

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

WORKSHOP

SU

***“BIOLOGIA DELLE CELLULE STAMINALI:
PROPRIETÀ E PROSPETTIVE”***

ABSTRACT

11-13 SETTEMBRE 2003

BRESSANONE (BZ)

WORKSHOP INBB
11-13 SETTEMBRE 2003

**“BIOLOGIA DELLE CELLULE STAMINALI:
PROPRIETÀ E PROSPETTIVE”**

Comitato Scientifico

Dott. Paolo Madeddu
Prof.ssa Maria Cristina Magli
Prof. Damiano Gustavo Mita
Prof. Adelio Rigo
Prof. Vittorio Tomasi
Prof. Carlo Ventura

Comitato Organizzativo

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

Segreteria

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

PROGRAMMA

Giovedì 11 settembre

h. 14,00 – 15,30 Registrazione dei partecipanti

h. 15,30 - 16,00 Introduzione del PROF. D.G. MITA
Presidente INBB

Saluto delle Autorità

h. 16,00 – 18,45 ***“Biologia delle cellule staminali”***

PROF.SSA MARIA CRISTINA MAGLI – CNR Pisa
“Cellule staminali: entità e funzioni?”

h. 16,45 – 17,15 Coffee break

PROF. SERGIO OTTOLENGHI – Università di Milano
“Meccanismi genetici di regolazione dello sviluppo di cellule staminali ematopoietiche”

PROF. MARIO STEFANINI – Università di Roma “La Sapienza”
“Biologia delle cellule staminali germinali”

Venerdì 12 settembre

h. 9,15 – 18,30 ***“Cellule staminali somatiche I”***

PROF.SSA WANDA PIACIBELLO - Università di Torino
“Caratterizzazione e manipolazione ex-vivo delle cellule staminali emopoietiche”

PROF. RANIERI CANCEDDA – Università di Genova
“Cellule staminali, ingegneria dei tessuti, medicina rigenerativa: un nuovo approccio alla rigenerazione e riparazione dei tessuti”

h 10,45 - 11,15 Coffee Break

PROF. FULVIO PORTA – Spedali Riuniti di Brescia
“Applicazioni terapeutiche delle cellule staminali mesenchimali”

PROF. FULVIO MAVILIO – Università di Modena
“Dal sangue al muscolo: il potenziale miogenico delle cellule staminali ematopoietiche”

h. 12,45 - 15,00 Pausa

PROF. FEDERICO BUSSOLINO. – Università di Torino
“Biologia dei precursori delle cellule staminali”

DOTT. PAOLO MAEDDU – Laboratorio Nazionale INBB
“Applicazioni terapeutiche delle cellule staminali endoteliali”

h. 16,30 - 17,00 Coffee Break

PROF. GIANLUIGI CONDORELLI – Ospedale San Raffaele di Roma
“L'utilizzo di cellule di cordone ombelicale per la riparazione tissutale nell'infarto del miocardio”

PROF. MICHELE DE LUCA – Ospedale Civile di Venezia
“Cellule staminali epiteliali: dal clone alla ricostruzione degli epiteli e della cornea umana”

Sabato 13 settembre

h. 9,15 – 12,00 *“Cellule staminali somatiche II”*

PROF. CARLO VENTURA – Laboratorio nazionale INBB
“Cardiogenesi in cellule embrionali staminali murine”

PROF.SSA SILVIA NICOLIS – Università di Milano
“Neuroni e glia da cellule staminali”

h. 10,45 - 11,15 Coffee Break

DOTT.SSA SABATA MARTINO - Università di Perugia
“Le cellule staminali per la terapia delle GM2 gangliosidosi”

INDICE

| | PAG. |
|---|-------------|
| <i>INTRODUZIONE AL WORKSHOP</i> | 7 |
| <i>BIOLOGIA DELLE CELLULE STAMINALI</i> | 9 |
| <i>CELLULE STAMINALI SOMATICHE I</i> | 15 |
| <i>CELLULE STAMINALI SOMATICHE II</i> | 29 |
| POSTER | 37 |

INTRODUZIONE AL WORKSHOP

A conclusione del mio quinquennio di Presidenza dell'I.N.B.B., mi fa piacere salutare gli aderenti con questa introduzione al libro degli atti del Workshop di quest'anno, che rappresenta uno dei miei ultimi impegni istituzionali.

Ci ritroviamo a Bressanone per il terzo Workshop tematico. Siamo partiti con la "Biofisica del DNA", siamo transitati attraverso le "Biotecnologie", siamo giunti alla "Biologia delle Cellule Staminali". E' stato un percorso logico, che ha rappresentato un crescendo continuo ed un tenersi al passo con il progresso della scienza. Con il Workshop di quest'anno, abbiamo individuato non solo uno dei settori di maggiore attualità ed interesse, ma anche un argomento capace di attrarre l'interesse pluridisciplinare dei nostri aderenti verso un tema di ricerca, sia di base che applicata, che sembra essere fra i più promettenti. Spero con questo di essere riuscito a stimolare l'interesse della maggior parte di voi e di aver reso, con questo, un buon servizio all'I.N.B.B. Un grazie sentito a tutti i colleghi che con entusiasmo hanno accettato l'invito a raccontarci le loro esperienze di ricerca, nonostante i loro numerosi impegni. Un grazie anche al Comitato scientifico che è riuscito ad invitare, fra quelli della nostra comunità scientifica nazionale, gli studiosi più prestigiosi del settore.

