Del Gaudio, M. Cammarota, U. Galderisi, A. Cascino and M. Cipollaro: "Enzymatic repair of selected crosslinked homoduplex molecules enhances nuclear gene rescue from Pompeii and Herculanum remains", *Nucl. Acids Res.* 30, 4e16, (2002). IF=5,748.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

A) estendere l'analisi tramite macroarrays del processo di stenosi dopo intervento chirurgico utilizzando altri ceppi di ratti che presentino patologie importanti per la chirurgia vascolare quali diverse forme di ipertensione, diabete o anche ratti knock-out per geni coinvolti nelle malattie cardiovascolari. B) estendere l'analisi tramite macroarrays dell'effetto legato all'oligo anti AT1 sui geni del cervello di ratto. C) mettere a punto tecniche di real time PCR per la determinazione di organismi OGM e utilizzare le tecniche di recupero del DNA antico per estrarre il DNA da prodotti della filiera agroalimentare e determinarne la cultivar di origine.

Collaborazioni internazionali in atto

Prof. E.P. Geiduschek presso l'Università di California, San Diego, U.S.A
 Prof. Maciej Henneberg, PhD, DSc, FAIBiol Wood Jones Professor of Anthropological and Comparative Anatomy Head, Department of Anatomical Sciences University of Adelaide, Adelaide, South Australia,
 Prof. Greenblatt, Charles, Professor and founding director of the Kuvim Centre for the Study of Infectious and Tropical Diseases, Hebrew University-Hadassah Medical School, Jerusalem, Israel.

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

6 apparecchiature per PCR, 2 gel doc per analisi di gel, elettroporatore, Polverizzatore, Spettrofotometro

Parole Chiave

RT-PCR, RAPD-PCR, Oligonucleotidi antisense, Stenosi, Ipertensione, Cultivar/OGM

UNITA' DI RICERCA INBB
Padova

Responsabile Scientifico
Andrea CAVAGGIONI

Linea di Ricerca
FEROMONI MURINI

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Andrea CAVAGGIONI	PO	andrea.cavaggioni@unipd.it
-------------------	----	----------------------------

Non Aderenti INBB

Carla MUCIGNAT	RU	carla.mucignat@unipd.it
----------------	----	-------------------------

Sede Unità di Ricerca

Istituto di Fisiologia Umana
Università degli Studi di Padova

Indirizzo Via Marzolo, 3

Telefono 0498275304

Fax 0498275301

E-mail andrea.cavaggioni@unipd.it

Sezione INBB di appartenenza

Padova

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Caratterizzare il ruolo feromonale delle proteine orinarie di topo maschio verso il topo femmina, nelle reazioni riproduttive e comportamentali.

Caratterizzare il ruolo dei volatili di orina di topo maschio sul comportamento di conspecifici. Mettere a punto un sistema semplice per studiare il legame di sostanze volatili alle proteine orinarie.

Caratterizzare l'immunoistochimica dell'organo vomeronasale di topo.

Caratterizzare la specificità individuale delle proteine orinarie di topo maschio

Risultati ottenuti

E' stato dimostrato l'effetto di induzione dell'estro da parte delle proteine orinarie in un contesto orinario prepubere. E' stata dimostrata una modulazione sull'aggressività di conspecifici. E' stato messo a punto un sistema di rivelazione di legame alle proteine che usa la fluorescenza del naftolo. E' stata caratterizzata la presenza di gusducina nell'organo vomeronasale. E' stato dimostrato che la proteine orinarie danno informazione sul sé medesimo (self) del topo

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

1. HURST JL, PAYNE CE, NEVISON CM, MARIE AD, HUMPHRIES RE, ROBERTSON DHL, CAVAGGIONI A., BEYNON RJ. (2001). Individual recognition in mice mediated by major urinary proteins. NATURE. vol.414, pp. 631-633 IF 25.814.

2. SARTOR G., PAGANI R., FERRARI E., SORBI R.T., CAVAGGIONI A., CAVATORTA P., SPISNI A. (2001). Determining the binding capability of the mouse Major Urinary Proteins using 2-naphthol as a fluorescent probe. ANALYTICAL BIOCHEMISTRY. vol. 292, pp. 69-75 IF 1.976.

3. CAVAGGIONI A., MUCIGNAT-CARETTA C. (2000). Major urinary proteins, alpha-2U-globulins and aphrodisin. BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. vol. 1482, pp. 218-228 IF 1.687.

4. MARCHLEWSKA-KOJ A., CAVAGGIONI A., MUCIGNAT-CARETTA C., OLEJNICZAK P. (2000). Stimulation of estrus in female mice by male urinary proteins. JOURNAL OF CHEMICAL ECOLOGY. vol. 26, pp. 2355-2366 IF 1.441.

5. CAVAGGIONI A., MUCIGNAT C., TIRINDELLI C. (1999). Pheromone signalling in the mouse: role of urinary proteins and vomeronasal organ. ARCHIVES ITALIENNES DE BIOLOGIE. vol. 137, pp. 193-200 IF 0.837.

6. ZANCANARO C., MUCIGNAT-CARETTA C., MERIGO F., CAVAGGIONI A. (1999). Immunohistochemical investigation of the vomeronasal organ. Nitric oxide synthase expression in the mouse during postnatal development. NEUROSCIENCE LETTERS. vol. 269, pp. 5-8 IF 2.091.

7. ZANCANARO C., MUCIGNAT-CARETTA C., MERIGO F., CAVAGGIONI A., OSCULATI F. (1999). Alpha-gustducin expression in the vomeronasal organ of the mouse. EUROPEAN JOURNAL OF NEUROSCIENCE. vol. 11, pp. 4473-4475 IF 3.82.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Generazione di predettori adatti alla analisi di proteomi interi ed alla annotazione funzionale di proteine su basi strutturali

Parole Chiave

Feromoni, topi, urine, vomeronasale, riproduzione, sistema olfattivo accessorio

UNITA' DI RICERCA INBB
Catania

Responsabile Scientifico

Federico CICIRATA

Linea di Ricerca

CIRCUITO CEREBRO-CEREBELLARE – CONNESSINE E GAP JUNCTIONS.

titolo

Studio morfo-funzionale del circuito cerebro-cerebellare – Clonaggio e studi funzionali di connessine espresse nel SNC

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Fantesca Serapide	RU
Maria Rosita Pantò	RU
Rosalba Parenti	RU

Non Aderenti INBB

Annalisa NOCOTRA	A
Deborah CICERO	A
Agata ZAPPALÀ	A

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento Scienze Fisiologiche – Università degli Studi di Catania

Indirizzo Viale Andrea Doria, 6

Telefono 095333841

Fax 095330645

E-mail cicirata@mbox.unict.it

Sezione INBB di appartenenza

Catania

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Clonaggio di connessine nel Sistema nervoso centrale e studio del loro ruolo funzionale

Indagini morfo-funzionali del circuito cerebro-cerebellare

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

1. F Cicirata, R Parenti, F Spinella, S Giglio, F Tuorto, O Zuffardi, M Gulisano. Genomic organization and chromosomal localization of the mouse connexin36 (mCx36) gene. *Gene*, 251: 123-130, 2000.
2. R Parenti, M Gulisano, A Zappalà, F Cicirata. Expression of connexin36 mRNA in adult rodent brain. *Neuroreport*, 11: 1497-1502, 2000.
3. M Gulisano, R Parenti, F Spinella, F Cicirata. Cx36 is dynamically expressed during early development of mouse brain and nervous system. *Neuroreport*, 11: 3823-3828, 2000.
4. MF Serapide, MR Pantò, R pParenti, A Zappalà, F Cicirata. Multiple Zonal Projections of the Basilar Pontine Nuclei to the Cerebellar Cortex of the Rat. *J Comp Neurol*, 430 :471-484, 2001.
5. M R Pantò, A Zappalà, R Parenti, M F Serapide and F Cicirata. The corticonuclear projections of the cerebellum preserve both anteroposterior and mediolateral pairing pattern. *Eur. J Neurosci*, 13:1-17, 2001
6. Placantonakis D, Cicirata F, Welsh JP. A dominant negative mutation of neuronal connexin 36 that blocks intercellular permeability. *Brain Res Mol Brain Res*. 2002;98(1-2):15-28.
7. Bittman K, Becker DL, Cicirata F, Parnavelas JG. Connexin expression in homotypic and heterotypic cell coupling in the developing cerebral cortex. *J Comp Neurol*. 2002;443(3):201-12.
8. Parenti R, Wassef M, Cicirata F. Expression of CRABPI mRNA in fastigial cells of the developing cerebellum. *Eur. J. Neurosci*. 2002, 15:211-215.
9. Parenti R, Campisi A, Vanella A, Cicirata F. Immunocytochemical and RT-PCR analysis of connexin36 in cultures of mammalian glial cells. *Arch ital Biol*. 2002, 140: 101-108.
10. Serapide MF, Zappalà A, Parenti R, Pantò MR, Cicirata F. Laterality of the pontocerebellar projections in the rat. *Eur. J. Neurosci*, 2002, 15:1551-1556.
11. Serapide MF, Parenti R, Pantò MR, Zappalà A, and Cicirata F. Multiple zonal projections of the nucleus reticularis tegmenti pontis to the cerebellar cortex of the rat. *Eur. J. Neurosci*, vol.15, pp.1-8, 2002
12. Parenti R, Zappalà A, Serapide MF, Pantò MR and Cicirata F. The projections of the basilar pontine nuclei and nucleus reticularis tegmenti pontis to the cerebellar nuclei of the rat. *J. Comp. Neurol.*, in stampa

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Studio della comunicazione diretta tramite gap junctions tra cellule del sistema immunitario e/o endotelio vasale

Studio del ruolo funzionale delle proiezioni pontine al cervelletto

Generazione di anticorpi poli- e monoclinale contro connessine espresse nel SNC

Collaborazioni internazionali in atto

Università Diego Hernandez di Alicante, Spagna

INSERM U-106, Parigi

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Set-up completo per studi di anatomia, elettrofisiologia unitaria extracellulare, biologia molecolare, immunologia sperimentale (produzione di anticorpi monoclinale e policlonali in mammifero e pollo).

Parole Chiave

Cervelletto – Organizzazione centrale del movimento – Connexine – gap junction -

UNITA' DI RICERCA INBB
Napoli

Responsabile Scientifico

Filiberto CIMINO
Franca ESPOSITO

Linea di Ricerca

RUOLO DELLE SPECIE REATTIVE DELL'OSSIGENO (ROS) NELLA TRASDUZIONE DEI SEGNALE MITOGENICI

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Filiberto CIMINO	PO	cimino@dbbm.unina.it
Franca ESPOSITO	PA	esposito@dbbm.unina.it

Non Aderenti INBB

Rosario AMMENDOLA	PA	ammendola@dbbm.unina.it
Giuseppa CHIRICO	DR	chirico@dbbm.unina.it
Lucia RUSSO	DR	russo@dbbm.unina.it
Tommaso RUSSO	PO	russo@unina.it
Nicola ZAMBRANO	RU	zambrano@dbbm.unina.it

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche Università di Federico II

Indirizzo Via Pansini 5 80131 Napoli

Telefono 0817464966

Fax 0817463650/7464359

Sezione INBB di appartenenza

Napoli

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Gli obiettivi della ricerca riguardano lo studio dei meccanismi molecolari attraverso i quali i ROS svolgono un importante ruolo di mediatori nella trasduzione di stimoli mitogenici. Sono in corso studi per identificare bersagli dell'azione dei ROS prodotti sia mediante esposizione a diversi agenti ossidanti, sia mediante attivazione dell'NADPH ossidasi, un enzima presente in molte cellule eucariotiche e responsabile della produzione fisiologica dei ROS. Inoltre, ci proponiamo lo studio dei meccanismi di attivazione e di regolazione della NADPH ossidasi attraverso il clonaggio del cDNA di Mox1, l'omologo della subunità catalitica dell'NADPH ossidasi dei macrofagi, e di altre subunità in fibroblasti.

Risultati ottenuti

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

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

1) V. Wanke, K. Accorsi, D. Porro, F. Esposito, T. Russo and M. Vanoni (1999) In budding yeast reactive oxygen species induce both RAS-dependent and RAS-independent cell cycle-specific arrest. Mol. Microbiol., 32, 753-764. I.F. 6.1

2) F. Esposito, L. Russo, T. Russo and F. Cimino (2000) Retinoblastoma protein dephosphorylation is an early event of cellular response to prooxidant conditions. Febs Lett. 470, 211-215. I.F. 3.58

- 3) F. Esposito, L. Russo, G. Chirico, R. Ammendola, T. Russo and F. Cimino. Regulation of p21waf1/cip1 expression by intracellular redox conditions, *IUBMB Life*, 52, 1-4, 2001
- 4) F. Esposito, T. Russo and F. Cimino. Generation of pro-oxidant conditions in intact cells to induce modifications of cell cycle regulatory proteins, *Redox Cell Biology and Genetics, Methods Enzymol.*, vol 352, pp. 258-268, 2002.
- 5) R. Ammendola, M. Ruocchio, G. Chirico, L. Russo, C. De Felice, F. Esposito, , T. Russo and F. Cimino (2002) Inhibition of NADH/NADPH oxidase affects signal transduction by growth factor receptors in normal fibroblasts, *Arch. Biochem. Biophys*, 397 (2), 253-257.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

I più importanti obiettivi riguarderanno: 1) Lo studio dell'attivazione di pathways di trasduzione del segnale mitogenico da parte dei ROS. 2) il clonaggio del cDNA di Mox1, l' omologo della subunità catalitica dell'NADPH ossidasi dei macrofagi, e delle altre subunità della NADPH ossidasi;

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

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

Parole Chiave

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

UNITA' DI RICERCA INBB
Napoli

Responsabile Scientifico
Marilena CIPOLLARO

Linea di Ricerca
ANALISI DI DNA ANTICO

Composizione del Gruppo
Aderenti INBB

Marilena CIPOLLARO	PA	marilena.cipollarounina2.it
Antonino CASCINO	PO	antonino.cascino@unina2.it

Non Aderenti INBB

Umberto GALDERISI	RU	umberto.galderis@unina2.it
Giovanni DI BERNARDO	DR	gianni.dibernardo@unina2.it
Stefania DEL GAUDIO	DR	
Elena PIEGARI	DR	

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sezione di Biotecnologie e Biologia Molecolare, 2.a Università di Napoli.

Indirizzo: Via Costantinopoli 16
Telefono ++39 081 5665879
Fax ++ 39 081 5667547
E-mail marilena.cipollaro@unina2.it

Sezione INBB di appartenenza
Napoli

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi:

Obiettivo principale è stato quello di sviluppare metodiche avanzate per l'analisi genetico molecolare del DNA estratto da reperti antichi.

Altre attività hanno riguardato: A) Utilizzo della metodica RAPD-PCR per distinguere cultivar di interesse agroalimentare e B) Prevenzione del processo di restenosi arteriosa, conseguenza di interventi chirurgici, tramite oligonucleotidi antisenso..

Risultati:

Negli ultimi anni grazie all'enorme sviluppo delle biotecnologie ed in particolare delle tecniche della biologia molecolare utilizzate nello studio degli acidi nucleici si sono accumulati dati in campi della ricerca in cui sembrava impossibile operare, tra questi ha raggiunto grande visibilità lo studio del DNA antico. Un'accurata analisi molecolare degli acidi nucleici estratti dai tessuti mummificati o dalle ossa di resti umani e animali prevede che vengano affrontate e superate una serie di difficoltà specifiche per lo stato fisico di questo particolare tipo di reperto. Ad esempio, nonostante le grandi potenzialità della PCR, la mancata amplificazione di un locus nucleare può dipendere dall'eccessivo danneggiamento dei frammenti di DNA nucleare contenenti il locus in esame. Per aumentare la resa nell'amplificazione di aDNA è stata messa a punto una metodica capace di riparare alcuni dei danni presunti a carico del campione di DNA antico, precedentemente denaturato per liberarsi da molecole eteroduplex di DNA e utilizzare come substrato solo quelle legate tra loro da legami crosslink. Servendosi della DNA polimerasi I e della T4 ligasi e facendo precedere questa fase di riparo enzimatico a quella dell'amplificazione, può essere così recuperata alle fasi di analisi successive quella frazione di molecole di aDNA danneggiate perché contenenti o "nicks", quindi riparabili dalla sola T4 DNA ligasi, o "gaps" (delezione di uno o più nucleotidi). Questo permette la polimerizzazione del tratto mancante del filamento dapprima da parte della DNA polimerasi e successivamente il loro riparo completato dall'azione della ligasi. L'autenticità dell'aDNA così riparato è stata dimostrata tramite evidenze sperimentali indipendenti, derivanti dall'analisi condotta in parallelo su reperti non umani ritrovati nello stesso sito archeologico ed utilizzati per liberarsi da possibili contaminazioni da DNA esogeno.

Questa metodica è stata anche trasferita al Reparto Investigazioni Scientifiche dell'Arma dei Carabinieri per essere utilizzata su reperti particolarmente danneggiati.

I campioni antichi analizzati provengono da siti specifici di Pompei ed Ercolano. Le ricerche sono condotte in collaborazione con la Soprintendenza Archeologica di Pompei ed il Laboratorio di Ricerche Applicate della Soprintendenza stessa.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

1. U. Galderisi, M. Cipollaro, G. Di Bernardo, L. De Masi, G. Galano and A. Cascino: "Identification of hazelnut (*Corylus avellana*) cultivars by RAPD analysis". *Plant Cell Reports*, 18: 652-655, (1999). IF=1,076
2. U. Galderisi, G. Di Bernardo, M. Cipollaro, G. Peluso, A. Cascino, R. Cotrufo and M.A.B. Melone. "Differentiation and apoptosis of neuroblastoma cells: role of N-myc gene product". *J. Cell. Biochem.* 73(1), 97-105, (1999). IF=2,817
3. U. Galderisi, M.A.B. Melone, G. Di Bernardo, G. Galano, A. Cascino and M. Cipollaro: "Antisense inhibitory effect: a comparison between 3'-partial and full phosphorothioate antisense oligonucleotides", *J. Cell. Biochem.* 74(1), 31-37, (1999). IF=2,817
4. U. Galderisi, G. Di Bernardo, M. Cipollaro, F. P. Jori, E. Piegari, A. Cascino, G. Peluso and M.A.B. Melone: "Induction of apoptosis and differentiation in neuroblastoma and astrocytoma cells by the overexpression of Bin1, a novel Myc interacting protein", *J. Cell. Biochem.* 74(3), 313-322, (1999). IF=2,817
5. U. Galderisi, M. Cipollaro, G. Di Bernardo, L. De Masi, G. Iacomino, G. Galano and A. Cascino: "Identification of *Ficus carica* cultivars by Random Amplified Polymorphic DNA Analysis", *HortScience*, 34(7): 1263-1265, (1999). IF=0,514
6. E. Piegari, U. Galderisi, L. Berrino, G. Di Bernardo, G. Galano M. Cipollaro, F. Esposito, F. Rossi and A. Cascino: "In Vivo Effects of Partial Phosphorothioated AT1 Receptor Antisense Oligonucleotides in Spontaneously Hypertensive and Normotensive Rats", *Life Sciences*, 66 (21), 2091-2099, (2000). IF=1,774
7. F. M. Guarino, F. Angelini, G. Odierna, M. R. Bianco, G. Di Bernardo, A. Forte, A. Cascino and M. Cipollaro: "Detection of DNA in ancient bones by histochemical methods", *Biotechnic & Histochemistry* 75 (2) 110-117 (2000). IF=0,714
8. Forte A., Di Micco G., Galderisi U., Guarino F. M., Cipollaro M., De Feo M., Gregorio R., Bianco M. R., Vollono C., Esposito F., Berrino L., Angelini F., Renzulli A., Cotrufo M., Rossi F. and Cascino A.: "Molecular analysis of arterial stenosis in rat carotids". *J. Cellular Physiology*, 186(2), 307-313, (2001). IF=2,827
9. U. Galderisi, F.P. Jori, G. Di Bernardo, M. Cipollaro, E. Piegari, A. Cascino, M.A.B. Melone, P.P. Claudio and A. Giordano "Specific role of pRb2/p130 gene in neurogenesis: its overexpression induces astrocyte and not neuronal differentiation" *Molecular and Cell. Neurosc.* 17, 415-425 (2001). IF=5,654
10. U. Galderisi, M. Cipollaro and A. Cascino: "Antisense oligonucleotides as drugs for HIV treatment", *Expert Opinion Ther. Patents* 11(10), 1605-1611, (2001). IF=1,188
11. F. P. Jori, U. Galderisi, E. Piegari, G. Peluso, A. Cascino, M. Cipollaro, A. Giordano and M.A.B. Melone: "RB2/p130 ectopic gene expression in neuroblastoma stem cells: evidences of cell fate restriction and induction of differentiation" *Biochem. J.* 360:569-577, (2001). IF=4,349
12. A. Forte, G. Di Micco, U. Galderisi, M. De Feo, F. Esposito, S. Esposito, A. Renzulli, M. Agozzino, M. Cipollaro, L. Berrino, M. Cotrufo, F. Rossi and A. Cascino: "Characterization of surgically induced stenosis in spontaneously hypertensive rats" *J. Vascular Research* (2002), IF=3,576
13. G. Di Bernardo, S. Del Gaudio, M. Cammarota, U. Galderisi, A. Cascino and M. Cipollaro: "Enzymatic repair of selected crosslinked homoduplex molecules enhances nuclear gene rescue from Pompeii and Herculanum remains", *Nucl. Acids Res.* 30, 4e16, (2002). IF=5,748.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Messa a punto di tecniche di "real time" PCR per la determinazione del numero di copie di aDNA amplificabile per loci nucleari ipervariabili ed alleli di malattie genetiche. Applicare le metodiche sviluppate ed estendere le analisi di geni nucleari anche a reperti unani antichi dell'area vesuviana. In particolare studiare il popolamento del Mediterraneo, seguendo ad esempio la migrazione dall'Eubea a san Montano (isola d'Ischia) del 1000 a C . Estendere le tecniche di recupero del DNA antico per analizzare il DNA estratto da prodotti della filiera agroalimentare e determinarne la cultivar di origine e/o la presenza di OGM nei cibi.

Collaborazioni internazionali in atto

Prof. E.P. Geiduschek presso l'Università di California, San Diego, U.S.A

Prof. Maciej Henneberg, PhD, DSc, FAIBiol Wood Jones Professor of Anthropological and Comparative Anatomy Head, Department of Anatomical Sciences University of Adelaide, Adelaide, South Australia,

Prof. Greenblatt, Charles, Professor and founding director of the Kuvim Centre for the Study of Infectious and Tropical Diseases, Hebrew University-Hadassah Medical School, Jerusalem, Israel.

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

6 apparecchiature per PCR, 2 gel doc per analisi di gel, elettroporatore, Polverizzatore, Spettrofotometro,

Parole Chiave

DNA antico, Sequenze, PCR, "real time" PCR, Riparo enzimatico, Oligonucleotidi antisenso, Cultivar/OGM

UNITA' DI RICERCA INBB
Milano

Responsabile Scientifico

Francesco CLEMENTI

Linea di Ricerca

I RECETTORI NICOTINICI NEURONALI: STRUTTURA, FARMACOLOGIA E REGOLAZIONE

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Francesco CLEMENTI	PO	clementi@csfic.mi.cnr.it
--------------------	----	--------------------------

Non Aderenti INBB

Diego FORNASARI	R	
Cecilia GOTTI	A Ric. CNR	c.gotti@csfic.mi.cnr.it
Roberta BENFANTE	BC	r.benfante@csfic.mi.cnr.it
Silvia VAILATI	BC	
Helen LUCCHETTI	DR	
Milena MORETTI	PT	milena.moretti@unimi.it
Adele ANTONINI	BC	
Michela MATTEOLI	A Ric. CNR	
Carlo SALA	A Ric CNR	

Sede Unità di Ricerca

Sezione di Farmacologia Cellulare e Molecolare, Istituto di Neuroscienze del CNR

Indirizzo: via Vanvitelli 32, 20129 Milano

Telefono 0253016962

Fax 027490574

Sezione INBB di appartenenza

Milano

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

I recettori nicotinici neuronali sono delle molecole chiave nella trasmissione colinergica nicotinic a livello dei gangli e del sistema nervoso centrale. Essi sono dei canali ionici la cui apertura è controllata dalla acetilcolina e sono costituiti da più subunità. Lo scopo della nostra ricerca è:

1- studiare la composizione in subunità dei recettori presenti nelle varie aree cerebrali del ratto adulto e durante lo sviluppo; isolare e purificare sottotipi nuovi di recettori e studiarne le caratteristiche farmacologiche e biofisiche dopo ricostituzione in vitro; confrontare tali caratteristiche con quelle di recettori di analoga composizione espressi in sistemi eterologhi quali cellule non nervose di mammifero e oociti di xenopus; studiare la loro localizzazione in vivo attraverso tecniche immunoistochimiche. In quest'anno ci dedicheremo ai recettori presenti nelle vie ottiche e mesostriatali.

2- Trovare farmaci specifici per i sottotipi dei recettori nicotinici neuronali. In base ai risultati delle ricerche condotte negli anni passati, in collaborazione con gli Istituti di Chimica Farmaceutica della nostra Università e della Università di Genova, ci siamo focalizzati su alcune molecole molto specifiche e di queste ne studieremo le caratteristiche biofisiche e farmacologiche in vitro ed in vivo.

3- Abbiamo messo a punto e validato gli scorsi anni un metodo di dosaggio degli anticorpi verso le subunità $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 7$. Useremo questo metodo per studiare se esistano anticorpi antirecettori neuronali in pazienti affetti da patologie autoimmuni che compromettano in sistema simpatico o funzioni in chiara correlazione con la funzione nicotinic. I dati ottenuti indicano che vi sono anticorpi anti $\alpha 4$ e $\alpha 7$ in alcuni pazienti con sindrome di Lambert-Eaton o affetti da miastenia grave che spiegano la sintomatologia a carico del sistema nervoso periferico. Quest'anno studieremo pazienti affetti da diverse forme di epilessia resistenti ai farmaci, dato che i nicotinici sono severamente coinvolti in queste patologie.

Risultati ottenuti

Localizzazione dei più importanti sottotipi di recettori nicotinici nel cervello di roditori e dell'uomo, loro purificazione, loro caratterizzazione farmacologica e biofisica.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

- 1) Gotti C., Hanke W. And Clementi F. (2000) Properties of heterologously and lipid bilayer reconstituted nicotinic acetylcholine receptors. In: Neuronal Nicotinic Receptors, Clementi, F., Fornasari D. and Gotti C., Es., Springer-Verlag, pp. 359-378
- 2) Balestra B., Vailati S., Moretti M., Hanke W., Clementi F. and Gotti C. (2000) Chick optic lobe contains a developmentally regulated $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ nicotinic receptor subtype. *Mol. Pharmacol.* 58: 300-311
- 3) F. Clementi, D. Fornasari and C. Gotti (2000) Neuronal nicotinic receptors: from structure to therapeutics *TIPS* 21:35-38 (I.F.=11,697)
- 4) S. Di Angelantonio, A. Nistri, M. Moretti, F. Clementi & C. Gotti (2000) Antagonism of nicotinic receptors of rat chromaffin cells by N,N,N-trimethyl-1-(4-*trans*-stilbenoxy)-2-propylammonium iodide: a patch clamp and ligand binding study. *Br J Pharmacol* 129, 1771-1779 (I.F.=3,722)
- 5) C. Gotti, E. Carbonnelle, M. Moretti, R. Zwart and F. Clementi (2000) Drugs selective for nicotinic receptor subtypes: a real possibility or a dream ? *Behaviour Brain Res* 113: 183-192 (I.F.=2,31)
- 6) C. Gotti, D. Fornasari and F. Clementi (2000) Neuronal Nicotinic receptors, Important new players in brain function *Eur J of Pharmacol* 393: 3-10 (I.F.= 2,04)
- 7) S. Vailati, M. Moretti, B. Balestra, M. McIntosh, F. Clementi and C. Gotti.(2000) $\beta 3$ subunit is present in different nicotinic receptor subtypes in chick retina *Eur J of Pharmacol* 393: 23-30 (I.F.= 2,04)
- 8) R. Zwart, R. Van Kleef, C. Gotti, C. Smulders and H. Vijverberg. (2000) Competitive potentiation of acetylcholine effects on neuronal nicotinic receptors by acetylcholinesterase inhibiting drugs. *J of Neurochem* (In press)(I.F.=4,906) .
- 9) Terzano S., Flora A., Clementi F., Fornasari D. (2000) The minimal promoter of the human $\alpha 3$ nicotinic receptor subunit gene: molecular and functional characterization. *J. Biol.Chem.* 275: 41495-41503 I.F. 7,199
- 10) Gotti C., Moretti M., Mantegazza R., Fornasari D., Tsouloufis T., Clementi F. (2001) Anti-neuronal nicotinic receptor antibodies in MG patients with thymoma. *J. Neuroimmunol.* 113: 142-145 I.F. 3,285
- 11) Barabino B., Vailati S., Moretti m., McIntosh J.M., Longhi R., Clementi F., and Gotti C.(2001) An $\alpha 4\beta 4$ nicotinic receptor subtype is present in chick retina. identification, characterisation and pharmacological comparison with the transfected $\alpha 4\beta 4$ and $\alpha 6\beta 4$ subtypes. *Mol Pharmac.* 59:1410-1417.(I.F: 3,285)
- 12) Flora A., Lucchetti H., Benfante R., Goridis C., Clementi F., and Fornasari D. (2001) Sp protein and PHOX2B regulate the expression of the human PHOX2A gene. *J.Neurosci*, 21: 7037-7045 (I:F: 8.9)

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Lo studio dei recettori nicotinici nella dipendenza da farmaci e nelle patologie del Sistema Nervoso Centrale e Periferico

Collaborazioni internazionali in atto

J.P. Changeux, Pasteur Institute, Paris,
E. Perry, University of Newcastle, UK
S. Wonnacott, University of Bath, UK

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Microscopia confocale, elettronica a trasmissione e scansione
Attrezzature per culture di tessuto
Beta e gamma counters
Set up di elettrofisiologia
Misura della concentrazione di ioni intracellulari

Parole Chiave

Recettori, neurotrasmettitori, sistema colinergico, recettori nicotinici neuronali, farmaci attivi sul sistema colinergico, miastenia grave, autoimmunità

UNITA' DI RICERCA INBB
Padova

Responsabile Scientifico
Claudio COBELLI

Linea di Ricerca
MODELLI DI SISTEMI FISIOLGICI

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Claudio COBELLI	PO	cobelli@dei.unipd.it
Gianna Maria TOFFOLO	PO	toffolo@dei.unipd.it
Alfredo RUGGERI	PA	ruggeri@dei.unipd.it
Maria Pia SACCOMANI	RU	pia@dei.unipd.it

Non Aderenti INBB

Giovanni SPARACINO	RU	gianni@dei.unipd.it
Alessandra BERTOLDO	BC	bertoldo@dei.unipd.it
Gianluca NUCCI	BC	nucci@dei.unipd.it
Elena BREDA	BC	ebreda@dei.unipd.it
Gianluigi PILLONETTO	BC	giapi@dei.unipd.it
Tiziano CALLEGARI	DR	tam@dei.unipd.it
Marco FORACCHIA	DR	foracch@dei.unipd.it
Barbara DI CAMILLO	DR	dicamill@dei.unipd.it
Enrico GRISAN	DR	enrigri@dei.unipd.it
Stefano CORAZZA	DR	corazza@dei.unipd.it
Chiara DALLA MAN	DR	chiara.dallaman@dei.unipd.it

Sede Unità di Ricerca
Dipartimento di Ingegneria dell'Informazione

Indirizzo Via Gradenigo 6/A, 35131 Padova
Telefono +39 049 8277616
Fax +39 049 8277699
E-mail cobelli@dei.unipd.it

Sezione INBB di appartenenza
Padova

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

- a) Sviluppo di modelli, metodi e algoritmi per l'analisi e la descrizione quantitativa di sistemi fisiologici;
- b) Modelli del metabolismo del glucosio; Modelli del metabolismo di aminoacidi e proteine; Modelli della meccanica respiratoria; Modelli del sistema recettoriale e dell'emodinamica cerebrale;
1. IDENTIFICABILITA' A PRIORI. Studio di nuovi metodi per l'analisi di sistemi biologici dinamici nonlineari con metodi di computer algebra e algebra differenziale.
2. STIMA PARAMETRICA. Sviluppo di modelli probabilistici di parametri fisiologici per la stima Bayesiana con tecniche di simulazione Markov Chain Monte Carlo.
3. DECONVOLUZIONE. Sviluppo di modelli probabilistici per la stima Bayesiana di sistemi fisiologici con tecniche a minima varianza e gradi di libertà equivalenti.
4. MODELLI DEL METABOLISMO DEL GLUCOSIO. Studio di modelli per la comprensione e stima di parametri non accessibili del sistema di controllo del glucosio nello stato normale e patologico sia a livello whole-body che regionale.
5. MODELLI DEL METABOLISMO DI AMINOACIDI E PROTEINE. Studio di modelli per la descrizione quantitativa della cinetica di aminoacidi e proteine a livello regionale.
6. MODELLI DELLA MECCANICA RESPIRATORIA. Studio di modelli isomorfi del sistema respiratorio e di modelli per il monitoraggio della meccanica respiratoria in terapia intensiva.
7. IMAGING MRI E PET DI PROCESSI FISIOLGICI. Stima di flusso e volume ematico nel cervello da immagini fMRI. Modellistica ed identificazione del sistema serotoninergico da immagini PET.
8. GENOMICA. Genomica funzionale. Analisi quantitativa delle interazioni tra geni (gene networks).
9. BIOINGEGNERIA DEL SISTEMA MOTORIO. Valutazione quantitativa del sistema motorio sia per l'analisi del gesto sportivo che come ausilio alla riabilitazione

Risultati ottenuti

1. IDENTIFICABILITA' A PRIORI. E' stato sviluppato un software per l'analisi di identificabilita' a priori di modelli compartimentali lineari. E' stato sviluppato un metodo per l'analisi di modelli dinamici non lineari basato sull'algebra differenziale.
2. STIMA PARAMETRICA. si è risolto il problema dell'identificazione bayesiana del modello minimo del glucosio durante IVGTT (test di tolleranza venosa al glucosio) in soggetti con diabete di tipo 2 (NIDDM). Inoltre, è stato avviato lo studio del modello minimo della cinetica del C-peptide mediante tecniche di identificazione bayesiana.
3. DECONVOLUZIONE. Si è implementato l'approccio stocastico lineare alla deconvoluzione in un software con interfaccia grafica sviluppato in Matlab. Inoltre, l'approccio stocastico alla deconvoluzione è stato esteso al caso in cui debbano essere ricostruiti mediante deconvoluzione dei segnali non stazionari. Infine, è stato proposto un modello random-walk che consente di tenere conto nel prior della non negatività dell'ingresso, sfruttando tecniche Markov chain Monte Carlo per la determinazione della stima.
4. MODELLI DEL METABOLISMO DEL GLUCOSIO. Sono stati messi a punto nuovi approcci per la stima dei parametri di controllo del sistema glucosio-insulina da protocolli che prevedono un ingresso orale (pasto e carico orale). Sempre in condizioni di ingresso fisiologico si sono sviluppati modelli della cinetica di glucosio, insulina e C-peptide a livello whole-body. A livello regionale è stato sviluppato un nuovo modello per la stima del trasporto e metabolismo del glucosio nel muscolo scheletrico da immagini PET.
5. MODELLI DEL METABOLISMO DI AMINOACIDI E PROTEINE. E' iniziato lo sviluppo di modelli per lo studio del metabolismo di leucina e fenilalanina nel muscolo scheletrico a partire da esperimenti con traccianti.
6. MODELLI DELLA MECCANICA RESPIRATORIA. E' stato messo a punto un metodo di monitoraggio in tempo reale dei parametri della meccanica respiratoria in pazienti ventilati artificialmente. E' stato sviluppato, nel dominio del tempo, un modello di simulazione anatomo-funzionale del sistema respiratorio.
7. IMAGING MRI E PET DI PROCESSI FISIologici. È stato sviluppato un metodo per la stima del flusso e del volume ematico nel cervello da immagini di risonanza con Gadolinio in pazienti con stenosi carotidea. Si è selezionato il modello ottimo per la stima del volume di occupazione recettoriale in studi PET su pazienti depressi.
8. GENOMICA. Si è intrapresa l'analisi delle sequenze temporali del livello di espressione genica legata alla presenza di insulina.
9. BIOINGEGNERIA DEL SISTEMA MOTORIO. Si sono testati modelli per la simulazione numerica agli elementi finiti del sistema muscolare. Si sta realizzando un laboratorio per la misura 3D del movimento del corpo.

Pubblicazioni più significative nel periodo 2000-2002

1. Nucci G, Tessarin S, Cobelli C. A morphometric model of lung mechanics for time-domain analysis of alveolar pressures during mechanical ventilation. *Ann Biomed Eng.* 2002; 30(4):537-45.
2. Dalla Man C, Caumo A, Cobelli C. The oral glucose minimal model: estimation of insulin sensitivity from a meal test. *IEEE Trans Biomed Eng.* 2002; 49(5):419-29.
3. Pillonetto G, Sparacino G, Magni P, Bellazzi R, Cobelli C. Minimal model $S(I)=0$ problem in NIDDM subjects: nonzero Bayesian estimates with credible confidence intervals. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002; 282(3):E564-73.
4. Pillonetto G, Sparacino G, Cobelli C. Reconstructing insulin secretion rate after a glucose stimulus by an improved stochastic deconvolution method. *IEEE Trans Biomed Eng.* 2001; 48(11):1352-4.
5. Bertoldo A, Peltoniemi P, Oikonen V, Knuuti J, Nuutila P, Cobelli C. Kinetic modeling of $[(18)F]FDG$ in skeletal muscle by PET: a four-compartment five-rate-constant model. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001; 281(3):E524-36.
6. Audoly S, Bellu G, D'Angio L, Saccomani MP, Cobelli C. Global identifiability of nonlinear models of biological systems. *IEEE Trans Biomed Eng.* 2001; 48(1):55-65.
7. Breda E, Cavaghan MK, Toffolo G, Polonsky KS, Cobelli C. Oral glucose tolerance test minimal model indexes of beta-cell function and insulin sensitivity. *Diabetes.* 2001; 50(1):150-8.
8. Vicini P, Cobelli C. The iterative two-stage population approach to IVGTT minimal modeling: improved precision with reduced sampling. Intravenous glucose tolerance test. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001; 280(1):E179-86.
9. Toffolo G, Breda E, Cavaghan MK, Ehrmann DA, Polonsky KS, Cobelli C. Quantitative indexes of beta-cell function during graded up&down glucose infusion from C-peptide minimal models. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001; 280(1):E2-10.
10. Caumo A, Bergman RN, Cobelli C. Insulin sensitivity from meal tolerance tests in normal subjects: a minimal model index. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85(11):4396-402.
11. Magni P, Bellazzi R, Sparacino G, Cobelli C. Bayesian identification of a population compartmental model of C-peptide kinetics. *Ann Biomed Eng.* 2000; 28(7):812-23.
12. Nucci G, Mergoni M, Bricchi C, Polese G, Cobelli C, Rossi A. On-line monitoring of intrinsic PEEP in ventilator-dependent patients. *J Appl Physiol.* 2000; 89(3):985-95.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

1. IDENTIFICABILITA' A PRIORI. Nuove strategie metodologiche e computazionali per estendere il dominio di validità degli algoritmi sviluppati.
2. STIMA PARAMETRICA. Sviluppo di metodi probabilistici che consentano di incorporare conoscenze fisiologiche sulla non negatività dei parametri incogniti e di tecniche di stima basate su Markov Chain Monte Carlo.
3. DECONVOLUZIONE. Sviluppo di metodi probabilistici che consentano di incorporare conoscenze fisiologiche sulla monotonicità dei segnali fisiologici e di tecniche di stima basate su Markov Chain Monte Carlo
4. MODELLI DEL METABOLISMO DEL GLUCOSIO. Sviluppo di nuovi approcci per la stima dei parametri di controllo del sistema glucosio-insulina (ad es. sensibilità all'insulina) da protocolli che prevedono un ingresso orale (pasto e OGTT). Nuovo modello di simulazione whole-body. Modelli regionali della cinetica da immagini PET.
5. MODELLI DEL METABOLISMO DI AMINOACIDI E PROTEINE. Modellistica ed identificazione, a livello d'organo, della sintesi e degradazione delle proteine da esperimenti con aminoacidi marcati.
6. MODELLI DELLA MECCANICA RESPIRATORIA. Analisi, mediante modelli di simulazione anatomicamente dettagliati, dell'impatto della ventilazione artificiale sulla distribuzione di flussi e pressioni a livello alveolare. Applicazione delle tecniche di analisi della variabilità della meccanica respiratoria al fine di ottimizzare l'adattamento paziente-ventilatore.
7. IMAGING MRI E PET DI PROCESSI FISIologici. Per quanto riguarda la modellistica in ambito fMRI verrà sviluppato un modello per la quantificazione del segnale BOLD. Nel campo PET si intendono sviluppare modelli per la quantificazione della cinetica del glucosio nel tessuto adiposo. Inoltre verranno approfonditi gli aspetti metodologici dell'imaging PET del sistema recettoriale con diversi traccianti.
8. GENOMICA. Messa a punto di modelli e metodi per lo studio quantitativo in vitro del sistema di controllo e regolazione genica sotto effetto dell'insulina.
9. BIOINGEGNERIA DEL SISTEMA MOTORIO. Sviluppo di metodi per l'identificazione della cinematica del muscolo scheletrico. Cinematica diretta e inversa del movimento umano al fine di fornire migliori strumenti clinici per l'analisi dei disordini motori.

Collaborazioni internazionali in atto

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

Department of Medical Research, University of Pittsburgh, PA, USA

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

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

PC Pentium (18)

Laserprinter (5)

Jetprinter (1)

Scanner (1)

Parole Chiave

Biosistemi, Modelli, Metabolismo, Sistemi Fisiologici, Identificazione, Imaging, Traccianti, Controllo Fisiologico, Endocrinologia.

UNITA' DI RICERCA INBB
Bologna

Responsabile Scientifico

Antonio CONTESTABILE

Linea di Ricerca

SOPRAVVIVENZA, MORTE CELLULARE E VIE DI SEGNALE ATTIVATE NELLO SVILUPPO CEREBRALE E NELLE NEUROLOGIE.

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Antonio CONTESTABILE	PO	acontest@alma.unibo.it
Alessandro POLI	PA	apoli@alma.unibo.it
Luigi VILLANI	PA	Villanig@alma.unibo.it
Marco VIRGILI	RU	mvirgili@alma.unibo.it

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Biologia evolutiva sperimentale

Indirizzo: Via Selmi 3, 40126 Bologna

Telefono: 051 2094134

Fax: 051 251208.

E-mail: acontest@alma.unibo.it

Sezione INBB di appartenenza

Bologna

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Chiarificare il ruolo svolto dal recettore NMDA per il glutamato nello sviluppo cerebrale e nelle neuropatie. Chiarificare il ruolo svolto dal monossido di azoto come messaggero diffusibile nello sviluppo cerebrale e nelle neuropatie e sua interazione con il recettore NMDA per il glutamato. Ruolo di fattori di trascrizione e di chinasi di sopravvivenza nei segnali di sopravvivenza collegati al monossido di azoto ed al recettore NMDA. Meccanismi di sopravvivenza ed eliminazione apoptotica delle cellule nervose nello sviluppo e nelle neuropatie. Vie di segnalazione attivate nella morte cellulare programmata e nella neuroprotezione. Alterazioni molecolari collegate ai processi cellulari di invecchiamento cerebrale. Ruolo delle cellule della microglia nella fisiopatologia cerebrale.

Risultati ottenuti

Interazioni monossido di azoto-recettore NMDA nello sviluppo cerebellare in condizioni normali e di microencefalia sperimentalmente indotta. Effetti del blocco cronico della produzione di monossido di azoto e del recettore NMDA nello sviluppo cerebrale. Chiarificazione del ruolo del fattore di trascrizione CREB nella sopravvivenza neuronale mediata dal monossido di azoto e dal recettore NMDA. Identificazione della chinasi di sopravvivenza Akt come elemento di trasduzione del segnale di sopravvivenza mediato dal monossido di azoto in cellule nervose. Coinvolgimento di proteasi, in particolare caspasi, nella morte cellulare programmata di cellule nervose. Ruolo neuropatologico delle poliamine cerebrali e loro coinvolgimento nell'invecchiamento cerebrale. Alterazioni di sistemi di neurotrasmettitori nell'invecchiamento cerebrale. Modificazioni dell'espressione genica nell'invecchiamento cerebrale.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

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

2) Virgili M., Contestabile A. (2000) Partial neuroprotection of in vivo excitotoxic brain damage by chronic administration of the red wine antioxidant agent, trans-resveratrol in rats. Neurosci Lett. 281, 123-126.

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

4) Monti B., Zanghellini P., Contestabile A. (2001) Characterization of ceramide-induced apoptotic death in cerebellar granule cells in culture. Neurochem. Int. 39, 11-18.

- 5) Virgili M., Monti B., Polazzi E., Angiolini G., Contestabile A. (2001) Topography of neurochemical alterations in the CNS of aged rats. Int. J. Devel. Neurosci. 19, 109-116.
- 6) Contestabile A. (2001) Antioxidant strategies for neurodegenerative diseases. Exp. Opin. Ther. Patents 11, 573-585.
- 7) Polazzi E., Gianni T., Contestabile A. (2001) Microglial cells protect cerebellar granule neurons from apoptosis: evidence for reciprocal signaling. Glia 36, 271-280.
- 8) Ciani E., Baldinotti I., Contestabile A. (2001) Sustained, long-lasting inhibition of nitric oxide synthase aggravates the neural damage in some models of excitotoxic brain injury. Brain Res. Bull. 56, 29-35.
- 9) Virgili M., Necchi D., Scherini E., Contestabile A. (2001) Increase of the ornithine decarboxylase/polyamine system and transglutaminase upregulation in the spinal cord of aged rats. Neurosci. Lett. 309, 62-66.
- 10) Contestabile A. (2001) Oxidative stress in neurodegeneration: mechanisms and therapeutic perspectives. Curr. Topics Med. Chem. 1, 553-568.
- 11) Contestabile A. (2002) Cerebellar granule cells as a model to study mechanisms of neuronal apoptosis or survival in vivo and in vitro. The Cerebellum 1, 41-55.
- 12) Ciani E., Virgili M., Contestabile A. (2002) Akt pathway mediates a cGMP-dependent survival role of nitric oxide in cerebellar granule neurons. J. Neurochem. 81, 218-228.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Utilizzazione di un modello animale di Sclerosi amiotrofica laterale e di un modello di sindrome di Down, finalizzata alla caratterizzazione cellulare e molecolare del danno ed alla sperimentazione di possibili approcci terapeutici. Dissezione molecolare delle vie di segnalazione cellulare coinvolte nella sopravvivenza od eliminazione apoptotica delle cellule nervose. Espressione genica in condizioni di alterato sviluppo cerebrale, di neuropatologie e dell'invecchiamento cerebrale. Meccanismi molecolari attivati dal monossido di azoto nelle cellule nervose a diversi stadi dello sviluppo. Interazioni reciproche fra cellule nervose e cellule della microglia nella sopravvivenza o morte cellulare programmata.

Collaborazioni internazionali in atto

Cristina Alberini. Mount Sinai University, New York

Frode Fonnum. Department of neurotoxicology. Kjeller, Norvegia.

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

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Attrezzature per colture cellulari; Gel imager; PCR; HPLC; Phospho-imager; Microscopio confocale

Parole Chiave

Sviluppo cerebrale, Invecchiamento cerebrale, Morte cellulare programmata, Vie di segnalazione cellulare, Studio dell'espressione genica, Neuropatologie, Neurotossicità e neuroprotezione, Modelli animali di patologie.

UNITA' DI RICERCA INBB
Napoli

Responsabile Scientifico
Mario DE ROSA

Linea di Ricerca

TECNICHE INNOVATIVE DI FERMENTAZIONE PER IL RAGGIUNGIMENTO DI ALTE RESE IN BIOMASSA E PRODOTTI CORRELATI ANCHE IN MICRORGANISMI RICOMBINANTI

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Mario DE ROSA	PO	mario.derosa@unina2.it
Maria CARTENI	PO	maria.carteni@unina2.it

Non Aderenti INBB

Chiara SCHIRALDI	RU	chiara.schiraldi@unina2.it
Mariateresa GIULIANO	BC	Mariateresa.giuliano@unina2.it
Teresa COSTABILE	DR	Teresa.costabile@unina2.it
Maddalena GENEROSO	DR	Maddalena.generoso@unina2.it
Carmelina MARESCA	DR	carmelina.maresca@unina2.it
Vivien VALLI	DR	vivien.valli@unina2.it

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sez. di Biotecnologie e Biologia Molecolare, Facoltà di Medicina e Chirurgia

Indirizzo: via De Crecchio n°7, 80138 Napoli, Italia

Telefono 081-5665866

Fax 081-5667546

E-mail mario.derosa@unina2.it

Sezione INBB di appartenenza

Napoli

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

L'obiettivo di questa linea di ricerca è relativo all'ottimizzazione di processi fermentativi di microrganismi caratterizzati da una cinetica di crescita con inibizione da prodotti metabolici. E' stato sviluppato un bioreattore a membrana, che è stato utilizzato nella crescita di microrganismi termocidofili, alofili, mesofili ricombinanti e probiotici nell'ottica di migliorare le rese di questi processi fermentativi per ottenere biomassa e/o biomolecole correlate alla crescita microbica.

- I microrganismi estremofili hanno un'enorme potenzialità applicativa, probabilmente inespressa a causa delle basse rese in biomassa tipiche delle loro colture. L'utilizzo su larga scala di enzimi isolati da tali microrganismi è subordinata allo sviluppo di opportune strategie di produzione degli stessi. Uno degli obiettivi primari di questa linea di ricerca risulta quindi l'ottimizzazione della produzione di biocatalizzatori da estremofili attraverso l'applicazione di tecniche di microfiltrazione.
- Il nostro gruppo di ricerca lavora da qualche anno sull'ottimizzazione delle condizioni di crescita di alcuni ceppi di probiotici quali *Lactobacillus casei*, e *Lactobacillus delbruekii* ssp. *bulgaricus*. Poiché la resa in biomassa di LAB è limitata dall'accumulo di metaboliti tossici quali l'acido lattico, risulta di interesse valutare l'applicazione di un bioreattore a membrana per raggiungere un'alta densità cellulare attraverso il controllo della concentrazione degli inibitori. Poiché i LAB sono produttori di polisaccaridi esocellulari (EPS), che potrebbero essere utilizzati come agenti addensanti naturali, costituisce ulteriore obiettivo della linea di ricerca, l'ottimizzazione delle condizioni di crescita per la produzione di biomolecole ad alto peso molecolare. Infatti, l'applicazione degli EPS da batteri lattici nell'industria alimentare è subordinata allo sviluppo di un processo che permetta alte rese produttive.
- Negli ultimi anni, sono stati purificati e caratterizzati diversi enzimi di interesse nel processo di trasformazione dell'amido in carboidrati ad alto valore aggiunto, da organismi estremofili, ed in particolare da estremi termofili. Poiché gli enzimi di interesse hanno potenzialità applicative nell'industria alimentare risulta di fondamentale importanza sviluppare un sistema di espressione GRAS (generally recognized as safe). A tal riguardo è in corso di studio l'espressione della α -glucosidasi da *Sulfolobus solfataricus* MT-4 in *Lactococcus lactis*. Il progetto di ricerca riguarda quindi da una parte l'ottimizzazione dell'espressione e della produzione enzimatica e dall'altra lo sviluppo di nuovi costrutti che permettano la secrezione dell'enzima di interesse nel mezzo di coltura nell'ottica di semplificare le procedure di purificazione.

Risultati ottenuti

Negli ultimi anni è stato sviluppato e validato un bioreattore a membrana, costituito da un recipiente di fermentazione tradizionale modificato all'altezza dei frangiflutti con l'inserimento di moduli a fibre cave in polipropilene. Il bioreattore così configurato è stato utilizzato per la crescita ad alte densità cellulari di microrganismi termofili, quali *Sulfolobus solfataricus* e *S. shibatae*, mesofili ricombinanti come *E. coli* e *Pichia pastoris* e batteri lattici potenzialmente probiotici come *L. bulgaricus*, *L. casei*. In tutti i processi sviluppati si è avuto un notevole miglioramento della resa in biomassa e prodotti correlati. Il sistema sperimentale ha inoltre, permesso di valutare il metabolismo degli organismi utilizzati ed i parametri cinetici di crescita. Tali valori sono stati successivamente utilizzati per lo sviluppo di un modello matematico che riuscisse a simulare il processo di microfiltrazione.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

C. Schiraldi, F. Marulli, I Di Lernia, A. Martino and M. De Rosa

A microfiltration bioreactor to achieve high cell density in *Sulfolobus Solfataricus* fermentation *Extremophiles* 3: 199-204 (1999)

F. La Cara, M. R. Scarfi, S. D'Auria, R. Massa, G. d'Ambrosio, G. Franceschetti, M. Rossi and M. De Rosa

Different effects of microwave energy and conventional heat on the activity of a thermophilic β -Galactosidase from *Bacillus acidocaldarius*

Bioelectromagnetics 20:172-176 (1999)

F. La Cara, S. D'Auria, M.R. Scarfi, O. Zeni, R. Massa, G. d'Ambrosio, G. Franceschetti, M. De Rosa and M. Rossi

Microwave exposure effect on a thermophilic alcohol dehydrogenase

Protein and Peptide Letters, Vol. 6, N° 3, 155-162, (1999)

Morana, I. Di Lernia, M. Carteni, R. De Rosa and M. De Rosa

Synthesis and characterization of a new class of stable S-adenosyl-L-methionine salts

International Journal of Pharmaceutics 194, 61-68 (2000)

C. Schiraldi, A. Martino, M. Acone, I. Di Lernia, A. Di Lazzaro, F. Marulli, M. Generoso, M. Carteni and M. De Rosa

Effective production of a thermostable α -Glucosidase from *Sulfolobus Solfataricus* in *Escherichia Coli* exploiting a microfiltration bioreactor

Biotechnology e Bioengineering 70(6), 670-676 (2000)

Martino, C. Schiraldi, A. Di Lazzaro, I. Fiume, G. Spagna, P.G. Pifferi, M. De Rosa

Improvement of the flavour of falanghina white wine using a purified glucosidase preparation from *Aspergillus niger*

Process Biochemistry 36, 93-102 (2000)

M. Moracci, B. Cobucci Ponzano, A. Trincone, S. Fusco, M. De Rosa, J. van der Oost, C.W. Sensen, R. L. Charlebois and M. Rossi

Identification and molecular characterization of the first α -xylosidase from an Archaeon

Journal of Biological Chemistry Vol. 275, n° 29 22082-22089 (2000)

A. Di Lazzaro, A. Morana, C. Schiraldi, A. Martino, C. Ponzone and M. De Rosa

An enzymatic process for the production of the pharmacologically active glycoside desglucodesrhamnoruscin from *Ruscus aculeatus* L.

Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic vol 11/4-6, 307-314 (2001)

D. De Pascale, M.P. Sasso, I. Di Lernia, A. Di Lazzaro, A. Furia, M. Carteni-Farina, M. Rossi and M. De Rosa

Recombinant thermophilic enzymes for trehalose and trehalosyl dextrins production

Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic Vol 11/4-6, 777-786 (2001)

A. Martino, C. Schiraldi, S. Fusco, I. Di Lernia, T. Costabile, T. Pellicano, M. Marotta, M. Generoso,

J. van der Oost, C.W. Sensen, R. L. Charlebois, M. Moracci, M. Rossi, M. De Rosa

Properties of the recombinant α -glucosidase from *Sulfolobus solfataricus* in relation to starch processing *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* Vol 11/4-6, 787-794 (2001)

C.Schiraldi, M. Accone, M. Giuliano, I. Di Lernia, C. Maresca, M. Carteni, M. De Rosa
Innovative fermentation strategies for extremophilic enzymes production *Extremophiles* 5: 193-198 (2001)

A. Morana, A. De Rosa, M. Carteni, M. Parlato, M. De Rosa
S-adenosyl-L-methionine N-ole-l-oyltaurate: pharmacokinetic of the orally administered salt in rats *International Journal of Pharmaceutics* 230:47-55 (2001)

I. Di Lernia, C. Schiraldi, M. Generoso and M. De Rosa
Trehalose production at high temperature exploiting an immobilized cell bioreactor
Extremophiles published online 18/4/2002

M. Marotta, A. Martino, A. De Rosa, E. Farina, M. Carteni and M. De Rosa
Degradation of dental plaque glucans and prevention of glucan formation using commercial enzymes
Process Biochemistry accepted for publication (2002)

D. de Pascale, I. Di Lernia, M.P. Sasso, A. Furia, M. De Rosa, M. Rossi
A novel thermophilic chimeric enzyme for trehalose production
Extremophiles accepted for publication (2002)

Schiraldi C., Giuliano M., and De Rosa M. Perspectives on the Biotechnological potential of Archaea, *ARCHAEA*, in press

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

In prospettiva si intende focalizzare la ricerca sull' espressione e produzione di enzimi termofili in organismi GRAS, quali ad esempio i batteri lattici.

Inoltre saranno valutate le condizioni di crescita ottimali per la produzione di metaboliti di interesse applicativo in relazione alla richiesta di ossigeno ed alla concentrazione di nutrienti complessi. In particolare il gruppo è interessato alla produzione di ectoine ed idrossiectoine da microrganismi alofili, ed alla produzione di acido lattico otticamente puro e di esopolisaccaridi da batteri lattici.