Approfitto di questa occasione per segnalarvi alcuni dei risultati positivi raggiunti dall'I.N.B.B. in questo quinquennio:

- a) è stato modificato lo Statuto rendendolo più aderente alla realtà;
- b) è aumentato il numero di Università consorziate e di aderenti;
- c) è stato consolidato il finanziamento ordinario del MIUR e sono stati gestiti finanziamenti aggiuntivi per attività di ricerca maggiori di un ordine di grandezza rispetto alla dotazione ordinaria;
- d) è stato fatto uno sforzo senza precedenti per ciò che riguarda l'attività di formazione di giovani ricercatori tramite l'assegnazione di borse di studio per attività di ricerca e borse di studio per la partecipazione a Convegni e Workshop organizzati dall'I.N.B.B.;
- e) sono stati firmati accordi di programma con varie istituzioni pubbliche, tra le quali ci piace ricordare il CNR e l'ISPESL;
- f) sono state firmate convenzioni con organismi pubblici e privati, sia dell'Università che del mondo delle imprese;
- g) è stata potenziata la sede del Laboratorio Nazionale di Osilo, che vanta un'attiva produttività scientifica qualitativa e quantitativa, e sono state poste le basi per un ampliamento istituzionale delle nostre attività di ricerca nella Regione Sardegna;
- h) si è intervenuti nel dibattito sulla Finanziaria del 2003, con un'audizione presso la Commissione Cultura del Senato e con documenti raccolti negli atti parlamentari;
- i) è stato proposto un raccordo istituzionale per iniziative congiunte fra i maggiori Consorzi Interuniversitari riconosciuti dal MIUR: l'iter di questa iniziativa sembra ben avviato e vede l'I.N.B.B. fra i protagonisti;
- j) sono stati organizzati, con successo, due Convegni Nazionali I.N.B.B. a Roma (novembre 2000) ed a Catania (ottobre 2002), nel corso dei quali sono state tenute interessanti relazioni nell'ambito dei raggruppamenti secondo cui è articolata l'attività scientifica I.N.B.B. e qualificate Tavole rotonde su questioni politico-istituzionali del settore ricerca.

Se mi fermassi qui, sembrerebbe che tutto è stato positivo. Accanto a tanta luce, comunque, c'è ancora qualche ombra che mi permetto di segnalare al nuovo Direttivo che si insedierà nel primo trimestre 2004. Per irrobustire l'attività dell'I.N.B.B. e per dargli maggiore visibilità, penso che occorra:

1. rivitalizzare le Sezioni Territoriali, ridefinendone obiettivi ed organizzazione;
2. rafforzare i rapporti con le Università consorziate creando una Consulta da convocare annualmente per sentire le proposte delle Università e per comunicare alle stesse le principali iniziative che l'I.N.B.B. intende promuovere;
3. richiedere un maggiore impegno ai membri del Consiglio Direttivo verso gli obiettivi di un più ampio dinamismo progettuale della rete degli aderenti INBB e di un ampliamento dei servizi offerti dal Consorzio.

Mi spiace aver preso molto del vostro tempo, ma a conclusione di un quinquennio di Presidenza, credo che questo "bilancio" fosse un atto dovuto. Se è stato fatto molto o poco, starà a voi giudicarlo. Da parte mia vi assicuro di aver fatto quanto meglio potevo. Ringrazio la Giunta ed il Consiglio Direttivo che mi hanno sostenuto e hanno sempre operato nell'esclusivo interesse del Consorzio.

Un grazie particolare al Direttore Generale dell'I.N.B.B., Dr. Occhialini ed all'Ufficio di Segreteria, Sig.re Occhioni e Citton, senza il cui aiuto e sostegno avrei dovuto solo chiedervi scusa per non aver potuto mantenere quanto forse vi aspettavate da me.

Grazie a tutti e un vivo auspicio per un futuro dell'I.N.B.B. sempre più ricco di successi.

Damiano Gustavo Mita
Presidente INBB

Roma, 31 luglio 2003

“BIOLOGIA DELLE CELLULE STAMINALI”

CELLULE STAMINALI: ENTITA' O FUNZIONI?

Maria Cristina Magli

CNR Pisa

La definizione di cellule staminali quale cellule indifferenziate capaci di generare cellule mature di diverso tipo e funzione esiste da numerosi decenni, tuttavia il concetto di cellule staminali è stato nel corso del tempo ripetutamente discusso e reinterpretato sulla base delle proprietà funzionali delle cellule.

Staminali per antonomasia sono le cellule staminali embrionali, capaci di dare origine a progenie di tutti i tipi cellulari, tuttavia il termine staminali è attribuito anche a cellule immature e pluripotenti presenti anche nei tessuti adulti. Tradizionalmente tali cellule staminali somatiche sono state considerate più limitate nella capacità differenziativa, in quanto capaci di generare solo i tipi cellulari caratteristici del tessuto in cui risiedono. Tuttavia, negli ultimi anni, diverse evidenze sperimentali suggeriscono che cellule staminali adulte siano in grado di produrre progenie di vari tessuti, anche di diversa origine embrionale. Ad esempio, è stato osservato che cellule staminali neurali possono differenziarsi in cellule del sangue o del muscolo scheletrico. D'altra parte, cellule immature isolate dal midollo osseo possono generare molteplici tipi cellulari, fra cui cellule sanguigne, endoteliali, muscolari, cardiache, ossee, cartilaginee, epatiche, neuronali e gliali. Tuttavia i risultati finora ottenuti, sebbene innovativi e molto promettenti, non hanno ancora completamente definito le potenzialità delle cellule staminali adulte né chiarito i meccanismi attraverso i quali una cellula decida il proprio percorso differenziativo. Uno dei problemi maggiori è legato alla difficoltà di isolare una popolazione omogenea di cellule staminali o di identificare a livello individuale le singole cellule staminali al fine di seguirne il destino e determinarne le potenziali capacità di sviluppo. A tale proposito vengono utilizzati diversi sistemi di "marcatura", quali l'espressione di proteine fluorescenti (GFP), di enzimi eterologhi (β -galattosidasi) o il sito di integrazione di un vettore virale nel genoma cellulare. Le cellule così marcate vengono poi studiate attraverso sistemi di differenziazione *in vitro* e/o trapianto in modelli animali e rigenerazione tissutale *in vivo*. Sempre più stringenti sono i criteri attraverso i quali viene valutata la "plasticità" delle cellule staminali, ovverosia la loro capacità di dare origine a progenie atipica. Questi includono non solo criteri morfologici e fenotipici, ma anche quantitativi e funzionali. Diversi modelli sono stati ipotizzati per spiegare la plasticità delle cellule staminali adulte. Il primo è un modello "gerarchico" secondo il quale le cellule staminali sono una popolazione eterogenea che comprende cellule con diverso grado di "staminalità", cioè di potenziale proliferativo e differenziativo. Secondo tale modello, oltre alle cellule staminali specifiche per ogni tessuto, nell'organismo adulto persisterebbe la presenza di cellule staminali totipotenti, simili a quelle

embrionali e queste sarebbero gli elementi capaci di generare progenie differenziata di molteplici tessuti. Un modello alternativo ipotizza invece che le cellule staminali tessuto-specifiche siano tutte equivalenti e la scelta del destino cellulare venga determinata da proteine regolatrici presenti nel microambiente. Secondo questo modello una cellula staminale isolata ad esempio dal cervello se viene a trovarsi nel microambiente del midollo osseo in cui c'è necessità di rigenerazione, è in grado di rispondere ai segnali di differenziazione tipici del midollo osseo. Un'altra ipotesi prevede invece la capacità da parte di cellule mature di de-differenziare e riprogrammarsi per dare origine ad un fenotipo cellulare completamente diverso. Attualmente i risultati disponibili sono compatibili con tutti questi modelli e per comprendere i meccanismi alla base della plasticità sono necessari ulteriori studi. Ci sono infatti evidenze sperimentali che indicano che differenti sistemi cellulari possono essere regolati da comuni fattori di crescita e/o fattori di trascrizione e che è quindi la combinazione di tali fattori a determinare il destino cellulare. D'altra parte, in alcuni casi è stato dimostrato che cellule staminali isolate da diversi tessuti non sono caratterizzate da specifici marcatori fenotipici, ma presentano un profilo simile e possono anche essere purificate utilizzando le stesse metodiche. Inoltre sono stati descritti casi in cui cellule mature di un tessuto si sono, in determinate condizioni, riprogrammate e hanno dato origine a cellule differenziate di un altro tessuto.

Altre questioni di base ancora irrisolte riguardano la funzione che il fenomeno della plasticità ha nell'omeostasi di un organo o tessuto, l'equivalenza o, viceversa, la differenza di potenziale di sviluppo fra cellule staminali di diversi tessuti e, infine, la identificazione e caratterizzazione dei segnali di regolazione delle cellule staminali. Tuttavia i risultati acquisiti indicano che le cellule staminali di alcuni tessuti possono essere mantenute ed espanse *ex vivo* e/o direzionate verso uno specifico percorso differenziativo. Inoltre, se iniettate semplicemente per via sistemica, sono in grado di raggiungere il corretto organo/tessuto bersaglio e di esprimere i geni specifici di tale organo o tessuto. Queste osservazioni rendono le cellule staminali candidati estremamente interessanti per interventi di terapia cellulare in numerose patologie di diversi tessuti, dal morbo di Parkinson al diabete, dalla sclerosi multipla alla distrofia muscolare, dall'infarto alle grandi ustioni.

MECCANISMI GENETICI DI REGOLAZIONE DELLO SVILUPPO DI CELLULE STAMINALI EMATOPOIETICHE

Sergio Ottolenghi

Dipartimento di Biotecnologie e Bioscienze ,Universita' di Milano Bicocca, Milano.

Le cellule staminali ematopoietiche (hematopoietic stem cells, HSC) originano da un progenitore mesodermico. Studi su cellule staminali embrionali (ES cells) in vitro hanno suggerito che, dal progenitore multipotente mesodermico, possa derivare un progenitore bipotente emato-endoteliale (emoangioblasto). In vivo, l'ematopoiesi inizia (nel topo) subito dopo la gastrulazione, intorno al giorno 7 di sviluppo embrionario (E7), sia nel sacco vitellino che all'interno dell'embrione propriamente detto, nella splanconopleura paraaortica, che evolve poi nella regione Aorta-Gonade-Mesonefro (AGM). Le cellule staminali, capaci non solo di dare origine ai vari tipi di cellule ematopoietiche, ma anche di rinnovarsi e di mantenere l'emopoiesi per tutta la vita, compaiono nella regione AGM solo intorno al giorno E11, originando, almeno in parte, da cellule "endoteliali" presenti all'interno dell' aorta e di altri vasi (vitellini,etc.).

La distruzione mirata di geni del topo (knock-out) ha permesso di identificare alcuni dei geni coinvolti nella generazione delle HSC. Fra questi, FLK-1, il recettore di VEGF, e' richiesto in vivo, ma non in vitro, per la genesi sia delle cellule endoteliali che di progenitori ematopoietici, agendo forse a livello dell'emangioblasto. Fattori trascrizionali, come SCL-Tal1 e Run-x (AML1), sono invece richiesti piu' a valle per la generazione (o l'iniziale espansione ed il mantenimento) delle HSC nell'embrione. SCL-Tal1 non e' tuttavia piu' necessario, nelle HSC, nel periodo adulto; questo puo' indicare che lo stato di HSC, una volta indotto, puo' essere mantenuto da meccanismi di autoregolazione di geni posti inizialmente sotto il controllo di SCL-Tal1. D'altro canto, il mantenimento dello stato pluripotente delle HSC presuppone anche meccanismi negativi, cioe' la repressione di fattori trascrizionali capaci di attivare la differenziazione in specifici tipi di cellule.

Questo e' ben esemplificato dal knock-out del gene Pax5, che codifica un fattore trascrizionale essenziale per i B linfociti; la perdita di Pax5 permette a queste cellule di differenziarsi in T linfociti, cellule mieloidi e, forse, anche di generare HSC.