Collaborazioni internazionali in atto

Prof. Erwin Galinski,
Prof. Garo Antranikian
Dr. Joergen Hugenoltz

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Fermentatore Braun Biotech. Int., Biostat CT (2.5 L) con unità di controllo digitale e software MFCS per acquisizione dei dati on-line , controllo remoto e calcolo dei parametri di crescita
Analizzatore di gas esausti- INNOVA System, con rivelatore magnetoacustico
Bioreattore CSTR per biotrasformazioni a cellule immobilizzate
Bireattori tubolari di misura fino ad 1 L
HPLC e HPAEC-pad, Dionex instrument
Incubatore
Centrifuga
Autoclave

Parole Chiave

Alta densità cellulare, enzimi termofili, biotrasformazioni a cellule immobilizzate, probiotici, microfiltrazione.

UNITA' DI RICERCA INBB
Napoli

Responsabile Scientifico

Mario DE ROSA

Titolo

SVILUPPO E CARATTERIZZAZIONE DI BIOMATERIALI INNOVATIVI DI INTERESSE PER APPLICAZIONI BIOMEDICHE

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Mario DE ROSA	PO	mario.derosa@unina2.it
Maria CARTENI	PO	maria.carteni@unina2.it

Non Aderenti INBB

Chiara SCHIRALDI	RU	chiara.schiraldi@unina2.it
Alfredo DE ROSA	RU	alfredo.derosa@unina2.it
Margherita ACONE	DR	margherita.acone@unina2.it
Antonella D'AGOSTINO	DR	Antonella.dagostino@unina2.it
Annaclaudia ESPOSITO	BC	Annaclaudia.esposito@unina2.it
Ernesto FARINA	DR	Ernesto.farina@unina2.it

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sez. di Biotecnologie e Biologia Molecolare, Facoltà di Medicina e Chirurgia

Indirizzo: via De Crecchio n°7, 80138 Napoli, Italia

Telefono 081-5665866

Fax 081-5667546

E-mail: mario.derosa@unina2.it

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

L'obiettivo della seguente attività di ricerca è lo sviluppo di materiali biocompatibili innovativi. Tali materiali hanno assunto da tempo un ruolo strategico in campo odontoiatrico, aprendo nuove frontiere al trattamento di patologie del cavo orale ed all'implantologia e restauro dentale.

L'attività di ricerca svolta presso i laboratori prevede lo sviluppo di due classi di biomateriali:

1. Idrogeli chimici: tali materiali sono costituiti principalmente da matrici polimeriche a base di metacrilati (HEMA, HPMA, etc), ampiamente utilizzate in odontoiatria modificate mediante l'aggiunta di nanoparticelle inorganiche (a base di silice o ossido di titanio), al fine di ottenere un materiale ibrido di buona biocompatibilità che presenti migliori proprietà chimico fisiche.
2. Idrogeli fisici: tali materiali sono ottenuti per criostrutturazione di soluzioni a diversa concentrazione di alcol polivinilico (PVA) a diverso peso molecolare, modificato per aggiunta di un componente essenziale della matrice extracellulare, l'acido ialuronico (HA) coinvolto nell'adesione, proliferazione e migrazione cellulare.

La sintesi di materiali ibridi ha dato buoni risultati sia da un punto di vista meccanico che biologico. Infatti l'aggiunta di nanoparticelle inorganiche ha portato ad un aumento del modulo elastico dell'ibrido e ad una più alta resa di polimerizzazione rispetto alla sola matrice polimerica. Da un punto di vista biologico i materiali non risultano essere citotossici; come risulta infatti da conta cellulare e saggi di vitalità cellulare le curve di crescita non subiscono alcun alterazione rispetto al controllo. I materiali ibridi elicitano adesione cellulare in maniera superiore alla matrice di controllo come viene evidenziato da analisi al SEM, le immagini manifestano la caratteristica morfologia allungata dei fibroblasti, cellule di linea utilizzate per prove di adesione.

Anche i gel fisici a base di PVA-HA hanno dimostrato di migliorare l'adesione cellulare rispetto al solo PVA, utilizzato come controllo negativo.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Si intende valutare sia dal punto di vista chimico-fisico che biologico materiali ottenuti variando la tipologia dei filler anche sviluppando materiali 3D da utilizzare come scaffold per la crescita di tessuti.

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Stufa a termoventilazione forzata, Incubatore a CO₂, Microscopio Ottico, Omogenizzatore DIAX 900 Heidolph.

Collaborazioni scientifiche

Prof. Antonio Apicella, Dip. di Ingegneria dei Materiali e della Produzione, Università di Napoli Federico II

Ing. Alessandro Sannino, Dip. di Ingegneria dell'Innovazione, Università di Lecce.

Pubblicazioni:

Rossi, A. Morana, I. Di Lernia, A. Ottombrino and M. De Rosa

Immobilization of enzymes on spongy polyvinyl alcohol cryogels: the example of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*

Italian Journal of Biochemistry 48 (2) 91-97 (1999)

Giuliano M., Schiraldi C., Maresca M., De Rosa M., 2002, L-carnitine production exploiting *Proteus mirabilis* immobilized in PVA- cryogels, Enzyme and Microbial Technology, submitted.

M. Marotta, A. Martino, A. De Rosa, E. Farina, M. Carteni and M. De Rosa

Degradation of dental plaque glucans and prevention of glucan formation using commercial enzymes

Process Biochemistry accepted for publication (2002)

Parole Chiave

Nanoparticelle, Criostrutturazione, Polimerizzazione radicalica, adesione cellulare

UNITA' DI RICERCA INBB
Pisa

Responsabile Scientifico

Danilo DE ROSSI

Linea di Ricerca

SVILUPPO DI MATERIALI, SISTEMI E TESSUTI INTELLIGENTI PER APPLICAZIONI NEL SETTORE DELLA BIOINGEGNERIA

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Danilo DE ROSSI	PO	derossi@piaggio.cci.unipi.it
Arti AHLUWALIA	PA	arti.ahluwalia@ing.unipi.it

Non Aderenti INBB

Alberto MAZZOLDI	RU	alberto@piaggio.cci.unipi.it
Pasquale SCILINGO	Assegnista	pasquale@piaggio.cci.unipi.it
Giovanni VOZZI	Assegnista	vozzi @piaggio.cci.unipi.it
Giovanni PIOGGIA	Assegnista	Giovanni.pioggia@ifc.cnr.it
Antonino PREVITI	DR	previti@piaggio.cci.unipi.it
Francesca BIANCHI	DR	franw@ifc.cnr.it

Sede Unità di Ricerca

Centro Interdepartmentale di Ricerca "E. Piaggio"

Indirizzo Facoltà di Ingegneria, Università di Pisa, via Diotisalvi 2

Telefono 050 553639

Fax 050 550650

E-mail derossi@piaggio.cci.unipi.it, arti.ahluwalia@ing.unipi.it

Sezione INBB di appartenenza

Bologna

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Il gruppo si occupa di argomenti che spaziano dallo sviluppo di tessuti sensibili e responsivi all'ingegneria tessutale. La filosofia unificante le diverse attività è quella orientata alla realizzazione di strutture e sistemi biomimetici che prendono ispirazione dalla natura. Argomenti comuni sono la microfabbricazione e l'utilizzo di materiali polimerici cosiddetti "intelligenti", o con proprietà trasduttive. I materiali utilizzati comprendono polimeri conduttori, nanotubi di carbonio, idrogeli e polimeri bioerodibili.

Risultati ottenuti

Negli ultimi anni sono stati sviluppati dei sistemi di microfabbricazione basati sull'uso di una microsiringa appositamente realizzata (PAM, il Pressure Assisted Microsyringe) e sulla tecnica di soft lithography. Sono state inoltre messe a punto metodiche per la deposizione di polimeri "intelligenti" tramite la tecnica ink-jet.

Utilizzando questi tools, il gruppo ha prodotto sensori olfattivi e biosensori, nonché attuatori e strutture polimeriche bi- e tri-dimensionali per l'adesione e la proliferazione cellulare.

Per quanto riguarda i tessuti sensibili, sono stati realizzati guanti, magliette e calze sensibili al movimento, utilizzando lycra rivestito con polimeri conduttori e grafite. Questi sistemi hanno utilità sia nella medicina, nello sport che nel mondo di intrattenimento.

Altri sviluppi interessanti sono lo sviluppo di una faccia biomimetica e di endoscopi capace di trasmettere il senso tattile del tessuto sotto esame.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

1. R.H. Baughman, C. Changxing, A.A. Zakhidov, Z. Iqbal, J.N. Barisci, G.N. Spinks, G.G. Wallace, A. Mazzoldi, D. De Rossi, A.G. Rinzler, O. Jashinski, S. Roth, M. Kertesz, Carbon nanotubes artificial muscles, *SCIENCE*, vol. 284, p. ., 1999
2. D. De Rossi, A. Della Santa, A. Mazzoldi, Dressware: wearable hardware, *Materials science & engineering c-biomimetic and supramolecular systems*, num. ., vol. 7, p. 31, 1999

3. A.Ahluwalia, Basta G., D. Ricci, R. Francesconi, C. Domenici, M. Grattarola, L. Palchetti, C. Preininger and D. De Rossi, Langmuir-Blodgett films of antibodies as mediators of endothelial cell adhesion on polyurethanes, J. BIOMATER. SCI. POLYMER EDN. , vol. 10, p. 295, 1999
4. Preininger C. , Clausen-Schaumann H., Ahluwalia A., De Rossi D., Characterisation of IgG Langmuir-Blodgett films immobilised on functionalised polymers, TALANTA, num. ., vol. 52, p. 921, 2000
5. R. Stella, G. Serra, D. De Rossi, J.N. Barisci, G.G. Wallace, Detection of olive oil aroma by an electronic nose based on conducting polymer sensors, SENSORS AND ACTUATORS B-CHEMICAL, num. 1-2, vol. 63, p. 1, 2000
6. A.Bicchi, D. De Rossi, E. P. Scilingo, Haptic discrimination of softness in teleoperation: the role of the contact area spread rate , IEEE TRANSACTIONS ON ROBOTICS AND AUTOMATION, num. 5, vol. 16, p. 496, 2000
7. A.Ahluwalia, G. Basta, D. Ricci, R. Francesconi, C. Domenici, M. Grattarola, L. Palchetti, C. Preininger and D. De Rossi, Langmuir-Blodgett films of antibodies as mediators of endothelial cell adhesion on polyurethanes, J. Biomater. Sci. Polymer Edn. , num. 3, vol. 10, p. 295, 1999
8. Ahluwalia, Basta, Chiellini, Ricci, Vozi, Endothelial adhesion on bioerodible polymers, JOURNAL OF MATERIALS SCIENCE-MATERIALS IN MEDICINE, vol. 12, p. 613, 2001
9. G. Vozi, , A. Previti, D. De Rossi, A. Ahluwalia, "Microsyringe Based Deposition of 2 and 3-D Polymer Scaffolds with a Well Defined Geometry for Application to Tissue Engineerings , Tissue Engineering, in press.
10. Ahluwalia A., De Rossi D., Giusto G., Chen O., Likhtenshtein G., Papper V.,Fluorescent Antigen Quenching for Determination of orientation of Solid Phase Antibodies, Analytical Biochemistry, in press.
11. Giovanni Vozi, Christopher J. Flaim, Francesca Bianchi, Arti Ahluwalia, Sangeeta Bhatia' Microfabricated PLGA Scaffolds,:A Comparative Study for Application to Tissue Engineering , J. Materials Science C, 2002.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Nei prossimi 3 anni il gruppo ha intenzione di sviluppare e progettare nuovi dispositivi che possono avere applicazione nell'ambito biomedico. In particolare, l'attività sarà centrata su:

- realizzazione di indumenti sensibili realizzati con fibra attiva per il monitoraggio di pazienti;
- sviluppo di tessuti biologici per il trattamento di malattie cardiovascolari;
- intelaiature attive per il rilascio di sostanze attive e per lo stimolo di cellule in siti e a tempi specifici;
- sonde biomediche attive (sensibili a tatto, direzionabili o con rilascio controllato);
- attuatori biomimetici.

Collaborazioni internazionali in atto

University of Texas: Porgramma sullo sviluppo di applicazioni per nanotubi

University of Illinois: Programma per la fabbricazione di inteliature conduttive per lo stimolo e registrazione di segnali provenienti da neuroni

Santa Fe Institute of Science and Technology: Programma per lo sviluppo di fibre attive

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Officina Meccanica, officina elettronica, sistemi di microfabbricazione, microscopio a fluorescenza, laboratorio di coltura cellulare, potenziostato, spettrofotometro

Parole Chiave

Materiali e tessuti intelligenti, ingegneria tessutale, attuatori polimerici, microfabbricazione, sensori e attuatori biomimetici

UNITA' DI RICERCA INBB
Padova

Responsabile Scientifico

Fabio DI LISA

Linea di Ricerca

MITOCONDRI E MORTE CELLULARE

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Fabio DI LISA.	PO	dilisa@civ.bio.unipd.it
Non Aderenti INBB		
Roberta MENABO	PT (CNR)	menabo@civ.bio.unipd.it
Marcella CANTON	BC	canton@civ.bio.unipd.it
Giovanni MIOTTO	RU	giovanni.miotto@unipd.it
Giuliano DODONI	DR	dodonig@yahoo.com

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Chimica Biologica – Università di Padova

Indirizzo Viale G. Colombo 3

Telefono 049-773887

Fax 049-80773310

E-mail dilisa@civ.bio.unipd.it

Sezione INBB di appartenenza

Padova

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

La tecnica del quenching selettivo della calceina, da noi sviluppata per lo studio in situ del poro della transizione di permeabilità mitocondriale (PTP), è stata applicata per studiare le relazioni tra tale processo e l'apoptosi. Dai nostri risultati la relazione non appare bidirezionale. Infatti, mentre stimoli apoptotici determinano l'apertura del poro di transizione della permeabilità, questo processo, come nel caso di cellule esposte a ionoforo del Ca^{2+} , non necessariamente è seguito da apoptosi. Complessa appare anche la relazione tra PTP e potenziale di membrana mitocondriale che è collassato solo a seguito di aperture prolungate di PTP. La durata del periodo di apertura, parametro rilevabile solo con la metodica della calceina, appare essere dunque elemento critico nel determinare sia l'alterazione irreversibile della funzione mitocondriale, sia il destino delle cellule in senso apoptotico. Abbiamo altresì caratterizzato il ruolo del PTP nel cuore ischemico attraverso lo studio del catabolismo dei piridin nucleotidi (PN). Abbiamo dapprima dimostrato che l'apertura del poro mitocondriale causa la deplezione dei PN nei mitocondri isolati. Successivamente abbiamo evidenziato che condizioni modeste di danno si associano ad una diminuzione di NAD(P) non superiore al 30%, imputabile alla scomparsa del NAD citosolico catalizzata dall'attivazione della NAD glicoidrolasi dovuta alla diminuzione dell'ATP. In condizioni di danno marcato (es. ri-perfusione post-ischemica o calcio paradosso), che comporti il sovraccarico intracellulare di Ca^{2+} , si osserva la quasi completa scomparsa del NAD (<20% del controllo) che ovviamente coinvolge anche il pool mitocondriale. Una diminuzione marcata dei contenuti dei PN indica dunque l'avvenuta apertura del PTP, come ulteriormente dimostrato dall'inibizione esercitata dalla ciclosporina A.

Risultati ottenuti

- Metodo originale per lo studio della transizione della permeabilità mitocondriale in cellule intatte
- Chiarimento delle relazioni tra disfunzione mitocondriale e morte cellulare
- Ruolo del catabolismo del NAD come indicatore di disfunzione mitocondriale nel danno ischemico
- Ruolo dei mitocondri nella morte cellulare indotta da composti fotoattivi

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

1. Bernardi P, Scorrano L, Colonna R, Petronilli V, Di Lisa F: Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues. *Eur J Biochem.* 1999;264:687-701.
2. Petronilli V, Miotto G, Canton M, Brini M, Colonna R, Bernardi P, Di Lisa F: Transient and long-lasting openings of the mitochondrial permeability transition pore can be monitored directly in intact cells by changes in mitochondrial calcein fluorescence. *Biophys J.* 1999;76:725-734.

3. Scorrano L, Petronilli V, Colonna R, Di Lisa F, Bernardi P: Chloromethyltetramethylrosamine (Mitotracker Orange™) induces the mitochondrial permeability transition and inhibits respiratory complex I. Implications for the mechanism of cytochrome c release. *J Biol Chem.* 1999;274:24657-24663.
4. Scorrano L, Petronilli V, Di Lisa F, Bernardi P: Commitment to apoptosis by GD3 ganglioside is mediated by selective opening of the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem.* 1999;274:22581-22585.
5. Scorrano L, Petronilli V, Colonna R, Di Lisa F, Bernardi P: Interactions of chloromethyltetramethylrosamine (Mitotracker Orange) with isolated mitochondria and intact cells. *Ann N Y Acad Sci.* 1999;893:391-395.
6. Bernardi P, Petronilli V, Di Lisa F, Forte M: A mitochondrial perspective on cell death. *Trends Biochem Sci.* 2001;26:112-117.
7. Di Lisa F, Ziegler M: Pathophysiological relevance of mitochondria in NAD⁺ metabolism. *FEBS Lett.* 2001;492:4-8.
8. Di Lisa F: Mitochondrial contribution in the progression of cardiac ischemic injury. *IUBMB Life.* 2001;52:255-261.
9. Di Lisa F, Menabò R, Canton M, Barile M, Bernardi P: Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes depletion of mitochondrial and cytosolic NAD⁺ and is a causative event in the death of myocytes in post-ischemic reperfusion of the heart. *J Biol Chem.* 2001;276:2571-2575.
10. Petronilli V, Penzo D, Scorrano L, Bernardi P, Di Lisa F: The mitochondrial permeability transition, release of cytochrome c and cell death. Correlation with the duration of pore openings *in situ*. *J Biol Chem.* 2001;276:12030-12034.
11. Robert V, Gurlini P, Tosello V, Nagai T, Miyawaki A, Di Lisa F, Pozzan T: Beat-to-beat oscillations of mitochondrial [Ca²⁺] in cardiac cells. *EMBO J.* 2001;20:4998-5007.
12. Canton M, Caffieri S, Dall'Acqua F, Di Lisa F: PUVA-induced apoptosis involves mitochondrial dysfunction caused by the opening of the permeability transition pore. *FEBS Lett.* 2002;522:168-172.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Chiarire i rapporti tra disfunzione mitocondriale ed altri eventi caratteristici della morte cellulare in generale, e dell'apoptosi in particolare. A questo scopo, saranno analizzati (i) in Collaborazione con il Prof. Edon Melloni l'attivazione di proteasi intracellulari con particolare riferimento al sistema calpaina-calpastaina; (ii) sorgenti e bersagli di specie radicaliche. Particolare attenzione verrà posta sull'ossidazione delle proteine miofibrillari adottando un'analisi proteomica che sarà sviluppata in collaborazione con J. Van Eyk

Collaborazioni internazionali in atto

Jennifer Van Eyk – Queen's University, Kingston, Ontario Canada

Paolo G. Camici – Imperial College, Londra

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Microscopio a fluorescenza con telecamera CCD + le attrezzature convenzionali della ricerca biochimica del Dipartimento

Parole Chiave

Mitocondri; Cuore; Ischemia; Riperfusione; Apoptosi; Transizione di permeabilità; Proteine miofibrillari; Radicali; Fluorescenza

UNITA' DI RICERCA INBB
Udine

Responsabile Scientifico

Pietro Enrico DI PRAMPERO

Linea di Ricerca

ENERGETICA E BIOMECCANICA DEL LAVORO MUSCOLARE E DELLA LOCOMOZIONE UMANA

titolo

Costo energetico della corsa

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Carlo CAPELLI	P.A.	ccapelli@makek.dstb.uniud.it
---------------	------	------------------------------

Non Aderenti INBB

Guglielmo ANTONUTTO	P.A.	gantonutto@makek.dstb.uniud.it
Maria Pia FRANCESCATO	R.U.	mfrancescato@makek.dstb.uniud.it
Paola ZAMPARO	R.U.	pzamparo@makek.dstb.uniud.it

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche, Università di Udine

Indirizzo P.le M. Kolbe 4, 33100 UDINE

Telefono 0432/494330.

Fax 0432/494301.

E-mail pprampero@makek.dstb.uniud.it ...

Sezione INBB di appartenenza

Udine

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

1. Fisiologia del lavoro muscolare in assenza di gravità.
2. Bioenergetica e biomeccanica della locomozione umana

Risultati ottenuti

1. La massima potenza muscolare sviluppabile in esercizi brevissimi, negli astronauti al ritorno dai voli spaziali di lunga durata, diminuisce molto di più (fino al 50 % dopo sei mesi) di quanto non diminuisca la massa muscolare (circa il 10 %, indipendentemente dalla durata). Quest'enorme diminuzione, mai osservata prima d'ora, è probabilmente dovuta alle sostanziali modifiche cui il sistema di controllo neuromotorio va incontro durante volo spaziale. Per ovviare in parte agli effetti dell'assenza di gravità. Per ovviare a questo stato di cose, sono stati studiati e proposti vari sistemi di contromisure, di cui uno, del tutto innovativo, basato sull'uso di normali biciclette controrotanti all'interno di un modulo spaziale cilindrico.
2. Misura del dispendio energetico in varie forme di locomozione umana, sia nei soggetti sani che in pazienti affetti da varie patologie, ed analisi dei fattori che limitano le prestazioni massime dell'atleta in varie attività sportive. Questo filone di ricerca, dall'ovvia rilevanza pratica in campo sportivo agonistico ha consentito di evidenziare una serie di fattori bioenergetici e biomeccanici che condizionano le prestazioni massimali in varie forme di locomozione.
3. Studio delle principali caratteristiche termodinamiche della contrazione muscolare, e delle relazioni tra la concentrazione intramuscolare dei fosfati altamente energetici, la velocità di accorciamento del muscolo ed il rendimento termodinamico della contrazione e della cinetica del consumo di ossigeno all'inizio ed alla fine del lavoro muscolare in varie condizioni nell'uomo.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

- 1 Effects of microgravity on maximal power of lower limbs during very short efforts in humans. G. Antonutto, C. Capelli, M. Girardis, P. Zamparo and P.E. di Prampero. J. Appl. Physiol. 86(1): 85-92, 1999.
- 2 The concept of critical velocity: a brief analysis. P.E. di Prampero. Eur. J. Appl. Physiol. 80: 162-164, 1999.
- 3 A brief comment on the factors limiting maximal oxygen consumption in humans. P.E. di Prampero. Eur. J. Appl. Physiol. 80: 516-517, 1999.
- 4 The energetics of anaerobic muscle metabolism: a reappraisal of older and recent concepts. P.E. di Prampero, G. Ferretti. Respiration Physiology 118: 103-115, 1999.

- 5 VO2 kinetics reveal a central limitation at the onset of subthreshold exercise in heart transplant recipients. B. Mettauer, Q. Ming Zhao, E. Epailly, A. Charloux, E. Lampert, B. Heitz-Naegelen, F. Piquard, P.E. di Prampero, J. Lonsdorfer. *J. Appl. Physiol.* 88: 1228-1238, 2000.
- 6 Cycling on Earth, in space, on the Moon. P.E. di Prampero. *Eur. J. Appl. Physiol.* 82: 345-360, 2000.
- 7 Effects of different after-loads and knee angles of maximal explosive power of the lower limbs in humans. P. Zamparo, G. Antonutto, C. Capelli, P.E. di Prampero. *Eur. J. Appl. Physiol.* 82: 381-390, 2000.
- 8 New perspectives in breath-by-breath determination of alveolar gas exchange. C. Capelli, M. Cautero, P.E. di Prampero. *Pflügers Arch.-Eur. J. Physiol.* 441: 566-577, 2001.
- 9 The self selected speed of running in recreational long distance running. P. Zamparo, R. Perini, C. Peano, P.E. di Prampero. *Int. J. Sports Med.* 22: 598 – 604, 2001

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

- 1 Studio degli effetti della microgravità reale e simulata sugli adattamenti cardiocircolatori e metabolici all'inizio ed alla fine del lavoro muscolare aerobico nell'uomo
- 2 Studio del costo energetico della corsa in accelerazione e di varie forme di locomozione patologica (protesi d'anca e di ginocchio, morbo di Parkinson, etc.).
- 3 Studio delle cinetiche del consumo di ossigeno e dell'idrolisi dei fosfati altamente energetici all'inizio del lavoro muscolare in varie condizioni sperimentali nell'uomo.

Collaborazioni internazionali in atto

1. Agenzia Spaziale Europea (ESA): costruzione di uno speciale ergodinamometro per sforzi di tipo "esplosivo".
2. Agenzia Spaziale Europea (ESA) ed Agenzia Spaziale Tedesca (DARA): studio delle risposte cardiocircolatorie e metaboliche prima e dopo allenamento di breve durata.
3. Agenzia Spaziale Europea (ESA) ed Agenzia Spaziale Francese (CNES, MEDES): studio delle risposte cardiocircolatorie e metaboliche prima e dopo allenamento prolungato.

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Spettrometro di massa per gas respiratori

"Tilting Table"

Ergodinamometro multifunzionale

Apparecchi portatili per la misura del consumo di ossigeno e della produzione di CO2 sul singolo respiro (K4)

Elettromiografo

Ergometro trasportatore,

Parole Chiave

Scambi gassosi, Locomozione umana, Fisiologia spaziale, Massimo consumo di ossigeno, Massima potenza anaerobica, Gettata cardiaca, Fosfati altamente energetici.

UNITA' DI RICERCA INBB
Genova

Responsabile Scientifico

Ermanno DI ZITTI

Linea di Ricerca

NANOARCHITETTURE ORGANICHE PER L'ELETTRONICA E PARADIGMI COMPUTAZIONALI

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Ermanno DI ZITTI	PA	dizitti@dibe.unige.it.
------------------	----	------------------------

Non Aderenti INBB

Silvano CINCOTTI	PA	cincotti@dibe.unige.it
Maria Teresa PARODI	PT	mtp@dibe.unige.it
Davide RICCI	PT	davide@dibe.unige.it.
Mauro PARODI	PO	parodi_mauro@dibe.unige.it
Marco STORACE	PA	storace@dibe.unige.it
Francesca SBRANA	DR	sbrana@dibe.unige.it

Sede Unità di Ricerca

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

Indirizzo: via Opera Pia 11A

Telefono: 010 3532788

Fax : 010 3532290

E-mail : dizitti@dibe.unige.it

Sezione INBB di appartenenza

Genova

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

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

Risultati ottenuti

L'unità si è impegnata nell'individuare e assemblare sperimentalmente plausibili strutture molecolari potenzialmente candidate per l'elaborazione molecolare dell'informazione tenendo conto anche dei recenti sviluppi della ricerca internazionale. In questo contesto l'attività ha riguardato le architetture composte da matrici di nanoparticelle metalliche dotate di proprietà di confinamento della carica (punti quantici), in grado di interagire mediante giunzioni tunnel e ricevere iniezioni di carica o lateralmente o dal substrato. Volendo realizzare sperimentalmente tali classi di schiere, si sono impiegate in una prima fase molecole lipidiche (DPPE) funzionalizzate con particelle di oro aventi diametro di 1.4 nm, mentre in seguito si sono preparati ad hoc dei veri e propri "nanocristalli molecolari" di oro, ottenuti con procedure di sintesi chimica, i quali consentissero di poter variare in modo flessibile il diametro e la spaziatura tra le nanoparticelle, nonché di poter funzionalizzare le stesse in modo appropriato per consentire l'ottimizzazione delle schiere ottenibili.

La scelta dei metodi di fabbricazione, basati su tecniche di auto assemblamento e di tipo Langmuir-Blodgett (LB), è stata operata in modo da lasciare ampia libertà per una successiva ingegnerizzazione del sistema, affinché le nanoparticelle potessero essere organizzate in strutture bidimensionali regolari. La caratterizzazione dei campioni ottenuti depositando film LB di nanocristalli su substrati autoassemblanti di ancoraggio è stata fatta mediante tecniche di microscopia a sonda di scansione, e ha mostrato la possibilità di ottenere strutture regolari una volta che si selezionino i nanocristalli in modo che abbiano dimensioni confrontabili.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

- A. Chiabrera, S. Cincotti, M. Parodi, M. Storace, "Electric Control of Molecular Dipoles: a Paradigm for Information Processing", in *Electricity and Magnetism in Biology and Medicine*, F. Bersani (Ed.), Kluwer Academic/Plenum Press, New York, pp. 93-96 (1999).

- M.T. Parodi, W. Rocchia, A. Chiabrera, E. Di Zitti, D. Ricci, “Structural properties of mixed ultrathin organic films investigated by scanning probe microscopy”, in *Sensors and Microsystems*, C. Di Natale, A. D’Amico, F. Davide (Eds) World Scientific Publ, Singapore, pp.181-185 (2000).
- M.T. Parodi, D. Ricci, W. Rocchia, F. Sbrana, E. Di Zitti “Assembling gold nanoparticle patterns for molecular electronics applications”, in *Sensors and Microsystems*, C. Di Natale, A. D’Amico, P. Siciliano (Eds), World Scientific Publ, Singapore, pp. 66-70 (2000).
- F. Sbrana, M.T. Parodi, D. Ricci, E. Di Zitti “Gold nanocrystal molecules synthesis and functionalised substrate preparation for metallo-organic ultrathin structures”, in *Sensors and Microsystems*, C. Di Natale, A. D’Amico, P. Dario (Eds), World Scientific Publ, Singapore (2002).
- F. Sbrana, M.T. Parodi, D. Ricci, E. Di Zitti, C. Di Natale, S. Thea “Assembling thiolated gold nanoparticles in compact patterns: a Transmission Electron Microscopy and Scanning Probe Microscopy investigation”, *Materials Science and Engineering: B – Solid State Materials for Advanced Technology*, in press (2002).
- F. Sbrana, M.T. Parodi, D. Ricci, E. Di Zitti “Langmuir films of thiolated gold nanoparticles transferred onto functionalized substrate: 2-D local organization”, *Materials Science and Engineering: C – Biomimetic and Supramolecular Systems*, in press (2002).

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

- Valutazione a confronto delle strutture a punti quantici ottenute e loro caratterizzazione da un punto di vista elettronico
- Sintesi, caratterizzazione e manipolazione di nanotubi di carbonio
- Definizione di un modello di circuito molecolare multiporta basato su monostrati piani di molecole organiche/metallo-organiche operanti in condizioni di rumore termico

Principali attrezzature di cui dispone l’Unità di Ricerca

- Laboratori di nanotecnologie ed elettronica molecolare
- Strumentazione per la fabbricazione di film ultrasottili (tra cui apparecchiatura per la deposizione di film di Langmuir-Blodgett KSV 5000 in camera di manipolazione sterile)
- Strumentazione per la caratterizzazione/manipolazione di nanostrutture
 - o Microscopio a scansione a forza atomica e ad effetto tunnel Park Scientific Instrument Universal
 - o Microscopio a sonda di scansione a forza atomica ed effetto tunnel Park Scientific Instruments AUTOPROBE CP
 - o Elettrometro Keithley

Parole Chiave

Elettronica molecolare, Nanostrutture, Film di Langmuir-Blodgett; Autoassemblamento; Microscopie a sonda di scansione; Punti quantici; Nanotubi di carbonio, Nanomanipolazione.

UNITA' DI RICERCA INBB
Milano

Responsabile Scientifico

Alide FAELLI

Linea di Ricerca

TRASPORTATORI, CANALI IONICI E CANALI PER L'ACQUA (ACQUAPORINE) IN MEMBRANE CELLULARI.

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Faelli Alide	PO	Alide.faelli@unimi.it
Meyer Giuliano	PA	Giuliano.meyer@unimi.it
Orsenigo Maria Novella	P.A.	Novella.orsenigo@unimi.it
Bottà Guido	RU	Guido.botta@unimi.it
Porta Cristina	RU	Cristina.porta@unimi.it

Non Aderenti INBB

Paulmichl Markus	PO	Markus.paulmichl@unimi.it
Tosco Marisa	PT	Marisa.tosco@unimi.it
Bazzini Claudia	PT	Claudia.bazzini@unimi.it
Garavaglia Maria Lisa	PT	Maria.garavaglia@unimi.it
Rodighiero Simona	DR	Simona.rodighiero@unimi.it
Sironi Chiara	DR	Chiara.sironi@unimi.it

Sede Unità di Ricerca

Laboratorio di Fisiologia Molecolare e dei Trasporti, Sez. Fisiologia Generale, Dip. Fisiologia e Biochimica Generali, Università degli Studi di Milano.

Indirizzo Via Celoria 26, 20133 Milano

Telefono +39-02-50314951

Fax +39-02-50314946

E-mail alide.faelli@unimi.it

Sezione INBB di appartenenza

Milano

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

- 1) Indagare i meccanismi cellulari del DRV (Decremento Regolatorio del Volume). In particolare: studiare la struttura 3-D ed il rapporto struttura/funzione della proteina ubiquitaria ICln, un canale ionico coinvolto nel DRV.
- 2) Caratterizzare elettrofisiologicamente i canali ionici presenti nel lievito *Saccharomyces cerevisiae*, un fondamentale sistema modello di cellula eucariote.
- 3) Studiare i trasportatori di cellule in coltura di mesotelio, con particolare interesse all'individuazione delle caratteristiche funzionali di canali ionici potenzialmente coinvolti nel versamento associato al mesotelioma pleurico.
- 4) Determinare l'effetto di secretagoghi sui canali ionici di cellule epiteliali di cistifellea di cavia, in cui l'innalzamento dei livelli intracellulari di cAMP determina una secrezione di fluido secondaria a una secrezione di Cl^- e HCO_3^- .
- 5) Caratterizzare molecularmente e funzionalmente antiporti, simporti e aquaporine presenti in epitelio di cistifellea e responsabili di trasporti transepiteliali di ioni e acqua.
- 6) Indagare l'effetto di protein chinasi diverse sui meccanismi coinvolti nel trasporto di HCO_3^- e di lattato nell'enterocita digiunale di ratto. Inoltre, poiché lo scambiatore $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ digiunale mostra caratteristiche atipiche, indagarne la struttura molecolare e confrontarla con quella delle altre isoforme della famiglia genica AE. Studiare le caratteristiche funzionali di un meccanismo endogeno di trasporto di anioni monocarbossilici rinvenuto nella membrana di oocita di *Xenopus laevis*.

Risultati ottenuti

- 1) Si è determinata la funzione di alcuni aminoacidi che circondano il presumibile poro di ICln.
- 2) In cellule di lievito si sono identificati canali del K^+ rettificanti uscenti.
- 3) In cellule di mesotelioma pleurico sono stati evidenziati e caratterizzati elettrofisiologicamente canali per il Cl^- .
- 4) Nell'epitelio di cistifellea sono stati identificati un canale anionico con caratteristiche simili a quelle del CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) e un canale per il K^+ attivabile da cAMP.
- 5) Si è osservata una coespressione di cotrasportatori catione cloruro ed aquaporine in cistifellea.

6) Il trasportatore per il lattato della membrana plasmatica dell'oocita di *Xenopus laevis* si è rivelato un cotrasportatore catione-monocarbossilato.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

- 1) FÜRST J., BAZZINI C., JAKAB M., MEYER G., KOENIG M., GSCHWENTER M., RITTER M., SCHMARDA A., BOTTA' G., BENZ R., DEETJEN P., PAULMICHL M. "Functional reconstitution of ICln in lipid bilayer". *Pflügers Arch.* **440**, 100-115, 2000.
- 2) MEYER G., GARAVAGLIA M. L., BAZZINI C., BOTTA' G. "An anion channel in guinea pig gallbladder epithelial cells is highly permeable to HCO_3^- ". *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **276**, 312-320, 2000.
- 3) PORTA C., DOSSENA S., ROSSI V., PINZA M., CREMASCHI D. "Rabbit nasal mucosa: nanospheres coated with polypeptides bound to specific anti-polypeptide IgG are better transported than nanospheres coated with polypeptides or IgG alone". *Biochim. Biophys. Acta (Biomembranes)* **1466**, 115-124, 2000.
- 4) FURLA P., ALLEMAND D., ORSENIGO M.N. "Involvement of H^+ -ATPase and carbonic anhydrase in inorganic carbon uptake for endosymbiont photosynthesis". *Am. J. Physiol.* **278**, R870-R881, 2000.
- 5) TOSCO M., ORSENIGO M.N., GASTALDI G., FAELLI A. "An endogenous monocarboxylate transport in *Xenopus laevis* oocytes". *Am. J. Physiol.* **278**, R1190-R1195, 2000.
- 6) CREMASCHI D., PORTA C., MEYER G., SIRONI C., GARAVAGLIA M.L. "Diphenylamine-2-carboxylic acid (DPC), usually an inhibitor of Cl^- and non-selective cation channels, inhibits $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange and opens Cl^- and cation conductances in rabbit gallbladder epithelium". *Pflügers Arch.* **442**, 409-419, 2001.
- 7) MEYER G., PORTA C., GARAVAGLIA M.L., CREMASCHI D. "Inhibitors of the $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger activate an anion channel with similar features in the epithelial cells of rabbit gallbladder: patch-clamp analysis". *Pflügers Arch.* **441**, 467-473, 2001.
- 8) BAZZINI C., BOTTÀ G., MEYER G., BARONI M.D., PAULMICHL M. "The presence of NHE1 and NHE3 Na^+/H^+ exchangers and an apical cAMP-independent Cl^- channel indicate that both absorptive and secretory functions are present in calf bladder epithelium". *Exp. Physiol.* **86**, 571-583, 2001.
- 9) CREMASCHI D., VALLIN P., SIRONI C., PORTA C. "Inhibitors of the $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger activate an apical anion conductance with similar features in the epithelial cells of rabbit gallbladder: analysis in intact epithelium". *Pflügers Arch.* **441**, 456-66, 2001.
- 10) VERRI A., LAFORENZA U., GASTALDI G., TOSCO M., RINDI G. "Molecular characteristics of small intestinal and renal brush border thiamin transporters in rats". *Biochim. Biophys. Acta* **1558**, 187-197, 2002.
- 11) ORSENIGO M.N., TOSCO M., BARONI M.D., BAZZINI C., LAFORENZA U., FAELLI A. "Protein kinase C regulation of rat jejunal transport systems: mechanisms involved in bicarbonate absorption". *Exp. Physiol.*, **87**, 3, 299-309, 2002.
- 12) MEYER G., BAZZINI C., BOTTÀ G., GARAVAGLIA M.L., RODIGHIERO S., MANFREDI R., SIRONI C., DE BIASI S., PAULMICHL M. " K^+ channel cAMP activated in guinea pig gallbladder epithelial cells". *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **290**, 1564-1572, 2002.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

- 1) Si completerà lo studio sul ruolo funzionale e sul rapporto struttura/funzione della proteina ICln.
- 2) Si completerà la caratterizzazione elettrofisiologia delle cellule mesoteliali pleuriche umane.
- 3) Si studieranno possibili alterazioni dei trasporti di acqua e ioni associate a molte patologie della cistifellea.
- 4) Si valuterà l'effetto della PKA sui sistemi di trasporto coinvolti nei movimenti di bicarbonato e lattato nell'enterocita digiunale di ratto. S'indagherà inoltre la possibile modulazione di tali sistemi in condizioni di acidosi e alcalosi sistemica.

Collaborazioni internazionali in atto

Prof. M. Ritter, Dip. di Fisiologia, Università di Innsbruck

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

- 1) Attrezzature per laboratorio di biochimica: 1 supercentrifuga ed 1 ultracentrifuga con set di 5 rotori, centrifughe da banco, 2 spettrofluorimetri, 1 fluorimetro, 1 HPLC, pHmetri.
- 2) Attrezzature per laboratorio di biologia e fisiologia molecolare: termocycler per RT-PCR, 4 unità elettroforetiche, 1 autoclave, 1 incubatore, 1 laboratorio per colture cellulari, 1 microscopio confocale UV laser, 2 microscopi a fluorescenza, 2 freezer a -80 °C.
- 3) Attrezzature per 1 unità di "patch-clamp/tip-dip" con "work-station" per acquisizione e analisi dati.
- 4) Sequenziatore automatico per acidi nucleici (LICOR).
- 5) Attrezzature per 1 unità di misure elettrofisiologiche su bilayer artificiali di area macroscopica.
- 6) Attrezzature e colonne per cromatografia ÄKTA PRIME.

Parole Chiave

RVD; proteina icln; aquaporine; scambiatore anionico; protein chinasi.

UNITA' DI RICERCA INBB
Milano

Responsabile Scientifico

Ferruccio FAZIO

Linea di Ricerca

NEUROLOGIA FUNZIONALE, NEUROSCIENZE COGNITIVE

titolo

Applicazioni delle neuroimmagini funzionali

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

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

Non Aderenti INBB

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

Sede Unità di Ricerca

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

Indirizzo Edificio LITA, via Fratelli Cervi 93 Segrate

Telefono 02-26432716

Fax 02-26415202

E-mail fazio@mednuc.hsr.it

Sezione INBB di appartenenza

Milano

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

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

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

Risultati ottenuti

I risultati delle ricerche sono stati tutti oggetto di pubblicazione su riviste indicizzate. Gli obiettivi e le ricadute delle conoscenze acquisite si sono tradotti in elementi essenziali per la ricerca nell'ambito dei sistemi cognitivi e dei

loro deficit in presenza di patologia neurologica e psichiatrica. La applicazione dei risultati nella pratica clinica ha riguardato protocolli diagnostici.

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

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

- 1) Cortelli P, Perani D, Parchi P, Grassi F, Montagna P, Demartin M, Castellani R, Tinuper P, Gambetti P, Lugaresi E, Fazio F. Regional cerebral metabolism in fatal familial insomnia: a correlation study with neuropathology. *Neurology*, 1997; 49: 126-133.
- 2) Paulesu E, Goldacre B, Scifo P, Cappa SF, Gilardi MC, Perani D, Fazio F. Functional heterogeneity of left inferior frontal cortex as revealed by fMRI. *NeuroReport*, 1997; 8: 2011-2016.
- 3) Decety J, Greize J, Perani D, Costes N, Grassi F, Jeannerod M, Fazio F. Brain activity during observation of actions. Influence of action content and subject's strategy. *Brain*, 1997; 10:1763-1778.
- 4) D Perani, E Paulesu, N Sebastian Galles, E Dupoux, S Dehaene, V Bettinardi, SF Cappa, F Fazio, J Mehler. The bilingual brain: proficiency and age of acquisition of the second language. *Brain*, 1998; 121: 1841-1852.
- 5) Pizzamiglio L, Perani D, Cappa SF, Vallar G, Paolucci S, Grassi F, Paulesu E, Fazio F. Recovery of neglect after right hemispheric damage. A H215O PET activation study. *Arch. Neurol*, 1998; 55: 561-568.
- 6) D Perani, T Schnur, M Tettamanti, M Gorno-Tempini, SF. Cappa, F Fazio. Word and picture matching: a PET study of semantic category effects. *Neuropsychologia*, 1999; 37, 293-306.
- 7) Herholz K, Nordberg A, Salmon E, Perani D, Kessler J, Mielke R, Halber M, Jelic V, Almkvist O, Collette F, Alberoni M, Kennedy A, Hasselbalch S, Fazio F, Heiss W-D Impairment of neocortical metabolism predicts progression in Alzheimer's disease. *Dementia & Geriatric Cognitive Disorders* 1999; 10, 494-504.
- 8) D. Perani, S.F Cappa, T. Schnur, M. Tettamanti, S. Collina, M. Rosa, F. Fazio. The neural correlates of verbs and nouns processing: a PET study. *Brain* 1999 Dec;122(12):2337-2344
- 9) G. Meola, V. Sansone, D. Perani, A. Colletuori, S. Cappa, M. Cotelli, F. Fazio, CA. Thornton, RT Moxley. Cognitive, brain MRI and PET studies in proximal myotonic myopathy and myotonic dystrophy. *Neurology* 1999 22;53(5):1042-50
- 10) E. Paulesu, E. McCrory, F. Fazio, L. Menoncello, N. Brunswick, S.F. Cappa, M. Cotelli, G. Cossu, F. Corte, M. Lorusso, S. Pesenti, A. Gallagher, D. Perani, C. Price, C.D. Frith, U. Frith. A cultural effect on brain function. *Nature Neuroscience*; 2000; 3 (1): 91-95
- 11) Perani D, Fazio F, Borghese NA, Tettamanti M, Ferrari S, Decety J, Gilardi MC. Different brain correlates for watching real and virtual hand actions. *NeuroImage*, 2001; 14: 749-758.
- 12) Volonté MA, Perani D, Lanzi R, Poggi A, Anchisi D, Balini A, Comi G, Fazio F. Regression of ventral striatum hypometabolism after calcium/calcitriol therapy in paroxysmal kinesigenic choreoathetosis due to idiopathic primary hypoparathyroidism. *J Neurol Neurosurg Ps*, 2001; 71: 691-695.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

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

Collaborazioni internazionali in atto

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

Department of Cognitive Neuroscience MIT, Boston (USA)

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

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

GE Advance PET, MRI GE Signa, SUN workstations

Parole Chiave

neuroscienze cognitive, neuroimmagini, neurologia, parametri funzionali cerebrali

UNITA' DI RICERCA INBB
Verona

Responsabile Scientifico

Federico FOGOLARI

Linea di Ricerca

SIMULAZIONI DI DINAMICA MOLECOLARE IN SOLVENTE IMPLICITO PER LO STUDIO DEL FOLDING DI PROTEINE

Composizione del Gruppo

Non Aderenti INBB

Henriette MOLINARI

PA

molinari@sci.univr.it

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento Scientifico e Tecnologico . Università degli Studi di Verona

Indirizzo Cà Vignal 1, Strada Le Grazie 15, 37134 Verona

Telefono ++39-045-8027906

Fax. ++39-045-8027929

E-mail fogolari@sci.univr.it

Sezione INBB di appartenenza

Udine

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Negli ultimi tre anni ci siamo proposti di studiare l'elettrostatica in sistemi biomolecolari mediante il formalismo basato sulla equazione di Poisson-Boltzmann. Ci siamo quindi posti il problema di stabilire i limiti di applicazione del formalismo e di studiare la possibilità di sviluppare un protocollo per la simulazione della dinamica biomolecolare basato sulla stessa equazione. Abbiamo inoltre applicato estensivamente metodi di simulazione basati sullo stesso formalismo nelle seguenti aree:

- Calcolo del potenziale elettrostatico alla superficie esposta al solvente al fine di determinare siti di interazione molecolare
- Calcolo delle energie libere e della loro dipendenza da variabili ambientali per lo studio degli effetti elettrostatici sulla stabilità e sulla associazione molecolare
- Calcolo dei pKa di residui ionizzabili in proteine
- Calcolo di traiettorie diffusionali di piccole molecole al fine di determinare le costanti di incontro molecolare
- Calcolo di forze medie di solvatazione per la simulazione della dinamica biomolecolare con un modello continuo di solvente

Risultati ottenuti

Per quanto riguarda le indagini metodologiche i limiti di applicabilità della linearizzazione dell'equazione di Poisson-Boltzmann sono stati determinati ed un efficiente protocollo di simulazione di dinamica molecolare basato sull'equazione di Poisson-Boltzmann e sulla superficie accessibile al solvente è stato messo a punto.

La stessa metodologia è stata applicata in particolare allo studio della beta-lattoglobulina permettendo di razionalizzare molte osservazioni sperimentali riguardanti il legame con piccole molecole cariche e la dimerizzazione. In particolare l'analisi dello stato di protonazione della proteina ha premesso di confermare la natura molto flessibile della proteina a basso pH e di spiegare la transizione conformazionale di Tanford. L'analisi degli effetti elettrostatici sulla cinetica di incontro fra un Fab e diversi antigeni ha evidenziato la ridotta influenza di questi sulle costanti cinetiche di incontro.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

1) Fogolari F., Zuccato P., Esposito G. and Viglino P., Biomolecular electrostatics with the linearized Poisson-Boltzmann equation. *Biophysical Journal* 76, 1-16 (1999).

2) Ragona L., Fogolari F., Romagnoli S., Zetta L., Maubois J. L. and Molinari H., Unfolding and refolding of bovine b-lactoglobulin monitored by hydrogen exchange measurements. *Journal of Molecular Biology*, 293, 953-969 (1999).

3) Fogolari F., Ragona L., Licciardi S., Romagnoli S., Michelutti R., Ugolini R. and Molinari H., Electrostatic properties of bovine b-lactoglobulin. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 39, 317-330 (2000).

4) Romagnoli S., Ugolini R., Fogolari F., Schaller G., Urech K., Giannattasio M., Ragona L. and Molinari H., NMR structural determination of viscotoxin A3 from *Viscum album* L..

Entry 1ed0 in the Protein Data Bank, Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (2000)

5) Ragona L., Zetta L., Fogolari F., Perez D. M., Puyol, P., De Kruif K., Lohr F., Ruterjans H. and Molinari H., Bovine b-lactoglobulin: Interaction studies with palmitic acid.

Protein Science 9, 1347-1356 (2000).

6) Fogolari F., Ugolini R., Molinari H., Viglino P., Esposito G., Simulation of electrostatic effects in Fab-antigen complex formation.

European Journal of Biochemistry, 267, 4861-4869 (2000)

7) Romagnoli S., Ugolini R., Fogolari F., Schaller G., Urech K., Giannattasio M., Ragona L. and Molinari H., NMR structural determination of viscotoxin A3 from *Viscum album* L..

Biochemical Journal, 350, 569-577 (2000)

8) Fogolari F., Esposito G., Viglino P. and Molinari H., Molecular mechanics and dynamics of biomolecules using a solvent continuum model.

Journal of Computational Chemistry, 22, 1830-1842 (2001).

9) Verzola B., Fogolari F., Righetti P. G., Monitoring folding/unfolding transitions of proteins by capillary electrophoresis: measurement of DG and its variation along the pH scale.

Electrophoresis, 22, 3728-3735 (2001).

10) Ugolini R., Ragona L., Silletti E., Fogolari F., Visschers R. W., Altling A. C. and Molinari H., Aggregation, stability and electrostatic properties of porcine b-lactoglobulin.

European Journal of Biochemistry, 268, 4477-4488 (2001).

11) Fogolari F., Tessari S. and Molinari H., Singular value decomposition analysis of protein sequence alignment score data. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 46, 161-170 (2002).

12) Ragona L., Catalano M., Zetta L., Longhi R., Fogolari F. and Molinari H., Peptide models of folding initiation sites of bovine b-lactoglobulin: identification of native like interactions involving G and H strands.

Biochemistry, 41, 2786-2796 (2002).

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Nei prossimi tre anni ci proponiamo di integrare vari approcci di biologia computazionale e simulazione di dinamica molecolare alla predizione di struttura delle proteine ed al problema del folding. In particolare ci proponiamo di integrare l'analisi strutturale e la simulazione di dinamica molecolare con approcci piu' classici in bioinformatica.

Collaborazioni internazionali in atto

Maciej Baginski – Universita' Politecnica di Gdansk (Polonia)

Dr. Marcel Aguilera – Universita' di Castillo' (Spagna)

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

3 PC Pentium Linux , 2 SGI O2. Spettrometro NMR Bruker 500 MHz. Laboratorio di Biologia molecolare.

Parole Chiave

Bioinformatica, Biologia computazionale, Biologia strutturale, Genomica Strutturale.

UNITA' DI RICERCA INBB
Bari

Responsabile Scientifico

Antonio FRIGERI

Linea di Ricerca

CARATTERIZZAZIONE FISIOPATOLOGICA E REGOLAZIONE DELLA AQUAPORINA-4 NEL SISTEMA NEUROMUSCOLARE DI MAMMIFERO

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Antonio FRIGERI	RU	a.frigeri@biologia.uniba.it
-----------------	----	-----------------------------

Non Aderenti INBB

Grazia Paola NICCHIA	Altro (assegnista)	p.nicchia@biologia.uniba.it
Michela PISONI	Altro (assegnista)	mpisoni@hotmail.com
Raffaello PERAGGINE	DR	
Alessandra COLELLA	DR	

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Fisiologia Generale e Ambientale – Università degli Studi di Bari

Indirizzo: Via Amedola 165/A

Telefono: 080-5442928

Fax: 080-5443388

Sezione INBB di appartenenza

Bari

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Il trasporto di acqua è importante in molteplici processi fisiologici del sistema neuromuscolare. Il muscolo scheletrico è coinvolto in movimenti osmotici di acqua importanti che si realizzano durante l'esercizio muscolare. Il metabolismo idrico inoltre, è essenziale in numerosi processi fisiologici del sistema nervoso centrale inclusa la produzione e il riassorbimento di liquido cerebrospinale, il trasporto di fluidi attraverso il neuropilo e l'endotelio vasale nonché nella regolazione del volume cellulare. In particolare, lo "swelling" degli astrociti è responsabile dell'edema cerebrale presente in caso di epilessia, ischemia, trauma cranico ed ipossia e disordini neurodegenerativi come la malattia di Huntington e il morbo di Parkinson. L'obiettivo della ricerca è stato l'analisi dell'espressione della AQP4 nel sistema neuromuscolare.

Risultati ottenuti

Al fine di avere un modello utile per analizzare il meccanismo molecolare del trasporto di acqua a livello del cervello abbiamo studiato l'espressione e la funzione dell'AQP4 in

culture primarie di astrociti. Il nostro studio ha dimostrato (Nicchia et al., 2000) che gli astrociti in coltura mantengono l'espressione funzionale dell'AQP4. Nel cervello, abbiamo inoltre evidenziato la stretta relazione esistente tra regolazione del trasporto di acqua, sviluppo del cervello ed integrità della barriera ematoencefalica (Nico et al., 2001).

Nel muscolo scheletrico abbiamo dimostrato che l'espressione dell'AQP4 può essere regolata in funzione dell'uso/disuso del muscolo e che la sua regolazione a lungo termine procede parallelamente alla transizione delle fibre lente in veloci (Frigeri et al., 2001b). Infine, abbiamo riscontrato una riduzione della espressione della AQP4 nel muscolo e nel cervello del topo mdx (Frigeri et al., 2001a), il modello animale della distrofia muscolare di Duchenne (DMD). Stessa riduzione è stata riscontrata nei pazienti DMD e Becker (Frigeri et al., 2002).

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2000)

1-Nico B., Ribatti D., Frigeri A., Nicchia G.P., Svelto M. and Roncali L. "Expression of aquaporins in the nervous system". The cerebellum 2002, in press

2- Ribatti D., Frigeri A., Nico B., Nicchia G.P., De Giorni M., Roncali L. and Svelto M. "Aquaporin-1 expression in the chick embryo chorioallantoic membrane. Anatomy Records 2002, in press.

3-Frigeri A., Nicchia G.P., Repetto S., Bado M., Minetti C., and Svelto M. "Altered Aquaporin-4 expression in Human muscular dystrophies: A Common feature ?" FASEB J. 2002, Jul, 16(9):1120-1122.

4-Pierno S., Desaphy J., Liantonio A., Frigeri A., Nicchia G.P., Svelto M., Bianco G., Léoty C., George A.L., De Luca A., and Diana Conte Camerino “Modulation of resting chloride conductance, ClC-1 channel expression, and excitation-contraction coupling in rat skeletal muscle fibers during modified muscle use”. *Brain* 2002, Jul, 125(7): 1510-1521.

5-Vacca A, Ribatti D, Roccaro AM, Frigeri A, Dammacco F. “Bone marrow angiogenesis in patients with active multiple myeloma”. *Semin Oncol.* 2001 Dec;28(6):543-550.

6-Nicchia G.P., Frigeri A., Nico B. and Svelto M. “ Tissue distribution and membrane localization of Aquaporin-9 water channel”: evidences for sex-linked differences in liver. *J. Histochem. Cytochem.* 2001, 49: 1547-1556.

7-Frigeri A., Nicchia G.P., Nico B., Quondamatteo F., Herken R., Roncali L., and Svelto M. “Aquaporin-4 deficiency in skeletal muscle and brain of dystrophic mdx-mice”. *FASEB J.*, 2001, 15,1:90-97. (copertina dedicata)

8-Nico B., Frigeri A., Nicchia G.P., Quondamatteo F., Herken R. Ribatti D., Svelto M. and Roncali L. “Role of aquaporin-4 water channel in the development and integrity of the blood-brain barrier”. *Journal of Cell Science*, 2001 ,114:1297-307.

9-Frigeri A., Nicchia G.P., Desaphy J., Pierno S., Deluca A., Conte Camerino D. and Svelto M. “Muscle loading modulates aquaporin-4 expression in skeletal muscle”. *FASEB J.*, 2001 May;15(7):1282-4.

10-Vacca A., Frigeri A., Ribatti D., Nicchia G.P., Nico B., Ria R., Svelto M., and Dammacco F. “Microvessel overexpression of aquaporin-1 parallels bone marrow angiogenesis in patients with active multiple myeloma”. *British Journal of Haematology*, 2001, May;113(2):415-21

11-Pierno S., Desaphy J.F., De Luca A., Liantonio A., De Bellis M., Frayssé B., Leoty C., Frigeri A., Nicchia G.P., Svelto M. and Conte Camerino D. “Modifications of ion channel activity and expression in soleus muscle fibers account for hypogravity-induced functional alterations”. Book chapter in *Microgravity and Space Station Utilization* (2001). Ed by R. Monti and C. Bonifazi.

12-Nicchia GP; Frigeri A; Liuzzi GM; Santacroce MP; Nico B; Procino P; Quondamatteo F; Herken R; Roncali L; Svelto M. “Aquaporin-4 containing astrocytes sustain a temperature and mercury-insensitive swelling in vitro”. *Glia*, 2000, 31:29-38. (copertina dedicata)

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

L'attività di ricerca verrà focalizzata allo studio del ruolo che l'AQP4 ha nel muscolo scheletrico e nella patogenesi della DMD. In particolare, analizzeremo la potenziale interazione tra l'AQP4 e le proteine del complesso della distrofina e studieremo il trasporto d'acqua in vescicole di sarcolemma. Inoltre analizzeremo l'effetto che l'inibizione della AQP4, indotta mediante interferenza dell'RNA, ha in astrociti in coltura. Infine analizzeremo il profilo di alterazione genica nell'edema cerebrale mediante analisi di microarray di cDNA.