L'identificazione di un certo numero di geni regolatori attivi nelle HSC e a vari stadi di sviluppo dei loro immediati discendenti, dovra' essere in futuro completata dalla comprensione "della rete" dei meccanismi di regolazione trascrizionale e dei "segnali" responsabili dell'attivita' coordinata e in successione dei vari geni fino ad ora identificati.

BIOLOGY OF SPERMATOGONIAL STEM CELLS

Mario Stefanini, Ilaria Falciatori, Elena Vicini

Dept of Histology and Medical Embryology, University of Rome 'La Sapienza', Rome Italy

We have isolated a cell population highly enriched in spermatogonial stem cells by FACS analysis after Hoechst staining. This experimental approach is widely used to isolate cells with 'side population' (SP) phenotype, which is a common molecular feature for stem cells. Cell suspensions from 7, 10, 16 and 20-day old mouse seminiferous cords were enzymatically isolated and stained with Hoechst 33342. At all ages studied, testes contained a SP population (T-SP) representing 0.3-0.5% of total cell population. Surface antigenic characterization of the immature mouse testis T-SP demonstrated that these cells are CD45⁻, Sca-1⁺, Ep-CAM⁺, 6-integrin⁺, EE2⁺, c-kit⁻, v-integrin⁻. Stem cell enrichment of this novel-identified testis SP was evaluated by germ cell transplantation experiments. Total cell suspensions and sorted SP were obtained from 20-day old ROSA 26 mice and transplanted into adult busulfan-treated mouse testes. Two months after transplantation, colonization of recipient testes by donor stem cell-derived spermatogenesis, was evaluated for each cell populations transplanted. Our results indicate that testis SP population is 13 fold enriched in stem cell activity evaluated as number and area of blue stained tubules found in recipient testes. Morphological analysis of the colonies indicates that, two months after transplantation, SP-derived spermatogenesis is organized in a distinct ordering of germ cell associations along the length of the seminiferous tubule.

“CELLULE STAMINALI SOMATICHE I”

ENDOTHELIAL PROGENITOR CELLS

Federico Bussolino

Division of Molecular Angiogenesis at Institute for Cancer Research and Treatment (IRCC). University of Turin, School of Medicine. Candiolo (Torino)

The development of the cardiovascular system is guided by vasculogenesis which generally occurs in the embryo life and by angiogenesis which regulates the growth of vessels in fetus, in the enlargement of body and in adult life. The key elements of vasculogenesis are hemangioblasts and angioblasts which arise from mesoderm under the differentiative regulation promoted by fibroblast growth factor (FGF)-2 and vascular endothelial growth factor (VEGF)-A. In the mat zone, more peripheral, hemangioblasts form “blood islands”, that are cellular aggregations made by peripheral cells from which originate endothelial cells, and of more internal cells, precursors of hematopoietic cells. Endothelial cells originating from these structures organize into a primitive plexus which vascularize endodermic tissues. In the *zona pellucida*, more internal, endothelium differs from angioblasts which did not aggregate in “blood islands”. This type of endothelial cells contribute in the heart organogenesis, formation of aorta and other larger vessels and create a primitive capillary plexus. In foetus, both primitive plexus are remodelled through angiogenesis process which is characterized by regression of some capillaries and enlargement of venules, which sprout or become divided by pillars of peri-endothelial cells (intussusception) or by transendothelial cell bridges, which then split into individual capillaries. Besides maturation of these endodermic vascular networks, in foetus the aim of angiogenesis is vascularization of ectodermic and mesenchymal origin, while in adult characterizes some physiological situations like vascularization of the ovary and the uterus during the female cycle, of the mammary gland during lactation and the wound healing. Not less significant is the role of angiogenesis in pathological settings: tumors, chronic inflammatory diseases, like rheumatoid arthritis and psoriasis, vasculopathies like diabetic microangiopathy, degenerative disorders like atherosclerosis and cirrhosis, the tissue injury occurring in ischemia. Five biological phases of angiogenesis have been established and characterized by different, overlapping genetic programs. Initiation is characterized by a EC shape change and increased permeability; progression phase includes the degradation of extracellular matrix, migration and proliferation of ECs; in the differentiation phase ECs stop to grow, survive in sub-optimal conditions, and differentiate into primitive capillaries; maturation phase includes the formation of new matrix, the recruitment of pericytes and smooth muscle cells and the remodelling of the primitive vascular network; guidance phase which dictate the architectural patterns of the vasculature into specific organs during development or the spatial tridimensional distribution of nascent vessels during neo-angiogenesis in the adult organism.

Besides the participation of resident ECs, a growing body of evidence now suggest that bone – marrow (BM) derived endothelial progenitor cells (EPCs) circulate in the blood and can play a relevant role in the formation of new vessels in pathologic settings. The relevance of this mechanism is strongly supported by the common embryonic origin of both hematopoietic and vascular system as previously mentioned. Also resident EPCs (i.e. in skeletal muscle) exist and should contribute in vessel formation.

The journey of BM-EPCs may be divided into three stages. First BM-EPCs are mobilized from BM. A number of soluble factors, including chemokines and vascular endothelial growth factor-(VEGF)-A, appear to promote this step and their production is stimulated by tissue injuries. The mobilization from BM is mediated through the activation of metalloproteinases and adhesion molecules. This property of BM-EPCs is reminiscent of that shared by angioblast, which have the ability to run long distances. Subsequently the cell move through the blood stream and preferentially home to damaged tissues. Finally, some BM-EPCs are incorporated into new blood vessels formed by the sprouting of pre-existing capillaries or possibly formed *in situ* by vasculogenesis. During the passage from BM to circulation and capillaries these cell mature and change their phenotype. Actually in man, they originate as CD133⁺, CD34⁺, cKit⁺, VE-cadherin⁺, VEGF receptor-2⁺, CD146⁺ CXCR4⁺, CD31⁺ cells, and then lose cKit and CD133. Subsets of CD133⁺ cells also express VEGF receptor-3 and may differentiate in lymphatic ECs. However whether lymphatic endothelial progenitors contribute to lymphangiogenesis during organ neovascularization is not known.