Collaborazioni internazionali in atto

Dr. Jean-Marc Verbavatz, Service de Biologie cellulaire de Saclay, France

Prof. Reiner Herken, Department of Anatomy, Goettingen University, Germany.

Prof. Kay Davies, Department of Human Genetics, Oxford University, England.

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

1-Apparecchiatura microfluorimetrica di TIR per lo studio del trasporto d'acqua di cellule in coltura

2-Strumento di misura del trasporto d'acqua di vescicole di membrane cellulari mediante diffusione della luce e flusso stoppato (stopped-flow light scattering)

3- Sistema per lo studio di interazione proteina-proteina mediante FRET (Fluorescence Recovery Energy Transfer)

4-Microscopio a fluorescenza, CCD camera e analisi d'immagine

5-Camera per le colture cellulari

6-Real time PCR

Parole Chiave

Aquaporine, canali per l'acqua, astrociti, Distrofie muscolari, edema cerebrale, microarray, interferenza dell'RNA.

UNITA' DI RICERCA INBB
Bologna

Responsabile Scientifico

Claudio GALLETTI

Linea di Ricerca

MECCANISMI CEREBRALI COINVOLTI NEL CONTROLLO VISUOMOTORIO

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Claudio GALLETTI	PO*	galletti@alma.unibo.it
Piero Paolo BATTAGLINI	PO	battagli@univ.trieste.it

Non Aderenti INBB

Patrizia FATTORI	PA	Pfattori@biocfarm.unibo.it
Friedhelm KUTZ DIETER	RU	kutz@biocfarm.unibo.it

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Fisiologia umana e generale - Università di Bologna

Indirizzo Piazza di Porta S. Donato 2, 40127 - Bologna

Telefono 051 2091741

Fax 051-251731

E-mail galletti@alma.unibo.it

Sezione INBB di appartenenza

Bologna

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

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

Risultati ottenuti

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

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

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

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

- 1- Galletti C., Fattori P., Kutz D.F. and Gamberini M. (1999) Brain location and visual topography of cortical area V6A in the macaque monkey. *Eur. J. Neurosci.*, **11**: 575-582.
- 2- Galletti C., Fattori P., Gamberini M., and Kutz D.F. (1999) The cortical visual area V6: brain location and visual topography. *Eur. J. Neurosci.* **11**: 3922-3936.
- 3- Galletti C., Gamberini M., Kutz D.F., Fattori P., Luppino G., Matelli M. (2001) The cortical connections of area V6: an occipito-parietal network processing visual information. *Eur. J. Neurosci.* **13**, 1572-1588.

4- Fattori P., Gamberini M., Kutz D.F., Galletti C. (2001) 'Arm-reaching' neurons in the parietal area V6A of the macaque. *Eur. J. Neurosci.* **13**, 2309-2313.

5- Battaglini P.P., Muzur A., Galletti C., Skrap M., Brovelli A. and Fattori P. (2002) Effects of lesions to area V6A in monkeys. *Exp Brain Res* **144**: 419-422.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

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

Collaborazioni internazionali in atto

Dept. of Anatomy, University College, Londra, UK (Prof. S. Zeki)

Institut des Sciences Cognitives, INSERM, Bron, F (Dr. S. Ben-Hamed)

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

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

Parole Chiave

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

UNITA' DI RICERCA INBB
Napoli

Responsabile Scientifico

Patrizia GALLETTI

Linea di Ricerca

MARKERS GENETICI DI IPEROMOCISTEINEMIA IN SOGGETTI AD ELEVATO RISCHIO CARDIOVASCOLARE

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Patrizia GALLETTI	PO	Patrizia.galletti@unina2.it
-------------------	----	-----------------------------

Non Aderenti INBB

Vincenzo ZAPPIA	PO	Vincenzo.zappia@unina2.it
Diego INGROSSO	RU	Diego.ingrosso@unina2.it
Alessandra PERNA	RU	Alessandra.perna@unina2.it
Amelia CIMMINO	DR	
Stefania D'ANGELO	BC	
Lucia MASELLA	DR	

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Biochimica e Biofisica "F.Cedrangolo" Facoltà di Medicina e Chirurgia . Seconda Università di Napoli

Indirizzo Via Costantinopoli 16

Telefono 0815665868

Fax 0815667608

E-mail patrizia.galletti@unina2.it

Sezione INBB di appartenenza

Napoli

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

L'omocisteina (Hcy) è un aminoacido sulfidrilico, intermedio del metabolismo della metionina. L'Hcy deriva in vivo dall'idrolisi enzimatica della S-adenosilomocisteina (AdoHcy), la quale è a sua volta il prodotto demetilato della S-adenosilmetionina (AdoMet), il donatore universale di gruppi metilici nelle reazioni di transmetilazione. L'Hcy viene metabolizzata attraverso due vie principali: conversione in cisteina (via della transsulfurazione; cofattore: piridossalfosfato) o nuovamente in metionina (via della rimetilazione; cofattori: cianocobalammina, metiltetraidrofolato). L'AdoHcy, un potente inibitore competitivo di tutte le metiltransferasi AdoMet-dipendenti che sono regolate in vivo dal rapporto $[AdoMet]/[AdoHcy]$ è prontamente rimossa attraverso la sua reversibile idrolisi enzimatica a Hcy ed adenosina. L'iperomocisteinemia, un aumento patologico delle concentrazioni plasmatiche di Hcy, rappresenta un fattore predittivo di malattia cardiovascolare (CVD) tromboembolica, sia nella popolazione generale che in gruppi selezionati di pazienti ad alto rischio di infarto del miocardio, ictus cerebrale e trombosi periferica arteriosa o venosa; tuttavia le basi patogenetiche che collegano omocisteina ed aterotrombosi sono ancora largamente sconosciute.

Risultati ottenuti

Dati ottenuti nel nostro laboratorio suggeriscono il possibile ruolo patogenetico della ipometilazione di proteine e DNA nel meccanismo della tossicità cardiovascolare indotta dall'Hcy:

I) In pazienti uremici iperomocisteinemici i livelli di Hcy plasmatica sono significativamente aumentati (40 uM vs 10 uM) ed è stato evidenziato un parallelo aumento delle concentrazioni plasmatiche ed intracellulari di AdoHcy.

II) Nei pazienti uremici iperomocisteinemici è stata dimostrata una significativa inibizione della riparazione delle proteine mediata dall'enzima L-isoaspartyl proteina-O-metiltransferasi, il che determina accumulo di proteine danneggiate nella membrana eritrocitaria.

III) Nei pazienti uremici, sia l'iperomocisteinemia che l'alterazione del potenziale di transmetilazione $[AdoMet]/[AdoHcy]$ vengono parzialmente corretti dalla somministrazione di folato.

IV) Il DNA è un altro bersaglio molecolare estremamente sensibile agli effetti di ipometilazione dovuti all'incremento dell'AdoHcy, in conseguenza dell'iperomocisteinemia. Poiché il livello di metilazione risulta essenziale per la modulazione di numerose funzioni geniche, analizzare in maniera più accorta a livello genico lo stato di metilazione ed espressione di un gruppo selezionato di geni regolati da metilazione ci condurrà ad una migliore interpretazione della fisiopatologia dell'iperomocisteinemia e ci permetterà di identificare markers molecolari in grado di seguire la deregolazione di funzioni cellulari in questi pazienti e la loro possibile correlazione con la sintomatologia clinica.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

- 1) A.F. PERNA, P. CASTALDO, N.G. DE SANTO, P. GALLETTI & D. INGROSSO,
Homocysteine and chronic renal failure
Miner. Electrolite Metab., 25 279-285, 1999
- 2) F. DELLA RAGIONE, V. CUCCIOLLA, A. BORRIELLO, V. DELLA PIETRA, C. MANNA, P. GALLETTI & V. ZAPPIA.
Pyrrolidine dithiocarbamate induces apoptosis by a cytochrome c-dependent mechanism
Biochem. Biophys. Res. Commun., 268, 523-527, 2000
- 3) C. MANNA, P. GALLETTI, G. MAISTO, V. CUCCIOLLA S.D'ANGELO & V. ZAPPIA
Transport mechanism and metabolism of olive oil hydroxytyrosol in caco-2 cells.
FEBS Lett, 470, 341-4 2000
- 4) D. INGROSSO, S. D'ANGELO, E. DI CARLO, A. PERNA V. ZAPPIA & P. GALLETTI
Increased methyl esterification of altered aspartyl residues in erythrocyte membrane proteins in response to oxidative stress.
Eur.J. Biochem. 267, 1-10, 2000
- 5) F. DELLA RAGIONE, V. CUCCIOLLA, A. BORRIELLO, V. DELLA PIETRA, G. PONTONI, L. RACIOPPI, C. MANNA, P. GALLETTI & V. ZAPPIA
Hydroxytyrosol, a natural molecule occurring in olive oil, induces cytochrome c-dependent apoptosis
Biochem. Biophys. Res. Commun., 278, 733-739, 2000
- 6) S.D'ANGELO, P. GALLETTI, G. MAGLIO, M. MALINCONICO, P. MORELLI, R. PALUMBO, M.C. VIGNOLA
Segmented poly(ether-ester-amide)s based on poly(L,L-lactide) macromers
Polymer, 42, 3383-92, 2001
- 7) S. D'ANGELO, D. INGROSSO, B. PERFETTO, A. BARONI, M. ZAPPIA, L. LOBIANCO LUBRANO, M.A. TUFANO AND P. GALLETTI.
UVA-irradiation induces L-isoaspartyl formation in melanoma cell proteins.
Free Rad Biol Med, 31, 1-9, 2001
- 8) A.F. PERNA, P. CASTALDO, N.G. DE SANTO, E. DI CARLO, A. CIMMINO, P. GALLETTI, V. ZAPPIA AND D. INGROSSO.
Plasma proteins containing damaged L-isoaspartyl residues are increased in uremia: implications for mechanism.
Kidney Int., 59, 2299-308, 2001
- 9) A.F. PERNA, D. INGROSSO, P. CASTALDO, P. GALLETTI AND N.G. DE SANTO
Homocysteine and Transmethylation in uremia.
Kidney Int., 78, S-203-3, 2001
- 10) A.F. PERNA, D. INGROSSO, E. SATTA, M. ROMANO, A. CIMMINO, P. GALLETTI, V. ZAPPIA, N.G. DE SANTO
Metabolic consequences of hyperhomocysteinemia in uremia
Am. J Kidney Dis., 38, S85-90, 2001
- 11) S. D'ANGELO, C. MANNA, V. MIGLIARDI, O. MAZZONI, P. MORRICA, G. CAPASSO, G., G. PONTONI, P. GALLETTI AND V. ZAPPIA
Pharmacokinetics and metabolism of hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil
Drug Metab Dispos., 29, 1492-8, 2001.
- 12) D. INGROSSO, A. CIMMINO, S.D'ANGELO, F. ALFINITO, V. ZAPPIA and P. GALLETTI
Protein methylation as marker of aspartyl damage in G6PD deficient erythrocytes: role of oxidative stress.
Eur.J. Biochem., 269, 2032-2039, 2002

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Caratterizzazione di geni markers, tipicamente metilati, allo scopo di evidenziare gli effetti di una ipometilazione del DNA sui loro livelli di trascrizione. Identificazione di nuovi geni markers dell'effetto tossico dell' Hcy e loro possibile applicazione nella valutazione clinica del rischio cardiovascolare. Valutazione del loro valore diagnostico e prognostico anche rispetto ad interventi terapeutici volti all'abbassamento dei livelli ematici di Hcy (trattamento con folati). Valutazione del ruolo della ipometilazione del DNA nei meccanismi patogenetici dell'effetto tossico dell'Hcy nella patologia cardiovascolare.

Collaborazioni internazionali in atto

Prof. S. Clarke Department of Chemistry and Biochemistry and The Molecular Biology Institute University of California Los Angeles Los Angeles, California 90024-1569, U.S.A.
Proff. M. D'Urso e M. D'Esposito, Laboratorio di Ricerca sul Genoma e Sequenziamento Istituto Internazionale di Genetica e Biofisica – Consiglio Nazionale delle Ricerche

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

- 1. HPLCs equipaggiati con rilevatori spettrofotometrico fluorimetrico e Diode Array

- 2. Elettroforesi capillare Waters
- 3. Apparecchiatura per elettroforesi bidimensionale e software per il riconoscimento e la quantizzazione delle singole bande elettroforetiche sul gel)
- 4. Real time PCR technology
- 5. Laser capture microdissector
- 6. Spotter, hybridizer & scanner for gene-array technology

Parole Chiave

Adenosilmetionina, adenosilomoisteina, omocisteina, iperomocistinemia, metilazioni delle proteine, metilazione del DNA, folato, regolazione genica, epigenetica.

UNITA' DI RICERCA INBB
Roma

Responsabile Scientifico

Bruno GIARDINA

Linea di Ricerca

CARATTERIZZAZIONE FUNZIONALE E STRUTTURALE DI BIOMOLECOLE

titolo

Correlazione tra struttura e funzione di emoproteine

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Bruno GIARDINA	PO	b.giardina@uniserv.ccr.rm.cnr.it
----------------	----	----------------------------------

Non Aderenti INBB

Maria Cristina DE ROSA	RCNR	c.derosa@uniserv.ccr.rm.cnr.it
Claudia BERTONATI	BC	c.bertonati@uniserv.ccr.rm.cnr.it
Elisabetta CLEMENTI	RCNR	e.clementi@uniserv.ccr.rm.cnr.it
Francesco MISITI	RU	f.misiti@uniserv.ccr.rm.cnr.it
Andrea BRANCACCIO	RCNR	a.brancaccio@uniserv.ccr.rm.cnr.it

Sede Unità di Ricerca

Istituto di Biochimica e Biochimica Clinica

Indirizzo L.go F. Vito 1, 00168 Roma

Telefono 06 30155135

Fax 06 30154309

E-mail b.giardina@uniserv.ccr.rm.cnr.it

Sezione INBB di appartenenza

Roma

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Le emoproteine, rappresentando un diretto legame tra organismo ed ambiente esterno, possono essere considerate un importante modello per studiare come l'evoluzione abbia agito, a livello molecolare, per garantire un adeguato apporto di ossigeno in relazione alle necessità fisiologiche dello specifico organismo. A questo riguardo, lo studio comparativo delle emoglobine provenienti da specie animali differenti, fornisce importanti informazioni sui rapporti struttura-funzione che sono alla base della modulazione del ciclo di ossigenazione/desossigenazione negli eritrociti delle varie specie.

Le tecniche di chimica computazionale rappresentano un utile strumento per lo studio delle relazioni struttura-funzione nei sistemi biologici e hanno previsto:

- i) la costruzione di modelli teorici di emoproteine di cui non è nota la struttura cristallografica o NMR mediante tecniche computazionali di dinamica molecolare.
- ii) studi di interazione proteina-ligando. L'interazione di alcuni effettori eterotropici con le emoproteine può essere studiata mediante tecniche di "docking" molecolare che utilizzano criteri geometrici, energetici o misti per individuare la complementareità tra ligando e proteina.

Risultati ottenuti

Ci siamo occupati della costruzione di modelli molecolari di alcune emoglobine varianti (Hb J-Sardegna [$\square 50(\text{CE8})\text{His} \rightarrow \text{Asp}$]; Hb F-Calabria [$\square 118(\text{GH1})\text{Phe} \rightarrow \text{Leu}$]) e dell'emoglobina del "pesce fossile" *Acipenser Naccarii* di cui non sono note le strutture tridimensionali. La costruzione del modello ha previsto innanzitutto la scelta di una struttura template con cui la proteina condivide una significativa similarità di sequenza e quindi la sostituzione delle catene laterali che differiscono tra le due proteine. Il modello preliminare così ottenuto è stato quindi rifinito mediante procedure di solvatazione. Dopo completamento del modello della proteina è stata effettuata una minimizzazione dell'energia totale del sistema con dinamica molecolare per superare i minimi locali. Inoltre abbiamo studiato teoricamente la possibilità di prevedere la complementareità tra ligando e recettore utilizzando il programma GRID per analizzare l'interazione di alcuni effettori eterotropici con le emoproteine. In particolare è stato studiato l'effetto di alcuni anioni a bassa densità di carica (quali ad esempio lo ioduro, il perclorato) sull'affinità di legame della mioglobina per l'azide, suggerendo un sito di legame per l'alogenuro e conseguentemente un possibile meccanismo molecolare responsabile della diminuita affinità della proteina per l'azide. Una ulteriore applicazione è rappresentata dallo studio del legame del 2,3-difosfoglicerato (DPG) con l'emoglobina. Nota la struttura del complesso emoglobina umana-DPG, mediante il programma GRID ed ulteriori procedure di "docking" molecolare, è stata analizzata

l'interazione del DPG con una serie di emoglobine (ad esempio quella di cavallo) per le quali non è nota la struttura del complesso.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

- 1 Manca, L., Cherchi L, De Rosa M.C., Giardina B. and Masala, B. A new, electrophoretically silent, fetal hemoglobin variant: Hb F-Calabria [α 118(GH1)Phe $\rightarrow$ Leu]. Manca L, Cherchi L, De Rosa MC, Giardina B, Masala B. *Hemoglobin*, 24, 37-44, 2000.
- 2 Corda M., De Rosa, M.C., Pellegrini, M.G., Sanna, M.T., Olanas, A., Fais, A., Manca, L., Masala, B., Zappacosta, B., Ficarra, S., Castagnola, M. and Giardina, B. Adult and fetal haemoglobin J-Sardegna [α 50(CE8)His $\rightarrow$ Asp]: functional and molecular modelling studies. *Biochem. J.* 346,193-9, 2000.
- 3 Pellegrini, M., Corda, M., Manca, L., Olanas, A., Sanna, M.T., Fais, A., De Rosa, M.C., Bertonati, C., Masala, B. and Giardina, B. Functional and computer modelling studies of hemoglobin from horse. The haemoglobin system of the Sardinian wild dwarf horse, *Eur. J. Biochem.* 268, 3313-3320, 2001.
- 4 Clementi, M.E., De Rosa, M. C., Bertonati, C., Capo, C., Cataldi, E., Petruzzelli, R., Giardina, B. The Hemoglobins of the "Fossil fish" *Acipenser Naccarii*: Functional properties and their structural basis. *Hemoglobin* 25, 447-51, 2001 .
- 5 De Rosa, M. C., Bertonati, C., Giardina, B., Di Stasio, E. and Brancaccio, A. The Effect of Anions on Azide Binding to Myoglobin: an Unusual Functional Modulation. *Biochim. Biophys. Acta* 1594, 341-352, 2002.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

L'impiego combinato di dati sperimentali e "modelling" ha sensibilmente ampliato la capacità di esplorare le relazioni struttura-funzione nelle macromolecole biologiche. I continui sviluppi delle risorse di calcolo hanno reso possibile l'approccio teorico allo studio delle interazioni proteina-proteina all'interno del globulo rosso. Algoritmi diversi in grado di prevedere la complementareità strutturale di due proteine sulla base della loro topologia o di altre proprietà chimico-fisiche verranno applicati allo studio della modulazione del metabolismo eritrocitario (interazione emoglobina-banda 3) e della funzionalità della membrana eritrocitaria (interazione emoglobina-spectrina).

Collaborazioni internazionali in atto

Dr. Matti Nuutinen University of Oulu, Finland.

Dr, Ole Brix Department of Zoology, University of Bergen, Bergen, Norway

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

3 workstations SGI

J-500A Spectropolarimeter

NMR Varian Gemini

Parole Chiave

Emoproteine, Modellistica molecolare, Effettori eterotropici, Dinamica molecolare

UNITA' DI RICERCA INBB
Catania

Responsabile Scientifico

Anna Maria GIUFFRIDA STELLA

Linee di Ricerca

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

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

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

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

Studio dei meccanismi molecolari alla base del processo di invecchiamento nel sistema nervoso centrale e in colture cellulari neuronali e/o astrogliali in condizioni di stress ossidativo, e in particolare:

- Individuazione e isolamento di geni la cui espressione è modificata significativamente, tramite l'applicazione della tecnica innovativa del "mRNA differential display".

Studi sulle interazioni tra stato redox e regolazione dell'espressione di geni correlati con meccanismi di protezione cellulare.

- Studio dell'espressione di singole subunità nucleari e/o mitocondriali degli enzimi della catena respiratoria mitocondriale, nonché di specifici fattori di regolazione trascrizionale e posttrascrizionale ad esse correlati.

- Studio dell'attività e dell'espressione degli enzimi che partecipano alle difese antiossidanti cellulari: Se- e non-Se-glutathione perossidasi, glutathione reduttasi, catalasi, Mn-SOD e Cu/Zn-SOD.

- Dosaggio dell'attività e dell'integrità della PARP (poli-ADP-ribosio polimerasi) e del suo ruolo nella protezione dalla morte cellulare programmata (apoptosi) o dalla necrosi.

- Studio della attivazione della via di trasduzione del segnale JAK/STAT in colture primarie astrogliali di ratto in risposta a citochine (IFN-gamma) e tossine batteriche (LPS) per l'espressione della forma inducibile della NOS (iNOS).

- Clonaggio genico ed analisi dell'espressione di proteine delle gap junctions (connessine) nel sistema nervoso dei roditori e dell'uomo.

titolo

BASI MOLECOLARI DEI PROCESSI NEURODEGENERATIVI E DELL'INVECCHIAMENTO

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Anna Maria GIUFFRIDA STELLA	PO	amgsbioc@unict.it
Vincenzo ALBANESE	PO	ibfsnc@area.ct.cnr.it
Roberto AVOLA	PO	marlet@unict.it
Vittorio CALABRESE	PA	calabres@unict.it
Maria Vincenza CATANIA	A (R - CNR)	mcatania@area.ct.cnr.it
Daniele Filippo CONDORELLI	PO	condorda@unict.it
Paola DELL'ALBANI	A (R - CNR)	dealpa@area.ct.cnr.it
Vincenzo Giuseppe NICOLETTI	PA	nicovigi@unict.it
Vittoria SPINA-PURRELLO	PT	spinavitt@unict.it
Vincenza BARRESI	BC	
Agata COPANI	DR	
Giuseppina FRASCA	DR	
Davide LICCIARDELLO	DR	
Carmelita MIRONE	DR	
Daniela PATTI	DR	
Agrippino RAVAGNA	DR	
Rosa SANTANGELO	DR	
Giovanni SCAPAGNINI	DR	
Filippo SPADARO	DR	
Angela TROVATO SALINARO	DR	

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Scienze Chimiche, Sezione di Biochimica e Biologia Molecolare
Università degli Studi di Catania

Indirizzo Via Andrea Doria, 6 – 95125 Catania
Telefono 0957384074
Fax 095336990.
E-mail amgsbioc@mbox.unict.it

Sezione INBB di appartenenza

Catania

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Individuazione:

- dei meccanismi di regolazione dell'espressione genica di enzimi della catena respiratoria mitocondriale in patologie neurodegenerative durante l'invecchiamento cerebrale ed effetti dello stress ossidativo in vivo ed in vitro, in colture di cellule astrogliali e neuronali.
- del ruolo protettivo delle stress protein (hsp) nella neurotossicità da ossido nitrico: implicazioni nel trattamento dei disordini neurodegenerativi
- del ruolo dell'ossido nitrico di origine gliale nella patogenesi della morte neuronale.
- del ruolo della via di trasduzione del segnale JAK/STAT nell'espressione della iNOS.
- della relazione tra la cNOS negli astrociti reattivi e il potenziamento della tossicità da attivazione dei recettori metabotropici del gruppo I in presenza di glia.
- del ruolo delle connessine nella patogenesi di diversi disordini neurodegenerativi.

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

Risultati ottenuti

Durante i processi di invecchiamento, nella corteccia cerebrale di ratto, e dopo induzione della NO sintasi in colture astrogliali con LPS ed IFN γ è stato osservato:

- a) un incremento dell'espressione di enzimi della catena respiratoria mitocondriale (citocromo c ossidasi, ATP sintasi) sia a carico delle subunità proteiche che degli mRNA corrispondenti.
- b) un incremento dell'espressione delle HSP70.

E' stata analizzata, tramite ibridazione in situ, la distribuzione del mRNA della connessina CX36 in aree selezionate del Sistema Nervoso Centrale umano; l'espressione più alta è stata riscontrata nell'oliva inferiore. È stato quindi dimostrato che l'espressione della CX36 persiste anche nell'adulto in una ristretta sottopopolazione di neuroni specializzati.

E' stato messo in evidenza che l'attivazione dei recettori mGlu del gruppo I potenzia la tossicità da NMDA nei granuli cerebellari solamente in presenza di glia, che rilascia quindi uno o più fattori tossici. Dai risultati ottenuti è possibile escludere che la NOS costitutiva espressa negli astrociti contribuisca ai fenomeni di eccitotossicità.

E' stata osservata, in colture primarie astrogliali trattate con IFN γ , la rapida attivazione della proteina STAT1 ed una correlazione temporale della fosforilazione delle proteine JAK2 e STAT1, con la trascrizione del mRNA per l'IRF1 e per la iNOS. Tale osservazione è stata confermata tramite un inibitore specifico della fosforilazione di JAK2.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1997-2000

1. Condorelli D.F., Nicoletti V.G., Barresi V., Conticello S.G., Caruso A., Tendi E.A., Giuffrida Stella A.M. Structural features of the rat GFAP gene and identification of a novel alternative transcript. J. Neurosci. Res., 56: 219-228, 1999.
2. Dell'Albani P., Santangelo R., Nicoletti V.G., Giuffrida Stella A.M., de Vellis J.. JAK/STAT signaling pathway is involved in NOS induction in primary astroglial cell culture. J. Neurochem. 73:S71D, 1999.
3. Copani A., Condorelli F., Caruso A., Vancheri C., Sala A., Giuffrida Stella A.M., Canonico P.L., Nicoletti F., Sortino M.A. "Mitotic signaling by Beta-amyloid causes neuronal death." The FASEB Journal, 13: 2225-2234, 1999.
4. Calabrese V., Copani A., Testa D., Ravagna A., Spadaro F., Tendi E., Nicoletti V., A.M. Giuffrida Stella. Nitric oxide synthase induction in astroglial cell cultures: effect of nitric oxide on the synthesis of heat shock protein 70 and the oxidant / antioxidant balance in astroglial cell cultures. J. Neurosci. Res. 60: 613-622, 2000.
5. Calabrese V., Testa D., Ravagna A., Bates T.E., A.M. Giuffrida Stella. HSP70 induction in the brain following ethanol administration in the rat: regulation by glutathione redox state. Biochem. Biophys. Res. Comm. 269: 397-400, 2000.
6. Calabrese V., Bates T.E., and Giuffrida Stella A.M.. NO Synthase and NO-Dependent Signal Pathways in Brain Aging and Neurodegenerative Disorders: The Role of Oxidant/Antioxidant Balance. Neurochemical Research 25, 9, 1315-1341, 2000.
7. Gallo F., Morale M.C., Spina-Purrello V., Tirolo C., Testa N., Farinella Z., Avola R., Beaudet A. and Marchetti B. Basic fibroblast growth factor (bFGF) acts on both neurons and glia to mediate the neurotrophic effects of astrocyte on LHRH neurons in culture. Synapse, 2000 36, pg. 233-266.

8. Condorelli F., Sortino M.A., Giuffrida Stella A.M., Canonico P.L. Relative Contribution of Different Receptor Subtypes in the Response of Neuroblastoma Cells to Tumor Necrosis Factor- α . J.Neurochem.75,1172-1179 (I.F 4,223), 2000
9. Calabrese V., Scapagnini G., Giuffrida Stella A.M., Bates T.E., Clark J.B. "Mitochondrial involvement in brain function and dysfunction: relevance to aging, neurodegenerative disorders and longevity." Neurochem. Res. 26, 739-764,2001.
10. Dell'Albani P., Santangelo R., Torrisi L., Nicoletti V.G., de Vellis J. and Giuffrida Stella A.M., "JAK/STAT signaling pathway mediates cytokine-induced iNOS expression in primary astroglial cell cultures." J. Neurosci. Res. Sep. 65 (5): 417-424, 2001.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Studiare durante l'invecchiamento e in diversi processi neurodegenerativi, le modificazioni dell'espressione:

- 1) dei geni nucleari e mitocondriali che codificano per proteine della catena respiratoria mitocondriale;
- 2) delle Heat-Shock Protein 70 (HSP70);
- 3) della Poli-ADP-ribosio polimerasi (PARP);
- 4) delle connessine;

e i processi di trasduzione del segnale che coinvolge le proteine Jak-Stat.

Collaborazioni internazionali in atto

Prof. Jean De Vellis, UCLA Mental Retardation Res. Center.

Los Angeles, California (USA)

Prof. Anders Hamberger, Department of Anatomy and Cell Biology,
University of Goteborg, Sweden

Prof. John Clark, University College of London UK

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Apparecchiature per colture cellulari

Apparecchiature per Southern, Northern, Western.

PCR

Spettrofotometri e spettrofluorimetri

Centrifughe e ultracentrifughe

Fotometro per piastre a micropozzetti

Parole Chiave

Neurodegenerazione, Aging, NOS, JAK/STAT, Connexine, HSPs, PARP, espressione genica.

UNITA' DI RICERCA INBB
Catania

Responsabile Scientifico

Salvatore GUCCIONE

Linea di Ricerca

APPLICAZIONI DI MODELLISTICA MOLECOLARI A PROBLEMATICHE RIGUARDANTI IL DRUG DELIVERY ED IL DRUG TARGETING (CONIUGATI LIPOAMMINOACIDICI, MATRICI POLIMERICHE, BIOMACROMOLECOLE E MODELLI DI MEMBRANA).

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Salvatore GUCCIONE

RU

guccione@unict.it

Non Aderenti INBB

Rosario PIGNATELLO

PA

r.pignatello@mbox.unict.it

Antonina PULEO

DR

apuleo@unict.it

Samantha PERSPICACE

BC* (ROCHE, Basel, Switzerland)

psamantha@freemail.it;

samantha.perspicace@Roche.com

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università di Catania

Indirizzo: Viale A. Doria 6, Ed. 2, Città Universitaria, 95125 Catania

Telefono: (095)738-4020

Fax: 095-443604

E-mail guccione@unict.it

Sezione INBB di appartenenza

Catania

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Obiettivo della ricerca è quello di ottimizzare il profilo farmacologico di molecole già in uso terapeutico quale l'antitumorale metotrexato sia attraverso la sintesi di opportuni "coniugati" (es. lipoconiugati amminoacidici) che ne condizionino il bilancio idro-lipofilo migliorandone la biodisponibilità, sia come nel caso di FANS (Ibuprofene, Flurbiprofene) attraverso l'analisi della interazione con matrici polimeriche usate come carrier, quali gli EUDRAGIT e successive modifiche strutturali che ne ottimizzino il rilascio.

Verranno impiegati *tools* computazionali dell'ultima generazione in combinazione con tecniche "sperimentali" (DSC, NMR, IR, Diffrazione ai Raggi X) e modelli di membrana, quali i liposomi. Linea guida del programma è quella di non disgiungere l'attività di ricerca da quella didattica e formativa con il coinvolgimento di elementi non strutturati in esperienze scientifiche esterne grazie alla *mobility* consentita dai numerosi e prestigiosi rapporti di collaborazione a livello nazionale ed internazionale, allo scopo di ottimizzare lo sviluppo delle linee di ricerca programmate attraverso competenze specifiche ed altamente innovative in problematiche di interesse biologico e farmaceutico, anche nella prospettiva di un concreto inserimento nel mondo del lavoro.

Risultati ottenuti

In quanto di nuova formazione, l'unità di ricerca non può presentare risultati congiunti se non *idealmente* dalla concreta consapevolezza e convinzione, supportate da precedenti risultati, che le differenti competenze possano essere integrate. Oltre ai ben noti softwares "*state of art*" quali GRID, VOLSURF, ALMOND, ampiamente documentati in letteratura ed oggi *tools* indispensabili nell'affrontare problematiche biofarmaceutiche, di particolare interesse è stata la analisi *via* GRID del meccanismo Ca^{++}/Mg^{++} -mediato dell'antibiotico Ofloxacin e la possibilità di una interazione EUDRAGIT-Farmaco non semplicemente "occlusiva" ma dove determinanti siano interazioni non covalenti (catione- π ; Van der Waals, elettrostatiche) che, opportunamente modulate, potrebbero migliorare la farmacocinetica di farmaci. Risultati interessanti sono anche stati ottenuti con coniugati lipoamminoacidici del farmaco antitumorale metotrexato.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

- 1) Watson K. A., McCleverty C., Geremia S., Cottaz S., Driguez H., Johnson L.N., *The EMBO Journal* **18**, 4619, 1999.
- 2) Tsitsanou K., Oikonomakos N.G., Zographos S.P., Skamnaki V., Gregoriou M., Watson K.A., Johnson L.N., Fleet G.W.J., *Protein Science* **8**, 741, 1999.
- 3) Boehm, H.-J., Boehringer, M., Gmünder, H., Huber, W., Klaus, W., Kostrewa, D., Kuehne, H., T. Luebbbers, t., Meunier-Keller, N., Mueller, F., *J. Med. Chem.* **43**, 2664, 2000.

- 4) Pignatello R., Amico D., Chiechio S., Giunchedi P., Spadaro C., Puglisi G., *Drug Delivery* **8**, 35, 2001.
- 5) R. Pignatello R., M. Ferro M., G. De Guidi G., G. Salemi G., M. A. Randelli M.A., S. Guccione S., M. Geppi M., C. Forte C.,
Puglisi G., *Int J. Pharm.* **218**, 27, 2001.
- 6) Pignatello R., Toth I., Pugliesi G., *Thermochimica Acta* **380**, 255, 2001
- 7) Fresta M., Guccione S., Beccari A.R., Furneri P.M., and Puglisi G., *Bioorg. Med. Chem.*, in press 2002.
- 8) Pignatello R., Bucolo C., Spedalieri G., Maltese A., Puglisi G., *Biomaterials*, **23**, 3247, 2002.
- 9) Bohrmann, B., Adrian, M., Dubochet, j., Müller, F., Huber, W., Nordstedt, c., Döbeli, H., *J.Struct.Biol.* **130**, 232, 2000.
- 10)Cruciani G., Pastor M.,Clementi S. *Molecular Modeling and Prediction of Bioactivity*. K. Gundertofte and F.E. Jørgensen (eds.) Kluwer Academic/ Plenum Publishers, New York 2000, 73.
- 11) Cruciani G.,Crivori P., Carrupt P.-A. and Testa B. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* **503**, 17, 2000.
- 12) Marchand-Geneste, N.,Watson Kimberly A., Alsberg Bjorn K., and King Ross D., *J. Med. Chem.*, **45**, 399, 2002.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

La credibilità acquisita a livello nazionale ed internazionale dai componenti “strutturati” dell’ unità di ricerca , offre come prospettiva un rientro economico che consenta di ampliare il parco di risorse umane e strumentali.

Obiettivi saranno la sintesi di ulteriori coniugati di molecole in uso terapeutico con analisi delle eventuali differenze sia nel binding che farmacocinetiche rispetto al parent, sia la definizione dell’ interazione EUDRAGIT-Farmaco e la sintesi di molecole opportunamente modificate per modulare quei parametri (descrittori) che possano influenzare positivamente il drug delivery/targeting, dando priorità agli aspetti concretamente applicativi della ricerca.

Collaborazioni internazionali in atto

- 1)Prof. Walter Huber, F.Hoffmann-La Roche, PRBD-CS 65/201, 4070 Basel, Switzerland.
- 2)Prof. Kimberly A. Watson, University of Reading, Schools of Plant Sciences & AMS, The Structural Biology Unit, Whiteknights PO Box 221, Reading RG6 6AS.
- 3)Prof. Istvan Toth, School of Pharmacy, University Of Queensland, Steele Building, Brisbane, Qld 4072, Australia.

Principali attrezzature di cui dispone l’Unità di Ricerca

- 1)Computers (PCs e Silicon Graphics Workstations) ad alte prestazioni;
- 2)Calorimetro a scansione differenziale Mettler;
- 3)Spettrometro NMR 200 MHz;
- 4)HPLC Varian;
- 5)Spettrofotometro FT-IR Perkin-Elmer 1600.
- 6) Strumentazione BIACORE per Surface Plasmon Resonance*.

*L’unità può inoltre disporre di un equipaggiamento BIACORE per Surface Plasmon Resonance presso la ROCHE (Basel, Switzerland).

Parole Chiave

Molecular Modelling; Drug Delivery; Lipoammino acidi; Matrici Polimeriche; Modelli di Biomembrana; Surface Plasmon Resonance (SPR); Prospettiva formativa.

UNITA' DI RICERCA INBB
Catania

Responsabile Scientifico

Salvatore GUCCIONE

Linea di Ricerca

MOLECULAR MODELLING E 3D-QSAR DI LIGANDI ENZIMATICI E RECETTORIALI .

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Salvatore GUCCIONE

RU

guccione@unict.it

Non Aderenti INBB

Maria MODICA

RU

mmodica@unict.it

Samantha PERSPICACE

BC* (ROCHE, Basel, Switzerland)

psamantha@freemail.it;

samantha.perspicace@Roche.it

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università di Catania

Indirizzo: Viale A. Doria 6, Ed. 2, Città Universitaria, 95125 Catania

Telefono: (095)738-4020

Fax: 095-443604

E-mail guccione@unict.it

Sezione INBB di appartenenza

Catania

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Obiettivo della ricerca è la sintesi di nuove molecole quali potenziali farmaci e/o *tools* per la caratterizzazione di *targets* non *determinati* per via cristallografica (Recettori accoppiati alle proteine G; Recettori canale; ACAT, ACYL-COA:CHOLESTEROL O-ACYL TRANSFERASE; MAO-A) o, considerate le diverse *chemotipie* prese in esame e quindi la possibilità di binding alternativo e/o multiplo, la mappatura di enzimi a "struttura nota" (MAO-B). I *targets* oggetto della ricerca sono implicati in diverse patologie di interesse sociale (depressione, obesità). L' approccio sintetico verrà iterativamente complementato da quello computazionale il cui obiettivo specifico sarà la definizione di nuovi metodi di alignment e nuovi paradigmi per 3D-QSAR allo scopo di creare modelli "versatili" applicabili a diverse classi di composti. In aggiunta, sarà sviluppata l' implementazione del software HINT (Hydropathic INteractions) per il calcolo di carboidrati complessi quali ciclodestrine e glicoconiugati . La Surface Plasmon Resonance sarà "cerniera" tra le metodologie soprariportate.

Linea guida del programma è quella di non disgiungere l' attività di ricerca da quella didattica e formativa con il coinvolgimento di elementi non strutturati in esperienze scientifiche esterne grazie alla *mobility* consentita dai numerosi e prestigiosi rapporti di collaborazione a livello nazionale ed internazionale, allo scopo di ottimizzare lo sviluppo delle linee di ricerca programmate attraverso competenze specifiche ed altamente innovative in problematiche di interesse biologico e farmaceutico anche nella prospettiva di un concreto inserimento nel mondo del lavoro .

Risultati ottenuti

Numerosi i risultati d' interesse ottenuti nel corso degli anni dai componenti dell' unità come evidenziato da pubblicazioni in riviste di alto prestigio internazionale, conferenze "su invito", partecipazioni a/e coordinamento di progetti di ricerca nazionali ed internazionali, nonché da incarichi di consulenza ed editoriali. Ligandi a diversa ed originale *chemotipia* altamente affini e selettivi, alcuni dei quali dotati di interessante profilo farmacologico *in vivo*, hanno aperto nuove prospettive sia in termini di potenzialità terapeutiche che nell' analisi della dinamica dell' interazione ligando-target.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

- 1)C.B. Vicentini, M. Guarneri, V. Andrisano, S. Guccione, T. Langer, R. Marschhofer, R. Chabin, A. Edison , X. Huang , W. B. Knight , P. Giori, *J. Enzyme Inhibition* **16** , 15, (2001).
- 2)S. Guccione, A. Doweyko, H. M. Chen, G. Uccello Barretta, F. Balzano, *J. Comput-Aided Mol. Des.* **14**, 647, (2000).
- 3) M. Modica, M. Santagati, S. Guccione, A. Santagati, F. Russo, A. Cagnotto, M. Goegan, T. Mennini, *Eur. J. Med. Chem.* **36**, 287 (2001).
- 4)V.A.Potemkin, R.M.Arslambekov, E.V. Bartashevich, M.A. Grishina, A.V.Belik, S.Perspicace, S.Guccione, *Russ. J. Struct. Chem.* (J.Struct.Chem. (Engl.Transl.), in press (2002) .

- 5) J. Wouters, B. Norberg, and S. Guccione, *Acta Cryst. Section C*, **C57**, o69±o71, (2001).
- 6) L. Orús, S. Pérez-Silanes, A-M. Oficialdegui, J. Martínez-Esparza, J-C. Del Castillo, M. Mourelle, T. Langer, S. Guccione, G. Donzella, E.M. Krovat, K. Poptodorov, B. Lasheras, S. Ballaz, I. Hervias, R. Tordera, J. Del Río, A. Monge, *J. Med. Chem.*, in press (2002).
- 7) M. Modica, M. Santagati, A. Santagati, F. Russo, A. Cagnotto, M. Goegan, T. Mennini., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **10**, 1089 (2000).
- 8) L. Costantino, G. Rastelli, M.C. Gamberini, M.P. Giovannoni V. Dal Piaz, P. Vianello, D. Barlocco., *J. Med. Chem.* **42**, 1894 (1999).
- 9) D. Barlocco, G. Cignarella, V. Dal Piaz, M. P. Giovannoni, P. De Benedetti, F. Fanelli, F. Montesano, E. Poggesi, A. Leonardi, *J. Med. Chem.* **44**, 2403(2001).
- 10) I. Sylte, A. Bronowska, S.G. Dahl, *Eur. J. Pharmacol.* **416**, 33 (2001).
- 11) A. Bronowska, A. Leś, Z. Chilmonczyk, S. Filipek, Ø. Edvardsen, R. Østensen, I. Sylte, *Bioorg. Med. Chem.* **9**, 881 (2001).
- 12) Cozzini P., Fornabai M., Marabutti A., Abraham D.J., Kellogg G.E. and Mozzarelli A., *J. Med. Chem.* **45**, 2469, (2002).

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

La credibilità acquisita a livello nazionale ed internazionale dai componenti “strutturati” dell’unità di ricerca e quindi la possibilità di accedere a finanziamenti attraverso attività di consulenza e convenzioni con enti Pubblici e Privati sia in Italia che all’ estero, offre la prospettiva per una ricaduta pratica che consenta di ampliare il parco di risorse umane e strumentali.

Obiettivi sono l’ ulteriore ottimizzazione dell’ affinità e selettività dei ligandi e lo studio del loro binding mirando anche ad uno sviluppo concretamente “applicativo” delle linee di ricerca sì da suscitare ulteriore interesse e *partnerships* attraverso i quali rendere concreta la prospettiva “pratica” di cui sopra .

Collaborazioni internazionali in atto

- 1) Prof. Glen E. Kellogg, Department Of Medicinal Chemistry & Institute For Structural Biology And Drug Discovery, Virginia Commonwealth University, Richmond, Va 23298-0540, Usa;
- 2) Prof. F. Javier Luque, Departament De Fisicoquímica, Facultat De Farmàcia, Universitat De Barcelona, Av. Diagonal S/N, S-08028, Barcelona, Spain;
- 3) Prof. V.A. Potemkin, Chelyabinsk State University, Chemical Department, 129 ul. Br.Kashirinykh, 454136 Chelyabinsk, Russian Federation.

Principali attrezzature di cui dispone l’Unità di Ricerca

- 1) Computers (PCs e Silicon Graphics Workstations) ad alte prestazioni;
- 2) Calorimetro a scansione differenziale;
- 3) Spettrometro NMR 200 MHz;
- 4) HPLC Varian;
- 5) Spettrofotometro FT-IR Perkin-Elmer 1600.
- 6) Strumentazione BIACORE per Surface Plasmon Resonance*.

*L’unità può inoltre disporre di un equipaggiamento BIACORE per Surface Plasmon Resonance presso la ROCHE (Basel, Switzerland).

Parole Chiave

Molecular Modelling; Ligandi Enzimatici e Recettoriali; Proteine G; Sintesi; Carboidrati.

UNITA' DI RICERCA INBB
Napoli

Responsabile Scientifico

Gaetano IRACE

Linea di Ricerca

FOLDING E MISFOLDING DI PROTEINE. ANALISI DEGLI EFFETTI INDOTTI DA SOSTITUZIONI AMMINOACIDICHE.

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Gaetano IRACE

PO

gaetano.irace@unina2.it

Ivana SIRANGELO

RU

ivana.sirangelo@unina2.it

Non Aderenti INBB

Clorinda MALMO

DR

clomal@sitoverde.com

Mariateresa CASILLO

AR

m.casillo@inwind.it

Clara IANNUZZI

Laureanda

claraianuzzi@hotmail.com

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Biochimica e Biofisica – II Università degli Studi di Napoli.

Indirizzo via L. De Crecchio 7 - 80138 Napoli

Telefono Fax. 081/5665863

E-mail gaetano.irace@unina2.it

Sezione INBB di appartenenza

Napoli

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

L'attività di ricerca si è sviluppata principalmente a comprendere il contributo di residui invarianti nell'organizzazione strutturale degli stati parzialmente strutturati. Mediante mutagenesi sito-diretta sono state prodotte mioglobine ricombinanti in cui sono stati sostituiti, alternativamente o contemporaneamente, i residui triptofanilici, che nelle mioglobine da mammifero occupano invariabilmente le posizioni 7 e 14 localizzate lungo l'elica A. Sono state, quindi, studiate le proprietà strutturali delle apomioglobine ricombinanti e sono stati caratterizzati da un punto di vista dinamico i microintorni dei residui in posizione 7 e 14 ed il sito idrofobico di legame per un *probe* estrinseco, l'ANS. In particolare, è stato messo in evidenza che la simultanea sostituzione dei due residui triptofanilici con residui di fenilalanina non permette alla proteina di raggiungere la conformazione nativa. Questo mutante ha rappresentato pertanto, un ottimo modello per studiare non solo il meccanismo di folding, ma anche per comprendere le basi molecolari per cui alcune mutazioni determinano misfolding. Alcuni stati patologici, sono infatti determinati da depositi extra-cellulari formati da aggregati proteici insolubili, noti come fibrille di tipo amiloide, che si originano da un alterato ripiegamento della catena polipeptidica. La simultanea sostituzione dei residui triptofanilici ha determinato una drastica riduzione del livello di espressione e la formazione di una proteina poco stabile che non è più in grado di legare l'eme. I dati di simulazione di dinamica molecolare indicano che la rimozione dei triptofani induce distorsione nel dominio AGH dell'intermedio del folding, cosa che probabilmente influenza le successive tappe di strutturazione.

Mediante l'introduzione di una coda di sei istidine è stato possibile purificare in forma omogenea la proteina ricombinante, che ha mostrato una forte tendenza all'aggregazione, dando origine alla formazione di precipitati. L'analisi degli spettri di dicroismo circolare nel lontano UV dei precipitati ha mostrato la mancanza di struttura alfa-elicoideale e presenza, invece, di elementi di struttura di tipo beta, tipica caratteristica degli aggregati proteici di tipo amiloide. Inoltre la proteina ha la capacità di legare il Rosso Congo e la Tioflavina T e induce birifrangenza del Rosso Congo sotto luce polarizzata. L'insieme di questi dati indica che la proteina mutata subisce un processo di aggregazione simile a quello che causa la formazione delle fibrille di tipo amiloide. Pertanto, la formazione di amiloide non sembra un fenomeno limitato a determinate sequenze, ma piuttosto una proprietà comune a molte, se non a tutte, le catene polipeptidiche.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

1) E., Bismuto, R., Nucci, M., Rossi & G., Irace

"Structural and dynamic aspects of β -glycosidase from mesophilic and thermophilic bacteria by multi-tryptophanyl emission decay studies"

PROTEINS Structure, Function, Genetics 35: 163-172 (1999).

2) E. Bismuto & G. Irace

"Structural and dynamical properties of the folded state of apomyoglobin under denaturing conditions"

in Current Topics in peptides proteins research, ed. Research Trends. Press Trivandrum India (1999).

3) I., Sirangelo, S., Tavassi & G., Irace

"Apomyoglobin folding intermediates characterized by hydrophobic fluorescent probe 8-anilino-1-naphthalene sulfonate (ANS)"

Biochim. Biophys. Acta 1476: 173-180 (2000).

4) I., Sirangelo, S., Tavassi, P.L. Martelli, R. Casadio & G., Irace

"The effect of tryptophanyl substitution on folding and structure of myoglobin"

Eur. J. Biochem. 267: 3937-3945 (2000).

5) E. Bismuto, P.L. Martelli, R. Casadio & G. Irace

"Tryptophanyl lifetime distribution of hyperthermophilic β -glycosidase from molecular dynamics simulation: a comparison with the experimental data"

Protein Sci. 9: 1730-1742 (2000).

6) E. Bismuto & G. Irace

"The effect of molecular confinement on the conformational dynamics of the native and partly folded state of apomyoglobin"

FEBS Letters 509, 476-480 (2001).

7) I. Sirangelo, G. Irace & E. Bismuto

"Fluorescence studies on partly folded apomyoglobin intermediates by the extrinsic probe 1-anilino-8-naphthalenesulfonate (ANS)"

Recent Res. Devel. Photochem&Photobiol. 5: 30-39 (2001)

8) E. Bismuto, P.L. Martelli, A. De Maio, D.G. Mita, G. Irace* & R. Casadio

"The effect of molecular confinement on the internal enzyme dynamics: frequency domain fluorometry and molecular dynamics simulation studies" *Corresponding Author

Biopolymers (Biospectroscopy) 67, 85-95 (2002).

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

L'attività di ricerca di questa Unità sarà mirata ad esaminare le basi molecolari dei fenomeni di aggregazione proteica e dei processi di misfolding alla base delle patologie di tipo amiloide. Inoltre, saranno effettuati studi con sistemi cellulari per comprendere il meccanismo di folding della mioglobina *in vivo* e il coinvolgimento di eventuali *molecular chaperons*.

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

1. spettrofotometro Jasco V550;
2. spettrofluorimetro Perkin -Elmer Mod PE LS 55;
3. apparecchio per elettroforesi su gel di poliacrilammide accessoriato Bio-Rad ;
4. microcentrifuga Eppendorf 5412;
5. FPLC Pharmacia;
6. FluorS Multimager Bio-Rad.

Parole Chiave

Proteine, struttura; proteine, folding; proteine, misfolding; folding in vivo

UNITA' DI RICERCA INBB
Bologna

Responsabile Scientifico
Giorgio LENAZ

Linea di Ricerca
STRUTTURA E FUNZIONE DELLA CATENA RESPIRATORIA MITOCONDRIALE

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Giorgio LENAZ	PO	lenaz@biocfarm.unibo.it
---------------	----	-------------------------

Non Aderenti INBB

Carla BOVINA	PA	bovia@biocfarm.unibo.it
Romano FATO	PA	bioenerg@biocfarm.unibo.it
Giovanna PARENTI CASTELLI	PA	gparenti@biocfarm.unibo.it
Alessandra BARACCA	RU	
Gabriella FORMIGGINI	RU	formiggi@biocfarm.unibo.it

Sede Unità di Ricerca
Dipartimento di Biochimica

Indirizzo Via Irnerio 48 Bologna ...
Telefono 051-2091229
Fax 051-2091217
E-mail lenaz@biocfarm.unibo.it

Sezione INBB di appartenenza
Bologna

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

- (a) Caratterizzazione dei componenti strutturali della catena respiratoria e della ATP sintasi mitocondriale..
- (b) Individuazione dei siti della catena respiratoria responsabili della formazione di radicali dell'ossigeno e studio del Coenzima Q come antiossidante.
- (c) Ruolo dei mitocondri nel processo di invecchiamento cellulare, perseguendo la teoria mitocondriale della senescenza.
- (d) Caratterizzazione biochimica di malattie genetiche causate da mutazioni del DNA mitocondriale.

Risultati ottenuti

- (a) Metodi di molecular modelling al computer hanno dimostrato che il Coenzima Q sia ossidato che ridotto ha una conformazione ripiegata, compatibile con gli alti coefficienti di diffusione riscontrati mediante quenching di fluorescenza di sonde inserite nella membrana. Gli studi sulla funzione pool del CoQ utilizzando i coefficienti di flusso metabolico suggeriscono una disposizione della catena respiratoria in supercomplessi. Gli studi sull'ATP sintasi hanno determinato con metodi spettroscopici le distanze tra subunità γ e IF1.
- (b) La formazione di superossido dal Complesso I è esaltata da inibitori agenti a livello del CoQ legato e non è modificata dall'estrazione del chinone, suggerendo che il componente responsabile dell'interazione con l'ossigeno è un centro FeS e non il CoQ semichinone. Il CoQ ridotto è anzi un potente antiossidante come dimostrato in epatociti isolati e in piastrine sottoposte a stress ossidativo.
- (c) E' stato dimostrato in epatociti isolati da ratti vecchi un aumento di perossidi. In accordo con il numero di subunità del Complesso I codificate dal DNA mitocondriale sono state riscontrate alterazioni del Complesso in fegato di ratto e in piastrine umane nella senescenza.
- (d) Nella Neuropatia Ottica di Leber e nella sindrome NARP, di cui sono note le mutazioni sul mtDNA ma non le lesioni biochimiche, sono stati messe in luce sottili alterazioni rispettivamente nella sensibilità del Complesso I agli inibitori e nella traslocazione protonica nell'ATP sintasi.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

- Biochemical features of mtDNA 14484 (ND6/M64V) point mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy (LHON). V. Carelli, A. Ghelli, L. Bucci, P. Montagna, A. De Negri, V. Leuzzi, C. Carducci, G. Lenaz, E. Lugaesi, M. Degli Esposti Ann. Neurol., 45, 320-328 (1999).

- Effect of aging and of an oxidation stress on peroxide levels and mitochondrial membrane potential in isolated rat hepatocytes. M. Cavazzoni, S. Barogi, A. Baracca, G. Parenti Castelli, G. Lenaz. FEBS Lett., 440, 53-56 (1999)

- Catalytic activities of the mitochondrial ATP synthase in patients with the mtDNA T8993G mutation in the ATPase 6 gene encoding subunit a Baracca, S. Barogi, V. Carelli, G. Lenaz, G. Solaini J. Biol. Chem. 275, 4177-4182 (2000)
- Mitochondrial bioenergetics in aging G. Lenaz, M. D'Aurelio, M. Merlo Pich, M.L. Genova, B. Ventura, C. Bovina, G. Formigini, G. Parenti Castelli Biochim. Biophys. Acta (Bioenergetics) 1459, 397-404 (2000)
- The site of production of superoxide radical in mitochondrial Complex I is not a bound ubiquinone but presumably iron-sulfur cluster N2. M.L. Genova, B. Ventura, G. Giuliano, C. Bovina, G. Formigini, G. Parenti Castelli, G. Lenaz FEBS Lett. 505, 364-368 (2001)
- A critical appraisal of the mitochondrial Coenzyme Q pool G. Lenaz FEBS Lett. (invited minireview), 509, 151-155 (2001)
- Enhanced activity of the plasma membrane oxidoreductase in circulating lymphocytes from insulin-dependent diabetes mellitus patients G. Lenaz, U. Paolucci, R. Fato, M. D'Aurelio, G. Parenti Castelli, G. Sgarbi, G. Biagini, L. Ragni, S. Salardi, E. Cacciari Biochem. Biophys. Res. Commun. , 290, 1589-1592 (2002)
- Fluorescence resonance energy transfer between coumarin derived mitochondrial F1-ATPase γ subunit and pyrene maleimide labeled fragments of IF1 and subunit c. Baracca, S. Barogi, S. Paolini, G. Lenaz, G. Solaini Biochem. J., 362, 165-171 (2002)
- Clinical-biochemical correlations in six patients with different load of mtDNA T8993G mutation associated with NARP/Leigh (MILS) syndrome V. Carelli, S. Barogi, A. Baracca, F. Pallotti, M.L. Valentino, P. Montagna, M. Zeviani, A. Pini, G. Lenaz, A. Baruzzi, G. Solaini Arch. Neurology, 59, 264-270 (2002)
- Control of oxidative phosphorylation by Complex I in rat liver mitochondria: implications for aging Ventura, M.L. Genova, C. Bovina, G. Formigini, G. Lenaz Biochim. Biophys. Acta (Bioenergetics), 1553, 249-260 (2002)
- Ubiquinol and a Coenzyme Q reducing system protect platelet mitochondrial function of transfusional buffy coats from oxidative stress M. Merlo Pich, A. Castagnoli, A. Biondi, A. Bernacchia, P.L. Tazzari, M. D'Aurelio, G. Parenti Castelli, G. Formigini, R. Conte, C. Bovina, G. Lenaz Free Rad. Res. 36, 429-436 (2002)
- Glycerophosphate-dependent hydrogen peroxide production by brown adipose tissue mitochondria and its activation by ferricyanide Z. Drahota, S. K. R. Chowdhury, D. Floryk, T. Mrádek, J. Wilhelm, H. Rauchová, G. Lenaz, J. Houštek J. Bioenerg. Biomembr. 34, 105-114 (2002)

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Gli obiettivi da perseguire saranno soprattutto la dimostrazione cinetica dell'esistenza o meno di supercomplessi della catena respiratoria, utilizzando la teoria del controllo del flusso metabolico, e la caratterizzazione dettagliata della produzione di superossido da parte dei complessi respiratori e delle condizioni che ne accentuano la produzione: questo con particolare riferimento a processi patologici (malattie genetiche mitocondriali, invecchiamento) in cui si presuppone un'alterazione della catena respiratoria capace di indurre un circolo vizioso di stress ossidativo e alterazione mitocondriale.

Collaborazioni internazionali in atto

- 1) S. Di Mauro, Columbia University, New York
- 2) Z. Drahota, Czech Academy of Sciences, Praga
- 3) H. Baum, King's College, London

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

- 1) Spettrofotometro Jasco a doppia lunghezza d'onda
 - 2) Spettrofluorimetro Jasco
 - 3) Attrezzatura completa per colture cellulari
 - 4) Miniossografo Oroboros (Innsbruck)
- Citometro di flusso Coulter (c/o Centro Interdipartimentale Biotecnologie)

Parole Chiave

Bioenergetica; Mitocondri; Coenzima Q; Catena Respiratoria; Specie Reattive dell'Ossigeno; ATP sintasi; DNA mitocondriale; Invecchiamento.

UNITA' DI RICERCA INBB
Genova

Responsabile Scientifico

Giuliana LEONCINI

Linea di Ricerca

LA VIA L-ARGININA/NO NELLE PIASTRINE UMANE E SUA REGOLAZIONE

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Giuliana LEONCINI

PO

leoncini@unige.it

Non Aderenti INBB

Maria Grazia SIGNORELLO

BC

signorellomg@virgilio.it

Raffaele PASCALE

DR

pas_raf@virgilio.it

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sezione Biochimica

Indirizzo: Viale Benedetto XV 1, 16132 Genova

Telefono: 0103538154

Fax: 010354415

E-mail: leoncini@unige.it

Sezione INBB di appartenenza

Genova

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Si è recentemente manifestato un rinnovato interesse per il metabolismo della L-arginina, interesse giustificato dal fatto che l'aminoacido è substrato della NO sintasi (NOS), enzima che genera NO importante secondo messaggero dotato di molteplici attività, tra le quali un potente effetto vasodilatatore ed antiaggregante piastrinico. Nelle piastrine umane, in cui è attiva la via L-arginina/NO, si ha produzione di NO dovuta essenzialmente all'azione di una NOS calcio dipendente. Il calcio d'altra parte stimola ed amplifica l'aggregazione delle piastrine. Un aumento intracellulare di calcio attiva l'enzima che sintetizza NO e stimola alcune tappe del processo aggregativo, che paradossalmente sono inibite dall'ossido nitrico.

Risultati ottenuti

Nell'ambito di tale problematica alcune ricerche hanno cercato di chiarire l'effetto del Ca^{2+} sul trasporto della L-arginina. I risultati ottenuti hanno evidenziato che un aumento del Ca^{2+} intracellulare, indotto da agonisti capaci di mobilizzare Ca^{2+} quali trombina o A23187, inibisce il trasporto della L-arginina nelle piastrine umane. Inoltre nelle piastrine di pazienti diabetici di tipo 2, nelle quali sono presenti aumentati livelli intracellulari di Ca^{2+} , è stato dimostrato un ridotto trasporto della L-arginina che risulta ulteriormente diminuito in presenza di trombina e A23187.

Nel tentativo di selezionare composti capaci di modulare la via L-arginina/NO abbiamo dimostrato che il gabexato mesilato, farmaco strutturalmente simile alla arginina, utilizzato nel trattamento delle pancreatiti, è capace di regolare la produzione di NO, inibendo il trasporto della L-arginina e riducendo quindi la disponibilità del substrato per l'enzima cNOS.

Nell'ambito di studi mirati a selezionare nuovi composti dotati di attività antiaggregante sono stati selezionati alcuni derivati pirido-pirimidinici con ottima attività antiplastrinica. Relativamente al meccanismo di azione di tali composti si ipotizza un significativo effetto a livello della via L-arginina/NO.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

1. Leoncini, G. and Signorello M.G. N-Ethylmaleimide-stimulated arachidonic acid release in human platelets. *Biochem. Pharmacol.* 57, 785-791, 1999.
2. Leoncini, G. and Signorello M.G. N-Ethylmaleimide inhibition of thrombin-induced platelet aggregation. *Biochem. Pharmacol.* 58,1293-1299, 1999.
3. Giovine, M., Signorello, M.G., Pozzolini, M. and Leoncini, G. Regulation of L-arginine uptake by Ca^{2+} in human platelets. *FEBS Lett.* 461, 43-46, 1999.
4. Roma, G., Cinone, N., Di Braccio, M., Grossi, G., Leoncini, G., Signorello, M. G. and Carotti, A. Synthesis, antiplatelet activity and comparative molecular fields analysis of substituted 2-amino-4H-pyrido[1,2-a]pyrimidin-4-ones, their congeners and isosteric analogues. *Bioorg. Med. Chem.* 8(4), 751-768, 2000.

5. Signorello, M.G., Giovine, M., Pascale, R., Cataldi, L., Bordone, C., Benatti, U. and Leoncini, G. Impaired L-arginine uptake in platelets from type 2 diabetic patients. *Biotechnol. Appl. Bioc.* 34, 19-23, 2001.
6. Signorello, M.G., Pascale, R. and Leoncini, G. Effect of homocysteine on arachidonic acid release in human platelets. *Eur. J. Clin. Invest.* 32, 279-284, 2001.
7. Leoncini, G., Pascale, R. and Signorello M.G. Modulation of L-arginine uptake and nitric oxide production by gabexate mesylate. *Biochem. Pharmacol.* 2002.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Gli obbiettivi che l'unità intende perseguire nei prossimi tre anni riguardano essenzialmente i seguenti capitoli:

1. La caratterizzazione dei sistemi di trasporto della L-arginina interessati all'influsso e all'efflusso dell'aminoacido nelle piastrine umane.
2. La definizione del ruolo del Ca^{2+} sulla via L-arginina/NO ed i meccanismi molecolari interessati.
3. La selezione di composti capaci di modulare il trasporto della L-arginina e la formazione di NO per chiarirne il meccanismo di azione.
4. La interazione regolativa tra cellule endoteliali e piastrine nel tentativo di chiarire se e come fattori rilasciati dall'endotelio possano influenzare l'efficienza della via L-arginina/NO delle piastrine umane e se fattori rilasciati durante l'aggregazione siano in grado di modulare il trasporto di arginina e/o la produzione di NO nelle cellule endoteliali.

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Ultracentrifughe, contatori a scintillazione liquida e solida, spettrofotometri, spettrofluorimetri, apparecchiature per elettroforesi verticale e generatori

Parole Chiave

L-Arginina – Trasporto – NO – cNOS – Calcio - Piastrine umane- Endotelio

UNITA' DI RICERCA INBB
Laboratorio Nazionale Sezione di Tecnologie Biomediche e Terapia Genica INBB (Osilo (SS))

Responsabile Scientifico

Paolo MADEDDU

Linea di Ricerca

MEDICINA CARDIOVASCOLARE, ANGIOGENESI, TERAPIA GENICA

titolo

Medicina Cardiovascolare e Terapia Genica in Angiogenesi

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Paolo MADEDDU

PA

madeddu@yahoo.com

Costanza EMANUELI

Ricercatrice INBB

emanueli@yahoo.com

Maria Bonaria SALIS

DR, Ricercatrice INBB

bonarias@hotmail.com

Anna Franca MILIA

DR, Ricercatrice INBB

annafm@hotmail.com

Non Aderenti INBB

Tiziana STACCA

Specializzanda

tstacca@hotmail.com

Alessandra PINNA

Tecnico laureato

minipinna@hotmail.com

Gallia GRAIANI

DR

Elisa DESORTES

Borsista

Frank SPILLMANN

DR EU Marie Curie Fellow

Sede Unità di Ricerca

Laboratorio Nazionale INBB,

Indirizzo Viale Sant'Antonio, SNC - 07033 Osilo (Sassari)

Telefono 0793441006

Fax 0793441006

E-mail madeddu@yahoo.com

Sezione INBB di appartenenza

Genova

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Terapia Genica dell'Ischemia Periferica e Miocardica e delle Ferite Cutanee Diabetiche.

Complicanze Vascolari di Diabete ed Ipertensione.

Ruolo Fisiopatologico del Sistema Callicreina-Chinine e Implicazioni Terapeutiche: Studi Pre-clinici e Clinici.

Terapia Cellulare (Cellule Staminali) delle Malattie Ischemiche.

Identificazione e Caratterizzazione di Nuove Molecole Angiogeniche.

Biologia delle Cellule Endoteliali.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002 (max 12 pubblicazioni)

1. Milia AF, Salis MB, Stacca T, Pinna A, Madeddu P, Trevisani M, Geppetti P, Emanuelli C. Protease-activated receptor-2 stimulates angiogenesis and accelerates hemodynamic recovery in a mouse model of hindlimb ischemia. *Circ Res.* 2002; 91(4):346-3352.
2. Emanuelli C, Salis MB, Pinna A, Stacca T, Milia AF, Spano A, Chao J, Chao L, Sciola L, Madeddu P. Prevention of diabetes-induced microangiopathy by human tissue kallikrein gene transfer. *Circulation.* 2002;106(8):993-999.
3. Rizzi A, Salis MB, Ciccocioppo R, Marzola G, Bigoni R, Guerrini R, Massi M, Madeddu P, Salvadori S, Regoli D, Calo' G. Pharmacological characterisation of [(pX)Phe(4)]nociceptin(1-13)NH(2) analogues2. In vivo studies. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2002 365(6):450-456.
4. Emanuelli C, Salis MB, Stacca T, Pinna A, Gaspa L, Spano A, Madeddu P. Ramipril improves hemodynamic recovery but not microvascular response to ischemia in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens.* 2002;15: 410-415.

5. Emanuelli C, Salis MB, Stacca T, Pintus G, Kirchmair R, Isner JM, Pinna A, Gaspa L, Regoli D, Cayla C, Pesquero JB, Bader M, Madeddu P. Targeting kinin B(1) receptor for therapeutic neovascularization. *Circulation*. 2002;105(3):360-366.
6. Emanuelli C, Salis MB, Stacca T, Pinna A, Gaspa L, Madeddu P. Angiotensin AT(1) receptor signalling modulates reparative angiogenesis induced by limb ischaemia. *Br J Pharmacol*. 2002;135(1):87-92.
7. Porcu P, Emanuelli C, Kapatsoris M, Chao J, Chao L, Madeddu P. Reversal of angiogenic growth factor upregulation by revascularization of lower limb ischemia. *Circulation*. 2002;105(1):67-72.
8. Emanuelli C, Madeddu P. Targeting kinin receptors for the treatment of tissue ischaemia. *Trends Pharmacol Sci*. 2001;22(9):478-484. Review.
9. Emanuelli C, Madeddu P. Angiogenesis gene therapy to rescue ischaemic tissues: achievements and future directions. *Br J Pharmacol*. 2001;133(7):951-958. Review.
10. Emanuelli C, Salis MB, Stacca T, Gaspa L, Chao J, Chao L, Piana A, Madeddu P. Rescue of impaired angiogenesis in spontaneously hypertensive rats by intramuscular human tissue kallikrein gene transfer. *Hypertension*. 2001;38(1):136-141.
11. Madeddu P, Vio CP, Straino S, Salis MB, Milia AF, Emanuelli C. Renal phenotype of low kallikrein rats. *Kidney Int*. 2001;59(6):2233-2242.
12. Madeddu P, Emanuelli C, Salis MB, Milia AF, Stacca T, Carta L, Pinna A, Deiana M, Gaspa L. Role of calcitonin gene-related peptide and kinins in post-ischemic intestinal reperfusion. *Peptides*. 2001;22(6):915-922.
13. Emanuelli C, Minasi A, Zacheo A, Chao J, Chao L, Salis MB, Straino S, Tozzi MG, Smith R, Gaspa L, Bianchini G, Stillo F, Capogrossi MC, Madeddu P. Local delivery of human tissue kallikrein gene accelerates spontaneous angiogenesis in mouse model of hindlimb ischemia. *Circulation*. 2001;103(1):125-32.
14. Emanuelli C, Zacheo A, Minasi A, Chao J, Chao L, Salis MB, Stacca T, Straino S, Capogrossi MC, Madeddu P. Adenovirus-mediated human tissue kallikrein gene delivery induces angiogenesis in normoperfused skeletal muscle. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20(11):2379-85.
15. Salis MB, Emanuelli C, Milia AF, Guerrini R, Madeddu P. Studies of the cardiovascular effects of nociceptin and related peptides. *Peptides*. 2000;21(7):985-93. Review.
16. Emanuelli C, Salis MB, Figueroa C, Chao J, Chao L, Gaspa L, Capogrossi MC, Madeddu P. Participation of kinins in the captopril-induced inhibition of intimal hyperplasia caused by interruption of carotid blood flow in the mouse. *Br J Pharmacol*. 2000;130(5):1076-1082.
17. Emanuelli C, Salis MB, Chao J, Chao L, Agata J, Lin KF, Munao A, Straino S, Minasi A, Capogrossi MC, Madeddu P. Adenovirus-mediated human tissue kallikrein gene delivery inhibits neointima formation induced by interruption of blood flow in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20(6):1459-1466.
18. El-Dahr SS, Dipp S, Meleg-Smith S, Pinna-Parpaglia P, Madeddu P. Fetal ontogeny and role of metanephric bradykinin B2 receptors. *Pediatr Nephrol*. 2000;14(4):288-296.
19. Gowdak LH, Poliakova L, Wang X, Kovesdi I, Fishbein KW, Zacheo A, Palumbo R, Straino S, Emanuelli C, Marrocco-Trischitta M, Lakatta EG, Anversa P, Spencer RG, Talan M, Capogrossi MC. Adenovirus-mediated VEGF(121) gene transfer stimulates angiogenesis in normoperfused skeletal muscle and preserves tissue perfusion after induction of ischemia. *Circulation*. 2000;102(5):565-571.
20. Madeddu P, Emanuelli C, Maestri R, Salis MB, Minasi A, Capogrossi MC, Olivetti G. Angiotensin II type 1 receptor blockade prevents cardiac remodeling in bradykinin B(2) receptor knockout mice. *Hypertension*. 2000;35(1 Pt 2):391-396.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Ricerche di angiogenesi terapeutica a condizioni caratterizzate da disfunzione endoteliale ed alta probabilità di incidenti vascolari acuti e basso potenziale angiogenico spontaneo (Diabete, Ipertensione, Aterosclerosi).

Sviluppo di nuovi sistemi di trasferimento genico caratterizzati da alta efficienza di infezione e trasduzione (lentivirus).

Infezione di cellule del midollo osseo per il potenziamento della angiogenesi terapeutica.

Angiogenesi terapeutica nell'ischemia miocardica.

Messa a punto di strategie innovative per contrastare l'angiogenesi neoplastica. Studio su popolazione di markers di angiogenesi.

Collaborazioni internazionali in atto

Julie Chao e Lee Chao, Medical University of South Carolina, Charleston, SC, USA

Roy Smith, Boston University, Boston, MA, USA

Michael Bader, Max Delbrück Center for Molecular Medicine, Berlino, Germania

Domenico Regoli, Pierangelo Geppetti e Girolamo Calò, Università di Ferrara

Luigi Aloe, CNR Roma

Marco Matucci Cerinic, Università di Firenze

Gianluigi Condorelli, Università Statale di Roma

Massimo Volpe e Speranzina Rubattu, Neuromed, Pozzilli

Cesare Peschle, ISS, Roma

Federico Bussolino, Università di Torino

Francesco Turrini, Porto Conte Ricerche, Alghero

Roberto Pola, Università Gemelli, Roma

Marina Ziche e Lucia Morbidelli, Università di Siena

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Laser Doppler Lisa; Analisi isto-morfometrica assistita da software; Attrezzatura per microchirurgia sperimentale;

Armadi Stabulari; Biologia Molecolare; Culture cellulari

Parole Chiave

Angiogenesi; Terapia Genica; Ischemia; Diabete; Sistema Callicreina-Chinine

UNITA' DI RICERCA INBB
Ancona

Responsabile Scientifico

Giulio MAGNI

Linea di Ricerca

ENZIMOLOGIA DELLA SINTESI E DELLA INTERCONVERSIONE DEI NUCLEOTIDI PIRIMIDINICI E PIRIDINICI

PRIMIDINA 5'NUCLEOTIDASI E NMN ADENILTRASFERASI, ENZIMI CHIAVE DELLE VIE BIOSINTETICHE DEI NUCLEOTIDI PIRIMIDINICI E PIRIDINICI

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Giulio MAGNI	PO	e-mail magnig@unian.it
Adolfo AMICI	RU	e-mail amicia@unian.it
Monica EMANUELLI	PA	e-mail m.emanuelli@unian.it
Nadia RAFFAELLI	PA	e-mail n.raffaelli@unian.it

Non Aderenti INBB

Francesca MAZZOLA	DR	e-mail fmazzola@vizzavi.it
Leonardo SORCI	DR	e-mail leosorci@libero.it
Francesca PIERELLA	DR*	e-mail frapiri@libero.it
Valeria NAPONELLI	DR	e-mail vlina@libero.it

Sede Unità di Ricerca

Istituto di Biochimica – Università degli Studi di Ancona

Indirizzo Via Ranieri 67--- 60131 Ancona

Telefono ...0712204677

Fax ...0712802117.

E-mail magnig@unian.it

Sezione INBB di appartenenza

Roma TorVergata

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Il nostro gruppo di ricerca è da anni coinvolto nella purificazione e nella caratterizzazione cinetica, molecolare e strutturale di enzimi chiave coinvolti nella regolazione del metabolismo dei nucleotidi pirimidinici e piridinici. In particolare per quanto riguarda il metabolismo dei nucleotidi pirimidinici sono in via di caratterizzazione due nucleotidasi da eritrocita umano, pirimidino-specifiche, chiamate PN-I e PN-II. Questo studio è teso alla individuazione del ruolo di tali enzimi sia nel modulare la citotossicità di analoghi di nucleotidi, usati in chemioterapia, sia nei processi di maturazione della cellula eritroide. Inoltre identico approccio è seguito nello studio di proteine enzimatiche con attività NMN adeniltrasferasica, che svolgono un ruolo chiave nella biosintesi del NAD₊, in una varietà di organismi che vanno dai procarioti ai microorganismi eucarioti (lieviti), all'uomo. Attualmente tali enzimi sono particolarmente studiati perché considerati interessanti bersagli sia nella prevenzione della diffusione delle malattie infettive sia nella lotta contro il cancro.

Risultati ottenuti

La deficienza della pirimidina 5'-nucleotidasi (PN-I) è una condizione autosomica recessiva che causa una anemia emolitica caratterizzata da una marcata punteggiatura basofila e dall'accumulo di alte concentrazioni intraeritrocitarie di nucleotidi pirimidinici. Il cDNA della PN-I è stato identificato, clonato, espresso e la proteina ricombinante, purificata e caratterizzata. Uno studio approfondito di tale proteina ha portato a stabilire la sua identità con una proteina, da altri indicata come p36, che viene espressa in cellule tumorali trattate con interferone alfa. Inoltre la sequenza del cDNA è stata usata per studiare, in collaborazione con altri laboratori stranieri, 3 famiglie con deficienza di PN-I. Questo approccio ha portato all'identificazione del gene della PN-I. Esso è stato trovato sul cromosoma 7, consiste di 10 esoni con splicing alternativo dell'esone 2, e produce proteine con 297 e 286 amminoacidi. E' stato possibile identificare per la prima volta 3 mutazioni in pazienti con parentele differenti.

L'enzima NMN adeniltrasferasi umano è stato ottenuto in forma ricombinante e studiato da un punto di vista cinetico e molecolare. Non ci sono differenze da questo punto di vista tra la proteina ricombinante e quella non ricombinante. Esperimenti di espressione, condotti tramite tecniche di Northern blotting hanno messo in evidenza la presenza di due trascritti di mRNA di 3,1 e 4,1 chilobasi. La proteina appare maggiormente espressa nei tessuti normali

che nelle cellule cancerose. Il gene per la NMN adeniltrasferasi è stato “mappato” nella regione p32-35 del cromosoma 1. In collaborazione con un gruppo di cristallografi la struttura dell'enzima umano e di quello da *Methanococcus jannaschii*, precedentemente ottenuto dal nostro gruppo sotto forma di proteina ricombinante, sono state risolte tramite cristallografia a raggi x ad una risoluzione di 2,5 Å, rivelando una struttura esamerica composta da subunità con topologia alfa/beta.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

1) G. MAGNI, A. AMICI, M. EMANUELLI, N. RAFFAELLI, S. RUGGIERI

Enzymology of NAD synthesis

Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology, Part A-73, p. 135-182, D.L. Purich (ed.), John Wiley and Sons, New York, 1999

2) N. RAFFAELLI, T. LORENZI, A. AMICI, M. EMANUELLI, S. RUGGIERI, G. MAGNI

Synechocystis sp. slr0787 protein is a novel bifunctional enzyme endowed with both nicotinamide mononucleotide adenyltransferase and «Nudix» hydrolase activities

FEBS Letters 444, 222-226, 1999

3) M. EMANUELLI, F. CARNEVALI, M. LORENZI, N. RAFFAELLI, A. AMICI, S. RUGGIERI, G. MAGNI

Identification and characterization of YLR328W, the *Saccharomyces cerevisiae* structural gene coding for NMN adenyltransferase. Expression and characterization of the recombinant enzyme.

FEBS Letters 455, 13-17, 1999

4) N. RAFFAELLI, T. LORENZI, P.L. MARIANI, M. EMANUELLI, A. AMICI, S. RUGGIERI, G. MAGNI

Escherichia coli NadR regulator is endowed with nicotinamide mononucleotide adenyltransferase activity

J. Bacteriol. 181, 5509-5511, 1999

5) A. AMICI, M. EMANUELLI, N. RAFFAELLI, S. RUGGIERI, F. SACCUCCI, G. MAGNI

Human erythrocyte pyrimidine 5'-nucleotidase, PN-I, is identical to p36, a protein associated to lupus inclusions formation in response to alpha-interferon

Blood 96 (4), 1596-1598, 2000

6) I. D'ANGELO, N. RAFFAELLI, V. DABUSTI, T. LORENZI, G. MAGNI, M. RIZZI

Structure of nicotinamide mononucleotide adenyltransferase: a key enzyme in NAD biosynthesis

Structure with Folding & Design 8, 1005-1014, 2000

7) N. RAFFAELLI, M. EMANUELLI, A. AMICI, S. RUGGIERI, T. LORENZI, G. MAGNI

Nicotinamide mononucleotide adenyltransferase from *Sulfolobus solfataricus*

Methods in Enzymology, 331, 281-292, 2001

7) N. RAFFAELLI, F.M. PISANI, T. LORENZI, M. EMANUELLI, A. AMICI, S. RUGGIERI, G. MAGNI

Nicotinamide mononucleotide adenyltransferase from *Methanococcus jannaschii*

Methods in Enzymology, 331, 292-298, 2001

8) M. EMANUELLI, F. CARNEVALI, F. SACCUCCI, F. PIERELLA, A. AMICI, N. RAFFAELLI, G. MAGNI

Human NMN adenyltransferase: molecular cloning, chromosomal localization, tissue mRNA levels, bacterial expression and enzymatic properties

J. Biol. Chem., 276 (1) 406-412, 2001

9) A.M. MARINAKI, E. ESCUREDO, J.A. DULEY, H.A. SIMMONDS, A. AMICI, V. NAPONELLI, G. MAGNI, I. BEN-BASSAT, E.H. HARLEY, S. LAY THEIN and D. C. REES

Genetic basis of hemolytic anemia by pyrimidine 5' nucleotidase deficiency

Blood, 97 (11): 3327-3332, 2001

10) T.G. MACK, M. REINER, B. BEIROWSKI, W. MI, M. EMANUELLI, D. WAGNER, D. THOMSON, T. GILLINGWATER, F. COURT, L. CONFORTI, F.S. FERNANDO, A. TARLTON, C. ANDRESSEN, K. ADDICKS, G. MAGNI, R.R. RIBCHESTER, V.H. PERRY, M.P. COLEMAN.

Wallerian degeneration of injured axons and synapses is delayed by a Ube4b/Nmnat chimeric gene.

Nat. Neurosci. 4(12):1199-206.2001

11) A. AMICI, G. MAGNI

Human erythrocyte pyrimidine 5'-nucleotidase, PN-I.

Arch. Biochem. Biophys. 397(2): 184-190, 2002

12) S. GARAVAGLIA, I. D'ANGELO, M. EMANUELLI, F. CARNEVALI, F. PIERELLA, G. MAGNI, M. RIZZI
Structure of human NMN adenylyltransferase: a key nuclear enzyme for NAD homeostasis
J. Biol. Chem., 277, 8524-8530, 2002.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Lo studio continuerà sulla scia già tracciata da molti anni nel nostro laboratorio. Verranno ulteriormente studiate le NMN adeniltrasferasi batteriche al fine di individuarne la struttura tridimensionale, che confrontata con quella da noi risolta per l'enzima umano potrà mettere in risalto quelle differenze che permetteranno di individuare quei determinanti strutturali per la progettazione di inibitori altamente efficaci nei riguardi dell'enzima batterico e grandemente selettivi nei riguardi di quello umano. Le nucleotidasi da eritrocita umano, ambedue ottenute in forma ricombinante, sono state sottoposte ad esperimenti di cristallizzazione al fine di poterne risolvere la struttura tridimensionale sia dell'enzima sia del complesso enzima-substrato. I dati ottenuti forniranno indicazioni indispensabili alla comprensione della differente specificità di substrato dei due enzimi. Mutazioni selettive confermeranno l'essenzialità di specifici residui amminoacidici presenti sia nel sito attivo sia indispensabili per una conformazione della proteina idonea ad una sua ottimale funzione catalitica.

Collaborazioni internazionali in atto

Purich DL., Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Florida College of Medicine, Gainesville, Florida, USA

Duley JA., Department of Chemical Pathology, Guy's Hospital, London, UK

Sutton B., King's College, Guy's Campus, London, UK

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Sequenziatore di proteine, spettrometro di massa LC/MS, HPLC, analizzatore di amminoacidi, PCR, spettrofotometri,

Parole Chiave

Nucleotidi, pirimidine, piridine, analoghi, enzimi, struttura, proteine

UNITA' DI RICERCA INBB
Genova

Responsabile Scientifico
Sergio MARTINOIA

Linea di Ricerca
NEUROINGEGNERIA E BIO-NANOTECNOLOGIE

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Sergio MARTINOIA

PA

giaser@dibe.unige.it

Roberto RAITERI

RU

rr@dibe.unige.it

Non Aderenti INBB

Maria Teresa TEDESCO

BC

brunella@bio_nt.dibe.unige.it

Laura PALEARI

BC

paleari@bio_nt.dibe.unige.it

Michela CHIAPPALONE

DR

chiappalone@dibe.unige.it

Alessandro VATO

DR

vato@dibe.unige.it

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Ingegneria Biofisica ed Elettronica, Università di Genova

Indirizzo: via Opera pia 11°, 16145 Genova

Telefono 010 353 2251

Fax 010 353 2133

E-mail giaser@dibe.unige.it

Sezione INBB di appartenenza

Genova

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Messa a punto di tecniche elettrofisiologiche non invasive e multisito, basate sull'accoppiamento funzionale di reti di neuroni a microtrasduttori planari, per lo sviluppo di:

- Sistemi neuro-elettronici;
- modelli di neurocomputazione

Sviluppo di sensori micromeccanici e studio dello stress superficiale indotto da adsorbimento di biomolecole su superfici solide.

Sviluppo di un immunosensore per RNA messaggero.

Studio di proprietà meccaniche di tessuti biologici su scala sub-cellulare.

Studio interazioni specifiche e legami di affinità tra molecole immobilizzate su superfici solide

Risultati ottenuti

E' stato messo a punto un set-up sperimentale multicanale (16-60 canali) per la registrazione/stimolazione dell'attività elettrica di reti di neuroni accoppiati a microtrasduttori.

Si è studiato il comportamento elettrofisiologico di reti di neuroni ottenuti dal midollo spinale di embrioni di pollo ed è stato analizzata l'attività elettrica in funzione degli stimoli chimici (farmacologici) ed elettrici.

È stato realizzato un sensore basato sulla deflessione di microtravi in silicio. Un sistema ottico è in grado di misurare la deflessione di due microtravi in parallelo con una risoluzione sub-nanometrica. Funzionalizzando opportunamente la superficie delle due microtravi è stato possibile seguire fenomeni di adsorbimento specifico come interazioni antigene-anticorpo o processi di ibridizzazione tra sonde oligonucleotidiche immobilizzate sulla superficie delle microtravi e target complementari presenti in soluzione.

È stata anche messa a punto una stazione di lavoro per effettuare misure su cellule e tessuti biologici *in vitro* combinando la microscopia a forza atomica con la microscopia a fluorescenza.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

- S. Martinoia, N. Rosso, M. Grattarola, L. Lorenzelli, B. Margesin, M. Zen. "Development of ISFET array-based microsystems for bioelectrochemical measurements of cell populations", *Biosensors & Bioelectronics*, 16, pp. 1043-1050 (2001).
- R. Raiteri, M. Grattarola, H.-J. Butt, P. Skládal "Micromechanical cantilever-based biosensors" *Sensors and Actuators B* 79, 115-126, 2001

- S. Ecke, R. Raiteri, E. Bonaccorso, C. Reiner, H.-J. Deiseroth, H.-J. Butt "Measuring normal and friction forces acting on individual fine particles" Review of Scientific Instruments 72, 113
- R. Raiteri, H.-J. Butt, M. Grattarola, "Changes in Surface Stress Measured with an Atomic Force Microscope", Electrochimica Acta, 46, 157-163, 2000.
- S. Martinoia, G. Massobrio: "A behavioral macromodel of the ISFET in SPICE", Sensors and Actuators, B, (in press), Elsevier Science, Losanna, Switzerland, 2000.
- M. Giugliano, M. Bove, M. Grattarola: "Insulin release at the molecular level: metabolic- electrophysiological modelling of the pancreatic beta-cells", IEEE Trans. Biomed. Eng., vol. 47, no. 5, 2000.
- S. Martinoia, L. Lorenzelli, G. Massobrio, B. Margesin, A. Lui: "A CAD system for developing chemical sensor-based microsystems with an ISFET-CMOS compatible technology", Sensor and Materials, 11-5, 279-295, MYU Tokyo, Japan, (1999).
- M. Bove, M. Giugliano, M. Grattarola, S. Martinoia, "Reti bioartificiali di neuroni", Le Scienze 375, italian edition of Scientific American pp. 64-70, November (1999).
- H. Jahnsen, B.W. Kristensen, P. Thiebaud, J. Noraberg, B. Jakobsen, M. Bove, S. Martinoia, M. Koudelka-Hep, M. Grattarola, and J. Zimmer: "Coupling organotypic brain slice cultures to silicon-based arrays of electrodes", Methods: a companion to methods in Enzymology, 18, Academic Press (1999).
- J.P. Thiebaud, C. Beuret, M. Koudelka-Hep, M. Bove, S. Martinoia, M. Grattarola, H. Jahnsen, R. Rebaudo, M. Balestrino, J. Zimmer, Y. Dupont: "An array of Pt-tip microelectrodes for extracellular monitoring of activity of brain slices", Biosensors and Bioelectronics, 14, pp. 61-65 (1999).
- S. Martinoia, M. Bove, M. Tedesco, B. Margesin, M. Grattarola: "A simple microfluidic system for patterning populations of neurons on silicon micromachined substrates", Journal of Neuroscience Methods, Vol. 87, pp. 35-44, (1999).
- M. Giugliano, M. Bove, M. Grattarola: "Fast calculation of short-term depressing synaptic conductances", Neural Computation, vol. 11, 1413-1426, (1999).

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Per la neuroingegneria la ricerca prevista riguarderà la messa a punto di un nuovo sistema sperimentale basato su reti di neuroni accoppiati a microtrasduttori ed interfacciati bi-direzionalmente ad un corpo artificiale (robot). La ricerca ha come scopo quello di evidenziare le proprietà plastiche della rete di neuroni studiando le modalità di apprendimento della rete in funzione di comportamenti orientativi del corpo artificiale.

Per le bionanotecnologie la ricerca prevista si focalizzerà sullo studio delle proprietà chimico-fisiche di biomateriali, in particolare tessuti biologici, e biomolecole, in particolare, recettori di membrana. Le tecniche usate saranno basate su microscopia a forza atomica e a fluorescenza. In parallelo continuerà lo sviluppo di biosensori e microsistemi basati sul silicio per applicazioni diagnostiche, in particolare lo sviluppo di un sistema per la determinazione quantitativa di RNA messaggero direttamente da lisato cellulare.

Collaborazioni internazionali in atto

- Institute of Physiology, Biomedical School, North Western Univ., Chicago (USA). Elettrofisiologia e bio-robotica
- Molecular Imaging Corp., Phoenix, Arizona. Sviluppo di nuove applicazioni della microscopia a forza atomica nell'ambito della biologia cellulare e molecolare.
- Biozentrum dell'Università di Basilea, Svizzera. Studio di proprietà nano-meccaniche di tessuti biologici

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Set-up multicanale per elettrofisiologia non convenzionale
 Sistema di caratterizzazione per matrici di microtrasduttori
 Microscopia a forza atomica ed effetto tunnel
 Microscopia ottica DIC ed in fluorescenza
 Dispositivo per la deposizione di film sottili con la tecnica di Langmuir-Blodgett
 Biosensori basati su microcantilevers

Parole Chiave

Neuroingegneria, Reti di neuroni, Matrici di microtrasduttori per elettrofisiologia, Microscopia a forza atomica, biosensori, nanotecnologie.

UNITA' DI RICERCA INBB
Verona

Responsabile Scientifico

Carlo Alberto MARZI

Linea di Ricerca

BASI NEUROFISIOLOGICHE DELL'ATTENZIONE VISIVA NELL'UOMO

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

C.A. MARZI	PO	Carloalberto.marzi@univr.it
------------	----	-----------------------------

Non Aderenti INBB

Massimo GIRELLI	BC	Massimo.girelli@univr.it
Elena NATALE	BC	Elena.natale@univr.it
Cristiana CAVINA-PRATESI	DR	Cristiana.cavinapratesi@univr.it
Enea PAVONE	DR	Enea.pavone@univr.it
Alessandra MINELLI	DR	Alessandra.minelli@univr.it
Sami SCHIFF	DR	Sami.schiff@univr.it
Tiziana METITIERI	DR	Tiziana.metitieri@univr.it
Daniela GUZZON	DR	Daniela.guzzon@univr.it

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Scienze Neurologiche e della Visione, Sezione di Fisiologia, Università di Verona

Indirizzo Strada Le Grazie 8, Verona 37134

Telefono 045 8027143

Fax 045 580881

E-mail carloalberto.marzi@univr.it

Sezione INBB di appartenenza

Udine

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Sono quelli di studiare i correlati neurofisiologici dell'attenzione visiva spaziale in soggetti umani normali o con lesioni selettive cerebrali.

Risultati ottenuti

Come documentato dalle pubblicazioni specificate sotto negli ultimi anni abbiamo cercato di chiarire le diverse basi neurali di due tipi di attenzione visiva spaziale, quella esogena e quella endogena. Siamo riusciti a dimostrare che pazienti con lesioni temporo-parieto-frontali destre che mostrano la sindrome del "neglect" dello spazio controlesionale hanno un disturbo specifico dell'attenzione esogena. Inoltre abbiamo documentato in pazienti con "estinzione unilaterale" che l'attenzione spaziale precoce e' cruciale per la percezione conscia degli stimoli visivi

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

Marzi, C.A., Perani, D., Tassinari, G., Colleluori, A., Maravita, A., Miniussi, C., Paulesu, E., Scifo, P., Fazio, F. Pathways of interhemispheric transfer in normals and in a split-brain subject: A PET study. Exp. Brain Res., 126, 451-458, 1999.

Tassinari, G., Marzi, C.A., Lee, B.B., Di Lollo, V., Campara, D. A possible selective impairment of magnocellular function in compression of the anterior visual pathways. Exp. Brain Res., 127, 391-401, 1999.

Tassinari, G., Campara, D., Marzi, C.A. Parallel pathways in the visual system: Selective effects of pre-geniculate damage. In: C. Taddei-Ferretti & C. Musio (Eds.) "Neuronal bases and psychological aspects of consciousness". World Scientific, Singapore, pp. 53-67, 1999.

Fanini, A., Marzi C.A. Unwanted reflex-like saccades in visual extinction patients. Behavioral and Brain Sciences, 22, 683, 1999.

Marzi, C.A., Girelli, M., Miniussi, C., Smania, N., Maravita, A. Electrophysiological correlates of conscious vision: evidence from unilateral extinction. Journal of Cognitive Neuroscience, 12:869-877, 2000.

Mascetti, G.G., Nicoletti, R., Carfagna, C., Cilia, S.M., and Marzi, C.A. Can expectancy influence hemispheric asymmetries? Neuropsychologia 39:626-634, 2001.

Cavina-Pratesi, C., Bricolo, E., Prior, M., and Marzi C.A. Redundancy gain in the stop-signal paradigm: implications for the locus of coactivation in simple reaction time. Journal of Experimental Psychology: Human Perception and Performance, 27:932-941, 2001.

C.A. Marzi, M. Girelli, E. Natale, C. Miniussi. What exactly is extinguished in unilateral visual extinction? Neurophysiological evidence. Neuropsychologia 39, 1354 – 1366, 2001.

Cavina-Pratesi, C., E. Bonato, E. Bricolo, M. Prior, L. Posteraro and C.A. Marzi. Hyperattention in neglect patients: perceptual or pre-motor phenomenon?, Cortex 37, 703-705, 2001.

V. Florio, S. Fossella, A. Maravita, C. Miniussi, C. A. Marzi Interhemispheric transfer and laterality effects in simple visual reaction time in schizophrenics. Cognitive Neuropsychiatry 7, 97-111, 2002.

Savazzi, S. and Marzi, C.A.. Speeding up reaction time with invisible stimuli. Current Biology, 12, 403-407, 2002.

Marzi, C.A., Natale, E., Anderson, B. Mapping spatial attention with reaction time in neglect patients. In H-O Karnath, D. Milner and G. Vallar (Eds.) “The Cognitive and Neural bases of Spatial Neglect”, Oxford University Press, in press

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Il programma e' quello di estendere il nostro approccio allo studio dell'attenzione visiva con esperimenti condotti con la risonanza magnetica funzionale (fMRI) sia in soggetti normali che cerebro-lesi cercando di usare gli stessi paradigmi comportamentali usati negli studi comportamentali ed elettrofisiologici. Cio' permettera' di verificare le nostre ipotesi sulla sede dei meccanismi attenzionali esogeni ed endogeni.

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Apparecchi computerizzati per la rilevazione del tempo di reazione e della forza di risposta a stimoli visivi ed uditivi sia fissi che mobili per lo studio dei pazienti.

Attrezzatura per lo studio dei Potenziali Evocati Visivi.

Attrezzatura per la stimolazione magnetica transcranica (TMS).

Parole Chiave

Attenzione – Visione – Neuropsicologia – Neglect – Potenziali Evocati – Risonanza Magnetica Funzionale – Stimolazione Magnetica Transcranica

UNITA' DI RICERCA INBB
Sassari

Responsabile Scientifico
Bruno MASALA

Linea di Ricerca

RELAZIONE STRUTTURA/FUNZIONE DI EMOGLOBINE NORMALI E MUTATE NELL'UOMO E IN ALTRI VERTEBRATI SUPERIORI

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Bruno MASALA	PO	masala@uniss.it
--------------	----	-----------------

Non Aderenti INBB

Laura MANCA	PA	manca@uniss.it
Monica PIRASTRU	BC	fisiol@uniss.it
Silvia SPEZZIGA	DR	fisiol@uniss.it

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Scienze Fisiologiche, Biochimiche e Cellulari

Indirizzo: Università di Sassari, Via Muroni, 25 I-07100 Sassari

Telefono +39079228650

Fax +39079228650

E-mail masala@uniss.it

Sezione INBB di appartenenza

Genova

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

L'identificazione e lo studio delle mutazioni della Hb sono di notevole importanza per il biochimico poichè consentono, in quanto "varianti naturali", di assegnare ad ogni singolo aminoacido della catena polipeptidica il suo specifico ruolo strutturale e funzionale [Masala B.: Hemoglobinopathies in Sardinia. Hemoglobin **16**:331-351,1992].

Ci si propone di proseguire ed estendere l'indagine nella popolazione della Sardegna e di altre aree del Mediterraneo identificando altre varianti presenti, di caratterizzarle a livello di sequenza aminoacidica, di definirne la sostituzione nucleotidica a livello di gene strutturale ricorrendo al sequenziamento nucleotidico, di studiarne le proprietà funzionali. Ci si prefigge di estendere le medesime indagini, per una necessaria comparazione, a livello delle Hb di vertebrati superiori. Nell'ambito dei vertebrati, lo studio servirà per chiarire le ragioni evolutive e funzionali alla base del polimorfismo emoglobinico mostrato da certi vertebrati e sarà utile in indagini genetiche finalizzate a scopi anche molto diversi.

Risultati ottenuti

E' stata descritta la presenza in Sardegna di numerose varianti della Hb umana, così come se ne sono scoperte di nuove (Hb Sassari, Hb Ozieri, Hb F-Sassari, Hb F-Calabria, Hb F-Columbus, Hb Waimanalo). Grazie a tali ricerche si è compreso il ruolo fisiologico e strutturale degli amino acidi implicati nei contatti fra subunità $\alpha_1\alpha_2$ ed altri dettagli.

Nell'ambito di tali studi è già stata descritta una nuova variante della Hb della pecora (Hb I) che si è dimostrata causata dalla stessa mutazione alla base di numerose varianti umane oltre che di un terzo di tutte le malattie genetiche umane. Sono inoltre stati sequenziati il gene α -globinico del muflone di Cipro e quattro geni α -globinici nella capra.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

1. Manca L., Cherchi L., De Rosa M.C., Giardina B., Masala B.: A new, electrophoretically silent, fetal hemoglobin variant: Hb F-Calabria [$G\alpha 118(GH1)Phe \rightarrow Leu$]. *Hemoglobin*, **24**:37-44, 2000.
2. Cherchi L., Palici di Suni M., Manca L., Masala B.: Characterization by DNA Sequencing of the Hb F-Columbus-GA [$G\alpha 94(FG1)Asp \rightarrow Asn$] Observed in Sardinian Newborn. *Hemoglobin*, **24**:53-59, 2000.
3. Corda M., De Rosa M.C., Pellegrini M.G., Sanna M.T., Olianias A., Fais A., Manca L., Masala B., Zappacosta B., Ficarra S., Castagnola M., Giardina B.: Adult and fetal haemoglobin J-Sardegna [$\alpha 50(CE8)His \rightarrow Asp$]: functional and molecular modelling studies. *Biochemical Journal*, **346**:193-199, 2000.

4. Pirastru M., Palici di Suni M., Vacca M., Masala B., Manca L.: The hemoglobin polymorphism in sardinian goats: nucleotide sequence and frequency of α^A , α^D , $\alpha^{D-MALTA}$, and α^E globin genes. In: *Hemoglobin Function in Vertebrates. Molecular Adaptations in Extreme and Non-Extreme Environments* (G. Di Prisco, B. Giardina, R. Weber eds.). pp. 97-108, Springer Verlag, Berlin, 2000.
5. Serreri E., Hadjisterkotis E., Naitana S., Rando A., Manca L., Masala B.: The organization of the β -globin gene cluster and the nucleotide sequence of the β -globin gene of Cyprus Mouflon (*Ovis gmelini ophion*). In: *Hemoglobin Function in Vertebrates. Molecular Adaptations in Extreme and Non-Extreme Environments* (G. Di Prisco, B. Giardina, R. Weber eds.). pp. 109-120, Springer Verlag, Berlin, 2000.
6. Hadjisterkotis E., Masala B., and Reese D.S.: The origin and extinction of the large endemic Pleistocene mammals of Cyprus. *Biogeographia*, **21**:593-606, 2000.
7. Pistidda P., Cherchi L., Corda M., Guiso L., Pardini S., Pirastru M., Manca L., Longinotti M., and Masala B.: Hb Tigraye [$\alpha^{79(EF3)Asp \rightarrow His}$] in a Caucasian Family from Sardinia. *Hemoglobin*, **25**:341-345, 2001.
8. Pellegrini M., Corda M., Manca L., Olianias A., Sanna M.T., Fais A., De Rosa C., Bertonati C., Masala B., and Giardina B.: Functional and computer modelling studies of haemoglobin from horse. The haemoglobin system of the Sardinian wild dwarf horse. *European Journal of Biochemistry*, **268**:3313-3320, 2001.
9. Ferranti P., Facchiano A., Zappacosta F., Vincenti D., Rullo R., Masala B., and Di Luccia A.: Primary structure of α -globin chains from river buffalo (*Bubalus bubalis* L.) hemoglobins. *Journal of Protein Chemistry*, **20**:171-179, 2001.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Vedi Riassunto della attività svolta

Collaborazioni internazionali in atto

Henri Wajcman Directeur de Recherches INSERM
INSERM U468 : Génétique Moléculaire et Physiopathologie
Hôpital Henri Mondor
51, Avenue du Mal De Lattre de Tassigny
94010 Créteil Cédex FRANCE
Phone : (33) 1 49 81 35 78 - Fax : (33) 1 48 99 33 45 –

Abdullah Kutlar
Director, Sick Cell Center
Medical College of Georgia
AUGUSTA, GA30912-3128

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Sequenziatore di frammenti di acidi nucleici ABPrism
HPLC Agilent

Parole Chiave

Emoglobina; geni globinici; mutazioni; polimorfismo emoglobinico; gene conversion; adattamento molecolare; evoluzione

UNITA' DI RICERCA INBB
Sassari

Responsabile Scientifico

Francesco MELIS.

Linea di Ricerca

STUDIO SUI POSSIBILI MECCANISMI NEURONALI ALLA BASE DEI DISTURBI MOTORI DA INTOSSICAZIONE ALCOOLICA

titolo

Risultanze elettrofisiologiche in corso di atassia alcoolica: ruolo dell'output cerebellare.

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Francesco MELIS	RU	melis@ssmain.uniss.it
Marcello A. CARIA	PA	mcaria@ssmain.uniss.it
C. Ombretta BECCIU MAMELI	PO	fisiou@ssmain.uniss.it

Non Aderenti INBB

Claudio TAVERA	BC	fisiou@ssmain.uniss.it
Giancarlo SANNA	PT	fisiou@ssmain.uniss.it
Andrea MONTI	PT	fisiou@ssmain.uniss.it
Candido F. TAVERA	PT	fisiou@ssmain.uniss.it

Sede Unità di Ricerca

Università degli Studi di Sassari, Facoltà di Medicina e Chirurgia; Dipartimento di Scienze Biomediche, Sezione di Fisiologia Umana

Indirizzo Viale San Pietro 43/B

Telefono 079.228286

Fax 079.228298

E-mail fisiou@ssmain.uniss.it

Sezione INBB di appartenenza

Sassari (GE)

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi e Risultati

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

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

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

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

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

assenza di disturbi di tipo comportamentale durante il trattamento con la sostanza intossicante. Gli esperimenti effettuati consentono di suggerire che l'esplorazione del VOR potrebbe rappresentare un test efficace per la valutazione funzionale del sistema nervoso centrale esposto a bassi livelli di piombo ematico e tessutale.

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

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

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

01. Mameli O., Melis F., Caria M.A., Solinas A., Mameli S., De Riu P.L. - Epileptic discharge of cortical, subcortical and spinal neurons in penicillin induced experimental epilepsy. - Arch. Ital. Biol., 137, 29-46, 1999.
02. Mameli O., Caria M.A., Melis F., Severino C., Solinas A., Mameli P., Mameli S., Padua G., Massarelli G., Pintus A. - Pathological changes in cardio-pulmonary system during experimental epilepsy. - Pflugers Archiv Eur. J. Physiol., 437, R35 (com. 70), 1999.
03. Melis F., Caria M.A., Stanzani S., Russo A., Cataudella T., Palmieri G., Lai L., Milia M., Solinas A., Severino C., Mameli O. - The interpeduncular nucleus as a putative link of olfactory inputs to the hypoglossal nucleus. - Pflugers Archiv Eur. J., Physiol., 438, R20 (com. 70), 1999.
04. Mameli O., Melis F., Caria M.A., Solinas A., Milia M., De Riu P.L., Tocco M.G., Ibba A. - A test for early detection of heavy metal neurotoxicity. - 20th Journées Internationales Méditerranéennes (Medicine du Travail), 135, Il Cairo (Egypt) 1999.
05. Mameli O., Melis F., Caria M.A., Solinas A., Severino C., Sanna Randaccio F. - Functional evaluation of CNS activity during exposition at low lead concentrations. - 1st International Conference on "Metals and Brain", from Neurochemistry to Neurodegeneration, 138 (com. P.29), Padova 2000.
06. Melis F., Caria M.A., Solinas A., Carai A., Russo A., Stanzani S., Mameli O. - Cortical motor control of the tongue motor nucleus in the rat. - Pflugers Archiv Eur. J. Physiol., 440, R33 (com. 56), 2000.
07. Melis F., Caria M.A., Solinas A., Carai A., Cataudella T., Pellitteri R., Russo A., Stanzani S., Mameli O. - Cortical projection to the hypoglossal neurons in the rat. - FENS, "Millennium Meeting", p.237 (com. 073.05), Brighton, UK, 2000.
08. Melis F., Caria M.A., Solinas A., Severino C., Tavera C., Mameli O. - Electrophysiological features during alcoholic intoxication. - INBB, 4th Convegno Nazionale, p.56, Roma 2000.
09. Caria M.A., Melis F., Solinas A., Tavera C., Mameli O. - Frequency-dependent LTP/LTD in guinea pig Deiter's nucleus. NeuroReport, 12, 2353-2358, 2001.
10. Mameli O., Caria M.A., Melis F., Mameli P., De Riu P.L., Yahyaoui M., Ouazzani R., Lahjouji F., Ould Cheikh B. - Impairment of cardiac activity during epileptic seizures: a relation to sudden death in epilepsy? - Eur. J. Neurol., vol. 8 (suppl. n.2), 48 (com. 160), Istanbul (Turkey) 2001.
11. Mameli O., Caria M.A., Melis F., Severino C., Tavera C., Mameli P., Mameli S. - Autonomic nervous system activity and life threatening arrhythmias in experimental epilepsy. - Seizure, 4, 269-278, 2001.
12. Mameli O., Caria M.A., Melis F., Solinas A., Tavera C., Ibba A., Tocco M., Flore C., Sanna Randaccio F. - Neurotoxic effect of lead at low concentrations. - Brain Res. Bull., 55, 269-275, 2001.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

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

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

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

Recentissimi esperimenti stanno intanto estendendo all'alluminio le osservazioni precedentemente effettuate sugli effetti dei metalli pesanti a carico del sistema nervoso centrale, in particolare focalizzando l'attenzione sulle modificazioni indotte sulla attività elettrica dei circuiti neuronali del tronco dell'encefalo. Risultati preliminari sembrano correlare le osservazioni elettrofisiologiche alle concentrazioni tessutali encefaliche del metallo.

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

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

Infine, è allo studio nell'uomo la possibilità di applicazione di una nuova tecnica di elaborazione digitale, la quale, per mezzo di un apposito "software", è capace di analizzare le simmetrie posturali dell'individuo. Questa metodica, definita "sistema per immagini di Moirè", è stata recentemente praticata in pazienti scoliotici, ed ha permesso di fornire una valutazione dei differenti gradi di curvatura della colonna vertebrale. In particolare, questa ricerca vorrebbe utilizzare il "sistema di Moirè" per la quantificazione delle variazioni posturali dei muscoli del tronco in seguito alla stimolazione calorica del labirinto. I risultati ottenuti evidenziano la validità del metodo nel fornire una valutazione degli effetti indotti dal riflesso vestibolo-spinale sulla postura dei muscoli del tronco, suggerendo allo stesso tempo una più larga possibilità di impiego in ambito clinico.

Collaborazioni internazionali in atto

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

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

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

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

Parole Chiave

Etanolo, output cerebellare, modulazione elettrofisiologica, atassia alcolica, ratto

UNITA' DI RICERCA INBB
Sassari

Responsabile Scientifico

Quirico MIGHELI

Linea di Ricerca

SVILUPPO DI MARCATORI BIOMOLECOLARI PER LA CARATTERIZZAZIONE DI FUNGHI FILAMENTOSI DI INTERESSE FITOPATOLOGICO

Titolo: Diagnosi molecolare di funghi fitopatogeni e tossigeni

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Quirico MIGHELI

PA

migheli@uniss.it

Non Aderenti INBB

Virgilio BALMAS

RU

balmas@uniss.it

Barbara SCHERM

BC

b_scherm@yahoo.de

Angela MARCELLO

PT

Sede Unità di Ricerca Dipartimento di Protezione delle Piante, Università di Sassari

Telefono: ++ 39 079 229295

Fax: ++ 39 079 229316

E-mail: migheli@uniss.it

Sezione INBB di appartenenza

Genova

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi della linea di ricerca sono: 1) sviluppo di nuove metodologie di diagnosi per funghi filamentosi patogeni nei confronti di piante agrarie; 2) sviluppo di nuove metodologie per l'identificazione di funghi tossigeni. Quali modelli di studio sono stati scelti *Fusarium oxysporum* e *Aspergillus* spp.

La specie *F. oxysporum* comprende sia isolati fitopatogeni che saprofiti, che possono convivere nello stesso ambiente e risultano morfologicamente indistinguibili. Tra quelli fitopatogeni si possono riconoscere differenti livelli di specializzazione nei confronti della pianta ospite a livello specifico (*formae speciales*) o subspecifico (razze fisiologiche). Tra gli isolati saprofiti, inoltre, si possono alcuni ceppi in grado di colonizzare attivamente la rizosfera delle piante esplicando una notevole capacità antagonistica nei confronti dei *F. oxysporum* fitopatogeni. Pertanto, la distinzione tra isolati fitopatogeni, saprofiti ed antagonisti riveste una notevole importanza sotto i profili agronomico, patologico ed ecologico.

Il metabolismo secondario dei funghi filamentosi è poco conosciuto e porta alla formazione di composti che spesso, come nel caso degli antibiotici o delle micotossine, risultano benefici o dannosi per la salute umana e animale. Uno dei processi biosintetici più studiati è rappresentato da quello che porta alla formazione delle micotossine sterigmatocistina, prodotta da *Aspergillus nidulans*, e dell'aflatossina, prodotta da *A. flavus* e *A. parasiticus*. Il modello oggi più accettato del processo biosintetico dell'aflatossina, a partire dal precursore, si articola in ben 12 passaggi. Tuttavia, occorre tener presente che l'effettiva capacità di produrre tali micotossine non è direttamente correlata alla presenza dei geni responsabili della biosintesi, in quanto in molti isolati di *Aspergillus* spp. si è osservata una ridotta o nulla attività tossigenica a fronte della presenza di tutti i componenti del processo biosintetico dell'aflatossina. Risulta quindi di primaria importanza mettere a punto sistemi di identificazione rapida dei ceppi realmente tossigeni tra tutti quelli presenti come contaminanti delle derrate alimentari.

I **risultati ottenuti** dal responsabile scientifico dell'unità e dai suoi collaboratori hanno riguardato la messa a punto di sonde e primer idonei all'identificazione non equivoca di isolati di *F. oxysporum* appartenenti a razze o a *formae speciales* dotate di diversa patogenicità nei confronti della pianta ospite. Inoltre, in collaborazione con altri gruppi di ricerca è stata condotta una serie di studi volti a mettere a punto un sistema di marcatura genica mediante trasposoni in *F. oxysporum*, con lo scopo di identificare le basi molecolari della patogenicità e dell'attività antagonistica in questo fungo. Le ricerche intraprese recentemente su *Aspergillus* spp. hanno permesso di individuare alcuni geni la cui espressione appare essenziale nel processo biosintetico dell'aflatossina, consentendo quindi l'applicazione di tecniche RT-PCR e microarray per la rapida identificazione degli isolati tossigeni.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

1. MIGHELI Q., LAUGÉ R., DAVIÈRE J.M., GERLINGER C., KAPER F., LANGIN T., DABOUSSI M.J. (1999). Transposition of the autonomous *Fot1* element in the filamentous fungus *Fusarium oxysporum*. *Genetics*, 151:1005-1013.
2. CHIOCCETTI A., GHIGNONE S., MINUTO A., GULLINO M.L., GARIBALDI A., MIGHELI Q. (1999) Identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *basilici* isolated from soil, basil seed, and plants by RAPD analysis. *Plant Disease*, 83: 576-581.
3. CHIOCCETTI A., BERNARDO I., DABOUSSI M.J., GARIBALDI A., GULLINO M.L., LANGIN T., MIGHELI Q. (1999). Detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* in carnation tissue by PCR amplification of transposon insertions. *Phytopathology*, 89: 1169-1175.
4. MIGHELI Q., STEINBERG C., DAVIÈRE J.-M., OLIVAIN C., GERLINGER C., GAUTHERON N., ALABOUVETTE C., DABOUSSI M.-J. (2000). Recovery of mutants impaired in pathogenicity after transposition of *impala* in *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Phytopathology* 90: 1279-1284.
5. CHIOCCETTI A., SCIAUDONE L., DURANDO F., GARIBALDI A., MIGHELI Q. (2001) PCR detection of *Fusarium oxysporum* f.sp. *basilici* on basil. *Plant Disease* 85: 607-671.
6. ARRAS G., SCHERM B., MIGHELI Q. (2002) Improving biocontrol activity of *Pichia guilliermondii* against post-harvest decay of oranges in commercial packing-houses by reduced concentrations of fungicides. *Biocontrol Science and Technology* (accettato per la pubblicazione).
7. TROUVELOT S., OLIVAIN C., RECORBET G., MIGHELI Q., ALABOUVETTE C. (2002) Recovery of *Fusarium oxysporum* Fo47 mutants affected in their biocontrol activity after transposition of the *Fot1* element. *Phytopathology* (accettato per la pubblicazione).
8. BALMAS V., SCHERM B., RAZZU F., DI PRIMO P., MIGHELI Q. (2002) Molecular characterization of the tomato pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* by RAPD-PCR and distribution of transposable elements. *Proceedings Sixth European Conference on Fungal Genetics*, 6-9 Aprile 2002, Pisa, Italia, p. 402 (riassunto).
9. PASQUALI M., ACQUADRO A., BALMAS V., MIGHELI Q., GULLINO M.L., GARIBALDI A. (2002) Molecular characterization and development of PCR primers for a new *Fusarium oxysporum* pathogenic on *Argyranthemum frutescens* L. *Proceedings Sixth European Conference on Fungal Genetics*, 6-9 Aprile 2002, Pisa, Italia, p. 428 (riassunto).
10. SCHERM B., BALMAS V., MURGIA M. L., PALOMBA M., MIGHELI Q. (2002) Identificazione di isolati aflatossigeni di *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* mediante RT-PCR. *Atti IX Convegno Nazionale SI.Pa.V. "Innovazioni in patologia vegetale"*, 1-2 Ottobre 2002, Roma, Italia (riassunto in stampa).