Under steady state conditions, circulating EPCs represent only 0.01% of cells in the blood. However, the angiogenic switch, vascular trauma, surgical manipulation, drug treatment (statins) promote mobilization of BM-EPCs.

The clinical relevance of the contribution of EPCs for functional organ revascularization is under evaluation in pre-clinical and clinical models. They include atherosclerosis, ischemia of limb, myocardium and brain, retinopathies, and generation of non thrombogenic vascular grafts.

The EPC frontier reflects the growing realization that adult cells and tissues have far more plasticity and potential for regeneration than previously realized. However, to accomplish the full potential therapeutic of these precursors we have much to learn about their biological function, not only in the context of disease but also in the more subtle yet equally important context of vascular homeostasis.

CELLULE STAMINALI, INGEGNERIA DEI TESSUTI, MEDICINA RIGENERATIVA: UN NUOVO APPROCCIO ALLA RIGENERAZIONE E RIPARAZIONE DEI TESSUTI

Ranieri Cancedda

Dipartimento di Oncologia Biologia e Genetica, Università di Genova e Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Genova

Il settore della medicina rigenerativa viene definito come una nuova area di ricerca avente come scopo il riparo e la rigenerazione di tessuti ed organi mediante l'impiego dei componenti "naturali" degli stessi, quali cellule e molecole (ad es. fattori di crescita). Il progresso nel campo delle biotecnologie e delle applicazioni terapeutiche da queste derivanti ha fornito ai clinici nuove tecnologie, nuovi approcci e nuovi materiali biologici, tra cui tessuti ingegnerizzati, per affrontare la ricostruzione chirurgica di tessuti soggetti a lesioni estese. In particolare la biologia cellulare e le sue applicazioni innovative nel campo dell'ingegneria tissutale hanno definito i ruoli di numerosi fattori di crescita nel controllo della proliferazione e del differenziamento cellulare; in aggiunta, le tecniche di coltura cellulare sono state implementate per consentire sia l'identificazione delle cellule staminale/progenitrici da cui derivano le cellule dei diversi tessuti, sia l'espansione "in vitro" di popolazioni cellulari selezionate. L'associazione di cellule coltivate "ex vivo", di molecole biologicamente attive e di materiali di diversa origine quale supporto, hanno ulteriormente spinto la ricerca, la valutazione e la commercializzazione di una nuova generazione di biomateriali trapiantabili. Le quantità di questi nuovi biomateriali non sono ormai più limitanti.

La cellula staminale è definita come una cellula in grado di riprodursi per lunghi periodi e dare origine alle cellule specializzate che formano i tessuti e gli organi. Cellule staminali sono state ottenute da embrioni, tessuti fetali, tessuti adulti.

Negli ultimi anni l'utilizzo di cellule staminali è stato proposto nella medicina rigenerativa e per l'ingegneria dei tessuti. Sono state sollevate importanti questioni morali sull'utilizzo di cellule staminali umane. In alcuni casi le questioni poste sono più che legittime, ma in altri casi le perplessità derivano esclusivamente da una cattiva informazione.

Anche se impropriamente, con il termine cellule staminali embrionali si intendono sia le cellule staminali embrionali vere e proprie sia le cellule germinali embrionali. Le cellule staminali embrionali derivano dalla massa cellulare interna della blastocisti, l'embrione precoce (dal 4° al 5° giorno). Molte delle conoscenze sulle cellule staminali embrionali sono state acquisite tramite ricerche su animali. In laboratorio queste cellule sono in grado di proliferare indefinitamente. Le cellule germinali embrionali derivano invece da tessuto fetale. Vengono isolate dalle cellule germinali primordiali dell'abbozzo delle gonadi del feto di 5 – 10 settimane. In una fase più avanzata dello sviluppo fetale, l'abbozzo delle gonadi è destinato a trasformarsi nei testicoli o nelle

ovaie e le cellule germinali primordiali daranno origine agli ovuli o allo sperma. Contrariamente a quanto avviene alle cellule staminali embrionali, in vitro le cellule germinali embrionali possono fare un numero limitato di divisioni cellulari (mediamente da 70 a 80). Sia le cellule staminali che le cellule germinali embrionali sono pluripotenti, ossia danno origine a tipi di cellule differenziate derivate da tutti i tre strati germinali primari dell'embrione (endoderma, mesoderma ed ectoderma). Le cellule staminali adulte sono invece cellule indifferenziate (non specializzate), presenti nei tessuti di organismi già sviluppati, ed in grado di dividersi in due cellule dando origine contemporaneamente a una replica della cellula indifferenziata originale ed ad una cellula specializzata con le caratteristiche delle cellule del tessuto di appartenenza. Per essere classificata come cellula staminale adulta, una cellula dovrebbe essere in grado di autoreplicarsi per tutto l'arco della vita dell'organismo. Questo criterio, per quanto fondamentale per la natura di una cellula staminale, è difficilmente dimostrabile in vivo.

Nel corpo le cellule staminali adulte mantengono costanti le funzioni di un tessuto (omeostasi) garantendo il fisiologico ricambio cellulare ed in alcuni casi sostituendo anche le cellule che muoiono a causa di traumi o malattie. Sono rare, si disperdono nei tessuti dell'animale maturo e si comportano in modo molto diverso a seconda dell'ambiente che le circonda. I tessuti adulti nei quali è stata dimostrata la presenza di cellule staminali comprendono il midollo osseo, il sangue periferico, il cervello, il midollo spinale, la polpa dentale, i vasi sanguigni, i muscoli dello scheletro, gli epitelii dell'epidermide e dell'apparato digestivo, la cornea, la retina, il fegato ed il pancreas. Non è chiara l'origine delle cellule staminali adulte. È stato proposto che siano cellule che nel corso dello sviluppo abbiano mantenuto alcune delle caratteristiche delle cellule embrionali. Alcune cellule staminali adulte sembrano in grado di differenziarsi in tessuti diversi da quelli di origine. Per esempio le cellule stromali di midollo osseo si differenziano in cellule del muscolo cardiaco, dei muscoli scheletrici, del tessuto adiposo, dell'osso, cartilagine e del sistema nervoso. Questa capacità viene chiamata plasticità.

Grazie alla loro pluripotenzialità e plasticità, sia le cellule staminali embrionali che quelle adulte rappresentano una fonte ideale di cellule da usare per la riparazione di tessuti e organi danneggiati. L'utilizzo di cellule staminali embrionali pone rilevanti problemi etici. L'utilizzo di cellule staminali adulte è generalmente ben accetto dalla società.

I primi tessuti ricostruiti "in vitro" a scopo di trapianto sono stati l'epidermide e gli altri epitelii stratificati. L'attenzione dei ricercatori è attualmente focalizzata sul riparo della cartilagine, dell'osso, e dei tendini per i quali esiste un potenziale enorme. Altre applicazioni preliminari nel campo dell'ingegneria dei tessuti riguardano il riparo del tessuto cardiomuscolare, il trapianto di specifiche cellule endocrine, l'espansione del comparto stromale per i trapianti nei pazienti

neoplastici, la coltura di cellule endoteliali per le protesi vascolari e l'espansione in vitro di cellule con potenziale neurogenerativo.

Colture ex vivo vengono inoltre impiegate per ingegnerizzare organi artificiali ibridi quali rene, fegato o pancreas.

Deve essere ricordato che la potenzialità della ricostruzione in vitro di tessuti viene ulteriormente amplificata dalla possibilità di correlarla alla terapia genica. Tessuti ingegnerizzati possono essere ottenuti a seguito di una modificazione genetica delle cellule del paziente e/o del donatore per inserzione, modificazione, delezione od eliminazione di un gene specifico.

L'UTILIZZO DI CELLULE DI CORDONE OMBELICALE PER IL RIPARO TISSUTALE NELL'INFARTO DEL MIOCARDIO

Rosanna Botta¹⁻², Cesare Peschle¹⁻² e Gianluigi Condorelli³⁻⁴

¹ Department of Hematology-Oncology, Istituto Superiore della Sanità, Rome, and ² Kimmel Cancer Center, Thomas Jefferson University, Philadelphia PA; ³ Laboratory of Molecular Cardiology, San Raffaele Biomedical Science Park, University "La Sapienza", Rome and ⁴ Institute of Molecular Medicine, University of California San Diego, La Jolla CA;

Le linee ematopoietiche (*Hem*) ed endoteliali (*End*) derivano da un progenitore cellulare comune, l'emoangioblasto. Nell'uomo, il ruolo dei progenitori endoteliali nella patologia cardiaca ischemica è oggetto d'intensi studi. Utilizzando un saggio di co-cultura in vitro, abbiamo dimostrato che le cellule progenitrici embrionali e perinatali possono essere indotte a differenziare in cardiomiociti. Più recentemente, è stato dimostrato che le cellule progenitrici ematopoietiche umane (HPCs) indotte con il VEGF a diventare cellule endoteliali potevano transdifferenziare in cardiomiociti in saggi di co-cultura. Se le cellule *Hem* umane primarie possano essere indotte a differenziare in vivo in cardiomiociti non è ancora noto. Inoltre, il contributo di quest'ultime verso l'angiogenesi e la cardiomiogenesi non è ancora stato stabilito. In questa presentazione descriviamo gli effetti del trapianto di cellule HPC da cordone ombelicale (CB) umano CD34⁺ sulla funzione cardiaca dopo infarto del miocardio in vivo nel modello di topo immunocompromesso NOD-SCID. Inoltre, abbiamo comparato l'effetto terapeutico di cellule CD34⁺ non separate verso la sottofrazione CD34⁺/KDR⁺ che contiene le cellule *Hem-End*. Qui dimostriamo che le cellule CD34⁺ possono di fatto migliorare la funzione cardiaca dopo infarto del miocardio, se paragonate alle cellule mononucleate totali ed ai controlli. Effetti benefici simili sono stati ottenuti utilizzando un numero molto più piccolo di cellule CD34⁺KDR⁺. Qui dimostriamo che quest'effetto benefico è da ascrivere un buona parte alla neoangiogenesi poichè la cardiomiogenesi da cellule umane trapiantate si verifica raramente. Pertanto, le cellule *Hem-End* di CB migliorano la funzione cardiaca dopo infarto del miocardio attraverso angiogenesi e parzialmente attraverso cardiomiogenesi.

STRATIFIED EPITHELIAL STEM CELLS: FROM CLONES TO CLINICS.

Michele De Luca and Graziella Pellegrini.

Fondazione Banca degli Occhi del Veneto
Epithelial Stem Cell Regional Research Centre

The proliferative compartment of stratified epithelia consists of two populations of multiplying keratinocytes, referred to as stem and transient amplifying cells. Stem cells are responsible for the continuous renewal and repair of these epithelia. Human epidermal stem cells are located both in distinct areas of the hair follicle and in the basal layer of interfollicular epidermis. Instead, human corneal stem cells are segregated in the basal layer of the limbus. Therefore, the corneal epithelium is formed exclusively by transient amplifying cells that continuously generate and migrate from the limbus. The p63 transcription factor distinguishes human keratinocyte stem cells from their transient amplifying (TA) progeny. Within the cornea, nuclear p63 is expressed by limbal basal cells, but not by TA corneal cells. In culture, p63 is expressed by epidermal and limbal oclones, but is undetectable in paraclones. “Young” TA keratinocytes (meroclones), have greatly reduced p63, even though they possess proliferative capacity. Keratinocyte senescence is controlled by clonal evolution. Down regulation of 14-3-3sigma prevents clonal evolution and forces keratinocytes into the stem cell compartment, allowing bypass of replicative senescence. This is accompanied by maintenance of telomerase activity and p63 expression and by inhibition of *p16^{INK4a}*. Thus, down regulation of endogenous sigma leads to immortalization of primary human keratinocytes without the need of exogenous oncogenes or oncoviruses.