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Si intende proseguire le ricerche relative alla caratterizzazione molecolare di *Fusarium* spp. con un progetto di ricerca mirante alla identificazione, mediante tecniche di heterologous transposon tagging, di geni coinvolti nel rapporto patogenetico e tossigenico di *F. culmorum*, un importante patogeno dei cereali. Tale ricerca verrà attuata in collaborazione con il gruppo di ricerca diretto dalla dottoressa M. J. Daboussi, operante presso l'Institut de Génétique et Microbiologie, l'Université Paris Sud di Orsay, Francia. Parallelamente, si intende proseguire la ricerca di sistemi di diagnosi per *Aspergillus* spp. aflatossigeni mediante tecniche di RT-PCR, HPLC-massa (in collaborazione con i Dr. Michele Palomba, Università di Sassari) e DNA chip.

Collaborazioni internazionali in atto

Dr. M.J. Daboussi, Institut de Génétique et Microbiologie, Université Paris Sud, Orsay, Francia

Dr. Michele Palomba, Dipartimento Farmaco-Chimico-Tossicologico, Università di Sassari

Prof. Matteo Lorito, Dipartimento di Arboricoltura, Botanica e Patologia Vegetale, Università degli Studi di Napoli Federico II

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

cappe a flusso laminare, microscopi completi di attrezzatura fotografica, microscopio elettronico a trasmissione, centrifughe e ultracentrifughe, sistema di amplificazione automatizzata degli acidi nucleici, spettrofotometro, celle climatizzate e serre.

Parole Chiave

Funghi fitopatogeni, patologia vegetale, micotossine, trasposon tagging, microarray, RT-PCR, *Fusarium*, *Aspergillus*.

UNITA' DI RICERCA INBB
Napoli

Responsabile Scientifico

Damiano Gustavo MITA

Linea di Ricerca

ENZIMI IMMOBILIZZATI: ASPETTI FONDAMENTALI ED APPLICATIVI

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Damiano Gustavo MITA	PO	Mita@unina2.it Mita@iigb.na.cnr.it
Marianna PORTACCIO	RU	Marianna.portaccio@unina2.it
Fabio PELUSO	Ricercatore	Peluso@marscenter.it

Non Aderenti INBB

Francesco Saverio GAETA	Dirigente di Ricerca CNR	Gaeta@marscenter.it
Nicola PAGLIUCA	I Ricercatore CNR	
Paolo CANCIGLIA	PA	Cancigli@unime.it
Anna DE MAIO	BC	
Silvana DI MARTINO	BC	
Paola DE LUCA	BC	
Daniela DURANTE	BC	
Valentina GRANO	BC	
Nadia DIANO	BC	Diano@iigb.na.cnr.it
Umberto BENCIVENGA	PT - CNR	Benciven@iigb.na.cnr.it
Sergio ROSSI	PT - CNR	Rossi@iigb.na.cnr.it

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Medicina Sperimentale – Facoltà di Medicina e Chirurgia – Seconda Università di Napoli

Indirizzo: Via S. Maria di Costantinopoli 16, 80138 – Napoli

Tel 081/2395887 – 5665822

Fax 081/2395887 – 5665822

E-mail Mita@unina2.it

Sezione INBB di appartenenza

Napoli

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Obiettivi dell'attività di ricerca svolta negli ultimi tre anni sono stati:

- 1) la costruzione di membrane catalitiche ed idrofobiche mediante la tecnica del grafting;
- 2) l'impiego di membrane catalitiche in processi biotecnologici di interesse farmaceutico, ecologico, agroalimentare e clinico;
- 3) l'impiego di membrane catalitiche per uso analitico;
- 4) la progettazione e costruzione di nuovi tipi di bioreattori non-isotermi;
- 5) la comprensione delle basi fisiche delle interazioni fra gradienti di temperatura ed attività catalitica di enzimi immobilizzati.

Risultati ottenuti

a) *Costruzione di membrane catalitiche ed idrofobiche mediante la tecnica del grafting.*

Membrane planari di Nylon e Teflon sono state trattate chimicamente o mediante radiazioni gamma allo scopo di copolimerizzarle con opportuni monomeri acrilici. Su questi supporti sono stati immobilizzati gli enzimi di interesse, in presenza o in assenza di opportuni spaziatori. Una volta immobilizzati gli enzimi, le membrane catalitiche sono state caratterizzate dal punto di vista biochimico (dipendenza dal pH, dalla temperatura e dalla concentrazione del substrato) e dal punto di vista biofisico (permeabilità idraulica e termoosmotica, dipendenza dell'incremento di attività in condizioni non-isotermie dall'entità del gradiente di temperatura).

b) *Impiego di membrane catalitiche in processi biotecnologici.*

2.a) *Settore farmaceutico.*

2.a.1) *Idrolisi di cefalexina.*

E' stata studiata in condizioni isoterme e non isoterme l'idrolisi di cefalexina da parte di penicillina G acilasi (PGA) immobilizzata. Si è osservato che il processo di idrolisi in condizioni non-isoterme aumenta di circa il 20% rispetto allo stesso processo condotto in paragonabili condizioni isoterme.

2.a.2) Sintesi di cefalexina.

Il processo di immobilizzazione enzimatica in genere porta ad una diminuzione della resa del processo catalitico rispetto alla resa dell'analogo processo condotto in fase libera. Utilizzando PGA immobilizzata su membrane operanti in un bioreattore non-isotermo si è ottenuto un incremento di attività enzimatica ed un recupero della perdita dell'efficienza del processo catalitico a causa dell'immobilizzazione.

2.b) Settore ecologico.

In questo settore i risultati ottenuti hanno riguardato l'abbattimento del contenuto di urea nelle acque reflue dell'agricoltura. Tale abbattimento è stato ottenuto mediante ureasi immobilizzata. Abbiamo dimostrato che in condizioni non-isoterme l'idrolisi dell'urea è accelerata ed è funzione dell'entità del gradiente di temperatura applicato, della concentrazione iniziale di urea, della natura dei residui aminoacidici coinvolti nel processo di immobilizzazione, e della lunghezza dello spaziatore tra supporto attivato ed enzima legato.

2.c) Settore agroalimentare.

Nel settore agroalimentare abbiamo studiato l'idrolisi del lattosio ad opera di beta-galattosidasi immobilizzata. Questi esperimenti sono stati condotti nell'ambito di un progetto finanziato da un Piano Nazionale di Ricerca su "Nuovi Prodotti a base di latte", svolto in collaborazione con la CIRIO Ricerche.

In particolare sono state costruite e caratterizzate nuove membrane catalitiche planari che in condizioni non-isoterme hanno dato incrementi medi di idrolisi di lattosio dell'ordine del 30% quando una differenza di 1°C era applicata attraverso lo spessore della membrana stessa.

2.d) Settore clinico.

Durante la circolazione extracorporea, ad esempio durante l'emodialisi e/o le operazioni di bypass cardiopolmonare, vengono rilasciate delle proteasi in seguito alla degranulazione dei granulociti. Le proteasi in circolo producono danni infiammatori e/o gravi disfunzioni renali e/o polmonari. Sfruttando le interazioni proteasi/antiproteasi abbiamo immobilizzato su membrane planari α_1 -antitripsina che, legando elastasi e/o catepsina, hanno ridotto la concentrazione di queste proteasi nella soluzione in circolo, ponendo le basi per la riduzione del danno proteolitico da esse indotto.

c) Impiego di membrane catalitiche per uso analitico.

E' stato costruito un biosensore per la determinazione del glucosio in differenti range di concentrazione. I differenti range lineari sono stati ottenuti usando membrane di Nylon con pori di tre differenti diametri e sulle quali erano stati copolimerizzati due differenti monomeri, glicidil metacrilato e butil metacrilato.

d) Progettazione e costruzione di nuovi tipi di bioreattori non-isotermi.

E' stato costruito un bioreattore a fibre cave, idrofobiche e catalitiche. Anche questo bioreattore, sperimentato con beta-galattosidasi immobilizzata, ha esibito aumenti di attività catalitica quando operante in condizioni non-isoterme. Sono state elaborate equazioni di bilancio di energia che hanno permesso di ottenere, mediante analisi computazionale, i profili di temperatura radiali ed assiali nel volume del bioreattore ed attraverso la parete della fibra cava.

5) Comprensione delle basi fisiche delle interazioni fra gradienti di temperatura ed attività catalitica di enzimi immobilizzati.

Una dettagliata analisi dei flussi di substrato attraverso la membrana catalitica, in presenza o in assenza di gradienti di temperatura, ha permesso di calcolare i profili di concentrazione di substrato nella membrana e di collegare questi profili con gli incrementi di attività catalitica in condizioni non-isoterme e con il processo di termodialisi. E' stata inoltre dimostrata la rilevanza della idrofobicità della membrana catalitica per il conseguimento di incrementi di resa dei processi enzimatici condotti in condizioni non-isoterme.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

- 1) Santucci M., Portaccio M., Mohy Eldyn M.S., Pagliuca N., Rossi S., Bencivenga U., Gaeta F.S. and Mita D.G.
Glucose determination by means of a new reactor/sensor system operating under non-isothermal conditions
Enzyme and Microbial Technology, 26, 593-604 (2000)
- 2) El-Masry M.M., De Maio A., Di Martino S., Bencivenga U., Rossi S., Manzo B.A., Pagliuca N., Canciglia P., Portaccio, M., Gaeta F.S. and Mita D.G.
Modulation of immobilized enzyme activity by altering the hydrophobicity of nylon grafted membranes. Part 2: Non-isothermal conditions
J. Mol. Catal. B: Enzymatic, 9, 231-244 (2000)
- 3) Diano N., El-Masry M.M., Portaccio M., Santucci M., De Maio A., Grano V., Bencivenga U., Gaeta F.S. and Mita D.G.
The process of thermodialysis and efficiency increase of bioreactors operating under non-isothermal conditions
J. Mol. Catal. B: Enzymatic, 11, 97-111 (2000)
- 4) H. El-Sherif, P. L. Martelli, R. Casadio, M. Portaccio, U. Bencivenga, D. G Mita
Urease immobilization on chemically grafted nylon membranes. Part 1: Isothermal characterization
J. Mol. Catal. B: Enzymatic, 14, 15-29 (2001)
- 5) Schroen C.G.P.H., Mohy Eldin M.S., Janssen A.E.M., Mita D.G. and Tramper J.
Non-isothermal cephalixin synthesis to reduce diffusion limitations in immobilised enzymes

- J. Mol. Cat. B: Enzymatic. 15, 163-172 (2001)
- 6) El-Masry M. M., De Maio A., Portaccio M., Di Martino S., Bencivenga U., Rossi S., Gaeta F.S. and Mita D.G.
Isothermal and non-isothermal characterization of catalytic nylon membranes chemically grafted: dependence on the grafting percentage
Enzyme and Microbial Technology, 28, 773-784 (2001)
 - 7) De Maio A., El-Masry M. M., El-Latif Z.H. , Portaccio M., Bencivenga U., and Mita D.G.,
Influence of the immobilization process on the activity of beta galactosidase bound to Nylon Membranes grafted with glycidyl methacrylate. Part 2 . Non-isothermal behaviour
J. Mol. Cat. B: Enzymatic. 16, 175-189 (2001)
 - 8) Travascio P., Zito E., De Maio A., Schroen C.G.P.H., Durante D., De Luca P., Bencivenga U., and Mita D.G.
Advantages of using non-isothermal bioreactors for the enzymatic synthesis of antibiotics: the Penicillin G Acylase as enzyme model
Biotechnology and Bioengineering, 79, 334-346 (2002)
 - 9) H. El-Sherif, S. Di Martino, P. Travascio, A. De Maio, M. Portaccio, D. Durante, S. Rossi, P. Canciglia and D. G Mita
Advantages in using non-isothermal bioreactors in agricultural waste waters treatment by means of immobilized urease. A study on the influences of spacer length and immobilized method
J. Agr. Food Chem., 50, 2802-2811 (2002)
 - 10) Grano V., Diano N., Portaccio M., Bencivenga U., De Maio A., De Santo N., Perna A., Salamino F., Mita D.G.
Reduction of protease concentration by means of immobilized antiproteases: the alpha₁-antitrypsin/elastase complex as an experimental model for hemodialysis in acute catabolic renal failure, extracorporeal blood circulation and cardiocirculatory bypass. Int. J. of Artificial Organs 25, 297-305 (2002)
 - 11) P. Travascio, E. Zito, M. Portaccio, N. Diano, V. Grano, S. Di Martino, T. Bertolini, S. Rossi, D.G. Mita. Enzyme reaction engineering: effect of methanol on the synthesis of antibiotics catalyzed by immobilized penicillin G acylase under isothermal and non-isothermal conditions. In press on Biotechnology Progress, (2002).
 - 12) 12) Portaccio M., El-Mansry M., Rossi S., Diano N., De Maio A., Grano V., Lepore M., Travascio P., Bencivenga U., Pagliuca N., Mita D. G.: An amperometric sensor employing glucose oxidase immobilized on nylon membranes with different pore diameter and grafted with different monomers. In press on J. Mol. Cat. B: Enzymatic (2002)

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Le prospettive, ed i conseguenti obiettivi, per i prossimi anni, riguardano: 1) lo scale-up dei bioreattori attualmente in uso, bioreattori di dimensioni da laboratorio, a prototipi di tipo industriale; 2) la preparazione di membrane catalitiche sempre più efficienti e realizzate mediante la tecnica del grafting con plasma; 3) la costruzione di supporti biocompatibili, caricati con inibitori di proteasi, da utilizzare durante la circolazione extracorporea per ridurre i danni da proteolisi indotti dalle proteasi in circolo; 4) la progettazione e costruzione di biosensori da utilizzare nella diagnostica clinica e/o on line in impianti di tipo industriale.

Collaborazioni internazionali in atto

- 10 Department of Polymers and Pigments – National Research Council – Dokki – Cairo - Egitto
- 11 Food and Bioprocess Engineering Group – Agricultural University – Wageningen – The Netherlands
- 12 Department of Pure and Applied Biochemistry - Chemical Center - Lund University - Sweden

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Gamma – cell; Spettrofotometri; Assorbimento atomico; Gascromatografo

Parole Chiave

Enzimi immobilizzati; Biotecnologie; Bioreattori; Biosensori; Penicillina G Acilasi; β -Galattosidasi; Ureasi; Glucosio Ossidasi.

UNITA' DI RICERCA INBB
Siena

Responsabile Scientifico
Neri NICCOLAI

Linea di Ricerca

DETERMINAZIONE STRUTTURALE DI PROTEINE MEDIANTE MISURE DI RISONANZA MAGNETICA NUCLEARE E CALCOLI TEORICI.

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Neri NICCOLAI	PO	niccolai@unisi.it
---------------	----	-------------------

Non Aderenti INBB

Andrea BERNINI	PT	bernini2@unisi.it
Arianna CIUTTI	DR	ciutti@unisi.it
Ottavia SPIGA	DR	spiga@unisi.it
Maria SCARSELLI	RU	scarselli2@unisi.it

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Biologia Molecolare

Indirizzo: Via Fiorentina 1, 53100 Siena

Telefono: 0577 234911

Fax: 0577 234903

E-mail: niccolai@unisi.it

Sezione INBB di appartenenza

Siena

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Obiettivo principale dell'attività di ricerca svoltasi in questi ultimi tre anni è stato l'aumento del patrimonio di conoscenze di base di Biologia Strutturale da porre come base per la ingegneria proteica.

Comunque appare evidente che la sola caratterizzazione della struttura tridimensionale non può fornire esaurientemente tutte le informazioni sui meccanismi con i quali le varie specie molecolari si possano reciprocamente presentare per dare luogo al proprio riconoscimento e, quindi, ad una determinata reazione chimica o, nel caso delle proteine, ad una specifica funzione biologica.

La presentazione molecolare, alla quale due proteine danno origine, è certamente determinata dalle rispettive caratteristiche di accessibilità superficiale, ma dati sperimentali a riguardo non sono facilmente reperibili in letteratura, rendendo di frontiera questa dimensione della Biologia Strutturale. E', inoltre, da notare che l'accessibilità di superfici proteiche nei confronti della specie più semplice ed ubiquitaria, l'acqua, non costituisce un elemento di conoscenza privo di ambiguità, visto che i dati ottenuti nel cristallo ed in soluzione sono, per la stessa proteina, spesso contraddittori.

Recentemente è stato suggerito che alcune specie paramagnetiche, da tempo proposte come sonde chimiche per la determinazione della composizione atomica di superfici proteiche da misure NMR, originino effetti che influenzano i parametri spettrali non in semplice dipendenza dalla collocazione topologica dei vari atomi nella struttura, ma piuttosto dalla loro effettiva accessibilità. Per gli atomi che compongono la superficie di una data proteina, è infatti da prevedere che tale accessibilità, a seconda delle caratteristiche locali di stabilità della sfera di idratazione, possa variare, anche di molto, a parità di area esposta.

La messa a punto di nuove strategie sperimentali per l'acquisizione d'informazioni sull'accessibilità superficiale di proteine costituisce una fase necessaria per dare all'ingegneria proteica una base concretamente razionale e per accrescere le conoscenze del complesso fenomeno dell'interazione tra molecole.

Risultati ottenuti

I risultati ottenuti, conseguentemente agli obiettivi proposti, sono stati rilevanti, come testimoniato dalle pubblicazioni che ne sono conseguite (vedi elenco).

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

1) Spiga O, Scarselli M, Bernini A, Ciutti A, Giovannoni L, Laschi F, Bracci L, Niccolai N: Metal ion complexation and folding of linear peptides (2002) Biophys Chem 97, 79-86

2) M. Scarselli, O. Spiga, A. Ciutti, L. Bracci, B. Lelli, L. Lozzi, D. Calamandrei, A. Bernini, D. Di Maro, S. Klein, 3)

N. Niccolai - 'NMR structure of a-bungarotoxin Free and Bound to a mimotope of the Nicotinic Acetylcholine Receptor' (2002) *Biochemistry*, Vol.41, 1457 - 1463

4) O. Spiga, A. Bernini, M. Scarselli, A. Ciutti, L. Bracci, L. Lozzi, B. Lelli, D. Di Maro, D. Calamandrei, N. Niccolai - 'Peptide-protein interactions studied by Surface Plasmon and Nuclear Magnetic Resonances ' (2002) *FEBS Letters*, Vol.511, 33 - 35

5) L. Bracci, A. Pini, L. Lozzi, B. Lelli, P. Battestin, A. Spreafico, A. Bernini, N. Niccolai, P. Neri - 'Mimicking the nicotinic receptor binding site by a single chain Fv selected by competitive panning from a synthetic phage library.' (2001) *Journal of Neurochemistry*, Vol.78, 24 - 31

6) N. Niccolai, A. Ciutti, O. Spiga, M. Scarselli, A. Bernini, L. Bracci, D. Di Maro, C. Dalvit, H. Molinari, G. Esposito, P. Temussi - 'NMR studies of protein surface accessibility.' (2001) *Journal of Biological Chemistry*, Vol.276, 42455 - 42461

7) A. Bernini, L. Bracci, A. Ciutti, O. Crescenzi, C. Dalvit, D. Di Maro, N. Niccolai, M. Scarselli, R. Spadaccini, O. Spiga, P. Temussi - 'Probing the surface of a sweet protein: NMR study of MNEI with a paramagnetic probe.' (2001) *Protein Science*, Vol.10, 1498 - 1507

8) D. Di Maro, M. Scarselli, A. Bernini, S. Cresti, G. M. Rossolini, L. Lozzi, P. Neri, N. Niccolai - 'On the structural stability of a small bioactive peptide of potential use in biotechnology' (1999) *Journal of Biomolecular Structure Dynamics*, Vol.16, 1053 - 1059

9) M. Scarselli, A. Bernini, C. Segoni, H. Molinari, G. Esposito, A. Lesk, F. Laschi, P. Temussi, N. Niccolai - 'Tendamistat surface accessibility to the TEMPOL paramagnetic probe.' (1999) *Journal of Biomolecular NMR*, Vol.15, 125 - 133

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Nei prossimi tre anni l'unità di ricerca sarà impegnata in progetti di genomica strutturale applicata a sistemi proteici di rilevanza immunologica. Gli studi sulla accessibilità superficiale di biomolecole saranno ulteriormente sviluppati allo scopo di mettere a punto metodi predittivi di tale caratteristica molecolare.

Collaborazioni internazionali in atto

Arthur M. Lesk, MRC Cambridge, UK

Sam Butcher, Department of Biochemistry, University of Wisconsin at Madison USA

William A. Gibbons, School of Pharmacy, University of London, London, UK

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Spettrometro NMR Bruker Avance 600

Numerose stazioni per grafica molecolare

Cluster di PC per calcoli di dinamica molecolare

Parole Chiave

Accessibilità di superfici proteiche; interazione tra proteine; interazione tra peptidi e proteine; presentazione molecolare; NMR; modellistica molecolare.

UNITA' DI RICERCA INBB
Genova

Responsabile Scientifico

Claudio NICOLINI

Linea di Ricerca

NANOTECNOLOGIE

titolo

Nanobiocatalisi e Nanocristallografia

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Sandro CARRARA

Laura PASTORINO

Riccardo NARIZZANO

Victor EROKHIN

Svetlana EROKHINA

DR

AS

carrara@ibf.unige.it

laurap@ibf.unige.it

narizzan@ibf.unige.it

erokhin@ibf.unige.it

svetla@ibf.unige.it

Sede Unità di Ricerca

DISTBIMO Università di Genova

Indirizzo Corso Europa 30, 16132 GE

Telefono 010 3538381

Fax 010 3538346

E-mail distbimo@ibf.unige.it

Sezione INBB di appartenenza

Genova

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Limite ad una più ampia diffusione della biocatalisi nei processi industriali è la scarsa stabilità nel tempo e nelle condizioni operative degli enzimi e più in generale dei sistemi biocatalitici oggi disponibili. Esiste pertanto a livello internazionale una stringente domanda di ricerca per ottenere biocatalizzatori stabili, che consentano applicazioni industriali su larga scala.

Su questa tematica si è concentrato il lavoro dell'unità di Genova, lavoro che è stato, in particolare, indirizzato allo sviluppo di nuovi approcci al problema dell'immobilizzazione dell'enzima penicillina G acilase (PGA) con lo scopo di aumentare l'efficienza del biocatalizzatore prodotto.

In questa fase, inoltre si stanno compiendo studi di molecular modeling per individuare mutazioni opportune a rendere per aumentare l'attività catalitica, la stabilità termica e favorire il processo di cristallizzazione di proteine di interesse scientifico e industriale nel campo della biocatalisi, optoelettronica, sensoristica e cristallizzazione.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1998 - 2002

- Nicolini C., *Engineering of enzyme monolayer for industrial biocatalysis*, Annals of the New York Academy of Sciences 864, 435-441, 1998.
- Berzina T S, Piras L and Troitsky V I *Study of horseradish peroxidase activity in alternate-layer Langmuir-Blodgett films*, Thin Solid Films, 327-329, 621-626, 1998.
- Troitsky V I and Matveeva N K, Thin Solid Films , 327-329, 659-62, 1998.
- M.K. Ram, M. Adami, S. Paddeu, C. Nicolini, *Nanoassembly of glucose oxidase on the in situ self-assembled electrochemical characterizations*, Nanotechnology 11, 112-119, 2000.
- Pastorino L., Berzina T.S., Troitsky V.I., Bernasconi E., Nicolini C., Application of monolayer engineering for immobilization of penicillin G acylase, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 23, 289-293, 2002.
- Pastorino L., Berzina T.S., Troitsky V.I., Fontana M.P., Bernasconi E., C. Nicolini, Biocatalytic LB assemblies based on penicillin G acylase, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 23, 357-363, 2002.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Il futuro lavoro dell'Unità di Genova sarà volto alla trasposizione su scala industriale della metodologia messa a punto per la deposizione in continuo di PGA su supporti polimerici di area estesa.

In quest'ottica, in conclusione, è stato progettato e costruito un modello, su scala da laboratorio, di reattore rotante per verificare l'efficienza di tali biocatalizzatori in condizioni operative simili a quelle utilizzate a livello industriale. Le caratteristiche e le prestazioni del reattore verranno studiate in differenti condizioni operative al fine di definire le specifiche per un reattore su scala prototipale e quindi preindustriale.

Sul fronte della cristallizzazione, invece, verranno condotti esperimenti per verificare l'applicabilità della nuova metodologia di cristallizzazione via templati su altre classi di proteine.

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Trough Langmuir – Blodgett, spettrofotometro UV/VIS, spettrofotometro IR, Difrattometro a raggi – X, HPLC, microscopio ad Angolo di Brewster.

Parole Chiave

Enzimi, mezzo biocatalitico, penicillina G acilasi, ingegneria dei monostrati.

UNITA' DI RICERCA INBB
Napoli

Responsabile Scientifico

Adriana OLIVA

Linea di Ricerca

EFFETTO DI FATTORI DI CRESCITA E DI MOLECOLE AD AZIONE DIFFERENZIANTE SU POPOLAZIONI DI CELLULE MESENCHIMALI STAMINALI DA MIDOLLO OSSEO UMANO

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Adriana OLIVA

PO

Adriana.Oliva@unina2.it

Non Aderenti INBB

Rachele DI PASQUALE

DR

Irene PASSARO

DR

Sede Unità di Ricerca

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

Indirizzo Via De Crecchio, 7 Napoli

Telefono 081/5665861

Fax 081/441688

E-mail Adriana.Oliva@unina2.it

Sezione INBB di appartenenza:

Napoli

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Nel midollo osseo le cellule progenitrici della linea ematopoietica coesistono con cellule stromali che forniscono alle prime il necessario supporto in termini di componenti della matrice extracellulare, di citochine e di fattori di crescita e ne regolano la crescita ed il differenziamento.

La componente non-ematopoietica del midollo osseo è rappresentata da cellule staminali mesenchimali multipotenti (MSC = Mesenchymal Stem Cells) che, oltre a fare localmente da supporto alle cellule progenitrici del sangue (cellule stromali), possono anche essere commissionate verso altri destini e costituire quindi una sorgente importante di cellule per altri tessuti connettivi (osteoblasti, condroblasti, adipociti) e anche, in presenza di specifici fattori di crescita e differenziamento, non connettivi (miociti, cardiomiociti).

Sulla base dell'estrema "plasticità" delle MSC appare evidente come queste cellule possano costituire un promettente bersaglio per nuove strategie nella terapia cellulare/genica di varie patologie. Particolarmente interessante, a tale proposito, appare il possibile impiego delle MSC nella terapia dell'osteoporosi, per ricostituire nel midollo osseo una riserva di cellule osteoprogenitrici, normalmente in diminuzione nel corso dell'invecchiamento.

In questi ultimi anni abbiamo intrapreso una serie di studi atti a valutare l'effetto di agenti stimolanti la proliferazione e/o il differenziamento delle MSC. In particolare abbiamo preso in esame l'effetto di agenti differenzianti, quali l'acido retinoico. L'acido retinoico induceva nelle MSC un rallentamento della proliferazione e l'attivazione di un programma di differenziamento verso un fenotipo osteoblastico, come confermato dall'incremento dell'attività della fosfatasi alcalina e dall'espressione di livelli dosabili di osteocalcina. Mentre non si osservavano significative alterazioni in relazione ai livelli delle CDK o delle cicline, i livelli di p16 e di p27 aumentavano significativamente in seguito al trattamento con RA, mentre diminuiva la quantità di p21. L'effetto antiproliferativo dell'acido retinoico è dunque legato all'aumento dei livelli di p16 e di p27. La diminuzione del contenuto cellulare di p21 è compatibile con il fatto che tale CKI comunque contribuisce all'assemblarsi dei complessi ciclina/CDK2 necessari al progredire nel ciclo cellulare.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

F. Della Ragione, A. Borriello, V. Della Pietra, V. Cucciolla, A. Oliva, A. Barbarisi, A. Iolascon, and V. Zappia
Cell division cycle alterations and human tumors.
Adv Exp Med Biol, 472, 73-88, 1999

G. Maglio, P. Maglio, A. Oliva, R. Palumbo
Polyamides containing α -aminoacids and hydrophilic oxyethylene groups along the chain
Polymer Bulletin 43, 191-198, 1999

A. Borriello, V. Della Pietra, M. Criscuolo, A. Oliva, G.P. Tonini, A. Iolascon, V. Zappia, and F. Della Ragione
p27Kip1 accumulation is associated with retinoic-induced neuroblastoma differentiation: evidence of a decreased proteasome-dependent degradation.
Oncogene. 19, 51-60, 2000.

L. Calandrelli, B. Immirzi, M. Malinconico, M.G. Vople, A. Oliva, F. Della Ragione
Preparation and characterization of composites based on biodegradable polymers for “in vivo” application
Polymer, 41, 8027-8033, 2000

F. Della Ragione, V. Criniti, V. Della Pietra, A. Borriello, A. Oliva, S. Indaco T. Yamamoto and V. Zappia
Identification of genes modulated by histone acetylation as new effectors of butyrate activity
FEBS Lett. 499, 199-204. 2001

S. Perrotta, B. Nobili, F. Rossi, M. Criscuolo, A. Iolascon, D. Di Pinto, I. Passaro,
L. Cennamo, A. Oliva, and F. Della Ragione
Infant hypervitaminosis A causes severe anemia and thrombocytopenia: evidence of a
retinol-dependent bone marrow cell growth inhibition
Blood, 99, 2017-2022, 2002

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Da tutto quanto sopra riportato appare evidente come le MSC costituiscano un promettente bersaglio per nuove strategie nella terapia cellulare/genica di patologie ematologiche e scheletriche, che implicano l'espansione/trasfezione in vitro di tali cellule e la loro successiva reinfusione in vivo. In particolare, appaiono estremamente promettenti il possibile impiego delle MSC sia nell'ottimizzare l'"*homing*" dei progenitori delle cellule ematopoietiche che segue ad un trapianto di midollo, sia la loro utilizzazione per ricostituire una riserva di cellule osteoprogenitrici, che possano intervenire, ad esempio, nel trattamento dell'osteoporosi.

Obiettivo futuro dei nostri studi sarà pertanto di individuare le condizioni ottimali per amplificare in tempi rapidi queste popolazioni cellulari, che sono presenti in percentuali estremamente esigue nel midollo osseo in rapporto alla componente emopoietica, senza “commissionarle” verso alcun fenotipo particolare ma lasciando loro, data la grande “plasticità” che le caratterizza, la possibilità di differenziarsi e di specializzarsi funzionalmente una volta raggiunto il distretto tissutale sede dell'alterazione patologica che si intende correggere e quindi guarire.

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Laboratorio di colture cellulari completo di cappe a flusso laminare, incubatori ad anidride carbonica, microscopio ottico invertito, centrifuga da tavolo, microfuge.

Parole Chiave

Cellule mesenchimali staminali, midollo osseo, osteoblasti, biomateriali, osteoporosi

UNITA' DI RICERCA INBB
Perugia

Responsabili Scientifici

Aldo ORLACCHIO
Carla EMILIANI

Linea di Ricerca

ESPRESSIONE E TRAFFICO INTRACELLULARE DI IDROLASI ACIDE LISOSOMIALI IN CONDIZIONI NORMALI E PATOLOGICHE (TUMORI, MALATTIE NEURODEGENERATIVE). APPROCCI DI TERAPIA GENICA PER MALATTIE DA ACCUMULO LISOSOMIALE.

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Aldo ORLACCHIO	PO	orly@unipg.it
Carla EMILIANI	PA	emiliani@unipg.it

Non Aderenti INBB

Tommaso BECCARI	RU	t.beccari@unipg.it
Brunella TANCINI	PT	
Cristina CAVALIERI	BC	
Simona MENCARELLI	BC	
Lorena URBANELLI	BC	
Sabata MARTINO	BC	
Lucia BIBI	DR	
Pia MONTANUCCI	DR	
Emanuele PERSICHETTI	DR	
Dante PICCINI	PT	
Egidia COSTANZI	PT	
Mario POLIDORO	PT	

Sede Unità di Ricerca

Università degli Studi di Perugia, Dipartimento di Scienze Biochimiche e Biotecnologie Molecolari

Indirizzo Via del Giochetto, 06100 Perugia.....

Telefono 075 585 7443 -7439.....

Fax 075 585 7443

E-mail orly@unipg.it - emiliani@unipg.it

Sezione INBB di appartenenza

Roma

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Il gruppo di ricerca si occupa di espressione, targeting, caratterizzazione molecolare di idrolasi acide lisosomiali in condizioni normali e patologiche e di approcci di terapia genica per alcune malattie da accumulo lisosomiale.

Abbiamo affrontato il problema della regolazione dei geni HEXA ed HEXB codificanti per la β -esosaminidasi. Nei promotori dei due geni sono infatti presenti sequenze consenso per diversi fattori di trascrizione che lasciano presagire sia una regolazione ormonale che una regolazione legata al differenziamento cellulare. Evidenze sperimentali a favore dell'esistenza di una regolazione ormonale sono state ottenute valutato l'espressione dei due geni in vari tessuti di ratto in funzione della gravidanza. Una regolazione a livello trascrizionale legata al differenziamento cellulare è stata evidenziata in linee cellulari leucemiche indotte a differenziare verso fenotipi diversi. Studi di localizzazione subcellulare effettuati con diversi tipi approcci sperimentali su cellule umane sia normali che leucemiche hanno messo in evidenza forme isoenzimatiche della β -esosaminidasi, composte da subunità α e β completamente processate, associate alla membrane plasmatiche. Queste evidenze lasciano presagire una attività dell'enzima in un ambito extra-lisosomiale e ci consentono di ipotizzare un meccanismo di scambio diretto lisosomi-membrana.

Studi analoghi sono in atto su fibroblasti da pazienti affetti da malattie neurodegenerative ed in particolare nella malattia di Alzheimer. E' nostra intenzione verificare se alterazioni di espressione, processazione e targeting di enzimi lisosomiali possa essere considerato un marker di tale patologia e se la comprensione dei meccanismi molecolari che conducono a tali alterazioni possano contribuire alla comprensione delle basi molecolari della malattia stessa.

L'Unità di ricerca si è inoltre occupata di sviluppare protocolli di terapia genica per le malattie di Tay-Sachs e di Sandhoff, due malattie genetiche causata dalla mancanza di esosaminidasi A, e caratterizzate principalmente dall'accumulo del ganglioside GM2, substrato naturale dell'enzima, soprattutto nei lisosomi dei motoneuroni, con

conseguente disfunzione cellulare e neurodegenerazione progressiva. Il progetto prevede lo sviluppo di strategie di terapia genica potenzialmente capaci di veicolare il gene attraverso la barriera ematoencefalica. Il trasferimento genico è stato effettuato "in vitro" utilizzando il vettore retrovirale MoMLV. Sono stati condotti esperimenti sia di trasduzione diretta di cellule da paziente con malattia di Tay-Sachs che di "cros-correction". In collaborazione con altri gruppi stiamo inoltre valutando l'efficacia di approcci di terapia genica "in vivo" utilizzando in questo caso modelli murini della malattia di Sandhoff.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

- 1) S.Ciferri, C.Emiliani, G.Guglielmini, A.Orlacchio, G.G.Nenci, P.Gresele (2000)
PLATELETS RELEASE THEIR LYSOSOMAL CONTENT *IN VIVO* IN HUMANS UPON ACTIVATION. *Thrombosis and Haemostasis*, 83, 157-164.
- 2) B.Tancini, C.Emiliani, S.Mencarelli, C.Cavalieri, J.L.Stirling and A.Orlacchio (2000)
EVIDENCE FOR THE REGULATION OF β -N-ACETYLHEXOSAMINIDASE EXPRESSION DURING PREGNANCY IN RAT. *Biochim.Biophys.Acta*, 1475, 184-190.
- 3) E.Costanzi, T.Beccari, S.Stinchi, L.Bibi, J.J.Hopwood, A.Orlacchio
GENE ENCODING THE MOUSE SULPHAMIDASE: cDNA CLONING, STRUCTURE AND CHROMOSOMAL MAPPING, *Mammalian Genome*, 2000, 11, 436-439
- 4) T.Beccari, F.Mancuso, E.Costanzi, C.Tassi, R.Baroni, A.Fiumara, An.Orlacchio, MC.Aisa, A.Orlacchio, b-HEXOSAMINIDASE, A-D-MANNOSIDASE AND B-MANNOSIDASE EXPRESSION IN SERUM FROM PATIENTS WITH CARBOHYDRATE DEFICIENT GLYCOPROTEIN SYNDROME TYPE I. *Clin.Chim.Acta*, 2000, 302, 125-132
- 5) An.Orlacchio, G.Bernardi, A.Orlacchio and C.Emiliani (2001) α -D-MANNOSIDASE PROPERTIES IN SERUM OF PATIENTS WITH AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS
J.Neurol., 248, 1090-1092
- 6) T.Beccari, L.Bibi, S.Stinchi, JL Stirling and A. Orlacchio
MOUSE BETA-MANNOSIDASE: CDNA CLONING, EXPRESSION, AND CHROMOSOMAL LOCALIZATION. *Bioscience Reports*, 2001, 21, 5315-5323
- 7) C.Matteucci, R. La Starza, B. Crescenzi, D.Falzetti, S. Romoli, C.Emiliani, A.Orlacchio, P. Marynen, M.F.Martelli, C.Mecucci (2002) INTERPRETATION OF THE COMPLEX KARYOTYPE AND IDENTIFICATION OF A NEW 6P AMPLICON BY INTEGRATED COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDIZATION AND FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION ON THE U937-I CELL LINE *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 135, 28-34
- 8) S.Martino, C.Emiliani, B.Tancini, G.M.Severini, V.Chigorno, S.Sonnino, A.Orlacchio, C.Bordignon (2002) ABSENCE OF METABOLIC CROSS-CORRECTION IN TAY-SACHS CELLS: IMPLICATION IN GENE THERAPY *J.Biol.Chem.*, 7; 277(23):20177-20184
- 9) E.Martin-Touaux, J.P.Puech, D. Chateau, C.Emiliani, E.J.Kremer, N.Raben, B.Tancini, A.Orlacchio, A.Kahn, L.Poenaru (2002) MUSCLE AS A PUTATIVE PRODUCER OF GAA FOR GSD II GENE THERAPY *Human Molecular Genetics*, 11(14):1637-1645
- 10) S.Martino, C.Cavalieri, C.Emiliani, D.Dolcetta, M.G. Cusella De Angelis, V. Chigorno, G.M. Severini, K. U. Sandhoff, C. Bordignon, S.Sonnino and A.Orlacchio (2002) RESTORATION OF THE GM2 GANGLIOSIDE METABOLISM IN BONE MARROW- DERIVED STROMAL CELLS FROM TAY-SACHS DISEASE ANIMAL MODEL. *Neurochemical Research*, in press
- 11) An.Orlacchio, T. Kawarai, E. Paciotti, A. Stefani, A. Orlacchio, S. Sorbi, P.H.St.George Hyslop Bernardi
ASSOCIATION STUDY OF THE 5H76 RECEPTOR GENE IN ALZHEIMER DISEASE. *Neuroscience Letters*, 2002, in press

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Continuare gli studi intrapresi per arrivare alla caratterizzazione dei meccanismi espressione, processazione e di trasporto di glicoidrolasi lisosomiali in cellule normali e successivamente in modelli cellulari della malattia di Alzheimer.

Mettere a punto sistemi che ci consentano di monitorare il traffico intracellulare dell' enzima lisosomiale β -esosaminidasi internalizzato in modelli cellulari (verrà prodotta una proteina di fusione beta-esosaminidasi/TAG, rilevabile all'interno della cellula tramite anticorpi specifici).

Sviluppare approcci di terapia genica per malattie di accumulo lisosomiale, utilizzando sistemi che consentano di aumentare l'up-take e la biodistribuzione dell'enzima. Una possibilità potrebbe essere quella di produrre enzima ricombinanti derivate dalla fusione C terminale tra la proteina "wild type" e un peptide che ne favorisca la distribuzione nei diversi tessuti ed il "targeting" lisosomiale.

Collaborazioni internazionali in atto

Prof. K. Sandhoff , Kekule-Institut für Organische Chemie und Biochemie, Universität Bonn, Bonn 53121.

Prof. A.Hasilik, Inst. für Physiologische Chemie, Klinikum der Philipps-Universität Marburg, Germany

Prof. L.Poenaru Laboratoire de Génétique, Université René Descartes, Paris V, Port-Royal Faculté de Médecine and unité INSERM 129 Paris, France

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Elettroforesi 2D e software per l'analisi del proteoma

Spettrofotofluorimetro,

Spettrofotometro,

PCR

HPLC

Ultracentrifuga

Parole Chiave

Enzimi lisosomiali, espressione genica, traffico intracellulare, terapia genica, Tay-Sachs, Sandhoff, Alzheimer

UNITA' DI RICERCA INBB
Campobasso

Responsabile Scientifico
Salvatore PASSARELLA

Linea di Ricerca

BIOENERGETICA MITOCONDRIALE IN CONDIZIONI FISIOPATOLOGICHE IN SISTEMI-MODELLO VEGETALI

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Salvatore PASSARELLA

PO

passarel@unimol.it

Non Aderenti INBB

Donato PASTORE

PA

pastore@unimol.it

Catello DI MARTINO

RU

lello.dimartino@unimol.it

Maria Luigia PALLOTTA

RU

pallotta@unimol.it

Daniela TRONO

BC

dadatrono@hotmail.com

Micheline IACOVINO

DR

scaltea@hotmail.com

Roberto PIZZUTO

DR

robertopizzuto@virgilio.it

Ersilia MARRA

DIRIGENTE DI RICERCA C.N.R.

e014em01@area.ba.cnr.it

Anna ATLANTE

PRIMO RICERCATORE C.N.R.

csmmaa08@area.ba.cnr.it

Daniela VALENTI

RICERCATORE C.N.R.

d.valenti@biologia.uniba.it

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Scienze Animali Vegetali e dell'Ambiente

Indirizzo: Via De Sanctis 86100 CAMPOBASSO

Tel.: 0874/404243

Fax: 0874/404678

E-mail: passarel@unimol.it

Sezione INBB di appartenenza

Molise

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

L'attività sperimentale svolta negli ultimi tre anni ha permesso l'ampliamento delle conoscenze su tematiche di ricerca differenti:

METABOLISMO E TRASPORTO DI MEMBRANA IN CONDIZIONI FISIOPATOLOGICHE

Sono stati identificati e caratterizzati nuovi processi di trasporto in mitocondri isolati: tre carrier per il substrato D-lattato in mitocondri di fegato di ratto, due per L-lattato in mitocondri isolati da cuore di ratto. Un carrier per il fumarato è stato caratterizzato in mitocondri isolati da lievito *Saccharomyces cerevisiae*.

Nei mitocondri vegetali è stato scoperto il canale del potassio.

TRASPORTO E BIOGENESI DEI MITOCONDRI

Sono stati individuati traslocatori, enzimi della sintesi e della degradazione di cosubstrati di deidrogenasi piridiniche e cofattori di enzimi flavinici mitocondriali.

BIOENERGETICA IN NEUROTOSSICITA' E IN CONDIZIONI DI STRESS OSSIDATIVO

E' stato studiato il ruolo dei mitocondri in condizioni di neurotossicità da glutammato utilizzando come sistema modello omogenati e/o mitocondri isolati da colture cellulari primarie di granuli di cervelletto di ratto. Il ruolo dei mitocondri è stato valutato in relazione alla produzione di specie reattive dell'ossigeno ed al rilascio del citocromo c, evento questo che interviene come meccanismo di difesa della cellula contro la neurotossicità. Nuovi metodi sono stati messi a punto per misurare le specie reattive dell'ossigeno in colture cellulari.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

1. Pastore, D., Stoppelli, M. C., Di Fonzo, N. and Passarella, S. (1999) The existence of the K(+) channel in plant mitochondria. *J Biol Chem.* 274, 26683-90.

2. Atlante, A., Gagliardi, S., Marra, E., Calissano, P. and Passarella, S. (1999) Glutamate neurotoxicity in rat cerebellar granule cells involves cytochrome c release from mitochondria and mitochondrial shuttle impairment. *J Neurochem.* 73, 237-46.

3. Valenti, D., Barile, M., Quagliariello, E. and Passarella, S. (1999) Inhibition of nucleoside diphosphate kinase in rat liver mitochondria by added 3'-azido-3'-deoxythymidine. *FEBS Lett.* 444, 291-5.
4. Pallotta, M. L., Fratianni, A. and Passarella, S. (1999) Metabolite transport in isolated yeast mitochondria: fumarate/malate and succinate/malate antiports. *FEBS Lett.* 462, 313-6.
5. Atlante, A., Calissano, P., Bobba, A., Azzariti, A., Marra, E. and Passarella, S. (2000) Cytochrome c is released from mitochondria in a reactive oxygen species (ROS)-dependent fashion and can operate as a ROS scavenger and as a respiratory substrate in cerebellar neurons undergoing excitotoxic death. *J Biol Chem.* 275, 37159-66.
6. Barile, M., Brizio, C., Valenti, D., De Virgilio, C. and Passarella, S. (2000) The riboflavin/FAD cycle in rat liver mitochondria. *Eur J Biochem.* 267, 4888-900.
7. Pastore, D., Fratianni, A., Di Pede, S. and Passarella, S. (2000) Effects of fatty acids, nucleotides and reactive oxygen species on durum wheat mitochondria. *FEBS Lett.* 470, 88-92.
8. Atlante, A., Calissano, P., Bobba, A., Giannattasio, S., Marra, E. and Passarella, S. (2001) Glutamate neurotoxicity, oxidative stress and mitochondria. *FEBS Lett.* 497, 1-5.
9. Pastore, D., Trono, D., Laus, M. N., Di Fonzo, N. and Passarella, S. 2001. Alternative oxidase in durum wheat mitochondria. Activation by pyruvate, hydroxypyruvate and glyoxylate and physiological role. *Plant Cell Physiol.* 42, 1373-82.
10. Pastore, D., Laus, M. N., Di Fonzo, N. and Passarella, S. (2002) Reactive oxygen species inhibit the succinate oxidation-supported generation of membrane potential in wheat mitochondria. *FEBS Lett.* 516, 15-9.
11. Valenti, D., Bari, L. D., Atlante, A. and Passarella, S. (2002) L-Lactate transport into rat heart mitochondria and reconstruction of the l-lactate/pyruvate shuttle. *Biochem J.* 364, 101-4.
12. de Bari, L., Atlante, A., Guaragnella, N., Principato, G. and Passarella, I. (2002) D-lactate transport and metabolism in rat liver mitochondria. *Biochem J.* 365, 391-403.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Il ruolo del mitocondri in condizioni di stress ossidativo, come nella morte cellulare programmata in sistemi vegetali è bel lungi dall'essere conosciuto in dettaglio. A tal fine la ricerca futura intende affrontare e dare risposta a questioni ancora aperte, quali:

1. In che modo condizioni diverse di stress biotico ed abiotico possono compromettere la bioenergetica mitocondriale in sistemi vegetali differenti?
2. In che modo lavorano e come si coordinano i sistemi di difesa contro il danno ossidativo, attivi nei mitocondri?
3. In che modo i mitocondri partecipano alla cascata di eventi che portano alla morte cellulare programmata in sistemi-modello vegetali come già studiato in sistemi cellulari animali?

Collaborazioni internazionali in atto

Dr. R.A. Butow

Department of Molecular Biology and Oncology, University of Texas Southwestern Medical Center, 5323 Harry Hines Boulevard, Dallas, TX. Email: butow@swmed.edu

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca (max 6)

Spettrofotofluorimetro perkin elmer ls50, supercentrifuga kontron, sistema per hplc kontron, ossigrafo gilson, centrifuga beckman

Parole Chiave

Mitocondri; metabolismo energetico; trasporto mitocondriale; stress abiotici e biotici; stress ossidativo; morte cellulare programmata; necrosi; specie reattive dell'ossigeno; antiossidanti.

UNITA' DI RICERCA INBB
Genova

Responsabile Scientifico

Isidoro Mario PEPE

Linea di Ricerca

ENERGETICA DELLA FOTOTRASDUZIONE VISIVA

Composizione del Gruppo

Non Aderenti INBB

Alessandro MORELLI	PO
Isabella PANFOLI	RU
Luigi NOTARI	DR*
Leopoldo AVALLE	PT

Sede Unità di Ricerca

Università di Genova, Dipartimenti DISTBIMO e DOBIG

Indirizzo Corso Europa 30

Telefono 010 3538349

Fax ...010 3538346

E-mail pepe@ibf.unige.it

Sezione INBB di appartenenza

Genova

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Gli obiettivi della ricerca consistono nella caratterizzazione degli enzimi Ca-ATPasi e miocinasi trovati sulle membrane dei dischi dei bastoncelli della retina di bue e nella elucidazione dei loro ruoli nell'ambito dell'omeostasi del calcio nella cellula fotorecetttrice e dell'energetica della fototrasduzione.

Risultati ottenuti

Come è noto, il segmento esterno del bastoncello della retina è la sede degli eventi molecolari che costituiscono la fototrasduzione visiva. Il fabbisogno energetico del segmento esterno al buio è di circa 50 μM di ATP al secondo, per la maggior parte speso per la sintesi del GMP ciclico, ed aumenta di circa 3 volte durante l'illuminazione. Le molecole di ATP sintetizzate nei mitocondri, che sono localizzati nel segmento interno del bastoncello, diffondono molto lentamente (minuti) dal segmento interno a quello esterno rispetto ai tempi della fototrasduzione (millisecondi) che si svolge sulle membrane dei dischi. E' noto che i dischi sono dei serbatoi di calcio con una concentrazione interna dell'ordine del millimolare mentre la concentrazione di calcio interna alla cellula è di circa $0,5 \times 10^{-6}$ M. Una pompa al calcio che idrolizza ATP nei dischi è stata isolata e caratterizzata dal nostro gruppo. Si tratta di una ATPasi del tipo SERCA (sercoplasmic and endoplasmic reticulum calcium ATPase) con un intermedio fosforilato di 100 kDa. La bassa affinità della pompa per il calcio (13mM) esclude che la sua funzione sia quella di pompare ioni calcio nei dischi. Il nostro gruppo ha dimostrato che a concentrazioni di calcio fisiologiche ($0,5 \times 10^{-6}$ M) la Ca-ATPasi rovescia la sua funzione per sintetizzare ATP direttamente sui dischi dove avvengono gli eventi molecolari della fototrasduzione.

Inoltre si è anche caratterizzata l'attività miocinasica di un enzima AK legato alla membrana dei dischi attraverso miristoilazione. L'attività di questo enzima è funzione della concentrazione di calcio esterna ed è massima ai livelli di calcio fisiologici.

Questi risultati sono molto importanti poiché dimostrano che l'ATP è rigenerata da ADP sulla superficie dei dischi, evitando la lenta diffusione di metaboliti e fornendo rapidamente energia a processi che avvengono sulle membrane dei dischi, come la fosforilazione della rodopsina fotoattivata o il rimpiazzo del GTP idrolizzato dalla trasducina.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

- 1) I.M.Pepe. Rhodopsin and phototransduction. *J. Photochem. Photobiol.* vol. 48, 1-10 (1999).
- 2) A.Palmeri, I.M.Pepe, R.Rolandi, S.Pagani and A.Morelli. Ion permeability induced by bacteriocins of *Lactobacillus Acidophilus* M247 on artificial lipid membrane. *Material Science & Engineering C*, vol. 8-9, 539-542 (1999).
- 3) I.M.Pepe and C. Cugnoli. The homeostasis of calcium in vertebrate photoreceptor cell. *Trends in Photochem. Photobiol.* vol. 6, 63-74 (1999).

- 4) I.M.Pepe. Energetics of visual phototransduction. In: Recent Research in Developments in Photochemistry and Photobiology. Transworld Research Network, Trivandrum, India. vol.4(Part-I) 95-106 (2000).
- 5) I.M.Pepe, I.Panfoli, L.Notari and A.Morelli. ATP synthesis in rod outer segments of bovine retina by the reversal of the disk calcium pump. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* vol. 268, 625-627 (2000).
- 6) L.Notari, I.M.Pepe, C.Cugnoli and A.Morelli. Adenylate kinase activity in rod outer segment of bovine retina. *Biochim. Biophys. Acta* vol. 1504, 438-443 (2001).
- 7) I.M.Pepe. Recent advances in our understanding of rhodopsin and phototransduction. *Progr. Ret. Eye Res.* vol. 20, 733-759 (2001).
- 8) C.Cugnoli, A.Morelli and I.M.Pepe. Visual transduction and rhodopsin regeneration. In: Handbook of Photochemistry and Photobiology. M.S.A.Abdel-Mottaleb, ed. American Scientific Publishers. (2002, in press).
- 9) I.M.Pepe, L. Notari, C.Cugnoli, I.Panfoli and A.Morelli. ATP synthesis in the disk membranes of rod outer segments of bovine retina. *J. Photochem. Photobiol. B*, vol. 66, 148-152 (2002).

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Ulteriore caratterizzazione della Ca-ATPasi e della Miocinasi dei dischi dei bastoncelli di retina. Identificazione della AK isoform dei dischi.

Possibili effetti dei campi elettromagnetici deboli sulla AK dei dischi dei bastoncelli di retina.

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Centrifughe, Ultracentrifuga, Spettrofotometri, Gel elettroforesi...

Parole Chiave

Phototransduction, Vision, Bioenergetics, Rhodopsin, Photosensitive proteins, Vitamin A, Ca-ATPase

UNITA' DI RICERCA INBB
Napoli

Responsabile Scientifico

Riccardo PIERANTONI

Linea di Ricerca

COMUNICAZIONI CELLULARI E CONTROLLO DELL'ATTIVITA' TESTICOLARE

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Silvia FASANO

Prof. Associato

silvia.fasano@unina2.it

Non Aderenti INBB

Gilda COBELLIS

Ricercatore

gilda.cobellis@unina2.it

Rosaria Meccariello

Assegnista (dottoranda)

rosaria.meccariello@unina2.it

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Medicina Sperimentale

Indirizzo Via Costantinopoli 16, 80138 Napoli

Telefono 0815667617

Fax 0815667536

E-mail dimesp@unina2.it

Sezione INBB di appartenenza

Napoli

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Ruolo dei proto-oncogeni e delle chaperonine nel controllo delle spermatogenesi

Risultati ottenuti

E' stato identificato il ruolo di Fos e di Msj-1 nelle mitosi spermatogoniali e nella spermiogenesi

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

1. R. Pierantoni. Male reproductive system, amphibians. Eds E. Knobil and J. D. Neil. In: "Encyclopedia of Reproduction". Academic Press, San Diego, 3: 10 - 15.
2. G.Cobellis, R.Pierantoni, S.Minucci, R.Pernas-Alonso, R.Meccariello and S.Fasano (1999). c-fos Activity in Rana esculenta testis: seasonal and estradiol-induced changes. Endocrinology, 140: 3238-3244. IF 5.365
3. G.Cobellis, M.Vallarino, R.Meccariello, R.Pierantoni, M.A. Masini, M.Mathieu, R.Pernas-Alonso, P.Chieffi and S.Fasano (1999). Fos localization in cytosolic and nuclear compartments in neurones of frog, Rana esculenta, brain: an analysis carried out in parallel with GnRH molecular forms. J.Neuroendocrinology 11: 725 - 735. IF 2.832
4. G.Cobellis, R.Meccariello, M.Vallarino, M.A.Masini, M.Mathieu, P.Chieffi, R.Pierantoni and S.Fasano (1999). Fos and GnRH molecular form presence in the brain of the frog, Rana esculenta. Eds. E.W.Roubos, S.E.W.Bonga, H.Vaudry and A. De Loof. In: "Recent Developments in Comparative Endocrinology" Shaker Publishing, Maastricht, The Netherlands, pp. 33-36.
- 5 R.Pierantoni (2000). Rigenerazione. In: "L'Universo del corpo" 5: 333- 335 Enciclopedia "Treccani".
- 6 R.Pierantoni (2000). Riproduzione. In: "L'Universo del corpo" 5: 335- 341 Enciclopedia "Treccani".
- 7 Cobellis G., Meccariello R., Minucci S., Palmiero C., Fienga G., Pierantoni R. and Fasano S. (2001). Direct effect of a GnRH agonist on Fos protein localization in Rana esculenta testis. Eds. H.J.Th. Goos, R.K. Rastogi, H. Vaudry and R. Pierantoni. In: "Perspective in Comparative Endocrinology: Unity and Diversity". Monduzzi, Bologna, Italy, pp. 1055-1060.
- 8 Goos H.J.Th., Rastogi R.K., Vaudry H. and Pierantoni R (2001). "Perspective in Comparative Endocrinology: Unity and Diversity". Monduzzi, Bologna, Italy, pp. 1- 1291.
- 9 Cobellis G., Meccariello R., Fienga G., Pierantoni R. and Fasano S. (2002). Cytoplasmic and nuclear Fos protein forms regulate resumption of spermatogenesis in the frog, Rana esculenta. Endocrinology 143:163-170 (IF. 5.365)
- 10 Pierantoni R, Cobellis G, Meccariello R, Fasano S (2002). Evolutionary aspects of cellular communication in the vertebrate hypothalamo-hypophysis-gonadal axis. Int.Rev.Cytol. 218:69-141. (IF 7.909).
- 11 Meccariello R., Cobellis G., Junier MP., Ceriani M., Boilée S., Pierantoni R., and Fasano S (2002). MSJ-1: an evolutionarily conserved protein for spermiogenesis. Biol.Reprod. 66: 1328-1335 (IF. 3.417)

12 Boilleé S., Berruti G., Meccariello R., Grannec G., Razan F., Pierantoni R., Fasano S. and Junier M.P. (2002). Early dferct in the expression of a HSP40/DNAJ chaperon protein, mouse sperm DNAJ (MSJ-1), in the spinal cord of trhe murine model of motoneuronal degeneration wobbler. Neuroscience in press (3.924)

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Caratterizzare i complessi AP1 nel testicolo

Realizzare il KO del gene msj-1

Collaborazioni internazionali in atto

Paolo Sassone-Corsi (Strasburgo, Francia)

Marie Pierre Junier (Parigi, Francia)

Robert Millar (Edinburgo, UK)

Hamid Habibi (Calgary, Canada)

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Ultracentrifuga, analizzatore di immagini, PCR, laboratori per tecniche istologiche di routine e ICC, laboratori per tecniche di Northern e Western blots, laboratorio radioisotopi

Parole Chiave

Gonadi, testicolo, steroidogenesi, spermatogenesi, spermiogenesi, proto-oncogene, chaperonine

UNITA' DI RICERCA INBB
Padova

Responsabile Scientifico

Lorenzo A. PINNA

Linea di Ricerca

ANALISI STRUTTURA-FUNZIONE DI PROTEIN CHINASI

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Flavio MEGGIO	PO	flavio.meggio@unipd.it
Arianna DONELLA-DEANA	PO	arianna.donella@unipd.it

Non Aderenti INBB

Anna-Maria BRUNATI	RU	lannamaria.brunati@unipd.it
Oriano MARIN	RU	oriano.marin@unipd.it
Maria RUZZENE	RU	maria@ck2.bio.unipd.it
Stefania SARNO	RU	stefy@ck2.bio.unipd.it
Sonia FACCHIN	BC	sonia@ck2.bio.unipd.it
Luca CESARO	PT	luca@ck2.bio.unipd.it

Sede Unità di Ricerca

Dip. Chimica Biologica, Università di Padova,

Indirizzo Viale G. Colombo 3, 35121 Padova

Telefono 049-8276108

Fax 049-8073310

E-mail lorenzo.pinna@unipd.it

Sezione INBB di appartenenza

Padova

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Enzimologia molecolare e studio dei rapporti struttura-funzione di alcune protein chinasi coinvolte nella trasduzione del segnale e la cui alterata espressione e/o attività si associano a condizioni patologiche, in particolare a neoplasie. Oggetto di studio sono state alcune chinasi Ser/Thr specifiche acidofile (CK2, CK1, G-CK, piD261) ed alcune chinasi tirosiniche non recettoriali (Lyn, c-Fgr, CSK, Syk). Si volevano chiarire le basi strutturali che determinano le loro funzioni cellulari, con particolare riguardo ai loro meccanismi di attivazione, regolazione e targeting, e con lo scopo di sviluppare per alcune di esse inibitori specifici.