At a clinical level, the success of cell and gene therapy requires cultivation and transplantation of stem cells. Cell therapy is an emerging therapeutic strategy aimed at replacing or repairing severely damaged tissue with cultured cells. For instance, epidermal regeneration obtained with autologous cultured keratinocytes can be life-saving for patients suffering from massive full-thickness burns. Furthermore, limbal stem cells can be cultivated at clonal level and generate cohesive sheets of corneal epithelium suitable for permanent regeneration of severely damaged corneal surface. We report clinical results obtained in an homogeneous group of patients whose limbal cell deficiency was evaluated by scoring the gravity of the clinical picture and the keratin expression pattern. Stem cells, obtained from the limbus of the contralateral eye, were cultivated onto a fibrin substrate and their preservation was evaluated by clonal analysis as well as by the expression of p63. Finally, the possibility of easy cultivation, the availability of surgical protocols for grafting autologous cultured keratinocytes back on patients and the possibility of stable transduction of clonogenic keratinocytes, opens new perspectives in the long-term treatment of genetic skin disorders. Epidermal stem cells of patients carrying junctional epidermolysis bullosa (JEB) can be genetically corrected. We are implementing a phase I/II clinical trial aimed at the *ex vivo* gene therapy of selected JEB patients. The aim of the trial is to validate the *ex vivo* procedure in a clinical setting, to prove its safety, and to investigate long-term survival of transduced cells, immune responses, persistence of transgene expression, and mobilization of transduced stem cells outside the area of the implant.

THERAPEUTIC APPLICATIONS OF ENDOTHELIAL STEM CELLS

Paolo Madeddu*^o, Costanza Emanuelli*[@], Elvira Pelosi[#], Maria Bonaria Salis*, Anna Maria Cerio[#], Giuseppina Bonanno^Δ, Mariella Patti[^], Giorgio Stassi[^], Gianluigi Condorelli[§]⁺, Cesare Peschle[#]⁺

*Experimental Medicine and Gene Therapy (EMGT), National Institute of Biostructures and Biosystems (INBB), Osilo and Porto Conte Technological Park, Italy;

[@] Biotechnology and Molecular Medicine, INBB, Scientific and Technologic Park of Sardinia, Pula, Italy.

^o Department of Internal Medicine, Sassari University, Italy;

[#] Department of Hematology, Oncology and Molecular Medicine, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy;

[^] Department of Surgical and Oncological Science, Palermo University, Italy;

^Δ Department of Obstetrics and Gynecology, Catholic University, Rome, Italy;

[§] Laboratory of Molecular Cardiology, San Raffaele Biomedical Science Park, Rome, Italy;

⁺ T. Jefferson University, Philadelphia, PA, USA.

Background: In human hematopoietic tissues, the small subset of primitive CD34⁺ cells that expresses vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2/KDR) includes primitive hematopoietic and endothelial cells, as well as hemangioblasts generating both hematopoietic and endothelial progeny. The present study examined whether cord blood-derived CD34⁺KDR⁺ cells enhance vascular and muscular regeneration in a limb ischemia model.

Methods and Results: A low number ($1-2 \times 10^3$) of CD34⁺KDR⁺, as compared to a large number (10^4) of CD34⁺KDR⁻ or CD34⁺ cells or vehicle, was intramuscularly implanted in non-immunocompetent mice submitted to unilateral limb ischemia. In separate groups, CD34⁺KDR⁺ cells were injected together with recombinant VEGF-A (rVEGF-A). *In vitro*, CD34⁺ fractions released VEGF into the culture medium. *In vivo*, ischemic muscle capillarization was enhanced by 10^3 CD34⁺KDR⁺ compared with vehicle, CD34⁺, or CD34⁺KDR⁻ ($P < 0.01$ for all comparisons). Arteriole density was augmented by the 2×10^3 CD34⁺KDR⁺ cell dosage (33.6 ± 4.1 vs. 17.7 ± 1.9 arterioles/mm² in vehicle-treated, $P < 0.05$), but not by the 10^3 dosage. CD34⁺ cells increased arteriole density (35.8 ± 6.5 arterioles/mm²), while CD34⁺KDR⁻ ones were ineffective. Endothelial cell apoptosis was reduced in CD34⁺KDR⁺ injected muscles. Furthermore, transplanted CD34⁺KDR⁺ cells were recognized to differentiate into mature human endothelial and skeletal muscle cells. Limb salvage and hemodynamic recovery was improved by CD34⁺KDR⁺ cells, but not by the CD34⁺KDR⁻ fraction. Clinical outcome was worsened by the addition of rVEGF-A.

Conclusions: This study demonstrates that a very low number of CD34⁺KDR⁺ cells favors reparative neovascularization and myogenesis, suggesting utility of this cell population for therapeutic regeneration.

FROM BLOOD TO MUSCLE: THE MYOGENIC POTENTIAL OF HEMATOPOIETIC STEM CELLS

Fulvio Mavilio

Department of Biochemical Sciences, University of Modena Medical School, Modena, Italy.