Risultati ottenuti

E' stata risolta la struttura cristallina della subunità catalitica di CK2 in complesso con due molecole inibitrici, l'emodina e il TBB (tetrabromobenzotriazolo). Si è inoltre dimostrato che questo secondo è dotato di elevata specificità verso CK2 essendo inefficace o molto meno efficace nei confronti di altre 34 chinasi. Il TBB è stato usato per studiare l'attività cellulare di CK2 in cellule Jurkat, rivelandosi un agente apoptotico. Si è così potuto stabilire che CK2 svolge normalmente un'azione anti-apoptotica, mediata, almeno in parte dalla sua fosforilazione della proteina HS1 che in seguito a tale fosforilazione diventa resistente all'azione delle caspasi. Mediante analisi mutazionale si è anche stabilito che l'attività costitutiva della subunità catalitica di CK2 (sospettata di essere responsabile del suo potenziale oncogenico) è conferita da particolari interazioni tra il segmento N-terminale ed il loop di attivazione. Una volta associata con la subunità regolatoria beta, l'attività costitutiva rimane indipendentemente da queste interazioni. Utilizzando una serie di peptidi che riproducono i domini A e Z del fattore di trascrizione NF-AT4 si è messo in evidenza un nuovo meccanismo di targeting da parte di CK1, basato sul riconoscimento di un dominio di "docking", situato tra i domini A e Z, che consente il riconoscimento di una serina atipica, la cui fosforilazione innesca una cascata fosforilativa di tipo gerarchico. Un'accurata analisi mutazionale di piD261 ha consentito di individuare in questa chinasi altamente atipica tutti i motivi fondamentali delle famiglia delle chinasi eucariotiche, dispersi tuttavia in un contesto estremamente alterato che suggerisce un meccanismo di catalisi significativamente diverso da quello usuale. E' stato dimostrato che la chinasi tirosinica Syk fosforila tre tirosine nel tratto terminale di alfa-sinucleina e che in tal modo impedisce la polimerizzazione di questa proteina e verosimilmente contrasta la formazione di placche che caratterizzano le diverse "sinucleinopatie", con particolare riguardo al Parkinson.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

14. A-M. Brunati, A. Donella-Deana, P. James, M. Quadroni, A. Contri, O. Marin and L.A. Pinna: "Molecular features underlying the sequential phosphorylation of HS1 protein and its association with c-Fgr protein tyrosine kinase" (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 7557-7564.
15. O. Marin, F. Meggio, S. Sarno, L. Cesaro, M.A. Pagano and L.A. Pinna: "Tyrosine vs. serine/threonine phosphorylation by protein kinase CK2. A study with peptide substrates derived from immunophilin Fpr3" (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 29260-29265.
16. A-M. Brunati, L. Bordin, G. Clari, P. James, M. Quadroni, E. Baritono, L.A. Pinna and A. Donella-Deana "Sequential phosphorylation of protein band 3 by Syk and Lyn tyrosine kinases in intact human erythrocytes. Identification of primary and secondary phosphorylation sites" (2000) *Blood*, 96, 1550-1557.
17. A-M. Brunati, L. Bordin, G. Clari, P. James, M. Quadroni, E. Baritono, L.A. Pinna and A. Donella-Deana "Sequential phosphorylation of protein band 3 by Syk and Lyn tyrosine kinases in intact human erythrocytes. Identification of primary and secondary phosphorylation sites" (2000) *Blood*, 96, 1550-1557.
18. S. Sarno, O. Marin, M. Boschetti, M.A. Pagano, F. Meggio and L.A. Pinna "Cooperative modulation of protein kinase CK2 by separate domains of its regulatory α -subunit" (2000) *Biochemistry*, 39, 12324-12329.
19. R. Battistutta, S. Sarno, E. De Moliner, E. Papinutto, G. Zanotti and L.A. Pinna "The replacement of ATP by the competitive inhibitor emodin induces conformational modifications in the catalytic site of protein kinase CK2" (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 29618-29622.
20. D.M. D'Agostino, T. Ferro, L. Zotti, F. Meggio, L.A. Pinna, L. Chieco-Bianchi and V. Ciminale "Identification of a domain of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Rev that is required for functional activity and modulates association with subnuclear compartments containing splicing factor SC35" (2000) *J. Virol.* 74, 11899-11910.
21. R. Battistutta, E. DeMoliner, S. Sarno, G. Zanotti and L.A. Pinna "Structural features underlying selective inhibition of protein kinase CK2 by ATP site-directed tetrabromo-benzotriazole" (2001) *Protein Science*, 10, 2200-22.
22. S. Facchin, R. Lopireiato, S. Stocchetto, G. Arrigoni, L. Cesaro, O. Marin, G. Carignani and L.A. Pinna "Structure-function analysis of yeast Vsk1p/piD261, an atypical protein kinase essential for normal life" (2002) *Biochem. J.* 364, 457-464
23. - O. Marin, V. Burzio, M. Boschetti, F. Meggio, C.C. Allende, J.E. Allende and L.A. Pinna "Structural features underlying the multi-site phosphorylation of the A domain of NF-AT4 transcription factor by protein kinase CK1" (2002) *Biochemistry*, 41, 618-62.
24. - Negro A., A-M. Brunati, A. Donella-Deana and L.A. Pinna "Multiple phosphorylation of α -synuclein by protein tyrosine kinase Syk prevents eosin induced aggregation" (2002) *FASEB J*, 16, 210-212
25. - Sarno, P. Ghisellini and L.A. Pinna "Unique activatory mechanism of protein kinase CK2: The N-terminal segment is essential for constitutive activity of the catalytic subunit, but not of the holoenzyme." (2002) *J. Biol. Chem.* Apr. 15 (in press)

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Comprensione dei meccanismi molecolari che stanno alla base del potenziale oncogenico ed anti-apoptotico di CK2. Sviluppo di nuovi e più specifici inibitori di CK2, CK1, Syk. Sviluppo di substrati peptidici specifici per il monitoraggio di singole chinasi tirosiniche, con particolare riguardo a Syk e Alk. Risoluzione delle strutture dell'oloenzima CK2 e di suoi complessi con inibitori ed altri ligandi. Risoluzione della struttura della chinasi piD261. Ruolo della fosforilazione tirosinica di GRP94 da parte di chinasi della famiglia Src.

Collaborazioni internazionali in atto

Department of Biochemistry, University of Dundee, Dundee UK.

NOVARTIS Pharma AG, Basel CH.

Instituto de Ciencias Biomedicas, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Sintetizzatore automatico di peptidi, Sequenziatore di proteine, BIAcore X.

Parole Chiave

Protein kinase, Protein phosphorylation, Phosphopeptides, Signal transduction, Neoplasia, Apoptosis, Enzyme regulation, Casein kinase.

UNITA' DI RICERCA INBB
Udine

Responsabile Scientifico

Carlo Adolfo PORRO

Linea di Ricerca

STUDIO DELL'ORGANIZZAZIONE FUNZIONALE DEL SISTEMA DOLORIFICO E CORTICALE MOTORIO NELL'UOMO MEDIANTE TECNICHE NON INVASIVE DI RISONANZA MAGNETICA FUNZIONALE PER IMMAGINI (FMRI)

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Carlo Adolfo PORRO	PO	cporro@makek.dstb.uniud.it
--------------------	----	----------------------------

Non Aderenti INBB

Laura PERISSIN	RU	lperissin@makek.dstb.uniud.it
Patrizia FACCHIN	DR	pfacchin@makek.dstb.uniud.it
Marta MAIERON	DR	mmaieron@makek.dstb.uniud.it

Sede Unità di Ricerca

Dip. Scienze e Tecnologie Biomediche – Univ. di Udine

Indirizzo: P.le Kolbe 4 – I-33100 Udine

Telefono: 0432 – 494339/494360

Fax: 0432 - 494301.

E-mail: cporro@makek.dstb.uniud.it

Sezione INBB di appartenenza

Udine

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

- A. Identificazione della componente corticale ipsilaterale legata all'esecuzione e alla rappresentazione mentale dei movimenti della mano
- B. Studio dei correlati cerebrali dell'anticipazione del dolore

Risultati ottenuti

- A1. Dimostrazione del coinvolgimento della corteccia del giro precentrale dell'emisfero dominante nella rappresentazione dei movimenti di ambedue le mani.
- A2. Dimostrazione di popolazioni neurali della corteccia motoria primaria controlaterale, ed in minor misura ipsilaterale, attivate durante la rappresentazione mentale di movimenti sequenziali delle dita della mano.
- B1. Dimostrazione di un incremento di attività sinaptica, espressa dal segnale medio fMRI, in specifiche regioni corticali e nel talamo mediale durante l'attesa di uno stimolo potenzialmente nocivo. Il segnale fMRI è aumentato sia nell'ambito del sistema dolorifico "laterale" (zona di rappresentazione somatotopica della sede attesa di uno stimolo nella corteccia somatosensoriale primaria) che "mediale" (porzioni della corteccia del cingolo anteriore e posteriore).
- B2. Dimostrazione della modulazione dell'attività di specifiche popolazioni corticali che codificano l'intensità ed il profilo temporale del dolore, situate sia nella corteccia parietale che in aree cingolate e prefrontali, in corso di anticipazione del dolore stesso. Questi dati dimostrano una modulazione cognitiva diretta dell'attività del sistema nocicettivo corticale.
- B3. Dimostrazione dell'esistenza di popolazioni corticali la cui attività è in relazione alle modificazioni neurovegetative (modificazioni della frequenza cardiaca) in corso di aspettativa e di dolore.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

- C.A. Porro, G.P. Biral, C. Benassi, M. Cavazzuti, P. Baraldi, F. Lui, R. Corazza. Neural circuits underlying ketamine-induced oculomotor behavior in the rat: 2-deoxyglucose studies. *Experimental Brain Research*, 124: 8-16, 1999.
- C.A. Porro, M. Cavazzuti, P. Baraldi, D. Giuliani, A.E. Panerai, R. Corazza. Central nervous system pattern of metabolic activity during tonic pain: evidence for modulation by beta-endorphin. *European Journal of Neuroscience*, 11: 874-888, 1999.
- C.A. Porro, R. Corazza. Functional magnetic resonance imaging as a tool for investigating human cortical motor function. *Arch. Ital. Biol.*, 60: 101-114, 1999.
- P. Baraldi, C.A. Porro, M. Serafini, G. Pagnoni, C. Murari, R. Corazza, P. Nichelli. Bilateral representation of sequential finger movements in human cortical areas. *Neuroscience Letters*, 267: 1-4, 1999.

- L. Perissin, P. Facchin, C.A. Porro. Diurnal variations in tonic pain reactions in mice. *Life Sciences*, 67: 1477-1488, 2000.
- C.A. Porro, V. Cettolo, M.P. Francescato, P. Baraldi. Ipsilateral involvement of primary motor cortex during motor imagery. *European Journal of Neuroscience*, 12: 3059-3063, 2000.
- M.L. Gorno-Tempini, S. Pradelli, M. Serafini, G. Pagnoni, P. Baraldi, C. Porro, R. Nicoletti, C. Umiltà, P. Nichelli. Explicit and incidental facial expression processing: an fMRI Study. *Neuroimage*, 14: 465-473, 2001.
- C.A. Porro, P. Baraldi, G. Pagnoni, M. Serafini, P. Facchin, M. Maieron, P. Nichelli. Does anticipation of pain affect cortical nociceptive systems? *Journal of Neuroscience*, 22: 3206-3214, 2002.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Studio dei correlati cerebrali del dolore e dell'analgesia mediante tecniche fMRI basate su "arterial spin labelling"

Sviluppo e validazione di algoritmi per lo studio di singoli eventi fMRI

Studio del ruolo funzionale della corteccia parietale e frontale nell'immagine motoria mediante stimolazione magnetica transcranica

Studio del ruolo funzionale della corteccia cingolata, parietale e frontale nella percezione del dolore mediante stimolazione magnetica transcranica

Collaborazioni internazionali in atto

Functional Imaging Unit, Laboratory of Brain and Cognition, NIMH, Bethesda, 20892-1148 Maryland (USA) (Chief: Dr. Peter Bandettini)

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

- Workstation grafica Silicon Graphics Indy
- Workstation grafica Silicon Graphics O2
- Workstation biprocessore Athlon MP 2000+ con unità di memorizzazione ad alta capacità
- Sistema per la stimolazione magnetica singola e ripetuta Magstim Standard Rapid

Parole Chiave

Corteccia Cerebrale – Dolore – Anticipazione – Sistema motorio - Immagine motoria - Mappatura cerebrale funzionale – Risonanza magnetica funzionale per immagini – Stimolazione magnetica transcranica

UNITA' DI RICERCA INBB
Napoli

Responsabile Scientifico

Raffaele RAGONE

Linea di Ricerca

DAI MESOFILI AI TERMOFILI: UN APPROCCIO GLOBALE ALLA STABILITÀ DELLE PROTEINE GLOBULARI

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Giovanni COLONNA

PO

colonna@unina2.it

Maria CARTENI

PO

maria.carteni@unina2.it

Non Aderenti INBB

Biagio DI MICCO

PA

biagio.dimicco@unina2.it

Luigi AMBROSONE

RU

ambrosion@unibas.it

Angelo FACCHIANO

A

angelo.facchiano@isa.av.cnr.it

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Biochimica e Biofisica, Seconda Università di Napoli

Indirizzo Via Costantinopoli 16, 80138 Napoli

Telefono 0815665869

Fax 0815665869

E-mail ragone@unina2.it

Sezione INBB di appartenenza

Napoli

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Approfondire la conoscenza dell'effetto della temperatura e di altri agenti sugli equilibri di denaturazione delle proteine globulari. Utilizzare il modello della stabilità delle proteine globulari da noi recentemente proposto, basato sulla dissoluzione delle *N*-alchil-ammidi liquide, per analizzare la dipendenza dalla temperatura dell'equilibrio di denaturazione. Identificare gli elementi strutturali che determinano la stabilità termica. Estensione del modello delle *N*-alchil-ammidi liquide a temperature superiori a 100 °C, includendo informazioni sulle proprietà termodinamiche delle *N*-alchil-ammidi solide. Chiarire come i processi di binding e la formazione di complessi sopramolecolari governino le relazioni struttura-funzione in proteine monomeriche ed oligomeriche.

Risultati ottenuti

E' stata caratterizzata la dipendenza dalla concentrazione proteica delle curve di denaturazione di sistemi oligomerici in condizioni isoterme. Si è evidenziato che l'associazione produce strutture quaternarie in grado di resistere a temperature molto elevate, sviluppando nel contempo un quadro d'insieme sulla stabilità termica delle proteine globulari. E' stata condotta un'analisi strutturale comparativa di proteine omologhe da mesofili e da termofili. E' stato studiato il ruolo svolto dai ponti d'idrogeno nella stabilizzazione termica di proteine globulari. Sono stati sviluppati temi di carattere teorico, con implicazioni per l'interpretazione dei dati sperimentali. Infine, sono stati definiti alcuni possibili meccanismi molecolari deputati al controllo della funzione biologica studiando equilibri di auto-associazione (frazione proteica IV da vescicola seminale di ratto), di formazione di complessi sopramolecolari (transglutaminasi/detergente, porina/trombina, platelet-derived growth factor-BB/basic fibroblast growth factor) e di binding [CCK_A-R(1-47)/CCK8].

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

- 1) P. Stiuso, G. Colonna, R. Ragone, M. Caraglia, J. W. B. Hershey, S. Beninati, A. Abbruzzese (1999) Structural organization of the human eukaryotic initiation factor 5A precursor and its site-directed variant Lys50→Arg. *Amino Acids* 16, 91-106.
- 2) C. Esposito, C. Esposito, P. Colicchio, I. Caputo, R. Porta, R. Ragone (1999) Overlapping between fluorescence modifications and activation of prostate transglutaminase induced by sodium dodecyl sulfate. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 366, 47-54.
- 3) A. M. Facchiano, G. Colonna, R. Ragone (1999) Reply to comment *Protein Engineering* 12, 438.
- 4) P. Stiuso, S. Metafora, A. M. Facchiano, G. Colonna, R. Ragone (1999) The self-association of protein SV-IV and its possible functional implications. *European Journal of Biochemistry* 266, 1029-1035.
- 5) A. M. Facchiano, G. Colonna, R. Ragone (1999) An analysis of calorimetric data on mesophilic proteins and its implications for stability to elevated temperatures. *Current Topics in Peptide & Protein Research* 3, 101-109.

- 6) R. Ragone (2000) How the protein concentration affects unfolding curves of oligomers. *Biopolymers* 53, 221-225.
- 7) L. Ambrosone, R. Ragone (2000) Electrochemical methods of evaluating the van't Hoff enthalpy in reactions involving biological macromolecules. *International Journal of Biological Macromolecules* 27, 241-244.
- 8) R. Ragone, S. De Luca, D. Tesaro, C. Pedone, G. Morelli (2000) Fluorescence studies on the binding between 1-47 fragment of cholecystokinin receptor CCKA-R(1-47) and nonsulfated cholecystokinin octapeptide CCK8. *Biopolymers* 56, 47-53.
- 9) B. Di Micco, S. Metafora, G. Colonna, M. Carteni, R. Ragone, M. A. Macalello, P. Di Micco, A. Baroni, P. Catalanotti, M. A. Tufano (2001) Porins from *Salmonella typhimurium* accelerate human blood coagulation by selective stimulation of thrombin activity: implications in septic shock DIC pathogenesis. *Journal of Endotoxin Research* 7, 211-217.
- 10) R. Ragone (2001) Hydrogen-bonding classes in proteins and their contribution to the unfolding reaction. *Protein Science* 10, 2075-2082.
- 11) K. Russo, R. Ragone, A. M. Facchiano, M. C. Capogrossi, A. Facchiano (2002) Platelet-derived growth factor-BB and basic fibroblast growth factor directly interact in vitro with high affinity. *The Journal of Biological Chemistry* 277, 1284-1291.
- 12) R. Ragone (2002) Homocystine solubility and vascular disease. *The FASEB Journal* 16, 401-404.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

- 1) Inclusione delle *N*-alchil-ammidi solide nel modello delle *N*-alchil-ammidi liquide;
- 2) Analisi termodinamica strutturale delle proteine globulari, con attenzione a casi specifici di modifiche naturali della struttura primaria coinvolte nei meccanismi di stabilizzazione termica;
- 3) Individuare linee-guida termodinamiche per la programmazione ed il controllo di esperimenti di ingegneria proteica;
- 4) Analisi del comportamento di sistemi biologici complessi in termini di equilibrio chimico (omeostasi ed effetti ormetici).

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Spettrofotometro; Spettrofluorimetro; Supporto hardware e software per la grafica molecolare.

Parole Chiave

Biotermodinamica; Termofilia; Stabilità delle Proteine; Relazioni struttura-funzione.

UNITA' DI RICERCA INBB
Catania

Responsabile Scientifico

Antonio RAUDINO

Linea di Ricerca

MODELLI TEORICI DI AGGREGATI SUPRAMOLECOLARI

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Antonio RAUDINO	PA	araudino@dipchi.unict.it
-----------------	----	--------------------------

Non Aderenti INBB

Giuseppe BUEMI	PA	gbuemi@dipchi.unict.it
----------------	----	------------------------

Francesco CASTELLI	PO	fcastelli@dipchi.unict.it
--------------------	----	---------------------------

Maria Grazia SARPIETRO	BC	
------------------------	----	--

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Scienze Chimiche, Università di Catania

Indirizzo Dip. Scienze Chimiche, Viale Andrea Doria 6, 95125, Catania

Telefono 095-7385078

E-mail araudino@dipchi.unict.it

Sezione INBB di appartenenza

Catania

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Scopo dell'attuale linea di ricerca è lo sviluppo di modelli matematici (nel campo della termodinamica statistica e della termodinamica di non-equilibrio) per l'interpretazione di diversi sistemi supramolecolari quali membrane lipidiche a più componenti, interazioni membrane-polimeri, aggregati chirali e teoria delle fluttuazioni in diversi fenomeni di self-assembling.

Risultati ottenuti

I principali risultati sono stati la comprensione di diversi comportamenti anomali mostrati da membrane contenenti glicolipidi che mostrano estesi fenomeni di metastabilità ed isteresi termica quando i dati sono confrontati con quelli delle normali membrane fosfolipidiche. Analoga presenza di stati metastabili a lunga vita (dell'ordine dei giorni o settimane) sono stati riscontrati in aggregati chirali cresciuti su matrici polimeriche chirali (DNA, polipeptidi). Le forti analogie con i fenomeni ferromagnetici sono promettenti da un punto di vista interpretativo ed in possibili future applicazioni quali sensori di chiralità locali.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

- 1) Thermal Hysteresis in Ganglioside Micelles Investigated by Differential Scanning Calorimetry and Light Scattering. L. Cantu', M. Corti, E. Del Favero, E. Muller, A. RAUDINO, S. Sonnino. *Langmuir*, 15 (1999) 4975-4980.
- 2) Phase Transition at the Surface of Mixed Micelles of the Ganglioside GM1 and Dodecyl-Phosphocholine. L. Cantu', M. Corti, E. Del Favero, A. RAUDINO. *J. Phys. Condens. Matter*, 12 (2000) 321-325.
- 3) Bistable Molecular Self-Assembling. RAUDINO, L. Cantu', M. Corti, E. Del Favero. Invited paper in: *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 5 (2000) 13-18.
- 4) Lipid Bilayers. A. RAUDINO, M.G. Sarpietro. Invited paper in: *Encyclopedia of Life Sciences*, Nature Publ. Group, Macmillan, London, 2001, 1-6.
- 5) Ternary Porphyrin Aggregates and Their Chiral Memory. R. Purrello, A. RAUDINO, L. Monsu'-Scolaro, A. Loisi, E. Bellacchio, R. Lauceri. *J. Phys. Chem.*, 104 (2000) 10900-10908.
- 6) Tightly Packed Lamellae With Large Conformational Flexibility at the Interfacial Region May Exhibit Multiple Periodicity in Their Repeat Distance. A Theoretical Analysis and X-Ray Verification in Ganglioside Lipid Bilayers. L. Cantu', M. Corti, E. Del Favero, A. RAUDINO. *Langmuir*, 16 (2000) 8903-8911.
- 7) Binding of Lipid Vesicles to Protein-Coated Solid Polymer Surfaces: A Model for Cell Adhesion To Artificial Biocompatible Materials. RAUDINO, A. Cambria, M.G. Sarpietro, C. Satriano. *J. Colloid Interface Sci.*, 231 (2000) 66-73.
- 8) Transport Through Monolayers and Bilayers at Fluid-Fluid Interface. RAUDINO, F. Castelli. Invited paper in: "Encyclopedia of Colloid and Interface Science", Dekker, New York, 5441-5455.

- 9) Porphyrins Binding and Self-Aggregation onto Polymeric Matrix. A Combined Thermodynamic and Modeling Approach. R. Lauceri, T. Campagna, A. RAUDINO, R. Purrello. *Inorganica Chimica Acta*, 317 (2001) 282-289.
- 10) Spectroscopic and Molecular Dynamics Simulation Studies of the Interaction of Insulin with Glucose. Falconi, M. Bozzi, M. Paci, A. RAUDINO, R. Purrello, A. Cambria, M. Sette and M.T. Cambria. *Int. J. Biol. Macromol.*, 29 (2001) 161-168.
- 11) Anomalous Dielectric Behaviour of Undulated Lipid Membranes. Theoretical Model and Dielectric Spectroscopy Measurements of the Ripple Phase of Phosphatidylcholine. RAUDINO, F. Castelli, G. Briganti, C. Cametti. *J. Chem. Phys.*, 115 (2001) 8238-8250.
- 12) From Achiral Porphyrins to Template-Imprinted Chiral Porphyrin Aggregates and Further. Chirality Propagation from Scratch. R. Lauceri, L. Monsu' -Scolaro, N. Micali, A. RAUDINO, R. Purrello. *J. Am. Chem. Soc.*, 124 (2002) 894-895.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Si intende studiare la formazione di micro-dominii di diversa composizione in membrane lipidiche a più componenti. Particolare attenzione sarà rivolta alle miscele fosfolipidi-glicolipidi e fosfolipidi-glicolipidi-colesterolo per le ovvie similitudini con reali sistemi biologici. Su tale progetto è in atto una collaborazione coi Dipartimenti di Biochimica (Milano) e Fisica Medica (Milano) per quel che riguarda la preparazione e purificazione di lipidi opportunamente selezionati e le misure di scattering (luce, raggi X, neutroni), con il Dipartimento di Fisica di Roma 1 (misure dielettriche), il Dipartimento di Chimica dell'Università di Catania (misure calorimetriche e modelli teorici) e l'Università di Lingby, (simulazioni al computer).

Collaborazioni internazionali in atto

- a) Prof. O.G. Mouritsen, Technical University of Denmark, Lingby, Denmark
- b) Prof. A. Blume, Martin Luther University, Halle-Wittenberg, Germany.

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Calorimetro Differenziale a Scansione DSC-30 Mettler, Langmuir-Blodgett apparatus, model KLV, Work Station Sun Ultra 1, Work Station Sun Ultra 60, 3 PC Pentium 3.

Parole Chiave

Lipid Membranes, Self-Assembly, Statistical Mechanics Models, Chiral Aggregates, Non-Equilibrium and Metastable States.

UNITA' DI RICERCA INBB
Potenza

Responsabile Scientifico

Paolo RICCIO

Linea di Ricerca

STUDIO DELLA STRUTTURA DELLA GUAINA MIELINICA E DEL SUO RUOLO NELL'AUTOIMMUNITÀ.
BIOTECNOLOGIE ALIMENTARI.

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Paolo RICCIO	PO	riccio@unibas.it
--------------	----	------------------

Non Aderenti INBB

Grazia Maria LIUZZI	RU	g.m.liuzzi@biologia.uniba.it
Anna FASANO	PT	a.fasano@biologia.uniba.it
Rocco ROSSANO	PT	rr443agr@unibas.it
Giulia CARLONE	DR	Giulia.carlone@biologia.uniba.it
Adele D'AMBROSIO	DR	fs547agr@unibas.it

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Biologia D.B.A.F. - Università della Basilicata

Indirizzo Campus di Macchia Romana - 85100 Potenza

Telefono 0971-205563

Fax 0971-205687

E-mail riccio@unibas.it

Web <http://www2.unibas.it/utenti/riccio>

Dipartimento di Biochimica e Biologia Molecolare - Università di Bari

Indirizzo Via Orabona, 4 - 70126 Bari

Tel. 080-5443376

Sezione INBB di appartenenza

Bari

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

FISIOPATOLOGIA DELLA MIELINA:

Determinare la struttura della guaina mielinica attraverso procedimenti di purificazione delle proteine mieliniche nella forma nativa associata ai lipidi. Studiare quali siano i meccanismi di degradazione della mielina e della barriera ematoencefalica determinati dall'intervento di fattori mielinotossici e in particolare di metalloproteinasi rilasciate da cellule immunocompetenti e/o dalla nevrogliia. Determinare il ruolo della struttura delle proteine mieliniche nell'autoimmunità.

BIOTECNOLOGIE ALIMENTARI

Trovare nuove formulazioni nella produzione dei formaggi.

Recuperare le proteine del siero del latte.

Determinare eventuali collegamenti fra proteine alimentari e patologie nell'uomo.

Stabilire la freschezza del pesce e il possibile impatto nelle allergie.

Risultati ottenuti

MIELINA: Studi sulla struttura: Purificazione di tre proteine mieliniche nella forma nativa, associata ai lipidi mielinici. Tali proteine sono più strutturate e compatte rispetto alle forme lipid-free.

Studi sulla degradazione della guaina mielinica in patologia: Una delle metalloproteinasi di matrice (MMP), la MMP-9, è presente a livelli elevati nel siero e nel liquor di pazienti con MS. Tale aumento è correlato allo stadio clinico della malattia ed è sensibile al trattamento con interferone beta. L'incremento dei livelli liquorali di MMP-9, riscontrato nei pazienti con MS, è dovuto a sintesi intratecale della MMP-9. Anche nel liquor di pazienti HIV-positivi con malattie neurologiche correlate all'infezione da HIV si osserva un incremento dell'attività della MMP-9.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

1. Liuzzi G.M., Santacroce M.P., Peumans W.J., Van Damme E.J.M., Dubois B., Opdenakker Gh., Riccio P. (1999) Regulation of gelatinases in microglia and astrocyte cell cultures by plant lectins. *Glia*. **27**, 53-61. (IF'98: 3.67).
2. Trojano M., Avolio C., Liuzzi G.M., Ruggieri M., Defazio G., Liguori M., Santacroce M.P., Paolicelli D., Giuliani F., Riccio P., Livrea P. (1999) Changes of serum soluble ICAM-1 and Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) induced by 18 months Interferon beta-1b treatment in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurology* **53**, 1402-1408. (IF'98: 4.97).
3. Riccio P., Borenshtein N., Fasano A., Bleve-Zacheo T., and Kirschner D.A. (2000) Multilamellar Packing of Myelin Modeled by Lipid-Bound MBP. *J. Neurosci. Res.* **59**, 513-521. (IF'98: 2.87).
4. Facci P., Cavatorta P., Cristofolini L., Fasano A., Fontana M.P., Riccio P. (2000) Kinetic and Structural Study of the Interaction of Myelin Basic Protein with Phospholipid Layers. *Biophysical J.* **78**, 1413-1419. (IF'98: 4.52).
5. Ristori G., Salvetti M., Pesole G., Attimonelli M., Buttinelli C., Martin R. Riccio P. (2000) Compositional Bias and Mimicry toward the Nonself Proteome in Immunodominant Epitopes of Self and Nonself Antigens. *FASEB J.* **14**, 431-438. (IF'98: 13.86).
6. Liuzzi, G.M., Mastroianni C.M., Massetti A.P., Santacroce M.P., Fanelli M., Vullo, V., Riccio.P. (2000) Increased levels of gelatinase B activity in cerebrospinal fluid of patients with HIV-associated neurological diseases. *J. NeuroVirology*. **6**, 156-163. (IF'98: 1.79).
7. Ristori G., Montesperelli C., Perna A., Cannoni S., Battistini L., Borsellino G., Riccio P., Pesole G., Chersi A., Pozzilli C., Buttinelli C., Salvetti M. (2000) Global immune dysregulation in multiple sclerosis: from the adaptive response to the innate immunity. *J. Neuroimmunol.* **107**, 216-219. (IF'98: 3.29).
8. Cavaletti G., Celon S., Marmiroli P., Matà S., Fasano A., Lolli F., Riccio P., Tredici G. (2000) Lipid-free versus lipid-bound P2 protein-induced experimental allergic neuritis: a clinico-pathological, neurophysiological and immunological study. *J. Neurosci. Res.* **62**, 709-716. (IF'98: 2.87).
9. Chignola R., Cestari T., Brendolan A., Fracasso G., Guerriero C., Gobbo M., Amato S., Riviera A.P., Sartoris S. Liuzzi G.M., Riccio P., Tridente G., Andrighetto G. (2000) Expression of myelin basic protein (MBP)-like epitopes in human non-neural cells revealed by two novel anti-MBP monoclonal antibodies. *Clin. Exp. Immunol.* **122**, 429-436. (IF'98: 2.68).
10. Rossano R., D'Elia A., Riccio P. (2001) One-Step Separation from Lactose, Recovery and Purification of Major Cheese-Whey Proteins by Hydroxyapatite. A Flexible Procedure Suitable for Small and Medium Scale Preparations. *Prot. Expr. Purif.* **21**, 165-169. (IF'98: 1.38).
11. Ristori G., Montesperelli C., Fiorillo M.T., Battistini L., Chersi A., Sorrentino R. Borsellino G., Perna A., Tramonti D., Cannoni S. Perrone M.P. Giubilei F., Riccio P., Buttinelli C., Salvetti M. (2001) T cell response to N-formylated peptides in humans. *Eur. J. Immunol.* **31**, 2762-70 (IF'98: 5,44)
12. Liuzzi G.M., Trojano M., Fanelli M., Avolio C., Fasano A., Livrea P., Riccio P. (2002) Intrathecal synthesis of matrix metalloproteinase-9 in patients with multiple sclerosis: Implication for pathogenesis. *Multiple Sclerosis*, **8**, 222-228.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

MIELINA: Migliore conoscenza della struttura della mielina attraverso studi di ricostituzione in liposomi delle proteine purificate e applicazione di tecniche biofisiche e biochimiche (SAXS, SANS, CD, MS, raggi x, cristallizzazione, elettroforesi varie). Determinare le variazioni di espressione delle MMP in cellule immunocompetenti e gliali, anche in presenza di farmaci. Chiarire il ruolo delle proteine mieliniche nella sclerosi multipla.

BIOTECNOLOGIE ALIMENTARI: Produzione di formaggi con coagulanti naturali estratti da crostacei o da cardi. Nuovo procedimento per il recupero delle proteine del siero del latte. Analisi della freschezza del pesce. Butirrofilina e sclerosi multipla.

Collaborazioni internazionali in atto

Dr. H. Haas, BTE, Munich, Germany;

Dr. J. Sedzik Department of Biosciences, Karolinska Institute of Structural Virology, Huddinge, Sweden.

Dr. Roland Martin, NIH, Bethesda.

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Spettrometro di massa MALDI ToF della Amersham Biosciences;

Elettroforesi capillare della Bio-Rad

Elettroforesi bidimensionale della Amersham Biosciences

FPLC

Laboratorio per Colture Cellulari completo di tre microscopi.

Parole Chiave

Mielina – Struttura proteine - Sclerosi multipla – NeuroAIDS – Autoimmunità - Latte – Formaggi - Pesce

UNITA' DI RICERCA INBB
Padova

Responsabile Scientifico

Adelio RIGO

Linea di Ricerca:

STRUTTURA-FUNZIONE DI BIOMOLECOLE COINVOLTE NELLE REAZIONI DI OSSIDO-RIDUZIONE

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Adelio RIGO	PO Biofisica	adelio.rigo@unipd.it
Fabio VIANELLO	PA Biofisica	fabio.vianello@unipd.it
Maria Luisa DI PAOLO	RU	marialuisa.dipaolo@unipd.it
Lucio ZENNARO	RU	lucio.zennaro@unipd.it

Non Aderenti INBB

Monica ROSSETTO	DR	monica.rossetto@unipd.it
Paola VANZANI	DR	paola.vanzani@unipd.it

Sede Unità di Ricerca

Università di Padova - Dipartimento...di Chimica Biologia

Indirizzo: Via G. Colombo 3

Telefono: 049-8276107

Fax: 049-8073310

E-mail: adelio.rigo@unipd.it

Sezione INBB di appartenenza

Padova

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Lo scopo delle attività di ricerca svolte negli ultimi 3 anni è stato quello di ottenere informazioni sia sulla funzione che sulla struttura di biomolecole coinvolte in processi di ossido riduzione. L'obiettivo finale è quello di riuscire ad individuare sia le correlazioni fra attività e struttura delle biomolecole che i fattori bio-chimico-fisici che modulano la loro funzione. Tali obiettivi sono di primaria importanza per:

- mettere in luce i vari tipi di interazioni che controllano il "docking" di molecole (substrati ed inibitori) con il sito catalitico di alcuni metallo-enzimi (ammino ossidasi e superossido dismutasi, etc.);
- tudiare il ruolo di alcuni metalli pesanti, ad esempio rame e manganese, nei processi di invecchiamento e di alcune malattie neurodegenerative in cui intervengono specie reattive dell'ossigeno molecolare;
- chiarire i meccanismi dei processi delle molecole dotate di "attività antiossidante";
- ottenere le informazioni da utilizzare per l'impiego di queste molecole in campo bio-tecnologico.

Risultati ottenuti

I risultati ottenuti possono essere suddivisi in base ai diversi campi appartenenti a questa linea di ricerca.

- Ammino ossidasi. Sono stati oggetto di studio sia due diverse ammino ossidasi contenenti lo ione rame: una purificata da plasma bovino ed una da germogli di pisello. Per individuare le correlazioni struttura-funzione, sono state utilizzate come sonde del sito attivo substrati ed inibitori caratterizzati da diverse strutture chimiche e/o distribuzioni di carica. Si è riusciti così ad ottenere un modello del sito attivo dell'ammino ossidasi di origine bovina, mentre nel caso dell'ammino ossidasi da germogli di pisello, grazie agli studi di meccanica e dinamica molecolare condotti dall'Unità di Trento (prof.ssa Scarpa) i risultati degli studi cinetici sono stati correlati alla struttura risolta del sito attivo ed individuare i residui importanti nel meccanismo catalitico. In entrambi i casi è emerso come le interazioni elettrostatiche abbiano un ruolo chiave nell'interazione con substrati fisiologici e/o inibitori.
- Superossido dismutasi (SOD) ed "enzyme mimics" con attività superossido dismutasica. E' stata studiata una nuova superossido dismutasi purificata da foglie di tabacco dall'Unità di Catania (Prof. Cambria). I risultati ottenuti che hanno dimostrato l'elevata attività catalitica e stabilità termica di questa SOD. Sono stati progettati e sintetizzati una serie di mimics delle Cu, Zn superossido dismutasi che hanno dimostrato una buona attività catalitica nel dismutare lo ione superossido e nell'ossidazione dell'ascorbato.
- E' stato studiato il ruolo di alcune specie reattive dell'ossigeno molecolare nella formazione del dopa-amminocromo a partire della dopamina in presenza di perossidasi nel cervello di ratto.

- Flavonoidi . Sono stati oggetto di studio queste molecole molto diffuse in natura caratterizzate da una notevole capacità antiossidante, ed in particolare quella di catturare radicali liberi altamente reattivi . Sono stati sviluppati e messi a punto metodi per valutarne le proprietà antiossidante i ed i meccanismi con cui intervengono nei processi di "scavenging" di radicali liberi.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

- 1) Galzigna, L., Schiappelli, M. P., Rigo, A., & Scarpa, M.(1999)
A rat brain fraction and different purified peroxidases catalyzing the formation of dopaminochrome from dopamine
Biochim. Biophys. Acta 1427 , 329-336.
- 2) Corazza, A., Vianello, F., Zennaro, L., Gourova, N., Di Paolo, M. L., Signor, L., Marin, O., Rigo, A. & Scarpa, M. (1999) Enzyme mimics complexing Cu(II) ion: structure-function relationship
J. Peptide Res. 54, 491-504.
- 3) Rigo, A., Vianello, F., Clementi, G., Rossetto, M., Scarpa, M., Vrhovsek, U. & Mattivi, F. (2000)
Contribution of proanthocyanidins to the peroxy radical scavenging capacity of some Italian red wines.
J. Agric. Food. Chem. 48, 1996-2002.
- 4) Scarpa, S., Corazza, A., Vianello, F., Rigo, A., Furian, L., Baldan, N., & Rigotti, P. (2001)
Deuterium nuclear magnetic resonance for evaluating the metabolic status of livers subjected to warm ischemia.
Transplantation 71, 1515-1517
- 5) Rossetto, M., Vianello F., Rigo, A., Vrhovsek, U., Mattivi, F. & Scarpa, M. (2001)
Stable free radicals as ubiquitous components of red wines.
Free Radical Res. 35, 933-939
- 6) Ragusa, S., Cambria, M.T., Scarpa, M., Di Paolo, M.L., Falconi, M., Rigo, A. & Cambria, A. (2001)
Properties of purified cytosolic isoenzyme I of Cu, Zn,-superoxide dismutase from nicotiana glauca leaves.
Prot. Expr. Purif. 23, 261-269 (2001).
- 7) Di Paolo, M.L., Scarpa, M., Corazza, A., Stevanato, R. and Rigo, A. (2002) "Binding of cations of group IA and IIA to bovine serum amine oxidase. Effect on the activity. "
Biophysical J. (in press)
- 8) Di Paolo, M.L., Stevanato, R., Corazza, A., Vianello, F., Lunelli, L., Scarpa, M., and Rigo, A. "A study of electrostatic versus hydrophobic interactions between bovine serum amine oxidase and its substrates."
Biochem.J. submitted
- 9) Rossetto, M., Vanzani, P., Mattivi, F., Scarpa, M., Rigo, A. (2002)
Synergistic antioxidant effect of catechin and malvidin on lipid peroxidation
Arch. Biochem. Biophys., submitted

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

1. Determinare l'influenza di parametri fisici e strutturali del sito attivo di proteine sulla attività enzimatica. Tra i parametri saranno considerati: le costanti di ionizzazione dei residui ammino acidici presenti nel sito attivo, la costante dielettrica locale, l'idrofobicità del sito attivo, i tempi di correlazione della dinamica molecolare;
2. Comprendere i meccanismi di trasferimento degli elettroni in alcune classi di antiossidante , con particolare riguardo agli aspetti sinergici.
3. Studiare la formazione e le possibili funzioni dei complessi dello ione rame e di altri ioni di metalli pesanti con biomolecole coinvolte in processi neurodegenerativi.
4. Progettare nuovi analoghi sintetici (polipeptidi) di enzimi contenenti lo ione rame, manganese etc., in base a studi di modelling.

Collaborazioni internazionali in atto

Dr. Monika Fuxreiter, Mount Sinai School of Medicine, New York (USA) e Università di Budapest (Ungheria)

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

NMR Bruker 300 MHz; NMR a frequenza variabile; ESR Bruker; Spettrofotometri; Stazione grafiche e di calcolo

Parole Chiave

Ammino ossidasi; Superossido dismutasi; Peptici; Polifenoli; Antiossidanti

UNITA' DI RICERCA INBB
Padova

Responsabile Scientifico

Adelio RIGO

Linea di Ricerca:

DISPOSITIVI BIOELETTRONICI PER LO STUDIO E CARATTERIZZAZIONE DI BIOMOLECOLE E BIOSISTEMI

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Adelio RIGO	PO Biofisica	adelio.rigo@unipd.it
Fabio VIANELLO	PA Biofisica	fabio.vianello@unipd.it
Maria Luisa DI PAOLO	RU	marialuisa.dipaolo@unipd.it
Lucio ZENNARO	RU	lucio.zennaro@unipd.it

Non Aderenti INBB

Monica ROSSETTO	DR	monica.rossetto@unipd.it
Paola. VANZANI	DR	paola.vanzani@unipd.it

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Chimica Biologica - Università di Padova

Indirizzo Via G. Colombo 3

Telefono 049-8276107

Fax 049-8073310.

E-mail adelio.rigo@unipd.it

Sezione INBB di appartenenza

Padova

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Esplorare le possibilità di impiego di materiali ed architetture biologiche, in sistemi di trasduzione, amplificazione, immagazzinamento ed elaborazione dell'informazione per la creazione di nuovi dispositivi e/o sistemi per la caratterizzazione di biomolecole e biosistemi.

Risultati ottenuti

Le ricerche in questo settore hanno avuto per oggetto la costruzione e messa a punto di dispositivi bioelettronici e di sonde per il riconoscimento e la quantificazione di molecole di interesse nel campo della biomedicina e nel campo ambientale e l'amplificazione di segnali mediante biosistemi. Per ottenere questi risultati, da un lato sono stati messi a punto procedimenti di purificazione originali di enzimi con capacità di trasferimento elettronico, il loro assemblaggio in films monomolecolari, dall'altro lato sono state sviluppate procedure per il loro ancoraggio su superfici trasduttrici di varia natura ed in particolare sul silicio e oro. I films monomolecolari sviluppati sono stati utilizzati nella costruzione e messa a punto di sistemi di rivelazione di biomolecole e di inquinanti ambientali.

Sono stati sviluppati nuovi metodi basati sull'impiego di sonde nucleari ed elettroniche di varia natura per lo studio di biosistemi da impiegare nel campo ambientale (monitoraggio di inquinanti), della bioelettronica e della biomedicina (attività amilasica, trapianto d'organi etc.).

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

Marcazzan, M., Vianello, F., Scarpa, M., & Rigo, A. (1999)

An ESR method for α -amylase activity on succinylated starch; amylose and amylopectin.

J. Biochem. Biophys. Methods 38, 191-202.

Vianello, F., Malek-Mirzayans, A., Di Paolo, M.L., Stevanato, R., & Rigo, A. (1999).

Purification and characterisation of amine oxidase from pea seedlings.

Prot. Expr. Purif. 15, 196-201 (1999)

Vianello, F., Zennaro, L., Di Paolo, M.L., Rigo, A., Malacarne, C. & Scarpa, M. (2000)

Preparation, morphological characterization and activity of thin films of horseradish peroxidase.

Biotechnology and Bioengineering, 68, 489-495.

Scarpa, S., Corazza, A., Vianello, F., Rigo, A., Furian, L., Baldan, N., & Rigotti, P. (2001)

Deuterium nuclear magnetic resonance for evaluating the metabolic status of livers subjected to warm ischemia.
Transplantation, 71, 1515-1517

Vianello, F., Bortoluzzi, S., Zennaro, L., & Rigo, A. (2002)
Determination of glucose oxidase immobilised as monolayer onto a flat surface
J. Biochem. Biophys. Methods, 51, 263-271

Corazza A., Vianello F., Rigo A., Cadrobbi R., Baldan N., Rigotti P., Scarpa M. (2002)
Biphasic behavior of the kinetics of ^{31}P -containing metabolites in ischemic porcine kidneys
Transpl. Int. Submitted

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Verranno sviluppati nuovi sistemi che permettano da un lato il trasferimento controllato degli elettroni da biomolecole al trasduttore e viceversa al fine di ottenere la trasduzione e immagazzinamento sia dell'energia che dell'informazione: Questi sistemi verranno utilizzati, oltre che nella costruzione di dispositivi bioelettronici, nella rivelazione e quantificazione di molecole in tracce di particolare interesse nel campo biomedico ed ambientale.

Collaborazioni internazionali in atto

Prof. B. Hock University of Munchen (Germany)

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

NMR300 MHz (Bruker)
NMR a campo variabile
Microscopio STM AFM (Park)
EPR ED 200 Bruker
Stazione elettrochimica

Parole Chiave

Biosensori
Films monomolecolari
Trasferimento elettronico
Metallo proteine
Sonde nucleari

UNITA' DI RICERCA INBB
Napoli

Responsabile Scientifico
Giuseppe ROBERTI

Linea di Ricerca
APPLICAZIONE DI TECNOLOGIE ELETTRICO-OTTICHE AVANZATE ALLA MEDICINA

Composizione del Gruppo
Non Aderenti INBB

Patrizia RICCIO	RU	Pariccio@unina.it
Ilaria IACCARINO	BC	
Maddalena AUTIERO	BC	

Sede Unità di Ricerca
Facoltà di Medicina e Chirurgia - Università degli studi di Napoli "Federico II"

Indirizzo Via Pansini, 5- 80131 Napoli
Telefono 081/7463476
Fax 081/7463476
E-mail Roberti@unina.it

Sezione INBB di appartenenza
Napoli

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

L'attività di ricerca dell'unità operativa è rivolta alla diagnostica tumorale *in vivo* ed *in vitro* mediante spettroscopia ad alta sensibilità e spettroscopia risolta in tempo della radiazione LIF endogena od esogena e mediante misure di transilluminazione laser nell'infrarosso in continua e "time-gated". Inoltre, sono studiati i processi di fotoattivazione laser lineare e non lineare di fotosensibilizzanti da utilizzare nella terapia fotodinamica dei tumori. Infine, la radiazione di fluorescenza viene utilizzata per mettere a punto tecniche di marcatura fluorescente di materiale biologico anche attraverso optoporazione laser di cellule. Lo studio del trasporto dei fotoni nei mezzi diffondenti come i tessuti biologici è stato modellizzato realizzando un programma parallelo di simulazioni numeriche basato su tecniche Monte Carlo prima su il calcolatore parallelo Cray T3 E del Cineca poi sul cluster BEOWULF operante presso lo stesso consorzio.

Risultati ottenuti

1) fotoattivazione di farmaci antitumorali e fotosensibilizzanti in genere

Sono stati studiati *in vivo* su pazienti gli effetti della Terapia Fotodinamica su verruche plantari con somministrazione topica di Acido delta-AmminoLevulinico noto per la sua proprietà di interferire nel ciclo di produzione endogena delle heme da parte dell'organismo e, quindi, di essere responsabile dell' accumulo nei tessuti di un precursore dell'ematoporfirina, la PpIX. L'irraggiamento con luce con spettro piccato a 630 nm e alla dose di 50 J/cm² produce la risoluzione del 75% dei casi trattati contro il solo 22% dei controlli. La produzione dell'agente fotoattivante PpIX è stato dimostrato con misure di spettroscopia di fluorescenza *in vivo*.

2) spettroscopia di tessuti biologici "ex vivo" ed "in vivo"

E' stata studiata la radiazione di autofluorescenza emessa da tessuti murini sani e tumorali, eccitati alla lunghezza d'onda di 337.1 nm con un laser ad Azoto, attraverso misure nel dominio spettrale e temporale. Si è trovato che l'intensità di autofluorescenza ed il tempo di decadimento di fluorescenza del tessuto patologico sono indicatori diagnostici efficaci di patologie tumorali. Infatti nella regione 400-500 nm sia l'intensità di fluorescenza che la vita media della componente veloce del decadimento di fluorescenza risultano più basse nei tessuti tumorali che in quelli sani.

3) Transilluminazione laser di campioni biologici

Misure di transilluminazione su soluzioni acquose assorbenti e diffondenti di Intralipid 10% e inchiostro e l'utilizzo di un modello numerico di trasporto dei fotoni nei mezzi diffondenti basato su tecniche Monte Carlo e implementato sul calcolatore parallelo Cray T3E del CINECA ci hanno permesso di determinare un nuovo e più affidabile valore del coefficiente di scattering dell'Intralipid a 820 nm e una modifica alla legge di scala di questa grandezza al variare della concentrazione di Intralipid nelle miscele acquose.

In collaborazione con il gruppo di fisica della materia operante presso l'Università dell'Insubria (resp. Prof.ssa Andreoni) sono stati effettuati esperimenti di cross-correlazione non collineare di seconda armonica in un cristallo di Beta-borato di bario al fine di rivelare oggetti immersi in mezzi altamente diffondenti. Si è mostrato che questa tecnica permette di aumentare la rivelabilità degli oggetti all'interno del mezzo.

4) modellistica del trasporto di fotoni nei tessuti biologici

Per ridurre il tempo di calcolo estremamente elevato delle simulazioni MC è stato sviluppato un programma Monte Carlo per il computer parallelo Cray T3E (128 DEC Alpha EV5 nodes, 600 Mflops) del CINECA. Il programma è stato dotato di una routine per il calcolo dei numeri casuali basata su un generatore di numeri pseudocasuali di Fibonacci con una lunghezza di sequenza molto elevata. La struttura parallela del programma permette di ridurre di un fattore 100 i tempi di esecuzione e quindi di rendere possibili simulazioni non realizzabili con programmi a singolo processore.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

Colasanti A., Kisslinger A., Liuzzi R., Quarto M., Riccio P., Roberti G., Tramontano D., Villani F.: 2000, Hypericin photosensitization of tumor and metastatic cell lines of human prostate, J. Photochem. Photobiol. B: Biol., 54, 103-107.

Colasanti A., Kisslinger A., Fabbrocini G., Liuzzi R., Quarto M., Riccio P., Roberti G., Villani F.: 2000, MS-2 fibrosarcoma characterization by laser induced autofluorescence, Laser in Med. and Surg., 26, 441-448.

Colasanti A., Guida G., Kisslinger A., Liuzzi R., Quarto M., Riccio P., Roberti G., Villani F.: 2000, Multiple processor version of a Monte Carlo code for photon transport in turbid media, Comp. Phys. Com., 132, 84-93.

Fabbrocini G., M. P. Di Costanzo, A. M. Riccardo, M. Quarto, A. Colasanti, G. Roberti, G. Monfrecola: 2001, Photodynamic therapy with topical α -aminolevulinic acid for the treatment of plantar warts, J. Photochem. Photobiol. B: Biology, 61, 30-34.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Si intende proseguire le ricerche nel campo della fotoattivazione utilizzando fotosensibilizzanti di nuovo tipo e nel campo della diagnostica attraverso fluorescenza, studiando patologie dermatologiche su pazienti e su biopsie. Lo studio della transilluminazione proseguirà sia con misure di trasmittanza risolta in tempo sia con misure di conteggio di singolo fotone di disomogeneità immerse in soluzioni fortemente diffondenti e con misure di imaging di oggetti riflettenti od opachi attraverso la cross-correlazione non collineare in cristalli di beta borato di bario. I programmi di simulazione del trasporto dei fotoni nei mezzi fortemente diffondenti saranno aggiornati alle risorse di calcolo parallelo disponibili e ai problemi da trattare (per esempio per le misure di tempo di volo sono necessarie valori di trasmittanza con alta risoluzione temporale e angolare). Le tecniche di imaging per fluorescenza saranno integrate in un'unica apparecchiatura con tecniche di imaging con radiazione γ e rivelatori a strisce di silicio.

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Laser ad azoto PTI PL 2300 + laser a colorante PTI

Laser cw ad ioni di argon COHERENT + laser a coloranti COHERENT

Laser a Mode-Locking attivo-passivo Nd:YAG Quanta System SyLP01

Diodo Laser Hamamatsu PLP-02

Sistema per spettroscopia e imaging "time-gated": (spettrografo a reticolo CHROMEX 500 IS/SM

rivelatore a matrice di CCD 512x512 EG&G OMA VISION 4000 intensificatore MCP più impulsatore di durata e ritardo variabile)

Fluorimetro a doppio fascio PERKIN-ELMER LS50

Analizzatore digitale di segnali Tektronix CSA 803A

Parole Chiave

Fotoattivazione laser, Laser Induced Florescence (LIF), Transilluminazione, Trasporto dei fotoni nei mezzi diffondenti, simulazioni MonteCarlo

UNITA' DI RICERCA INBB
Napoli

Responsabile Scientifico

Francesco ROSSI

Linea di Ricerca

MODULAZIONE E CONTROLLO FARMACOLOGICO DEI SISTEMI CARDIOVASCOLARE E RESPIRATORIO
E DELLA NOCICEZIONE

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Francesco ROSSI	PO	francesco.rossi@unina2.it
Enrico LAMPA	PO	enrico.lampa@unina2.it

Non Aderenti INBB

Ciro VACCA	PA	ciro.vacca@unina2.it
Liberato BERRINO	PA	liberato.berrino@unina2.it
Amelia FILIPPELLI	PA	amalia.filippelli@unina2.it
Walter FILIPPETTI	FT	walter.filippetti@unina2.it
Sabatino MAIONE	PA	sabatino.maione@unina2.it
Michele D'AMICO	RU	michele.d'amico@unina2.it
Bruno D'AGOSTINO	RU	bruno.dagostino@unina2.it
Maddalena FALCIANI	A	maddalena.falciani@unina2.it
Maria Redenta VITELLI	BC	
Giuseppina MARROCCO	BC	
Barbara RINALDI	A	
Patrizia OLIVA	DR	
Enza PALAZZO	CT	enza.palazzo@unina2.it
Ferdinando ESPOSITO	A	
Ida MARABESE	CT	ida.marabese@unina2.it
Vito DE NOVELLIS	RU	vito.denovellis@unina2.it
Clara DI FILIPPO	A	
Filomena MAZZEO	DR	filomena.mazzeo@unina2.it
Giulia MOTOLA	DR	
Adriana PALLA	PT	adriana.palla@unina2.it

Sede Unità di Ricerca

Dip. Di Medicina Sperimentale - Sezione di Farmacologia "Leonardo Donatelli" - Seconda Università degli Studi di Napoli

Indirizzo Via Costantinopoli, 16

Telefono 081-5665877

Fax 081-5667600

E-mail francesco.rossi@unina2.it

Sezione INBB di appartenenza

Napoli

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

L'attività di ricerca è stata indirizzata verso lo studio della farmacologia cardiovascolare, respiratoria e della nocicezione.

Nell'ambito della farmacologia cardiovascolare sono stati condotti studi in vivo sul ruolo di peptidi vasoattivi nella modulazione centrale della funzione cardiovascolare in vari modelli di ipertensione sperimentale. Sono stati condotti studi in vivo ed in vitro sui meccanismi patogenetici che sottendono l'infarto del miocardio in condizioni di diabete e si è cercato di identificare i targets molecolari responsabili delle alterazioni cardiache che insorgono in questa patologia. Inoltre, sono stati condotti studi sul ruolo dei leucociti polimorfonucleati neutrofili nel danno miocardico da ischemia-riperfusion e studi su colture primarie di cardiomiociti di ratto allo scopo di chiarire i meccanismi regolatori del pathway del calcio. Infine, sono stati condotti ulteriori studi di biologia molecolare sugli oligonucleotidi antisense per valutare il loro utilizzo nella prevenzione della stenosi arteriosa e come farmaci antiipertensivi.

Per quanto riguarda la farmacologia respiratoria, sono stati condotti studi in vitro e in vivo: i primi diretti ad indagare i mediatori coinvolti nel controllo del tono broncomotore e della flogosi nell'asma bronchiale; i secondi volti a definire il

ruolo dei neuropeptidi nella iperresponsività delle vie aeree indotta da Par j1, il maggior allergene della *Paritaria judaica*, il cui polline è responsabile della maggior parte delle sensibilizzazioni allergiche nella parte meridionale del Mediterraneo. Inoltre si è indagato sul possibile effetto protettivo degli APLs (Altered Peptides Ligands - peptidi analoghi dell'epitopo immunodominante, contenenti una sola sostituzione aminoacidica nella sequenza rispetto al peptide wild type) in animali sensibilizzati ed esposti a challenge con l'allergene.

Nella modulazione farmacologia della nocicezione, sono stati condotti studi atti a valutare il ruolo della trasmissione glutammatergica e cannabinergica nei processi neuroadattativi centrali coinvolti nell'induzione dell'iperalgisia e dell'allodinia. Inoltre è stato evidenziato il coinvolgimento dei recettori metabotropi del glutammato nei meccanismi che determinano la genesi ed il mantenimento del dolore cronico e come l'attivazione di tali recettori induce cambiamenti funzionali nei circuiti delle corna dorsali, spesso associati a eventi eccitotossici, come la morte neuronale.

Risultati ottenuti

Per quanto riguarda la farmacologia cardiovascolare: a) è stato dimostrato il ruolo del peptide endotelina-1 nel controllo della funzione cardiovascolare in ratti con ipertensione indotta da desossicorticosterone acetato e da ouabaina somministrata cronicamente; b) è stata evidenziata l'interazione centrale e periferica dell'endotelina con mediatori della funzione cardiovascolare quali l'ouabaina nel controllo della pressione arteriosa, dei flussi sanguigni e delle resistenze vascolari periferiche; c) *in vitro* è stato studiato il coinvolgimento di tale peptide nelle alterazioni della contrattilità cardiaca e coronarica in condizioni di elevate concentrazioni di glucosio; d) è stata identificata l'iperglicemia come fattore prognostico sfavorevole in corso di infarto del miocardio nel diabete sperimentale ed è stata valutata la formazione di radicali liberi dell'ossigeno, comparsa di fenomeni apoptotici iperglicemia-indotti e alterazione di fattori angiogenetici in questo modello sperimentale; e) si è dimostrato l'effetto protettivo dell'annexina 1 nell'infarto sperimentale previa riduzione dell'infiltrazione neutrofila nel tessuto miocardico; f) è stato dimostrato un effetto di prevenzione della stenosi e restenosi arteriosa e dell'ipertensione in ratti milano geneticamente prevalentemente da parte di oligonucleotidi antisense per i recettori dell'angiotensina II.

Riguardo alla farmacologia respiratoria, lo studio funzionale ha dimostrato che gli animali sensibilizzati ed esposti all'antigene mostrano un incremento significativo della responsività delle vie aeree all'istamina. Dai primi risultati ottenuti si può desumere che il pretrattamento con APLs possa essere capace di inibire tale iperresponsività. Pertanto da questi primi dati appare evidente che gli APLs possano svolgere un effetto protettivo sull'iperresponsività delle vie aeree in animali sensibilizzati ed esposti a *challenge* con l'allergene.

Per quanto attiene allo studio della nocicezione, è stato dimostrato che a livello dell'are PAG, il glutammato attraverso la stimolazione di particolari sottogruppi recettoriali potrebbe modulare l'effetto antinocicettivo indotto dai cannabinoidi. Studi morfologici e molecolari hanno dimostrato che la morte dei neuroni del midollo spinale da neuropatia periferica indotta sperimentalmente, sembrerebbe avvenire mediante un meccanismo programmato di morte cellulare (apoptosi).

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

1. MAIONE S., MARABESE I., OLIVA P., ROSSI F.SCA., MARABESE I., TRABACE L., ROSSI F.: *Effects of persistent nociception on periaqueductal gray release glycine*. Neuroscience, **97**: 311-316, 2000.
2. D'AMICO M., DI FILIPPO C., LA M., SOLITO E., MCLEAN PG., FLOWER RJ., OLIANI SM., PERRETTI M.: *Lipocortin 1 reduces myocardial ischemia-reperfusion injury by affecting local leukocyte recruitment*. FASEB J. 2000 Oct;14(13):1867-9.
3. MAIONE S., OLIVA P., MARABESE I., PALAZZO E., ROSSI F.SCA., BERRINO L., ROSSI F.: *PAG matter metabotropic glutamate receptors modulate formalin-induced nociception*. Pain, **85**: 183-189, 2000.
4. MARFELLA R., NAPPO F., DE ANGELIS L., SINISCALCHI M., ROSSI F., GIUGLIANO D.: *The effect of acute hyperglycaemia on Qtc duration in healthy man*. Diabetologia, **43**: 571-575, 2000.
5. LA M., D'AMICO M., BANDIERA S., DI FILIPPO C., OLIANI SM., GAVINS FN., FLOWER RJ., PERRETTI M.: *Annexin 1 peptides protect against experimental myocardial ischemia-reperfusion: analysis of their mechanism of action*. FASEB J. **15**(12):2247-56, 2001
6. PALAZZO E., MARABESE I., DE NOVELLIS V., OLIVA P., ROSSI F., BERRINO L., ROSSI F.SCA., MAIONE S.: *Metabotropic and NMDA glutamate receptors participate in the cannabinoid-induced antinociception*. Neuropharmacology, **20**: 319-326, 2001
7. FALCIANI M., RINALDI B., D'AGOSTINO B., MAZZEO F., ROSSI S., NOBILI B., ROSSI F., FILIPPELLI A.: *Effects of nebivolol on human platelet aggregation*. J. Cardiovasc.Pharmacol. **38**: 922-29; 2001
8. D'AGOSTINO B., ADVENIER C., FALCIANI M., GALLELLI L., MARROCCO G., PIEGARI E., FILIPPELLI A., ROSSI F.: *Endothelin-1 increases cholinergic nerve-mediated contraction of human bronchi via tachykinin synthesis induction*. Br.J.Pharmacol. **134**: 1447-54; 2001
9. CERIELLO A., QUAGLIARO L., D'AMICO M., DI FILIPPO C., MARFELLA R., NAPPO F., BERRINO L., ROSSI F., GIUGLIANO D.: *Acute hyperglycaemia induces nitrotyrosine formation and apoptosis in perfused heart from rat*. Diabetes. **51**: 1076-1082, 2002

10. D'AGOSTINO B., ADVENIER C., de PALMA R., GALLELLI L., MARROCCO G., ABBATE G. F., ROSSI F.: The involvement of sensory neuropeptides in airway hyper-responsiveness in rabbits sensitized and challenged to *Parietaria judaica*. Clin. Exp. All. 32: 472-479, 2002.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Il programma di ricerca in tema di farmacologia cardiovascolare si prefigge, in particolare, i seguenti obiettivi: 1) valutare se la somministrazione di analoghi sintetici della manganese superossido dismutasi (SODm) che catturano l'anione superossido (O²⁻), senza interferire con le altre specie reattive dell'ossigeno (NO, perossinitriti), è in grado di ridurre il danno da ischemia/riperfusion cardiaca, in condizioni di diabete e/o iperglicemia nel ratto; 2) valutare nel ratto l'espressione cardiaca del fattore stimolante l'angiogenesi HIF-1 in seguito a ischemia/riperfusion in condizioni di diabete e/o iperglicemia sperimentalmente indotti; 3) valutare se la assenza dell'enzima iNOS può determinare alterazioni dell'evoluzione dell'insulto miocardico indotto dal diabete e se la risposta ipossica (espressione di HIF-1) può essere modificata in assenza di questo enzima. Questi ultimi studi saranno condotti su topi knockout per l'enzima iNOS.

Il raggiungimento del primo obiettivo farà luce sul ruolo dei radicali liberi dell'ossigeno in diabetici affetti da ischemia miocardica, con la prospettiva di individuare farmaci che possano migliorare la prognosi dell'infarto miocardico nel diabetico. Il raggiungimento del secondo e terzo potrà contribuire a chiarire i meccanismi fisiopatologici alla base della prognosi sfavorevole in caso di malattia coronarica nel soggetto diabetico.

In ambito respiratorio, fornire ulteriori dati sulla conoscenza dei meccanismi fisiopatologici della iperresponsività e della infiammazione delle vie aeree potrà risultare essenziale per la messa a punto di nuove strategie terapeutiche, in modo da porre le basi per lo studio di una nuova immunoterapia nel trattamento delle sindromi allergiche, ed in particolare nell'asma.

Comunque, nel prosieguo dello studio, ci proponiamo di chiarire ulteriormente il ruolo protettivo degli APLs in modo da porre le basi per una futura strategia terapeutica dell'asma bronchiale allergico.

Riguardo lo studio della nocicezione, riteniamo interessante valutare se la morte neuronale descritta a livello delle lamine I-III del corno posteriore del midollo spinale di ratto dopo legatura del nervo sciatico, sia di tipo apoptotico (analisi dell'espressione dei geni dell'apoptosi) e se essa sia coinvolta direttamente nella comparsa e nel mantenimento della sintomatologia dolorosa cronica. Tale possibilità verrà verificata anche mediante l'utilizzo di farmaci che inibiscono direttamente gli esecutori finali dell'apoptosi, le caspasi. Pertanto, lo studio che proponiamo valuterà nel ratto, in due modelli sperimentali di dolore cronico sia infiammatorio che neuropatico, il ruolo dell'apoptosi a tre diversi livelli: a) durante le primissime fasi dello sviluppo del dolore cronico mediante il blocco dei recettori mGlu5 del glutammato, b) in una fase intermedia probabilmente modulata da alcuni mediatori come i cannabinoidi e, infine, c) bloccando direttamente la comparsa della morte programmata con un inibitore selettivo delle caspasi.

Collaborazioni internazionali in atto

ADVENIER C. – Faculté de Médecine- Paris Ouest Université Paris V

PAGE C. P.- Department of Pharmacology, King's College, University of London, UK

SPINA D. – Sackler Institute of Pulmonary Pharmacology, London, UK

WARNER T.D.- The William Harvey Research Institute, London, UK

BOWERY N.- Department of Pharmacology, University of Birmingham, UK

WHITTON P.- Department of Pharmacology, School of Pharmacy, London, UK

SALT T.- Department of Ophthalmology, University College of London, UK

PERRETTI M.- Department of Biochemical Pharmacology, The St. Bartolomew's and Royal London School of Medicine and Dentistry, UK

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Set up per elettrofisiologia extracellulare

Fluorimetro

Sistema di acquisizione dati computerizzato Mac Lab

Apparecchio Langendorf per cuore isolato

Pulmonary Monitoring System

Mouse Plethysmograph

Apparecchi stereotassici per ratto e topo

Plantar test

Pompa elettronica per microperfusione

Parole Chiave

Farmaci

Neurotrasmettitori

Sistema cardiovascolare

Sistema respiratorio

Nocicezione

UNITA' DI RICERCA INBB
Napoli

Responsabile Scientifico

Mosè ROSSI

Linea di Ricerca

GLI ESTREMOFILII COME FATTORIE CELLULARI

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Mosè ROSSI	PO	rossi@dafne.ibpe.na.cnr.it
------------	----	----------------------------

Non Aderenti INBB

Simonetta BARTOLUCCI	PO	bartoluc@cds.unina.it
Maria CIARAMELLA	IR CNR	ciaramel@dafne.ibpe.na.cnr.it
Annamaria GUAGLIARDI	RU	guaglia@cds.unina.it
Marco MORACCI	IR CNR	moracci@dafne.ibpe.na.cnr.it
Francesca PISANI	IR CNR	pisani@dafne.ibpe.na.cnr.it

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Chimica Biologica – Università Federico II

Indirizzo Via Mezzocannone 16 – 80134 Napoli

Telefono 081 6132 270 / 273

Fax 081 6132 277

e-mail rossi@dafne.ibpe.na.cnr.it

Sezione INBB di appartenenza

Napoli

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

L'attività svolta comprende lo studio dei meccanismi che a livello molecolare hanno permesso lo sviluppo della vita alle alte temperature.

I modelli sono stati vari enzimi e proteine e il DNA di vari microrganismi termofili

Risultati ottenuti

Risoluzione della struttura di varie proteine; studio del rapporto tra struttura e funzione; clonaggio ed espressione di geni di termofili in mesofili; sviluppo di biosensori; costruzione di un plasmide "shuttle" per esportare geni in termofili

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

G. Manco, F. Febbraio, E. Adinolfi, M. Rossi: Homology modeling and active-site residues probing of the thermophilic Alicyclobacillus acidocaldarius esterase 2.

Protein Science, 8(9), 1789-96, 1999

G. Desogus, S. Onesti, P. Brick, M. Rossi, F.M. Pisani: Identification and characterisation of a DNA primase from the hyperthermophilic archaeon *Methanococcus jannaschii*.

Nucleic Acids Res. 27, 4444-4450, 1999

M. Moracci, M. Rossi: Book Review: "Thermophiles: The keys to molecular evolution and the origin of life" (Eds.j. Wiegel and M.W.W. Adams), London: Taylor and Francis

Proteins Science, 8, 1564-1565, 1999

J. Pouwels, M. Moracci, B. Cobucci Ponzano, G. Perugino, J. Van der Oost, T. Kaper, J. Lebbink, W. de Vos, M. Ciaramella and M. Rossi: Activity and stability of hyperthermophilic enzymes: a comparative study on two archaeal β -glycosidases"

Extremophiles, 4: 157-164, 2000

M. Moracci, B. Cobucci Ponzano, A. Trincone, S. Fusco, M. De Rosa, J. Van der Oost, C. W. Sensen, R. L. Charlebois, and M. Rossi: Identification and molecular characterization of the first α -xylosidase from an Archaeon

Journal Biol. Chemistry, 275: 22082-22089, 2000

A. Guagliardi, L. Cerchia, M. Moracci and M. Rossi: The chromosomal protein sso7d of the Crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* rescues aggregated proteins in an ATP hydrolysis-dependent manner.
Journal Biol. Chemistry, 275: 31813-31818, 2000

A. Cassano, E. Drioli, R. Molinari, D. Grimaldi, F. La Cara, M. Rossi: Enzymatic membrane reactor for eco-friendly goat skin unhairing.
J. Soc. Leather Technol. Chem., 84: 205-211, 2000

F. M. Pisani, M. De Felice, F. Carpentieri, M. Rossi: Biochemical characterization of a clamp-loader complex homologous to eukaryotic replication factor C from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*.
J. Mol. Biol., 301: 61-73, 2000

G. Manco, L. Mandrich, M. Rossi: Residues at the active site of the esterase 2 from *Alicyclobacillus acidocaldarius* involved in substrate specificity and catalytic activity at high temperature.
J. Biol. Chem. 276: 37482-37490, 2001

M. Moracci, A. Trincone, B. Cobucci-Ponzano, G. Perugino, M. Ciaramella, M. Rossi. Enzymatic synthesis of oligosaccharides by two glycosyl hydrolases of *Sulfolobus solfataricus*.
Extremophiles, 5: 145-152, 2001

P. Del Vecchio, G. Graziano, V. Granata, G. Barone, L. Mandrich, G. Manco, M. Rossi. Temperature- and denaturant-induced unfolding of two thermophilic esterases.
Biochemistry, 41(4):1364-1371, 2002

L. Esposito, F. Sica, C.A. Raia, A. Giordano, M. Rossi, L. Mazzarella, A. Zagari.
Crystal structure of the alcohol dehydrogenase from the hyperthermophilic Archaeon *Sulfolobus solfataricus* at 1.85Å resolution.
J. Mol. Biol., 318: 463-477, 2002

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Sviluppo ulteriore della ricerca sulla struttura-funzione degli enzimi degli estremofili e applicazioni di essi in sistemi produttivi

Collaborazioni internazionali in atto

Università Tecnologica - Amburgo (Germania)
IAMSTEC – Yokohama (Giappone)
University of Maryland – Baltimora (USA)

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Sequenziatore di proteine; fermentatore ad alta temperatura; Silicon graphics.

Parole Chiave

Estremofili; enzimi; biocatalisi; biotecnologie; biosensori.

UNITA' DI RICERCA INBB
Roma

Responsabile Scientifico
Giuseppe ROTILIO

Linea di Ricerca
BIOMOLECOLE DELLO STRESS OSSIDATIVO

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Giuseppe ROTILIO	PO	rotilio@uniroma2.it
Andrea BATTISTONI	PA	andrea.battistoni@uniroma2.it
Luisa ROSSI	PA	luisa.rossi@uniroma2.it

Non Aderenti INBB

Maria Teresa CARRÌ	PA	carri@bio.uniroma2.it
Anna Paola MAZZETTI	RU	
Francesca PACELLO	BC	francesca.pacello@uniroma2.it
Melania D'ORAZIO	BC	dorazio@uniroma2.it
Marco LOMBARDO	DR	
Serena AMMENDOLA	DR	ammendola@uniroma2.it

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Biologia, Università di Roma Tor Vergata

Indirizzo Via della Ricerca Scientifica 00133 Roma

Telefono 06 72594373

Fax 0672594311

E-mail rotilio@uniroma2.it

Sezione INBB di appartenenza

Roma Tor Vergata

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Numerosi processi cellulari ed eventi patologici sono modulati da processi redox. Il nostro gruppo ha come obiettivo quello di indagare i meccanismi molecolari rame-dipendenti nelle cellule nervose in relazione a specifiche patologie neurodegenerative ed il coinvolgimento dell'enzima superossido dismutasi a rame e zinco (Cu,ZnSOD) nei processi di virulenza batterica

Risultati ottenuti

Nell'ambito della linea di ricerca che si occupa del ruolo dell'enzima Cu,ZnSOD nei batteri patogeni, abbiamo dimostrato che l'enzima modula la sopravvivenza batterica sia nei fagociti che in cellule di tipo epiteliale e che, in *M. tuberculosis*, il gene è fortemente indotto in risposta alla fagocitosi. Abbiamo inoltre intrapreso lo studio di nuove varianti dell'enzima isolate da batteri patogeni. I nostri studi hanno rivelato che diverse Cu,ZnSOD procariotiche possiedono caratteristiche uniche che possono portare alla modulazione dell'attività e della funzione dell'enzima. Esempi di variazioni specie specifiche includono: a) la presenza nell'enzima da *Haemophilus* spp. di un'estensione amino terminale ricca in residui di istidina, che conferisce alla proteina un'elevata affinità per i metalli bivalenti; b) la formazione di una tasca per il legame dell'eme in *H. ducreyi*.

Per quanto riguarda lo studio sul ruolo dello stress ossidativo nelle patologie neurodegenerative, l'attività di ricerca sui mutanti di Cu,ZnSOD coinvolti nella Sclerosi Laterale Amiotrofica Familiare (FALS) ha dimostrato che l'inattivazione della protein-fosfatasi calcineurina è indotta direttamente e specificamente dalla espressione di mutanti in linee cellulari transfettate, in aree cerebrali di topi transgenici ed anche in vitro mediante interazione diretta con tali proteine mutanti.

Per far luce sull'identità dei mediatori biochimici responsabili della neurodegenerazione causata dall'alterazione dell'omeostasi del rame abbiamo utilizzato due modelli sperimentali: il topo Mottled/Brindled, modello animale della malattia di Menkes e cellule di neuroblastoma umano SH-SY5Y, che abbiamo deprivato di rame. I nostri dati suggeriscono che in entrambi i modelli le alterazioni nel metabolismo del rame siano associate un'aumentata suscettibilità all'apoptosi.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

1. Battistoni, A., Pacello, F., Folcarelli, S., Ajello, M., Donnarumma, G., Greco, R., Ammendolia, M.G., Touati, D., Rotilio, G., and Valenti, P.. "Increased expression of periplasmic Cu,Zn superoxide dismutase enhances the

- survival of *Escherichia coli* invasive strains within nonphagocytic cells." *Infection and Immunity*. (2000) 68, 30-37.
2. Ciriolo, M.R., De Martino, A., Lafavia, E., Rossi, L., Carri, M.T., Rotilio, G. "Cu,Zn-superoxide dismutase-dependent apoptosis induced by nitric oxide in neuronal cells". *J Biol Chem*. (2000) 275, 5065-72
 3. Ferri, A., Gabbianelli, R., Casciati, A., Paolucci, E., Rotilio, G. and Carri, M.T. "Calcineurin activity is regulated both by redox compounds and by mutant FALS-SOD1" *J.Neurochem*. (2000) 75, 606-613.
 4. G. Rotilio, M. T. Carri, L. Rossi and M. R. Ciriolo "Copper-dependent oxidative stress and neurodegeneration." (2000) *IUBMB Life*, 50, 1-6.
 5. Ciriolo, M.R., Battistoni, A., Falconi, M., Filomeni, G., and Rotilio, G. "Role of the electrostatic loop of Cu,Zn superoxide dismutase in the copper uptake process" (2001) *Eur.J.Biochem*. 268, 737-742.
 6. Battistoni, A., Pacello, F., Mazzetti, A.P., Capo, C., Kroll, S.J., Langford, P., Sansone, A., Donnarumma, G., Valenti, P., and Rotilio, G. "A histidine-rich metal binding domain at the N terminus of Cu,Zn-superoxide dismutases from pathogenic bacteria: a novel strategy for metal chaperoning". *J.Biol.Chem*. (2001) 276, 30315-30325
 7. Pacello, F., Kroll, S.J., Langford, P., Indiani, C., Smulevich, G., Desideri, A., Rotilio, G., and Battistoni, A. "A novel heme protein: the Cu,Zn superoxide dismutase from *Haemophilus ducreyi*" *J.Biol.Chem*. (2001) 276, 30326-30334
 8. Ferri, A., Gabbianelli, R., Casciati, A., Celsi, F., , Rotilio, G. and Carri, M. T. Oxidative inactivation of calcineurin by Cu,Zn superoxide dismutase G93A, a mutant typical of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J.Neurochem*. (2001) 79, 531-538
 9. Rossi, L., Marchese, E., Lombardo, M.F., Rotilio, G., and Ciriolo, M.R. "Increased susceptibility of copper-deficient neuroblastoma cells to oxidative stress-mediated apoptosis" (2001) *Free Radic Biol Med*. 30, 1177-1187
 10. Rossi, L., De Martino, A., Marchese, E., Piccirilli, S., Rotilio, G., and Ciriolo, M.R. "Neurodegeneration in the animal model of Menkes' disease involves Bcl-2-linked apoptosis" *Neuroscience* (2001) 103, 181-188
 11. D'Orazio M., Folcarelli, S., Rotilio, G. and Battistoni A. "Lipid modification of the Cu,Zn superoxide dismutase from *Mycobacterium tuberculosis*" *Biochem. J*. (2001) 359, 17-22
 12. Langford, P.R., Sansone, A., Valenti, P., Battistoni, A., Kroll, J.S. "Bacterial superoxide dismutase and virulence" *Methods Enzymol* (2002) 349:155-66

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

I nostri principali obiettivi sono: a) contribuire a delineare i meccanismi attraverso i quali processi redox causati da alterazioni dell'omeostasi del rame promuovono la neurodegenerazione, sia in modelli cellulari e animali di sclerosi laterale amiotrofica che in modelli di patologie neurodegenerative; b) approfondire il ruolo della Cu,ZnSOD nella infettività batterica e valutare se tale enzima possa rappresentare un bersaglio per lo sviluppo di nuove strategie mirate al controllo delle infezioni batteriche

Collaborazioni internazionali in atto

Prof. JS Kroll - Imperial College School of Medicine at St. Mary's - Department of Paediatrics- London (UK)
Lionello Bossi -Centre de Genetique Moleculaire-CNRS-Gif-sur-Yvette-(Fr)

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Spettrometro ESR Bruker ESP 300

Spettrometro per assorbimento atomico Perkin Elmer

Strumentazione completa per studi di biochimica, di biologia molecolare e cellulare

Parole Chiave

Superoossido dismutasi, stress ossidativo, rame, sclerosi laterale amiotrofica, neurodegenerazione, infezioni batteriche, fattori di virulenza

UNITA' DI RICERCA INBB
Ancona

Responsabile Scientifico

Silverio RUGGIERI

Linea di Ricerca

STRUTTURA E FUNZIONE DI PROTEINE COINVOLTE NELLA INTERAZIONE PIANTA-PATOGENO

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Silverio RUGGIERI	PO	ruggieri@unian.it
-------------------	----	-------------------

Non Aderenti INBB

Giuseppe ORSOMANDO	RU	orsomando@unian.it
Antonino TESTA	BC	antesta@unina.it

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di biotecnologie agrarie ed ambientali

Indirizzo Via Brecce Bianche

Telefono 071-2204395

Fax 071-2802117

E-mail ruggieri@unian.it

Sezione INBB di appartenenza

Roma

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Isolamento di proteine dotate di attività di elicitazione, di fattori di avirulenza e di tossine proteiche rilasciate dai patogeni fungini.

Studio dei determinanti biochimico-strutturali coinvolti nel riconoscimento pianta-patogeno e nella cascata metabolica di trasduzione del segnale per l'attivazione della difesa e/o la patogenesi, coinvolgenti stress ossidativo e omeostasi redox cellulare, aspetti enzimologici e biotecnologici. Identificazione di recettori enzimatici vegetali. Studio della fluttuazione del NAD(H) nella pianta in relazione alla interazione con il patogeno. Effetti delle proteine rilasciate dai patogeni, e/o della loro espressione eterologa, sulla evoluzione della patogenesi in pianta, sulla induzione di resistenza, sulla selezione di piante dotate di resistenza, ai fini della progettazione di strategie di protezione compatibili.

Risultati ottenuti

È stata isolata per la prima volta e purificata una nuova proteina fitotossica (proteina PcF) da filtrati culturali dell'Oomicete *Phytophthora cactorum*, patogeno distruttivo per molte piante di interesse agroalimentare, per la cui eliminazione vengono impiegati trattamenti chimici nocivi per l'alimentazione umana e l'ambiente. La PcF è una piccola proteina acida (52 residui, Mr 5622 Da), anfipatica, contiene 6 residui di cisteina (3 ponti S-S, un doppietto-signature CC) e la sequenza presenta un residuo di idrossiprolina caratteristico in posizione 43. La proteina pura riproduce i sintomi (morte cellulare localizzata/HR) causati dal filtrato culturale e dal patogeno. La sequenza del cDNA codifica un peptide segnale, che viene rimosso durante il processo di secrezione. La sequenza genomica codificante dimostra l'assenza di introni. La proteina PcF induce l'attivazione dell'enzima fenilalanina ammoniaca liasi in piante di pomodoro, rivelando che in questo sistema di interazione induce la sintesi di derivati fenilpropanoidi coinvolti nella difesa (fitoalessine) ad attività nutrizionale antiossidante.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

- Magni G., Amici A., Emanuelli M., Raffaelli N., Ruggieri S.

Enzymology of NAD synthesis

Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology, Part A-73, p. 135-182, D.L. Purich (ed.), John Wiley and Sons, New York, 1999

- Raffaelli N., Lorenzi T., Amici A., Emanuelli M., Ruggieri S., Magni G.

Synechocystis sp. slr0787 protein is a novel bifunctional enzyme endowed with both nicotinamide mononucleotide adenyltransferase and «Nudix» hydrolase activities

- Emanuelli M., Carnevali F., Lorenzi M., Raffaelli N., Amici A., Ruggieri S., Magni G.

Identification and characterization of YLR328W, the *Saccharomyces cerevisiae* structural gene coding for NMN adenyltransferase. Expression and characterization of the recombinant enzyme.

FEBS Letters 455, 13-17, 1999

- Raffaelli N., Emanuelli M., Pisani F.M., Amici A., Lorenzi T., Ruggieri S., Magni G.
Identification of the archaeal NMN adenylyltransferase gene
Mol. Cell. Biochem. 193, 99-102, 1999
- Raffaelli N., Lorenzi T., Mariani P.L., Emanuelli M., Amici A., Ruggieri S., Magni G.
Escherichia coli NadR regulator is endowed with nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase activity
J. Bacteriology, 181, 5509-5511, 1999
- Ruggieri S., dalla Rizza M., Lorenzi M., Mezzetti B., Magni G., Orsomando G,
Purification of a Novel Protein from the Pathogen *Phytophthora cactorum*, toxic to strawberry
The FASEB J., 13(7), 1408(445), 1999
- Amici A., Emanuelli M., Raffaelli N., Ruggieri S., Saccucci F., Magni G.
Human erythrocyte pyrimidine 5'-nucleotidase, PN-I, is identical to p36, a protein associated to lupus
inclusions formation in response to α -interferon
Blood, 96, 1596-1598, 2000
- Raffaelli N., Pisani F.M., Lorenzi T., Emanuelli M., Amici A., Ruggieri S., Magni G.
Nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase from *Methanococcus jannaschii*
Methods in Enzymology, 331, 292-298, 2001
- Raffaelli N., Lorenzi T., Emanuelli M., Amici A., Ruggieri S., Magni G.
Nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase from *Sulfolobus solfataricus*
Methods in Enzymology, 331, 281-292, 2001
- Martinez-Tome M, Jimenez AM, Murcia A, Frega N, Ruggieri S, Strabbioli R
Antioxidant properties of mediterranean spices compared with food additives
J. Food Protect., 64, 1412-1419, 2001
- Orsomando G, Lorenzi M, Raffaelli N, DallaRizza M, Mezzetti B, Ruggieri S.
Molecular characterization of PcF, a novel protein purified from culture filtrates of *Phytophthora cactorum*,
causing toxic symptoms on plant
Petria, 11(2), 81-82, 2001
- Orsomando G, Lorenzi M, Raffaelli N, Dalla Rizza M, Ruggieri S
Phytotoxic protein PcF, purification, characterization, and cDNA sequencing of a novel hydroxyproline-containing
factor secreted by the strawberry pathogen *Phytophthora cactorum*.
J Biol Chem., Jun 15; 276(24), 21578-84, 2001

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Espressione eterologa di proteina PcF ricombinante; struttura 3D (NMR) e dinamica conformazionale per la caratterizzazione strutturale-funzionale del meccanismo di azione. Effetto funzionale di mutazioni sito-specifiche. Espressione eterologa in patogeni virulenti e avirulenti e in piante: effetto sulla patogenesi. Modeling *in silico* per il disegno razionale di fitofarmaci mirati di nuova concezione e per la difesa biocompatibile delle piante di interesse agroalimentare. Strategie biotecnologiche per l'incremento del contenuto di fitoalessine flavonoidi antiossidanti naturali nelle piante agroalimentari.

Collaborazioni internazionali in atto

M. Antonia Murcia Tomas

Facultad de Veterinaria y Ciencia y Tecnologia de Alimentos. Universidad de Murcia - Spain

Y. Cenatiempo

ESA CNRS 6031 - IBMIG

Université de Poitiers - France

S. Kamoun

Department of Plant Pathology - Ohio State University - OARD Center, Wooster, USA

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Sequenziatore di proteine, spettrometro di massa, HPLC, PCR, Colture cellulari, Spettrofotometri

Parole Chiave

Biochimica, proteine, patogeni, piante, elicidine, enzimi, stress ossidativo, NAD, fenil alanina ammoniacale liasi

UNITA' DI RICERCA INBB
Genova

Responsabile Scientifico
Franca SALAMINO

Linea di Ricerca

REGOLAZIONE DEL SISTEMA PROTEOLITICO CA-DIPENDENTE
MESSA A PUNTO DI INIBITORI PROTEOLITICI DA IMMOBILIZZARE SU MEMBRANE BIOCOMPATIBILI
AI FINI DI RIDURRE I LIVELLI DI PROTEASI LIBERATE NEL SIERO DI PAZIENTI SOTTOPOSTI A
CIRCOLAZIONE EXTRACORPOREA

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Franca SALAMINO

P.O

salamino@unige.it

Non Aderenti INBB

Monica AVERNA

Assegnista di ricerca

Roberto STIFANESE

DR

Raffaella SALLO

DR

Sede Unità di Ricerca

Università degli Studi di Genova – Dipartimento di Medicina Sperimentale- sez Biochimica

Indirizzo Viale Benedetto V, 1 16132 Genova

Telefono 010 358160 // 8157

Fax +39 010 354415

E-mail salamino@unige.it

Sezione INBB di appartenenza

Biomolecole

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Lo studio di questa unità di ricerca è focalizzato sulla regolazione del sistema proteolitico Ca^{2+} -dipendente costituito da isoforme di calpaina, enzima proteolitico della famiglia delle tiolo proteasi dalla calpastatina, il suo regolatore inibitorio intracellulare calpastatina e dagli attivatori della calpaina. anch'essi di natura proteica, come la calpastatina. Negli ultimi tre anni il nostro obiettivo principale è stato di studiare l'interazione dell'enzima calpaina con il suo inibitore calpastatina, la loro localizzazione intracellulare e le modulazioni della regolazione del sistema in funzione di modificazioni posttraduzionali dell'inibitore.

Recentemente è stata attivata anche una linea di ricerca relativa agli studi di inibitori di proteasi liberate nel siero di apzineti sottoposti a circolazione extracorporea.

Risultati ottenuti

I risultati più importanti delle nostre ricerche che si possono brevemente riassumere come segue: in cellule a riposo la calpaina è localizzata nel citosol in forma inattiva mentre la calpastatina è localizzata in formazioni aggregate vicino al nucleo. Quando le cellule sono sottoposte a stimoli extracellulari che promuovono l'aumento di calcio intracellulare la calpastatina diffonde nel citosol in forma non aggregata ed è in grado di interagire con la calpaina che è stata attivata. La calpaina utilizza l'inibitore come un substrato suicida che viene digerito dalla proteasi con la formazione di frammenti dapprima ancora attivi e poi completamente degradati. La cellula quindi ha per un breve lasso di tempo la possibilità di aumentare la potenzialità inibitoria nei confronti della calpaina. D'altra parte, se la sintesi di neo calpastatina non aumenta la sua velocità la cellula si viene a trovare in deficit di calpastatina. E' il caso di alcune patologie come l'ipertensione che sono caratterizzate da persistenti alti livelli di calcio intracellulare.

Stimoli che portano a fosforilazione cAMP dipendente, riportano la calpastatina nella loro forma aggregata.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

1. Averna, M., De Tullio, R., Salamino, F., Melloni, E. and Pontremoli, S. (1999) *Phosphorylation of rat brain calpastatins by PKC* FEBS Lett. 450, 13-16
2. De Tullio, R., Passalacqua, M., Averna, M., Salamino, F., Melloni, E., and Pontremoli, S. (1999) *Changes in intracellular localization of calpastatin during calpain activation* Biochem. J 343, 467-472.
3. Pontremoli, S., Melloni, E. and Salamino, F. (1999) *Calpain: from structure to biological function* Calcium as a cellular regulation (eds Carafoli, E. and Klee, C) Oxford University Press, New York Oxford pp.371-388
4. Melloni, M., Michetti, M., Salamino, F., Minafra, R., Sparatore, B. and Pontremoli, S. *Isolation and Characterization of Calpain Activator Protein from Bovine Brain* (2002) "Methods in Molecular Biology"

Calpain Methods and Protocols Human Press (Elce John ed.),Kingstone, Ontario, Canada)Vol. 144 cap 12; pp 99-105 :

5. Melloni,E., Averna, M., Salamino,F., Sparatore,B., Minafra,R. and Pontremoli, S (2000) *AcylCoA-binding Protein is a Potent m-Calpain Activator* rJ. Biol. Chem. 275, 82-86.
6. De Tullio,R., Averna,M., Salamino,F., Pontremoli,S. and Melloni,E. (2000) *Differential degradation of calpastatin by μ and m-calpain in Ca^{2+} - enriched human neuroblastoma LAN-5 cells*. FEBS Lett. 475, 17-21.
7. Melloni,E., Minafra,R., Salamino,F., and Pontremoli,S. (2000) *Properties and intracellular localization of calpain activator protein*. Biochem. Biophys. Res. Comm. 272, 472-476.
8. Averna, M., De Tullio,R., Passalacqua,M., Salamino,F., Pontremoli,S. e Melloni,E. (2001) *Changes in intracellular calpastatin localization are mediated by reversible phosphorylation* Biochem. J. 354, 25-30
9. Averna M, De Tullio R, Salamino F., Minafra,R. Pontremoli S Melloni E. (2001). *Age dependent degradation of calpastatin in kidney of hypertensive rats*. J. Biol. Chem. 276, 38426-432
10. Grano,V., Diano,N., Portaccio,M., Bencivegna,U., De Maio,A., De Santo,N., Perna,A., Salamino,F., Mita,D.G. (2002) *Reduction of protease concentration by means of immobilised antiproteases: the alfa 1-antitrypsin/elastase complex as an experimental model for hemolysis in acute catabolic renal failure, extracorporeal blood circulation and cardiocirculation bypass* International Journal of artificial organs, Vol.25

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Tra i nostri obiettivi vi è una maggior conoscenza di quelli che sono i segnali extracellulari che portano a diversa localizzazione della calpastatina. Inoltre cercheremo di produrre frammenti di calpastatina i più piccoli possibile ma che conservino l'attività inibitoria per poter iniziare lo studio di produzione di una molecola in grado di compensare le patologie derivate da eccessiva attività calpainica

Infine le nostre ricerche sono indirizzate anche a studiare la possibilità di riduzione dell'aumento di proteolisi extracellulare che si osserva a seguito della circolazione extracorporea

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Sistemi HPLC e FPLC per purificazione proteine, sequenziatore di proteine; sequenziatore di DNA , termociclatore per PCR, microscopio confocale, laboratorio per uso radioisotopi, laboratorio per colture cellulari.

Parole Chiave

Proteolisi intracellulare, proteolisi extracellulare, calpaina, calpastatina, ipertensione.

UNITA' DI RICERCA INBB
Trento

Responsabile Scientifico
Marina SCARPA

Linea di Ricerca
SPECIE REATTIVE NEI BIOSISTEMI

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Renzo ANTOLINI	PO	antolini@science.unitn.it
Marina SCARPA	PO	scarpa@science.unitn.it
Elvira D'AMATO	PT	damato@science.unitn.it

Non Aderenti INBB

Giandomenico NOLLO	A	nollo@science.unitn.it
Flavia RAVELLI	A	ravelli@science.unitn.it
Michele LUNELLI	BC	mlunelli@science.unitn.it
Paolo FERRARI	BC	ferrari@science.unitn.it

Sede Unità di Ricerca
Dipartimento di Fisica, Università di Trento

Indirizzo: Via Sommarie 14, 38050 Povo-Trento
Telefono: 0461.882029
Fax: 0461.881696
E-mail: scarpa@science.unitn.it

Sezione INBB di appartenenza
Padova

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Il nostro principale obiettivo riguarda la comprensione dei processi che avvengono nei tessuti (in particolare tessuti cardiaci) e nei fluidi biologici e che coinvolgono la formazione di specie transienti. Tra queste sono gli intermedi prodotti nei processi ossidativi che si verificano in condizioni normali o di particolare stress (ad esempio nelle condizioni di ischemia indotte da un intervento chirurgico o quando un organo viene espantato e riperso).

Recentemente ci stiamo occupando degli intermedi derivati dagli antiossidanti di natura polifenolica. Infatti uno dei nostri obiettivi è dimostrare che specie transienti aventi tempi di emivita relativamente lungo si formano a partire dai polifenoli e svolgono un ruolo determinante per la bioattività di questi composti.

Collateralmente, con l'obiettivo di comprendere alcuni aspetti del rapporto struttura-funzione, stiamo studiando due metalloenzimi coinvolti nella generazione (ossidasi) o nel controllo (superossido dismutasi) delle specie transienti.

Risultati ottenuti

Messa a punto e sviluppo di metodi per lo studio della perossidazione lipidica e misura dell'attività ed efficienza di alcuni antiossidanti.

Caratterizzazione di specie transienti prodotte in alimenti ad elevato contenuto di composti antiossidanti.

Caratterizzazione di alcuni parametri spettroscopici della superossido dismutasi purificata da fonti vegetali.

Monitoraggio del danno indotto dall'ischemia negli organi da trapianto; messa a punto di un metodo utilizzando la risonanza magnetica nucleare per la valutazione dello stato di conservazione del fegato da trapianto.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

Galzigna, L., Schiapelli, M.P., Rigo A, Scarpa M. (1999)

"A rat brain fraction and different purified peroxidases catalyzing the formation of dopaminochrome from dopamine."
Biochim. Biophys. Acta 1427, 329-336.

Marcazzan, M., Vianello, F., Scarpa, M., Rigo, A. (1999)

"An ESR assay for α -amylase activity toward succinylated starch, amylose and amylopectin."
J. Biochem. Biophys. Methods 38, 191-202.

Corazza, A., Vianello, F., Zennaro, L., Gourova, N., Signor, L., Marin, O., Rigo, A. Scarpa, M. (1999)

"Enzyme mimics complexing Cu(II) ion. Structure function relationships."
J. Peptide Res., 54, 491-504..

Vianello F., Zennaro, L., Di Paolo, M.L., Rigo, A., Malacarne, C., Scarpa, M. (2000)
“Preparation, morphological characterization and activity of thin films of horseradish peroxidase.”
Biotechnol. Bioeng. 68/5, 488-495.

Rigo A., Vianello F., Clementi G., Rossetto M., Scarpa M., Vrhovsek U., Mattivi F. (2000).
“Contribution of the proanthocyanidins to the peroxy radical scavenging capacity of some Italian red wines.”
J. Agric. Food Chem. 48, 1996-2002.

Scarpa M., Corazza A., Vianello F., Rigo A., Furian L., Baldan N., Rigotti P. (2001)
“Deuterium nuclear magnetic resonance for evaluating the metabolic status of livers subjected to warm ischemia”
Transplantation 71, 1515-1517.

Rossetto M., Vianello F., Rigo A., Vrhovsek U., Mattivi F., Scarpa M.
(2001)
“Free radicals as stable components of red wine.”
Free Rad Res. 35 (6), 931-937.

Ragusa S., Cambria M.T., Scarpa M., Di Paolo M.L., Falconi M., Rigo A., Cambria A. (2001).
“Properties of purified cytosolic isoenzyme I of Cu, Zn superoxide dismutase from *Nicotiana Plumbaginifolia* leaves.”
Protein Expression and Purification 23, 261-269.

Graffigna AC, Nollo G, Pederzoli C, Ferrari P, Widesott L, Antolini R. (2002)
“Continuous monitoring of myocardial acid-base status during intermittent warm blood cardioplegia.”
Eur. J. Cardiothorac Surg. 21(6), 995-1001.

Di Paolo M.L., Scarpa M., Corazza A., Stevanato R., Rigo A. (2002)
“Binding of cations of group IA and IIA to bovine serum Amine Oxidase. Effect on the activity.”
Biophys. J in corso di stampa.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Si prevede di identificare e caratterizzare alcune specie aventi brevi tempi di emivita prodotte nei processi ossidativi. In particolare vorremmo esplorare la possibilità che specie transienti, prodotte a partire da alcuni antiossidanti, svolgano un ruolo nella bioattività di questi composti. Verranno anche sviluppati alcuni aspetti relativi al coinvolgimento degli antiossidanti nella genesi o nella prevenzione di alcune importanti patologie (patologie cardiovascolari, cancro, invecchiamento) e nei processi di ischemia e riperfusione.

Si proseguiranno gli studi già in corso, riguardanti la struttura e reattività delle ammine ossidasi. Gli aspetti che verranno sviluppati dall'Unità di Trento riguardano: a) lo studio di siti di legame dei metalli mediante tecniche di risonanza magnetica; b) la caratterizzazione del microambiente all'interno del sito attivo mediante tecniche computazionali; c) applicazione di metodiche di dinamica molecolare e browniana per lo studio della struttura e dinamica dell'enzima purificato da plasma bovino.

Collaborazioni internazionali in atto

Monika Fuxreiter, Università di Budapest
Berthold Hock, Università di Monaco.

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Spettrofluorimetro
Spettrofotometro
Potenziostato
Stazioni di grafica e calcolo.

Parole Chiave

Radicali liberi, antiossidanti, ischemia, metalloenzimi.

UNITA' DI RICERCA INBB
Parma

Responsabile Scientifico
Alberto SPISNI

Linea di Ricerca

USO INTEGRATO DELLA SPETTROMETRIA NMR AD ALTA RISOLUZIONE MULTIDIMENSIONALE E MULTINUCLEARE CON LA SPETTROSCOPIA DI DICROISMO CIRCOLARE (CD) E DI FLUORESCENZA E CON CALCOLI DI MODELLISMO MOLECOLARE PER LO STUDIO DELLA STRUTTURA E DINAMICA IN SOLUZIONE DI PEPTIDI BIOLOGICAMENTE ATTIVI E DI PROTEINE.

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Giorgio SARTOR	PA	gsartor@unipr.it
Lorella FRANZONI	RU	lfranz@unipr.it
Cesira DE CHIARA	BC	cesira.dechiara@unipr.it
Giuseppe NICASTRO	PT	beppe@ipruniv.cce.unipr.it

Non Aderenti INBB

Emanuela CASALI	RU	ecasali@unipr.it
Elena FERRARI	BC	eferrari@unipr.it
Maria Beatrice VENTURELLI	DR	mbventur@gottero.dms.unipr.it

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università di Parma.

Indirizzo: Via Volturno, 39

Telefono: 0521 903801/7

Fax: 0521 903802

E-mail: aspin@unipr.it

Sezione INBB di appartenenza

Parma

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Determinare la struttura tridimensionale in soluzione di peptidi e proteine per poterla correlare alla funzione svolta da tali macromolecole. Nel caso di proteine di grandi dimensioni quali i recettori accoppiati alla proteina G, studiare le proprietà conformazionali e funzionali di loro segmenti per risalire alla descrizione del meccanismo molecolare della proteina intera. I sistemi attualmente allo studio sono i recettori accoppiati alla proteina G quali il recettore della angiotensina II ed i recettori α -adrenergici, proteine appartenenti alla super-famiglia delle lipocaline quali una proteina appartenente alla famiglia delle Major Urinary Proteins (MUP) e la cellular retinol binding protein (cRBP) appartenente alla famiglia delle FABP. Sono oggetto di studio tossine come la crotamina, presente nel veleno di serpente (crotalo) e la TsTx-IV, presente nel veleno di scorpione (Tytius). Le tecniche utilizzate sono la spettrometria NMR multinucleare e multidimensionale, il CD, la fluorescenza e la micro-calorimetria. I peptidi sono sintetici, le proteine di MW superiore agli 8Kd sono ricombinanti e perciò il laboratorio è in grado di clonare ed esprimere proteine in forma nativa e modificate sito-specificamente. Per proteine di peso molecolare inferiore agli 8Kd, quando possibile si usano proteine native. La estrazione e purificazione è condotta in laboratorio. Infine si usano metodiche computazionali di modellismo e dinamica molecolare per rappresentare la struttura 3D di questi polipeptidi e per descriverne le caratteristiche di flessibilità molecolare.

Risultati ottenuti

È stato completato lo studio della struttura e dinamica della cRBP-I. Sono stati caratterizzati alcuni segmenti della proteina IF1, inibitore della ATPasi, sono state analizzate ulteriormente le caratteristiche conformazionali di vari fragmenti del recettore AT₁. Tutto ciò è stato realizzato usando la spettrometria NMR multinucleare e multidimensionale e la spettroscopia CD. Infine è stata determinata la struttura cristallografica di una isoforma ricombinante di major urinary proteins, rMUP.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

1) Franzoni L., Nicastrò G., Pertinhez T.A., Oliveira E., Nakaie C.R., Paiva A.C.M., Schreier S. and Spisni A.

"Structure of two fragments of the Third Cytoplasmic Loop of the Rat Angiotensin II AT_{1A} Receptor: Implications with Respect to Receptor Activation and G-Protein Selection and Coupling" Journal of Biological Chemistry 1999, 274, 227-235

- 2)Duranti M.A., Franzoni L., Sartor G., Benedetti A., Iwai L.K., Gruber A., Zingales B., Guzman F., Kalil J., Spisni A. and Cunha-Neto E. "Trypanosoma Cruzi: Conformational Preferences of Antigenic Peptides Bearing the Immunodominant Epitope of the B13 Antigen" *Exp. Parasitol.*, 1999, 93, 38-44
- 3)Abbate F., Franzoni L., Löhr F., Lücke C., Ferrari E., Sorbi R.T., Rüterjans H. and Spisni A. "Letter to the Editor: Complete ¹H, ¹⁵N and ¹³C Assignment of the Recombinant Mouse Major Urinary Protein" *J. Biomol. NMR*, 1999, 15, 187-188
- 4)Lücke C., Franzoni L., Abbate F., Löhr F., Ferrari E., Sorbi R.T., Rüterjans H. and Spisni A. "Solution Structure of a Recombinant Mouse Major Urinary Protein" *European J. Biochem.*, 1999, 266, 1210-1218
- 5)Sartor G., Pagani R., Ferrari E., Tibor Sorbi R., Cavaggioni A., Cavatorta P. and Spisni A. "An evaluation of the binding properties of the mouse Major Urinary Proteins using 2-naphthol as a fluorescent probe" *Analytical Biochemistry*, 2001, 292, 69-75
- 6)Paula R. Kuser, Lorella Franzoni, Elena Ferrari, Alberto Spisni and Igor Polikarpov "The X-ray structure of a recombinant major urinary protein at 1.75 Å resolution. A comparative study of X-ray and NMR-derived structures" *Acta Crystallographica sect. D.*, 2001, D57, 1863-1869
- 7)Thelma A. Pertinhez, Regina Krybus, Eduardo M. Cilli, Antonio C.M. Paiva, Clóvis R. Nakaie, Lorella Franzoni, Giorgio Sartor, Alberto Spisni and Shirley Schreier "Conformational Flexibility of three Cytoplasmic Segments of the Angiotensin II AT_{1A} Receptor. A Circular Dichroism and Fluorescence Spectroscopy Study" *J. Peptide Science*, (2002), 8, 23-35
- 8)Lorella Franzoni, Christian Lücke, Carlos Pérez, Davide Cavazzini, Martin Rademacher, Christina Ludwig, Alberto Spisni, Gian Luigi Rossi e Heinz Rüterjans "Structure and Backbone Dynamics of Apo- and Holo-Cellular Retinol-Binding Protein in Solution" *J. Biological Chemistry* (2002), 277, 21983-21997
- 9)Cesira de Chiara, Giuseppe Nicastro, Alberto Spisni, Franco Zanotti, Tiziana Cocco and Sergio Papa "Activity and NMR structure of synthetic peptides of the bovine ATPase inhibitor protein, IF₁" *Peptides* (2002) in press
- 10) Roberto K. Salinas, Claudio S. Shida, Thelma A. Pertinhez, Alberto Spisni, Clovis R. Nakaie, Antonio C.M. Paiva and Shirley Schreier "Trifluoroethanol and Binding to Model Membranes Stabilize a Predicted Turn in a Peptide Corresponding to the First Extra-Cellular Loop of the Angiotensin II AT_{1A} Receptor" *Biopolymers* (2002) in press
- 11) Leonardo F. Fraceto, L.M.A. Pinto, Lorella Franzoni, A.A.C. Braga, Alberto Spisni, Shirley Schreier and Eneidan de Paula "Spectroscopic Evidence for a Preferential Location of Lidocaine inside Phospholipid Bilayers" *Biophysical Chemistry* (2002) in press

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Completare la descrizione delle porzioni citoplasmatiche del recettore della angiotensina II e dello α -adrenenrgico. Continuare gli studi sul meccanismo di entrata ed uscita del retinolo nella cRBP, studiare alcuni aspetti del processo di unfolding e refolding della rMUP, completare la struttura della crotamina e della TsTx-IV, determinare la struttura di alcune tossine presenti in funghi e nel veleno di scorpione. Clonare ed esprimere mutanti sito specifici della MUP per modularne la funzione biologica.

Collaborazioni internazionali in atto

- Prof. Gian Luigi Rossi, Istituto di Scienze Biochimiche, Università di Parma, Parma;
- Prof. Paulo Lee Ho, Instituto Butantan, São Paulo, Brasile;
- Prof. Heinz Rüterjans, Institute of Biophysical Chemistry, J.W. Goethe University, Frankfurt, Germany.

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

- Spettrofotometro per dicroismo circolare Jasco J715
- NMR Varian Inova 600 (operativo da fine anno)
- Sistema per purificazione di proteine Akta Purifier
- Workstation Silicon Graphics O2
- Spettrometro di Massa MALDI-TOF Micromas (operativo da fine anno)

Parole Chiave

NMR, CD, proteine, struttura, proteine ricombinanti, dinamica molecolare.

UNITA' DI RICERCA INBB
Venezia

Responsabile Scientifico
Roberto STEVANATO

Linea di Ricerca

SINTESI, CARATTERIZZAZIONE E STUDIO DELLE POSSIBILI INTERAZIONI CON MEMBRANE E CON LA FISIOLOGIA MITOCONDRIALE DI NO-FENOLODERIVATI.

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Roberto STEVANATO	PO	rstev@unive.it
Federico MOMO	PA	momo@unive.it

Non Aderenti INBB

Achille ZANIN	PT	azanin@unive.it
Sabrina FABRIS	DR	sabri@unive.it

Sede Unità di Ricerca Dipartimento di Chimica Fisica

Indirizzo: Dorsoduro 2137 – 30123 - Venezia

Telefono : 041.2348600

Fax: 041.2348594

E-mail: rstev@unive.it

Sezione INBB di appartenenza

Padova

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Recentemente abbiamo evidenziato che nei mitocondri energizzati da succinato, il nitrosopropofol (2,6-diisopropil-4-nitrosufenolo) interferisce con il metabolismo energetico mitocondriale con andamento dipendente dalla concentrazione e si osserva la completa inibizione a concentrazioni dell'ordine di 100 μ M, come risulta da misure di respirazione.

Esperimenti ESR e DSC sull'influenza di propofol e nitrosopropofol sulle proprietà di membrana di liposomi fosfolipidici hanno dimostrato una notevole perturbazione provocata dal nitrosoderivato, che risulta inserirsi nel doppio strato lipidico in corrispondenza delle teste polari, mentre il propofol, molecola omologa privata del gruppo NO, diffusamente utilizzato come anestetico, appare invece sistemarsi in profondità nello strato lipidico, approssimativamente a confine fra i due foglietti.

L'attenzione su questi composti deriva da osservazioni preliminari dalle quali è emerso che la simultanea presenza di propofol e nitrosoglutatione, un NO-donatore fisiologico, influenza la respirazione residua e quella stimolata da ADP, la sintesi dell'ATP e la formazione ed utilizzazione del potenziale elettrochimico transmembrana. E' stato dimostrato che, in presenza di Cu^{2+} , ma analoga azione catalizzatrice può essere svolta anche da proteine al rame, il propofol reagisce con S-nitrosoglutatione producendo il nitrosopropofol ed il 4,4'-diidrossi-3,3',5,5'-tetraisopropilbifenile (dipropofol), come confermato da verifiche analitiche spettrofotometriche, gascromatografiche e di spettrometria di massa.

Data l'importanza dei risultati, si è quindi ritenuto di procedere alla sintesi del nitrosopropofol mediante una procedura messa a punto dallo scrivente gruppo di ricerca sulla base di indicazioni riportate in letteratura, al fine di dare una interpretazione precisa del fenomeno e valutarne le conseguenze a livello fisiologico.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

- 1) Vianello, F., Malek-Mirzayans, A., Di Paolo, M.L., Stevanato, R., Rigo, A. Purification and characterization of amino oxidase from pea seedlings. *Protein Expr. Purif.* 15(2), 196-201 (1999)
- 2) Toninello, A., Dalla Via L., Stevanato, R., Yagisawa S. Kinetics and free energy profiles of spermine transport in liver mitochondria *Biochemistry*, 39/2, 324-331 (2000).
- 3) Momo, F., Fabris, S., Stevanato, R. Interaction of linear mono and di-amines with DMPC and DMPG multilamellar liposomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 382/2, 224-231 (2000)
- 4) Stevanato, R., Momo, F., Marian, M., Rigobello, M.P., Bindoli, A., Bragadin, M., Vincenti, E., Scutari, G. Combined effect of propofol and GSNO on oxidative phosphorylation of isolated rat liver mitochondria *Nitric Oxide* 5/2, 158-165 (2001)

- 5) Momo, F., Fabris, S., Stevanato, R. Chemical physical aspects of the interactions of amines with phospholipid membranes Recent Research Developments in Biophysics and Biochemistry 1, 173-187 (2001)
- 6) Momo, F., Fabris, S., Bindoli, A., Scutari, G., Stevanato, R. Different effects of propofol and nitrosopropofol on DMPC multilamellar liposomes. Biophysical Chemistry 95(2), 145-55 (2002)
- 7) Stevanato, R., Momo, F., Marian, M., Rigobello, M.P., Bindoli, A., Bragadin, M., Vincenti, E., Scutari, G. Effects of nitrosopropofol on mitochondrial energy-converting system. Submitted to Biochemical Pharmacology

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

- la sintesi chimica e la purificazione di nitrosoderivati di omologhi del fenolo;
- lo studio ESR e DSC degli effetti di differenti fenolonitrosoderivati sulle proprietà di membrana e la verifica delle possibili correlazioni con le caratteristiche chimicofisiche delle sostanze in esame;
- la verifica del possibile rilascio di NO ed delle relative condizioni chimicofisiche;
- l'individuazione della natura e del destino degli eventuali residui molecolari degli NO-derivati privati del gruppo NO;
- la misura degli effetti di questa classe di sostanze sulla respirazione mitocondriale;
- lo studio delle possibili proprietà antiossidanti di questa classe di molecole.

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

- Spettrometro ESR Bruker
- Gascromatografo GC17A con rivelatore a selezione di massa QP 5000 Shimadzu
- Calorimetro differenziale a scansione Setaram DSC92
- Microcalorimetro LKB 2107
- Spettrofotometro DU 640 Beckman
- Autoclave e attrezzatura per la sintesi di NO-derivati

Parole Chiave

NO-fenoloderivati; liposomi; membrane; respirazione mitocondriale

UNITA' DI RICERCA INBB
Ancona

Responsabile Scientifico

Fabio TANFANI

Linea di Ricerca

RELAZIONI STRUTTURA-FUNZIONE NELLE PROTEINE

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Fabio TANFANI	PA	tanfani@popcsi.unian.it
Enrico BERTOLI	PO	segbioch@popcsi.unian.it

Non Aderenti INBB

Andrea SCIRE'	DR	fabiolab@popcsi.unian.it
Francesco Maria PIERFEDERICI	DR	fabiolab@popcsi.unian.it

Sede Unità di Ricerca

Istituto di Biochimica, Università di Ancona

Indirizzo Via Ranieri, 60131 Ancona

Telefono 071-2204687.

Fax 071-2204398

E-mail tanfani@popcsi.unian.it

Sezione INBB di appartenenza

ROMA "Tor Vergata"

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Negli ultimi tre anni questa unità di ricerca si è dedicata allo studio della struttura di varie proteine da organismi termofili e mesofili. In particolare abbiamo studiato la beta glicosidasi ed un fattore di allungamento da *Sulfolobus solfataricus*, una esterasi da *Bacillus acidocaldarius* ed un'altra da *Archaeoglobus fulgidus*. Per quanto riguarda gli organismi mesofili abbiamo studiato una proteina legante gli odori, una transglutaminasi, una fosforilasi, la gliossalasi II, FIATPasi, H⁺-ATPasi e Na⁺/K⁺-ATPasi.

L'obiettivo era quello di caratterizzare in dettaglio le variazioni di struttura secondaria, terziaria e di compattezza delle proteine indotte da vari fattori, incluse le alte temperature, il legame con substrati ed inibitori, soluzioni saline, interazioni con lipidi. Le variazioni strutturali osservate venivano quindi correlate con dati funzionali.

Risultati ottenuti

I risultati ottenuti da queste ricerche hanno permesso di ottenere informazioni sulla termostabilità delle proteine, sui cambiamenti conformazionali indotti da inibitori, sali, lipidi ed altri fattori. I dati strutturali, correlati con quelli funzionali, hanno contribuito in modo significativo alla comprensione delle relazioni struttura-funzione nelle suddette proteine.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

1. Paolini S., Tanfani F., Fini C., Bertoli E. and Pelosi P. (1999) Porcine odorant-binding protein: structural stability and ligand affinities measured by Fourier transform infrared spectroscopy and fluorescence spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta* 1431, 179-188
2. D'Auria S., Nucci R., Rossi M., Bertoli E., Tanfani F., Gryczynski I., Malak H. and Lakowicz J.R. (1999) β -glycosidase from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*: structure and activity in the presence of aliphatic alcohols. *Journal of Biochemistry (Tokyo)* 126, 545-552
3. Bergamini C.M., Dean M., Matteucci G., Hanau S., Tanfani F., Ferrari C., Boggian M., and Scatturin A. (1999) Conformational stability of human erythrocyte transglutaminase: Patterns of thermal unfolding at acidic and alkaline pH. *European Journal of Biochemistry* 266, 575-582
4. D'Auria S., Herman P., Lakowicz J.R., Bertoli E., Tanfani F., Rossi M. and Manco G. (2000) The thermophilic Esterase from *Archaeoglobus fulgidus*: Structure and conformational dynamics at high temperature. *Proteins: Structure-Function-Genetics* 38, 351-360
5. Tanfani F., Linnertz H., Obsil T., Krumscheid R., Urbanova P., Jelinek O., Mazzanti L., Bertoli E., Schoner W., and Amler E. (2000) Effects of fluorescent pseudo-ATP and ATP-metal analogs on secondary structure of Na⁺/K⁺-ATPase. *Biochimica Biophysica Acta* 1457, 94-102

6. Griebler R., D'Auria S., Schinzel R., Tanfani F., and Nidetzky B. (2000) Mechanism of thermal denaturation of maltodextrin-phosphorylase from *Escherichia coli*. *Biochemical Journal* 346, 225-263
7. Griebler R., D'Auria S., Tanfani F., and Nidetzky B. (2000) Thermal denaturation pathway of starch phosphorylase from *Corynebacterium callunae*. Oxyanion binding provides the glue that efficiently stabilizes the dimer structure of the protein. *Protein Science* 9, 1149-1161
8. D'Auria S., Herman P., Lakowicz J.R., Tanfani F., Bertoli E., Manco G. and Rossi M. (2000) The esterase from the thermophilic eubacterium *Bacillus acidocaldarius*. Structural-functional relationships and comparison with the esterase from the hyperthermophilic Archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Proteins: Structure-Function-Genetics* 40, 473-481
9. Scirè A., Tanfani F., Saccucci F., Bertoli E., and Principato G. (2000) Specific interaction of cytosolic and mitochondrial glyoxalase II with acidic phospholipids in form of liposomes results in the inhibition of the cytosolic enzyme only. *Proteins: Structure-Function-Genetics*. 41, 33-39
10. Lapathitis G., Tanfani F., Kotyk A., and Bertoli E. (2001) Two-dimensional gel electrophoresis and FT-IR spectroscopy reveal both forms of yeast plasma membran H^+ -ATPase in activated and basal-level enzyme preparation. *FEBS Letters* 505, 155-158
11. Contessi S., Tanfani F., Scirè A., Mavelli I., and Lippe G. (2001) Effects of Fe(III) binding to the nucleotide-independent binding site of F_1 ATPase: enzyme thermostability and response to activating anions. *FEBS Letters* 506, 221-224.
12. Tanfani F., Scirè A., Masullo M., Raimo G., Bertoli E., and Boccchini V. (2001) Salts Induce Structural Changes in the Elongation Factor 1α from the hyperthermophilic Archaeon *Sulfolobus solfataricus*: a Fourier-Transform Infrared Spectroscopic Study. *Biochemistry* 40, 13143-13148

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Per i prossimi tre anni sono previsti studi strutturali e funzionali riguardanti la beta glicosidasi da *Sulfolobus solfataricus* e alcuni suoi mutanti a cui sono stati sostituiti aminoacidi presenti nel sito attivo. Gli studi prevedono di analizzare la struttura delle proteine in assenza ed in presenza di vari substrati e di individuare mediante tecniche spettroscopiche i residui aminoacidici coinvolti nella catalisi. Studi simili verranno condotti sulla SOD dal *Sulfolobus solfataricus* e sulla fosforilasi dall'organismo mesofilo *Corynebacterium callunae*. In questo ultimo caso, verranno prodotti dei mutanti a cui sono stati sostituiti aminoacidi essenziali alla formazione di omodimeri. La proteina ricombinante ed i vari mutanti verranno analizzati soprattutto dal punto di vista della loro termostabilità, un importante requisito soprattutto in campo biotecnologico.

Collaborazioni internazionali in atto

Prof Bernd Nidetzky, Institut für Biotechnologie, AG Bio/Tecnologie, Technische Universität Graz (Austria): Studi su fosforilasi da vari organismi.

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

- 1 spettrometro FT-IR 1760-x (Perkin-Elmer)
- 1 spettrometro FT-IR NEXUS (nicolet) ...
- 1 Biosensore ottico IASys (Affinity Sensors)

Parole Chiave

Struttura secondaria, Proteine, Infrarosso, FTIR, Mutanti, Termostabilità,

UNITA' DI RICERCA INBB
Palermo

Responsabile Scientifico

Giovanni TESORIERE

Linea di Ricerca

MECCANISMI APOPTOTICI IN CELLULE TUMORALI PRIVE DEL PRODOTTO DEL GENE ONCOSOPPRESSORE RB

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Giovanni Tesoriere	PO	gtesor@unipa.it
Renza Vento	PO	rvento@unipa.it
Giuseppe Calvaruso	PA	gcalva@unipa.it
Michela Giuliano	PA	mgiulian@unipa.it

Non Aderenti INBB

Marianna Lauricella	RU	mlauricella2001@yahoo.it
Sonia Emanuele	RU	soniaemanuele@hotmail.com
Antonella D'Anneo	DR	Adanneo@hotmail.com
Anna De Blasio	DR	annadeblasio@inwind.it

Sede Unità di Ricerca

DPT di Biologia Cellulare e dello Sviluppo Sezione di Biochimica, Policlinico

Indirizzo Via del Vespro 129 90127 Palermo

Telefono 091 6552459 091 6552460

Fax 091 6552449

E-mail gtesor@unipa.it

Sezione INBB di appartenenza

Catania

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

L'inattivazione o la perdita del gene del retinoblastoma può rappresentare una tappa essenziale nel processo di tumorigenesi in molte forme neoplastiche umane, come il retinoblastoma l'osteosarcoma, il carcinoma del polmone, diverse forme di leucemie e carcinomi della mammella.

Il gene del retinoblastoma (RB) è un oncosoppressore ed il suo prodotto (la proteina pRb) è conosciuto come regolatore della trascrizione capace di controllare proliferazione, differenziamento e morte programmata.

Recenti valutazioni suggeriscono l'esistenza di una stretta correlazione tra la comparsa di un fenotipo apoptotico e la mancanza o l'inattivazione di pRb. Da tempo conduciamo studi in cellule tumorali prive di RB con l'obiettivo di dimostrare che l'assenza di pRb funzionale rappresenta una condizione che rende le cellule prone all'apoptosi.

Risultati ottenuti

Abbiamo condotto studi sugli eventi apoptotici nelle cellule di retinoblastoma umano Y79, caratterizzate dall'assenza di pRb. Abbiamo dimostrato che numerosi composti inducono apoptosi in queste cellule anche a concentrazioni particolarmente basse.

Grande efficacia hanno mostrato la camptotecina (inibitore della topoisomerasi I) e il suo analogo topotecano, il cisplatino e lo MG132 (inibitore del proteasoma 26S). L'azione di questi induttori si accompagna ad un notevole incremento del livello della p53 e dei suoi targets trascrizionali (p21, Bax, IGF-BP3). L'apoptosi può essere indotta nelle cellule Y79 anche dal sodio butirato, composto poco tossico per l'organismo, la cui associazione con camptotecina o MG132 determina un potentissimo effetto sinergico. Potente effetto apoptotico è anche indotto in queste cellule dall'acido arachidonico che induce stress ossidativo.

Successivi studi sono stati rivolti a cellule di osteosarcoma umano SAOS-2 che sono prive tanto di pRb che di p53. I risultati ottenuti hanno dimostrato che anche queste cellule sono suscettibili all'apoptosi. Per confermare che l'assenza di pRb è una condizione che rende le cellule prone all'apoptosi, abbiamo trasfettato RB nelle cellule SAOS-2. I cloni ottenuti stabilmente trasfettati con RB sembrano essere particolarmente resistenti all'apoptosi.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

The apoptotic effects and synergistic interaction of sodium butyrate and MG132 in human retinoblastoma Y79 cells.

M. Giuliano, M. Lauricella, G. Calvaruso, M. Carabillò, S. Emanuele, R. Vento and G. Tesoriere.

Cancer Res. 59, 5586-5595 (1999).

Induction of apoptosis by arachidonic acid in human retinoblastoma Y79 cells: Involvement of oxidative stress.
R. Vento, N. D'Alessandro, M. Giuliano, M. Lauricella, M. Carabillò, G. Tesoriere
Exp. Eye Res. 70, 503-517, (2000).

Synergistic cytotoxic interactions between sodium butyrate, MG132 and camptothecin in human retinoblastoma Y79 cells.
M. Lauricella, G. Calvaruso, M. Giuliano, M. Carabillò, S. Emanuele, R. Vento and G. Tesoriere.
Tumor Biol. 21, 337-438, (2000)

pRb suppresses camptothecin-induced apoptosis in human osteosarcoma Saos-2 cells by inhibiting c-Jun terminal kinase.
M. Lauricella, G. Calvaruso, M. Carabillò, A. D'Anneo, M. Giuliano, S. Emanuele, R. Vento and G. Tesoriere.
FEBS Letters 499, 191-197 (2001)

Sodium phenylbutyrate induces apoptosis in human retinoblastoma Y79 cells: The effect of combined treatment with the topoisomerase I-inhibitor topotecan.
G. Calvaruso, M. Carabillò, M. Giuliano, M. Lauricella, A. D'Anneo, R. Vento and G. Tesoriere.
Int. J. Oncol. 18, 1233-1237 (2001)

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Abbiamo esteso i nostri studi a linee di epatoma umano caratterizzate dall'accumulo di β -catenina e nelle quali abbiamo di recente dimostrato l'inattivazione funzionale di pRb.
Siamo impegnati nella produzione di cloni stabilmente trasfettati con pRb e/o p53 da impiegare, in parallelo con le linee parentali prive di tali antioncogeni.
Abbiamo l'obiettivo di identificare "modelli" di cellule tumorali caratterizzate da alterazioni molecolari che le rendono sensibili "target" per droghe apoptotiche.

Collaborazioni internazionali in atto

Prof. Chris D. Gregory, MRC Centre for Inflammation Research, University of Edinburgh, George Square, Edinburgh
EMB 9XD

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Due cappe a flusso laminare; citofluorimetro EPIC COULTER XL; Microscopio a fluorescenza LEICA; sistema HPLC Gilson con doppia pompa, detector UV-vis e collettore di frazioni, geneAmp PCR system 2004, spettrofotometro Secoman.

Parole Chiave

Cellule tumorali, Apoptosi, pRb, p53, Bcl-2, caspasi, PARP, proteasoma.

UNITA' DI RICERCA INBB
Parma

Responsabile Scientifico

Rita TIRINDELLI

Linea di Ricerca

SISTEMI DI TRASDUZIONE DEI SISTEMI OLFATTIVI

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Roberto TIRINDELLI

PA

robertin@unipr.it

Non Aderenti INBB

Lucia SILVOTTI

PT

Giorgia MONTANI

BC

Elisabetta BIASI

DR

Sede Unità di Ricerca

Istituto di Fisiologia Umana, Università di Parma

Indirizzo Via Volturno, 39, I-43100, Parma

Telefono 0521-903890.

Fax 0521-903900.

E-mail robertin@unipr.it

Sezione INBB di appartenenza

Milano

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

I ferormoni sono utilizzati per la comunicazione intraspecifica in quasi tutto il mondo animale. Nei mammiferi la comunicazione ferormonale fornisce una vasta gamma di informazioni sociali e sessuali utilizzando un complesso programma di emissione ed uno specifico sistema di rilevamento, il sistema olfattivo accessorio. In molti animali, invece, questi segnali chimici o ferormoni attivano neuroni nell'organo olfattivo accessorio o organo vomeronasale (VNO) di Jacobson.

Recentemente abbiamo identificato una famiglia di recettori (V2R) per feromoni che si è aggiunta ad un'altra precedentemente scoperta da altri (V1R).

Nel VNO poco è conosciuto riguardo alla decodificazione dei segnali sensoriali, tuttavia i putativi recettori sono stati ben caratterizzati. I recettori V1R, ad esempio, sono espressi radialmente dai neuroni della parte apicale dell'epitelio sensoriale, mentre i V2R in una regione più basale.

I recettori V2R sono strutturalmente correlati alle famiglie di GPCR che includono il recettore sensibile al calcio (CaSR) ed i recettori metabotropici del glutammato (mGluRs). Tutti presentano in comune una larghissima regione extracellulare (circa 70 Kda), presumibilmente deputata all'interazione con i propri ligandi. L'obiettivo è stato lo studio molecolare dei recettori V2R.

Risultati ottenuti

La caratterizzazione del pattern di espressione di un membro dei V2R, da noi identificato e denominato V2R₂, nell'epitelio vomeronasale, ci ha dimostrato che questi si coesprime con tutti gli altri recettori ferormonali. Da ciò viene dedotto che ciascun neurone vomeronasale esprime una combinazione di due tipi di recettori di cui uno è sempre V2R₂. Una possibilità che stiamo confermando è che una eterodimerizzazione sia necessaria, come avviene per i recettori GABA_b, per l'esportazione sulla membrana e l'interazione con il ligando.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

- 1) Cavaggioni, A, Mucignat, C, and Tirindelli, R. (1999) Pheromone signalling in the mouse: role of urinary proteins and vomeronasal organ. Archives Italiennes de Biologie, 137, 193-200
- 2) Giacobini, P, Benedetto, A, Tirindelli, R, and Fasolo, A. (2000) Proliferation and migration of receptor neurons in the vomeronasal organ of the adult mouse. Dev. Brain Res. 123, 33-40
- 3) Martini, S., Silvotti, L., Shirazi, A., Ryba, N.J.P. and Tirindelli, R. (2001) Co-expression of putative pheromone receptors in the sensory neurons of the vomeronasal organ. J. Neurosci. 21, 843-848.
- 4) Biasi E, Silvotti L, Tirindelli R. (2001) Pheromone detection in rodents. Neuroreport. 12(14):A81-4.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Lo studio prevederà:

Studio struttura-funzione dei recettori V2R

Ricerca dei ligandi per questi recettori

Collaborazioni internazionali in atto

Dr Nicholas Ryba, NIDR, NIH, Bethesda, USA

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Laboratorio di Biologia Molecolare

Laboratorio per colture cellulari

Laboratorio per manipolazione di embrioni e transgenesi

Parole Chiave

Olfatto, Trasduzione, Ferormoni, Recettori, G-Protein , Transgeni, Roditori.

UNITA' DI RICERCA INBB
Bologna

Responsabile Scientifico

Vittorio TOMASI

Linea di Ricerca

RUOLO FISILOGICO DELLA PROTEINA PRIONICA

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Vittorio TOMASI	PO	Tomasi@alma.unibo.it
Non Aderenti INBB		
Enzo SPISNI	RU	Spisni@alma.unibo.it
Spartaco SANTI	A	
Federico LICASTRO	PA	Licastro@alma.unibo.it
Tiziana GUARNIERI	PT	Guarniei@alma.unibo.it
Cristiana GRIFFONI	BC	Tomasi@alma.unibo.it
Massimo RICCIO	DR	

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di biologia sperimentale, Università di Bologna

Indirizzo : Via Selmi 3 40126 Bologna

Telefono 0512094147

Fax 051251208

E-mail tomasi@alma.unibo.it

Sezione INBB di appartenenza

Bologna

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Il ruolo della proteina prionica nella trasduzione del segnale a livello di caveole è stato studiato utilizzando cellule neurali e non neurali. I risultati hanno evidenziato che la proteina prionica viene internalizzata a partire dai RAFTS, si lega alla caveolina-1 ed infine partecipa al reclutamento di trasduttori di segnale come la proteina ERK ½. I risultati di queste ricerche sono stati comunicati in diversi congressi internazionali, sono stati in parte inseriti in una review (Massimino et al., Cell Signalling 2002) e sono in corso di presentazione per la stampa.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

- 1) C. Griffoni, E. Spisni, S.Santi, M. Riccio, T. Guarnieri, V.Tomasi (2000) Knock down of caveolin-1 by antisense oligonucleotides impairs angiogenesis in vitro and in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276, 756-761.
- 2) V. Tomasi, E. Spisni, C. Griffoni, T. Guarnieri (2000) Caveolae, caveolar enzymes and angiogenesis. Current topics in Biochemical Research. 3, 81-90.
- 3) E. Spisni, C. Griffoni, S. Santi, M. Riccio, R. Marulli, V. Tomasi (2001) Co-localization of prostacyclin (PGI₂)-synthase and caveolin-1 in endothelial cells underscores new roles of PGI₂ in angiogenesis. B. Samuelsson Adv. Prost. Leuk. Res. Vol. 16, pp 139-142 Kluwer Academic Publisher.
- 4) C. Griffoni, P. P. Laktionov, E. Y. Rykova, E. Spisni, M. Riccio, S. Santi, A. V. Bryksin, N. V. Volodko, R. Kraft, V. V. Vlassov, V. Tomasi (2001) The Rossmann fold of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is a nuclear docking site for antisense oligonucleotides containing a TAAAT motif. *Biochim. Biophys. Acta.* 1530, 32-46.
- 5) E. Spisni, C. Griffoni, S. Santi, M. Riccio, R. Marulli, G. Bartolini, M. Toni, V. Ullrich, V. Tomasi (2001) Co-localization prostacyclin (PGI₂) synthase – caveolin 1 in endothelial cells and new roles for PGI₂ in angiogenesis. *Exp. Cell Res.* 266, 33-43.
- 6) Tomasi V., Laktionov P.P., Bryksin A.V., Volod'ko N.V., Griffoni C., Rykova E.Y., Spisni E., Kraft R., Vlassov V.V. (2001) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is responsible for intranuclear localization of some oligonucleotides. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 20: 863-867

7) M. L. Massimino, C. Griffoni, M. Toni, E. Spisni, V. Tomasi (2002) Involvement of caveolae and caveolae-like domains in signalling, cell survival and angiogenesis. *Cell. Signall.* 14, 1-6.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

L'obiettivo primario è quello di mettere a punto tecniche proteomiche (utilizzo di fusion proteins con GST oppure tecnica TAP-TAG) utili per isolare complessi caveolari coinvolti nella trasduzione del segnale ai fini di valutare il ruolo della proteina prionica nella organizzazione sopramolecolare di tali complessi.

Collaborazioni internazionali in atto

Pavel.Laktionov e Valentin Vlassov, Academy of Science, Novosibirsk, Lab of Biorganic Chemistry, Russia
V. Ullrich, Faculty of Biology, University of Konstanz, Germany

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

DNA/RNA synthesizer PERKIN-Elmer

DNA sequencer, Perkin-Elmer.

Microscopio confocale Saraastro con dispositivo per il monitoraggio di cellule vive

Unità completa per colture cellulari

Parole Chiave

Caveole e trasduzione del segnale

UNITA' DI RICERCA INBB
Bari

Responsabile Scientifico

Giovanna VALENTI

Linea di Ricerca

SEGNALI INTRACELLULARI COINVOLTI NELLA TRAFFICO VESCICOLARE DEL CANALE PER L'ACQUA ACQUAPORINA 2

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Giovanna VALENTI

PO

g.valenti@biologia.uniba.it

Non Aderenti INBB

Monica CARMOSINO

Assegnista *

m.carmosino@biologia.uniba.it

Antonia LAERA

DR

a.laera@biologia.uniba.it

Giuseppe PROCINO

DR

g.procino@biologia.uniba.it

Sabine GOURAUD

DR

gouraud@biologia.uniba.it

Grazia TAMMA

DR

gratamma@tin.it

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Fisiologia Generale ed Ambientale, Università degli Studi di Bari

Indirizzo Via Amendola n. 165/A –70126 Bari

Telefono 080/5443328

Fax 080/5443444

E-mail g.valenti@biologia.uniba.it

Sezione INBB di appartenenza

Bari

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

La AQP2 è il canale per l'acqua regolato dall'ormone antidiuretico, avente la sua maggiore espressione nel dotto collettore renale. La regolazione di permeabilità di questo canale è fondamentale per il bilancio idrico dell'intero organismo. Mutazioni di AQP2 sono associate ad una forma genetica autosomica di diabete insipido nefrogenico. La nostra ricerca e' incentrata alla identificazione dei segnali (proteine G, protein chinasi SNARE, Ca) che regolano il traffico intracellulare della AQP2. Molti di questi segnali sono stati analizzati nel nostro laboratorio. Inoltre particolare attenzione e' stata rivolta allo studio di patologie ereditarie o acquisite associate a mancato funzionamento della AQP2 o delle proteine coinvolte nella cascata di segnali che portano alla sua attivazione.

Risultati ottenuti

In particolare ci siamo interessati ad una mutazione che induce un fenotipo dominante di NDI, la mutazione AQP2-E258K dove il residuo di acido glutamico in posizione 258 e' sostituito da una lisina. Dati preliminari ottenuti nel nostro laboratorio suggeriscono che la AQP2-E258K è bloccata nell'apparato del Golgi a causa della mancata fosforilazione costitutiva della AQP2-E258K in ser-256 da parte di un'altra serin-chinasi che abbiamo tentativamente identificato come Golgi-casein chinasi (G-CK). Pertanto il fenotipo NDI potrebbe essere dovuto all'incapacità della AQP2 mutata di entrare nel corretto compartimento vescicolare. Inoltre nel nostro laboratorio abbiamo esteso la nostra ricerca ad altre patologie caratterizzate da disordini del bilancio idrico quali la enuresi notturna. A questo riguardo chiari evidenze sperimentali sono state ottenute a favore di un ruolo chiave giocato dalla AQP2 in questa patologia (Valenti et al JASN 2000) suggerendo anche un efficace intervento terapeutico (Valenti et al Am. J. Physiol. 2002).

Gran parte del nostro lavoro sperimentale è rivolto alla caratterizzazione dei segnali intracellulari che regolano il traffico della AQP2. Il nostro interesse scientifico è stato rivolto al ruolo delle proteine G monomeriche della famiglia delle Rho nel traffico intracellulare della AQP2 (Tamma et al Am. J. Physiol. 2001, Klusmann et al J.Biol. Chem. 2001). Abbiamo definito che una inibizione di RhoA è una tappa fisiologica della cascata di segnali indotti dalla vasopressina. La inibizione di RhoA ha l'effetto di disorganizzare il citoscheletro di actina subapicale favorendo la fusione delle vescicole contenenti la AQP2. Inoltre il nostro laboratorio ha ottenuto la prima evidenza sperimentale sul ruolo funzionale delle proteine SNAREs nella traslocazione vescicolare della AQP2 indotta dalla vasopressina (Gouraud et al. J. Cell Sci. 2002).

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

- 1-Gouraud S, Laera A, Calamita G, Carmosino M, Rossetto O, Mannucci R, Rosenthal W, Svelto M, Valenti G
Requirement for VAMP/synaptobrevin-2 in cAMP-stimulated Aquaporin 2 translocation in renal collecting duct cells.
J. Cell Sci 2002 (in press)
- 2- Valenti G, Laera A, Gouraud S, Pace G, Aceto G, Penza R, Selvaggi FP, Svelto M
Low calcium diet in hypercalciuric enuretic children restores normal urinary Aquaporin 2 excretion and improves clinical symptoms
Am. J. Physiol. Renal Physiol. 2002 (in press)
- 3- Procino G, Carmosino M, Marin O, Brunanti AM, Contri A, Pinna LA, Mannucci R, Nielsen S, Kwon TH, Svelto M, Valenti G
Phosphorylation of Aquaporin-2 at Ser-256: A mechanism for coupling exit from Golgi complex and targeting the plasma membrane
J Cell Biol. 2001 (submitted)
- 4- Carmosino M, G. Procino, Nicchia GP, Mannucci R, Verbavatz JM, Gobin R, Svelto M, Valenti G
Histamine treatment induces rearrangements of orthogonal arrays of particles (OAPs) in human AQP4-expressing gastric cells.
J Cell Biol 2001 Sep 17;154(6):1235-44.
- 5-Tamma G, Klusmann E, Maric K, Aktories K, Svelto M, Rosenthal W, Valenti G
The small GTP-binding protein Rho inhibits cAMP-induced translocation of aquaporin-2 into the apical membrane of renal cells.
Am J Physiol Renal Physiol 2001 Dec;281(6):F1092-101
- 6- Klusmann E, Tamma G, Lorenz D, Wiesner B, Maric K, Hofmann F, Aktories K, Valenti G, Rosenthal W
An Inhibitory Role of Rho in the Vasopressin-mediated Translocation of Aquaporin-2 into Cell Membranes of Renal Principal Cells.
J Biol Chem 2001 Jun 8;276(23):20451-20457
- 7- Calamita G, Mazzone A, Cho YS, Valenti G, Svelto M
Expression and localization of the aquaporin-8 water channel in rat testis.
Biol Reprod 2001 Jun;64(6):1660-6
- 8- Valenti G
Le Acquaporine: una famiglia di canali per l'acqua
Nefrologia pediatrica. Eds BIOS 47-58 2001
- 9- Carmosino M, Procino G, Casavola V, Svelto M, Valenti G
The cultured human gastric cells HGT-1 express the principal transporters involved in acid secretion.
Pflugers Arch 2000 Oct;440(6):871-80
- 10- Valenti G, Laera A, Pace G, Aceto G, Lospalluti ML, Penza R, Selvaggi FP, Chiozza ML, Svelto M
Urinary aquaporin 2 and calciuria correlate with the severity of enuresis in children.
J Am Soc Nephrol 2000 Oct;11(10):1873-81
- 11- Valenti G. Ruolo delle Acquaporine in fisiopatologia renale
Giornale Italiano di Nefrologia, 2000, 17, 63-79, (invited review)
- 12- Valenti G, Procino G, Carmosino M, Frigeri A, Mannucci R, Nicoletti I, Svelto M. The phosphatase inhibitor okadaic acid induces AQP2 translocation independently from AQP2 phosphorylation in renal collecting duct cells.
J Cell Sci 2000 Jun;113 (Pt 11):1985-92
- 13- Procino G, Carmosino M, Pinna LA, Nicoletti I, Nielsen S, Svelto M, Valenti G. Regulation of Aquaporin-2 water channel trafficking by phosphorylation: lessons from transfected epithelial cells
Molecular biology and physiology of water and solute transport, Goteborg 2000 (Edited by S. Nielsen and S. Hohmann. Kluwer, 173-178, (book chapter)
- 14- Klusmann E, Krause E, Wiesner B, Beyermann M, Edemir B, Bouchaala C, Lorenz D, Maric K, Tamma G, Valenti G, Rosenthal W
cAMP-mediated aquaporin-2 translocation: Identification of protein kinase A anchoring proteins potentially involved in AQP2 translocation and the role of the small GTPases of the Rho family in the translocation.
Molecular biology and physiology of water and solute transport, Goteborg 2000 (Edited by S. Nielsen and S. Hohmann. Kluwer, 145-149, 2000. (book chapter)

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

E' stato riportato che alcune forme di diabete insipido nefrogenico sono causate da mutazioni della AQP2. Ci proponiamo di trasfettare cellule renali di dotto collettore con la AQP2 mutata in questi particolari siti. Lo scopo e' quello di analizzare se la AQP2 mutata e' disturbata nel suo traffico intracellulare e in quali compartimenti subcellulari viene ritardata. Per analizzare la dinamica della interazione in vivo delle proteine segnale con i loro putativi effettori, ci proponiamo di usare la tecnica della FRET (fluorescence resonance energy transfer). La FRET e' un processo in cui l'energia e' trasferita da una molecola donatrice fluorescente ad una molecola accettrice fluorescente.

Collaborazioni internazionali in atto

Pof. Walter Rosenthal, Istituto di Farmacologia Molecolare, Berlino (Germania)

Prof. Michael Caplan, Yale University, USA
Prof. Carel van Os, University of Nijmegen, (Olanda)

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Camera per colture cellulari completa
Microscopio a fluorescenza
Apparato per elettroforesi ed Immunoblot
Attrezzatura di base per biologia molecolare
Apparato microfluorimetrico per misure di trasporto d'acqua
Centrifughe e Ultracentrifughe
FRET
Stop flow light scattering

Parole Chiave

Acquaporine; rene; G protein, diabete insipido nefrogenico, trasduzione del segnale

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

Responsabile Scientifico

Carlo VENTURA

Linea di Ricerca

STUDIO DELL'ESPRESSIONE GENICA NEL CORSO DEL DIFFERENZIAMENTO CELLULARE

titolo

Analisi dei meccanismi molecolari responsabili della cardiogenesi in cellule staminali embrionali pluripotenti

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Carlo VENTURA	PO	chim_med@ssmain.uniss.it
---------------	----	--------------------------

Margherita MAIOLI	BC	chim_med@ssmain.uniss.it
-------------------	----	--------------------------

Non Aderenti INBB

Francesco GALIMI	RU	fgalimi@uniss.it
------------------	----	------------------

Yolande ASARA	BC	yasara@uniss.it
---------------	----	-----------------

Sede Unità di Ricerca

Laboratorio Nazionale dell'Istituto Nazionale di Biostrutture e Biosistemi, Osilo (Sassari) e Laboratorio di Ricerche Cardiovascolari, Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Sassari

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

Telefono : 079-228277; 079-3441006

Fax : 079-228120

E-mail : chim_med@ssmain.uniss.it

Sezione INBB di appartenenza

Genova

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

In precedenti studi, abbiamo dimostrato che la cellula miocardica, oltre ad essere bersaglio di diversi fattori di crescita ed ormoni, rappresenta essa stessa una fonte di peptidi che potrebbero svolgere un ruolo determinante nella regolazione della crescita e del differenziamento cardiaco in condizioni normali e patologiche. Al riguardo, abbiamo precedentemente dimostrato che la cellula miocardica esprime il gene della prodinorfina ed è inoltre in grado di sintetizzare e secernere la dinorfina B, suo prodotto biologicamente attivo. Entrambi erano inoltre sovraespressi nei miociti di Syrian cardiomyopathic hamster, un modello sperimentale di cardiomiopatia ipertrofica

Nel presente progetto ci siamo proposti il duplice obiettivo di stabilire un eventuale ruolo del gene della prodinorfina nella cardiogenesi e di verificare se esistessero le premesse teoriche per un approccio terapeutico al recupero del danno miocardico basato sulla manipolazione del gene della prodinorfina in cellule staminali cardiache

Risultati ottenuti

Abbiamo prodotto evidenze sperimentali che indicano come il gene della prodinorfina svolga un ruolo causale nel processo della cardiogenesi, inducendo la trasformazione di cellule embrionali staminali in miociti cardiaci. Nella linea di cellule staminali murine P19, il gene della prodinorfina e la dinorfina B sono risultati essere sovraespressi in seguito all'esposizione cellulare a dimetilsolfossido (DMSO), agente differenziante in grado di indurre il fenotipo miocardico nelle cellule oggetto di studio. In assenza di DMSO, la dinorfina B, ha indotto l'espressione di trascritti cardiogenetici quali GATA-4 ed Nkx-2.5 assieme all'espressione di geni cardiospecifici quali α -myosin heavy chain (MHC) e myosin light chain-2V. A questi eventi molecolari corrispondeva la comparsa di una architettura specifica del fenotipo miocardico. Il differenziamento è risultato riconducibile ad un meccanismo autocrino della dinorfina mediato dalla sua interazione con specifici recettori oppioidi del sarcolemma.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

1. Pintus G., Tadolini B., Maioli M., Posadino A.M., Gaspa L., Ventura C. Heparin down-regulates phorbol ester-induced protein kinase c (PKC) gene expression in human endothelial cells: enzyme-mediated autoregulation of PKC- α and β genes. FEBS Letters 449: 135-140, 1999.
2. Ventura C., Pintus G., Maioli M. Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase gene expression to the rescue of myocardial contractility in hypothyroid associated heart failure. Cardiovasc. Res. 43: 282-284, 1999.
3. Ventura C., Maioli M., Pintus G., Gottardi G., Bersani F. Elf-pulsed magnetic fields modulate opioid peptide gene expression in myocardial cells. Cardiovasc. Res. 45: 1054-1064, 2000.

4. Ventura C., Maioli M. Opioid peptide gene expression primes cardiogenesis in embryonal pluripotent stem cells. *Circ. Res.* 87:189-194, 2000.
5. Ventura C. Maioli M. PKC control of gene expression. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 11:243-267, 2001.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Lo studio dei processi coinvolti nella cardiogenesi in cellule staminali pluripotenti al momento in fase assolutamente iniziale. La comprensione degli aspetti molecolari legati all' insorgenza del fenotipo miocardico é resa difficoltosa dalla scarsa disponibilità di metodologie dedicate allo studio su vasta scala della struttura e funzione del genoma.

Nel prossimo futuro ci proponiamo di utilizzare metodologie innovative della genomica molecolare, quali la "Serial analysis of Gene Expression" (SAGE), e i DNA Chips per affrontare in maniera organica lo studio dell' espressione genica nel corso del differenziamento miocardico e di patologie cardiovascolari

Collaborazioni internazionali in atto

1. Prof. James K. Gimzewski: Department of Chemistry and Biochemistry, UCLA, Los Angeles, CA, U.S.A.
2. Prof. Edward G. Lakatta: Laboratory of Cardiovascular Science, Gerontology Research Center, National Institute on Aging – National Institutes of Health, Baltimore, MD, U.S.A
3. Prof. Richard P. Harvey: The Victor Chang Cardiac Research Institute, 384 Victoria Street, Darlinghurst NSW 2010, Australia.

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Cappe a flusso laminare per colture cellulari, incubatori per colture cellulari, microscopi a trasmissione, apparati per PCR centrifughe, camere elettroforetiche orizzontali e verticali, HPLC.

Parole Chiave

Differenziamento Cellulare, Cellule Miocardiche, Endorfine, Espressione Genica, Fattori di Trascrizione, Recettori Nucleari, Nanobiotecnologie del DNA

UNITA' DI RICERCA INBB
Udine

Responsabile Scientifico

Paolo VIGLINO

Linea di Ricerca

STUDI STRUTTURALI DI PROTEINE AMILOIDOGENICHE.

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Paolo VIGLINO	PO	pviglino@mail.dstb.uniud.it
Gennaro ESPOSITO	PA	gesposito@mail.dstb.uniud.it
Alessandra CORAZZA	RU	acorazza@mail.dstb.uniud.it

Non Aderenti INBB

Giuliana VERDONE	DR	gverdone@mail.dstb.uniud.it
Fabio PETTIROSSI	DR *	fpettirossi@mail.dstb.uniud.it

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche – Università di Udine

Indirizzo P.le Kolbe 4- 33100 Udine

Telefono 0432 494320 - 494325

Fax 0432494301

E-mail pviglino@mail.dstb.uniud.it

Sezione INBB di appartenenza

Udine

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Una quindicina di proteine non correlate tra loro nè dal punto di vista della sequenza amminoacidica, nè per quanto riguarda il loro arrangiamento tridimensionale sono responsabili di altrettante patologie amiloidi. La caratteristica comune è il deposito nei tessuti e negli organi di fibrille amiloidi insolubili caratterizzate da un unico pattern conformazionale detto cross- β . Oltre alle proteine coinvolte in patologie amiloidi è stato scoperto da Dobson e collaboratori (Dobson 1999 *Trend Biochem. Sci.* 24:329-332) che altre proteine perfettamente solubili possono formare aggregati amiloidi in opportune condizioni portando alla formulazione dell'ipotesi che il riarrangiamento strutturale fino alla formazione di strutture cross- β sia una proprietà intrinseca delle catene polipeptidiche.

In particolare la nostra attenzione è rivolta alla beta2-microglobulina (β 2-m) e ad alcuni mutanti del lisozima coinvolti rispettivamente nella amiloidosi da dialisi (DRA) e in una forma di amiloidosi sistemica ereditaria non neuropatica.

La β 2-m nei soggetti sani si trova associata nel complesso maggiore di istocompatibilità (MHC), negli emodializzati (200,000 individui nella sola Europa) invece col tempo si accumula nel sangue e forma depositi amiloidi in una percentuale superiore al 90% dei pazienti rendendo la DRA una patologia di notevole rilevanza clinica.

Nel 1993 Pepys (Pepys et al. *Nature* 1993 362:553-557) ha scoperto che una delle proteine meglio caratterizzate, il lisozima, nella sua forma mutata, è soggetto ad una transizione conformazionale che porta la proteina a formare aggregati insolubili e fibrille amiloidi dando origine ad una amiloidosi sistemica ereditaria, non neuropatica. Mutazioni puntuali nel gene del lisozima danno luogo a due mutanti amiloidogenici (I56T, D67H) che sono stati caratterizzati dal gruppo di Pepys (Booth et al. 1997 *Nature* 385:787-793). Da tali studi risulta che solo il mutante D67H mostra una deviazione rispetto alla struttura nativa nella zona del dominio beta, mentre la variante I56T presenta ai raggi X la stessa struttura del lisozima nativo. Nel tentativo di stabilire una correlazione struttura-funzione per quanto riguarda la capacità dei mutanti del lisozima di formare amiloide è allo studio nel nostro laboratorio una variante naturale T70N non amiloidogenica (Booth et al. 2000 *Hum. Mut.* 18:180) che presenta la mutazione all'interno del dominio beta in analogia con il D67H.

Risultati ottenuti

Benchè fosse nota la struttura cristallografica della β 2-m nel complesso MHC (Bjorkman P.J. et al. 1987 *Nature* 329: 506-512.) abbiamo ritenuto particolarmente interessante risolvere, per via NMR, la struttura tridimensionale della β 2-m isolata in soluzione in modo da evidenziare differenze che potessero far luce sulla sua tendenza amiloidogenica (Verdone et al. 2002 *Protein Science* 11 : 487-499). Da tale studio abbiamo evidenziato che il folding globale della proteina in soluzione rimane invariato, ma che vi sono una serie di variazioni che coinvolgono gli strand I, II, V e VI e il loop tra gli strand V-VI. Tali differenze portano ad un minore impaccamento della proteina e sono tutte a carico delle aree della β 2-m che nel complesso contattano la catena pesante dell'MHC ponendo perciò l'attenzione sul ruolo della solvatazione nella stabilità della proteina.

Dallo studio NMR di mappe protoniche bidimensionali (2D-TOCSY, 2D-NOESY, 2D-DQF-COSY) del mutante T70N del lisozima umano è stato possibile evidenziare, attraverso un'analisi comparativa dei chemical shifts, che non vi sono variazioni significative al di fuori del dominio beta (residui 42-92): ciò sta a significare la sostanziale persistenza della struttura nativa nelle zone esterne a tale dominio. Partendo da questo presupposto è stato effettuato un modelling ristretto in cui i vincoli sperimentali riguardano solo i residui dal 42 al 90. Il risultato ottenuto mostra che il mutante T70N adotta una struttura simile a quella del lisozima nativo a dispetto della sua mutazione nelle vicinanze del D67 e del pattern di legami idrogeno che il residuo 70 ed il 67 formano nella proteina nativa.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

- 1) Fogolari F., Zuccato P., Esposito G., and Viglino P. Biomolecular electrostatics with the linearized Poisson-Boltzmann Equation Bioph. J. 76: 1-16, (1999)
- 2) Scarselli M, Bernini A, Segoni C, Molinari H, Esposito G, Lesk AM, Laschi F, Temussi P, Niccolai N. Tendami surface accessibility to the TEMPOL paramagnetic probe. J Biomol NMR. 2:125-33 (1999).
- 3) Tell G, Pellizzari L, Esposito G, Pucillo C, Macchia PE, Di Lauro R, Damante G. Structural defects of a Pax8 mutant that give rise to congenital hypothyroidism. Biochem J. 341 :89-93 (1999).
- 4) Corazza A., Vianello F., Zennaro L., Gourova N., Di Paolo ML., Signor L., Marin O. Rigo A. and Scarpa M. Enzyme mimics complexing Cu(II) ion: structure-function relationships. J. Peptide Res. 5 : 491-504 (1999).
- 5) Esposito G., Michelutti R., Verdone G., Viglino P., Hernandez H., Robinson C.V., Amoresano A., Dal Piaz F., Monti M., Pucci P., Mangione P., Stoppini M., Merlini G., Ferri G. and Bellotti V. Removal of N-terminal hexapeptide from human β_2 -microglobulin facilitates protein aggregation and fibril formation. Protein Science 9: 831-845, (2000).
- 6) Fogolari F., Ugolini R., Molinari H., Viglino P. and Esposito G. Simulation of electrostatic effects in Fab-antigen complex formation Eur. J. Biochem. 267: 4861-4869 (2000).
- 7) Esposito G., Viglino P., Novak M, Cattaneo A. The solution structure of the C-terminal segment of tau protein. J Pept Sci 11:550-9 (2000).
- 8) Niccolai N, Ciutti A, Spiga O, Scarselli M, Bernini A, Bracci L, Di Maro D, Dalvit C, Molinari H, Esposito G, Temussi PA. NMR studies of protein surface accessibility. J Biol Chem. 276:42455-61 (2001).
- 9) Scarpa M., Corazza A., Vianello F., Rigo A., Furlan L., Baldan N. and Rigotti P. Deuterium nuclear magnetic resonance for evaluating the metabolic status of livers subjected to warm ischemia *Transplantation*, 71 1515-1517 (2001).
- 10) Esposito G., Nadalin L., Verdone G., Corazza A., Viglino P., Fedrigio M. An improved method for pulse width calibration in indirectly detected experiments *Magnetic Resonance in Chemistry* 39 :249-250 (2001).
- 11) Verdone G., Corazza A., Viglino P., Pettirossi F., Giorgetti S., Mangione P., Andreola A., Stoppini M., Bellotti V., G. Esposito G. "NMR Solution Structure Of The Human β_2 -Microglobulin" Protein Data Bank Code: 1JNJ *Deposition Date*: 24-Jul-2001.
- 12) Verdone G., Corazza A., Viglino P., Pettirossi F., Giorgetti S., Mangione P., Andreola A., Stoppini M., Bellotti V. and Esposito G. "The solution structure of human β_2 -microglobulin reveals the prodromes of its amyloid transition" *Protein Science*, 11 :487-499 (2002).

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Nel caso della β_2 -m lo studio della struttura ci ha permesso di evidenziare una zona della proteina (N-term, loop II-III, loop V-VI) nella quale la solvatazione è particolarmente critica. Perciò sono alla studio 2 mutanti (R3A, H31Y) ed una forma troncata mancante dei primi 3 residui per confermare l'importanza dei contributi elettrostatici alla stabilità della proteina.

Per quanto riguarda il lisozima le evidenze strutturali della variante T70N e un'accurata analisi delle misure di scambio idrogeno-deuterio portano a concludere che non ci sia una correlazione diretta tra struttura tridimensionale e amiloidogenicità e che si debbano indirizzare gli studi per una migliore comprensione del fenomeno verso il legame tra cooperatività dei fenomeni di unfolding e stabilità. In altre parole a misurare i singoli contributi all'energia libera di folding e ad evidenziare la correlazione tra i vari termini.

Collaborazioni internazionali in atto

- 1) Prof. Ian Campbell -Dept. of Biochemistry, University of Oxford, Oxford UK
- 2) Prof. Pascal Dumy - L.E.D.S.S.V. VI - Université Joseph Fourier de Grenoble - Grenoble FRANCE

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Spettrometro NMR Bruker operante a 500 MHz sul ^1H dotato di probe con gradienti di campo.

3 stazioni grafiche Sgi per l'analisi dei dati NMR e per calcoli di meccanica e dinamica molecolare:

- 1) Octane, 2) O₂, 3) Indigo

rete di PC Linux

Parole Chiave

Amiloidosis, β_2 -microglobulina, human lysozyme, NMR, protein structure, protein folding, misfolding

UNITA' DI RICERCA INBB
Bari

Responsabile Scientifico

Francesco VITIELLO

Linea di Ricerca

STUDIO DELLA PLASTICITÀ SINAPTICA IN SISTEMI NEURONALI SEMPLICI

Composizione del Gruppo

Non Aderenti INBB

Maria Vincenza POLICASTRO

DR

mv.policastro@fisiol.uniba.it

Gennaro DIANA

PT

gdiana@fisiol.uniba.it

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Farmacologia e Fisiologia Umana - Sezione di Fisiologia Umana - Policlinico,

Indirizzo Piazza Giulio Cesare , 70124-Bari

Telefono: 0805478523

Fax: 0805478417

E-mail: f.vitiello@fisiol.uniba.it

Sezione INBB di appartenenza:

Bari

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

L'attività si è focalizzata sullo studio, nel sistema nervoso di invertebrato, (i) delle variazioni dell'espressione genica nel neurone presinaptico dovute alla formazione del contatto con la cellula bersaglio e (ii) della regolazione della liberazione del neurotrasmettitore da parte di tossine batteriche.

Modello molto utile per lo studio dei fenomeni di plasticità sinaptica si è rivelato il circuito ricreato in vitro fra il neurone gigante serotonergico C1 del ganglio cerebrale del mollusco polmonato *Helix* ed il suo bersaglio fisiologico, il neurone postsinaptico B2 del ganglio buccale. Il lavoro svolto ha portato all'individuazione di alcune sequenze differenzialmente espresse nel neurone C1 di *Helix* integrato in un circuito funzionale con il suo bersaglio fisiologico B2 rispetto allo stesso neurone presinaptico coltivato in condizioni in cui non può formare un contatto funzionale attivo in quanto in presenza di un bersaglio non fisiologico.

Per lo studio dell'influenza che le piccole proteine G della superfamiglia delle proteine Ras hanno sulla liberazione del neurotrasmettitore, è stato utilizzato un modello sperimentale costituito da un sistema *in vitro* di neuroni di *Aplysia* che consente l'analisi elettrofisiologica delle sinapsi e la microiniezione di tossine clostridiali in grado di alterare i meccanismi di liberazione del mediatore. Nel corso di questo lavoro sono state studiate la localizzazione delle proteine Ras nel terminale presinaptico ed il loro effetto sulla probabilità del legame di una vescicola sinaptica alla zona attiva. I risultati ottenuti dimostrano che, fra le proteine Ras, solo Rac influenza la liberazione del neurotrasmettitore, molto probabilmente tramite un meccanismo calcio-dipendente.

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

- 1) Doussau F., Humeau Y., Vitiello F., Popoff M.R. e Poulain B. (1999) Dissection des mécanismes synaptiques de la libération des neurotransmetteurs par l'utilisation de toxines bactériennes. *J. de la Société de Biologie*, 193: 457-467.
- 2) Doussau F., Gasman S., Humeau Y., Vitiello F., Popoff M., Boquet P., Bader M-F. e Poulain B. (2000) A Rho-related GTPase is involved in Ca^{2+} -dependent neurotransmitter exocytosis. *J. Biol. Chem.*, 275: 7764-7770.
- 3) Cibelli G., Corsi P., Diana G., Vitiello F. e Thiel G. (2001) Corticotropin-releasing factor triggers neurite outgrowth of a catecholaminergic immortalized neuron involving cAMP and MAP kinase signalling pathways. *Eur. J. Neurosci.*, 13: 1339-1348.
- 4) Humeau Y., Doussau F., Vitiello F., Greengard P., Benfenati F. e Poulain B. (2001) Synapsin controls both reserve and releasable synaptic vesicle pools during neuronal activity and short-term synaptic plasticity in *Aplysia*. *J. Neurosci.*, 21: 4195-4206.
- 5) Ghirardi M., Naretto G., Fiumara F., Vitiello F. e Montarolo P.G. (2001) Target-dependent modulation of neurotransmitter release in cultured *Helix* neurons involves adhesion molecules. *J. Neurosci. Res.*, 65: 111-120.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Obiettivo generale della ricerca dei prossimi tre anni è lo studio del ruolo del citoscheletro presinaptico nella liberazione del mediatore. Saranno considerati i seguenti aspetti del problema:

- identificazione di domini peptidici corrispondenti a siti di interazione proteina-proteina importanti per il “trafficking” delle vescicole sinaptiche;
- studio del ruolo delle piccole proteine G nella organizzazione strutturale e funzionale del citoscheletro;
- studio di agenti che modificano l’assemblaggio del citoscheletro di actina direttamente o agendo tramite proteine del terminale leganti l’actina;
- analisi degli effetti di segnali derivanti dalla cellula bersaglio sull’attivazione di protein chinasi della terminazione presinaptica.

Collaborazioni internazionali in atto

1. Centre de Neurochimie du CNRS di Strasbourg, Francia (Dr. Bernard Poulain e Dr. Jean de Barry)
2. Institute of Medical Biochemistry and Molecular Biology, University of Saarland Medical School, Homburg, Germania (Dr. Gerald Thiel)

Principali attrezzature di cui dispone l’Unità di Ricerca

Camere per colture cellulari, microscopi, apparecchiature per tecniche di biochimica classica, apparecchiature per tecniche di biologia molecolare.

Parole Chiave

Piccole proteine G, liberazione neurotrasmettitore, plasticità sinaptica, espressione genica.

UNITA' DI RICERCA INBB
Roma

Responsabile Scientifico

Pietro VOLPE

Linea di Ricerca

MODULATION OF TRANSCRIPTION THROUGH NON-UNIFORM METHYLATION OF THE EUKARYOTIC GENE PROMOTER

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Pietro VOLPE	PO	volpe@bio.uniroma2.it
--------------	----	-----------------------

Non Aderenti INBB

Mitra SALEHI	DR
Giulia CAPPELLI	DR
Samantha VIRGILI	DR
Alessandra SACCHI	Tirocinante
Tamilla EREMENKO	Coll. CNR
Francesca MARIANI	Coll. CNR
Annalucia SERAFINO	Coll. CNR
Settimio GRIMALDI	Coll. CNR
Antonella LISI	Coll. CNR
Tiziana CACCIAMANI	Coll.
Anna LA TEANA	Coll.
Tiziana DURANTI	Coll.
Gabriella DI PIETRO	Coll.
Daniela MARASCHIO	Coll.
Michela ROSI	Coll.
Matteo CENTURELLI	Coll.
Lina GHIBELLI	Coll.
Carla LINTAS	Coll.
Roberto BARONE	Coll.
Rossana TARTAGLIONE	Coll.

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Biologia dell'Università di Roma "Tor Vergata"
Istituto di Neurobiologia e Medicina Molecolare CNR Roma

Indirizzo V.le della Ricerca Scientifica, 1

Telefono 0672594244

Fax 0672594244

E-mail volpe@bio.uniroma2.it

Sezione INBB di appartenenza

Roma

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Modulation of transcription through non-uniform methylation of the eukaryotic gene promoter

Mechanism for initiation of translation in E. Coli

Pathways of DNA synthesis and post-synthetic modification in bacteria

Cell cycle-dependent differentiation of hemoglobin genes

Synthesis and modification of DNA in apoptotic cells

Analysis of the host-pathogen reciprocal influence on transcription

Influence of ionising radiations on the DNA double helix, gene expression and membranal state

Gene expression under low-frequency/low-intensity magnetic field or magnetic field-deprivation

Biological adaptation to magnetic fields of low-frequency/low intensity

Magnetic fields at zero frequency increase cell survival by inhibiting apoptosis via modulation of the calcium uptake

Magnetic fields at zero frequency depress the defence of the human macrophage against mycobacterial infection

Static magnetic field-dependence of the cytokine gene expression in normal and mycobacterium-infected human macrophages

Pubblicazioni più significative nel periodo 1999-2002

- 1) Volpe P. (1999) Introduzione alla Biofisica delle Radiazioni. UNESCO Publishers, Venice, pp. 1-256.
- 2) Fanelli C., Coppola S., Barone R., Colussi C., Gualandi G., Volpe P. and Ghibelli L. (1999) Magnetic fields increase cell survival by inhibiting apoptosis via modulation of Ca^{2+} influx. FASEB J. 13, 95-102.
- 3) Volpe P., Parasassi T., Saporita O., Ravagnan G. and Eremenko T. (1999) Influence of the low doses of radiation on the DNA double helix, gene expression and membranal state. Internat. J. Rad. Med. 1, 1-12.
- 4) Volpe P. (1999) Biological Questions at the Border of the Third Millennium. In: Possible Consequences of the Misuse of Biological Sciences (Becker Y. and Falaschi A., eds.), UNESCO Publishers, Venice, Vol.6, pp. 319-332.
- 5) Grimaldi S., Pozzi D., Lisi A., Rieti S., Manni V., Ravagnan G., Giuliani L., Eremenko T. and Volpe P. (2000) Influence of the magnetic field on the tadpole metamorphosis. Internat. J. Rad. Med. 1, 96-103.
- 6) Mariani F., Cappelli G., Riccardi G. and Colizzi V. (2000) *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv comparative gene expression analysis in synthetic medium human macrophage. Gene 253, 281-291.
- 7) Volpe P. (2001) The gene repair-modification theory. Internat. J. Rad. Med. 3, 138-139.
- 8) Mariani F., Cappelli G., Serafino A., Eremenko T. and Volpe P. (2001) Influence of non-ionizing radiation on cell viability, necrosis and apoptosis. Internat. J. Rad. Med. 3, 82-83.
- 9) Mariani F., Cappelli G., Eremenko T. and Volpe P. (2001) Influence of static magnetic fields on cell viability, necrosis and apoptosis. J. Biol. Res. 77, 71-84.
- 10) Cappelli G., Volpe P., Sanduzzi A., Sacchi A., Colizzi V. and Mariani F. (2001) Human macrophage gamma interferon decreases gene expression but not replication of *Mycobacterium tuberculosis*: Analysis of the host-pathogen reciprocal influence on transcription in a comparison of strains H37Rv and CMT97. Infect. Immun. 69, 7262-7270.
- 11) Mariani F., Bocchino M. L., Cappelli G., Persichini T., Colizzi V., Bonanno E., Ponticello A. and Sanduzzi S. (2001) Tuberculosis and lung cancer: an interesting case study. Monaldi Arch. Chest Dis. 56, 30-32.
- 12) Volpe P. (2001) Knowledge of brain memory codification as a challenge for the Third Millennium. J. Biol. Res. 77, 51-69.
- 13) Volpe P. (2001) The gene repair-modification theory in Biophysics of Radiations. Internat. J. Rad. Med. 3, 123-144.