Bone marrow (BM)-derived cells have the potential to differentiate into a number of non-hematopoietic cell progenies (muscle, liver, blood vessels or epithelia) when assayed in appropriate tissue regeneration models *in vivo*. We and others had previously shown that fully differentiated muscle fibers can be formed by the progeny of transplanted, genetically-marked BM, or BM fractions enriched in hematopoietic stem cells, in models of acute or chronic muscle regeneration (Ferrari et al, *Science* 279:1528, 1988; Gussoni et al, *Nature* 401:390, 1999). Whether stem cells directly, or their differentiated progeny, are recruited to the muscle and induced to myogenic differentiation, is still unclear. We now show that cells with muscle-forming activity can be found in both adult (BM) and fetal (liver) hematopoietic tissues, and can be traced back to the earliest recognizable hematopoietic organs, such as the aorta-gonads-mesonephros region (AGM) of day-11 and the dorsal aortal region of day-9 mouse embryos. Interestingly, cell fractionation experiments indicate that the myogenic potential segregates in all cases with cells bearing hematopoietic markers, or differentiating into hematopoietic progenies in an *in vitro* assay, such as the CD45⁺ fraction of the BM and the flk1⁻ fraction of the AGM. Short-term *in vivo* assays, such as direct injection or systemic (intravenous) administration to regenerating muscle of lethally-irradiated mice, indicate that cells already committed to a hematopoietic fate can give rise directly to muscle tissue *in vivo* without previous homing to the BM and independently from their hematopoietic reconstitution potential. The stromal/mesenchymal (CD45⁻) fraction of the BM, or the angiogenic (flk1⁺) fraction of the AGM, have no myogenic activity in this type of assay. These data suggest that muscle repair by BM-derived cells maybe due to transdifferentiation of committed progenitors in response to local signals provided by the regenerating tissue rather than to recruitment of pluripotent stem cells from distant hematopoietic organs. These signals are only poorly provided by the muscles of *mdx* mice, a murine model of muscular dystrophy. In fact, transplantation of co-isogenic, normal BM in the *mdx4cv* mutant, a *mdx* variant characterized by an extremely low background of spontaneous revertant fibers, gives rise to a minimal (< 0.5 %) number of muscle fibers expressing the normal dystrophin protein throughout the animals lifespan (> 13 months after transplantation) (Ferrari et al., *Nature* 411:1014, 2001). These data indicate that the murine dystrophic background does not provide per se a competitive advantage to normal myogenic progenitors with respect to dystrophin-deficient satellite cells. Expansion and active recruitment to myogenic differentiation of transplanted hematopoietic cells are therefore critical factors for a future use of BM transplantation in cell/gene therapy of muscular dystrophy.

CARATTERIZZAZIONE E MANIPOLAZIONE EX-VIVO DELLE CELLULE STAMINALI EMOPOIETICHE

Wanda Piacibello

Internal Medicine Biotechnology, University of Torino Med School, Lab Division of Clinical Oncology

La cellula staminale emopoietica (HPSC) è per definizione una cellula capace di una enorme capacità di automantenimento ed in grado di generare cellule mature di tutte le linee differenziate. Quest'ultimo fenomeno avviene tramite la generazione di cellule intermedie, commissionate verso una o più linee maturative, per cui possiedono un grande potenziale proliferativo-differenziativo e, talora, un piccolo grado di automantenimento. Caratterizzazione e quantificazione di questi progenitori e delle HPSC sono fondamentali per la comprensione dei meccanismi e delle sequenze di automantenimento, proliferazione e differenziazione per il trapianto, l'espansione ex-vivo e la terapia genica. Fino a poco tempo fa l'analisi quantitativa delle cellule emopoietiche primitive umane era limitata a saggi in vitro, come i test clonogenici per cellule formanti colonie (le diverse CFC) o colture a lungo termine (LTC). Le CFC identificavano soltanto progenitori commissionati uni o multipotenti. Le LTC permettono di identificare cellule più primitive (LTC-IC), capaci di generare colonie mieloidi per almeno 5-12 settimane di coltura su idonei tappeti stromali. Il saggio trapiantologico del topo è stato fondamentale per caratterizzare e definire le cellule staminali emopoietiche più primitive. Recentemente, un saggio analogo è stato reso possibile anche per l'uomo. Diversi gruppi hanno provato a trapiantare cellule staminali emopoietiche in diversi ceppi murini mutanti, nel tentativo di trovare un modello di trapianto uomo-topo riproducibile. Ne è risultato che l'iniezione endovenosa di progenitori emopoietici umani in topi Non Obesi Diabetici con Immunodeficienza Severa Combinata (NOD/SCID) irradiati subletalmente determina l'attecchimento, nei tessuti emopoietici (midollo osseo, milza e timo), di cellule primitive umane, che proliferano e differenziano, producendo numerose LTC-IC, CFCs, precursori e cellule più immature o mature mieloidi, eritroidi, megacariocitarie e linfocitarie anche senza l'impiego di fattori di crescita esogeni. Le cellule emopoietiche che hanno determinato l'attecchimento di cellule umane sono state denominate SRC (Cellule Ripopolanti gli SCID). Le SRC sono biologicamente distinte e molto più primitive della maggior parte delle LTC-IC e di tutte le CFC. Questo saggio sperimentale è molto importante per definire e comprendere molti aspetti biologici delle cellule staminali emopoietiche umane sia in campo clinico che sperimentale. Inoltre un concetto è evidente: simbolo della cellula staminale emopoietica è la sua capacità di ricostituzione emopoietica completa e duratura.

Un altro punto molto importante è l'identificazione di condizioni di coltura in vitro (o "ex-vivo"), che permettano alle cellule staminali emopoietiche umane di autorinnovarsi e di espandersi. In particolare il sangue di cordone ombelicale (CB) ha attratto particolare attenzione come fonte alternativa di cellule emopoietiche per trapianto e terapia genica. Tuttavia, poiché il suo volume è fisiologicamente limitato e perciò non sufficiente per trapiantare pazienti adulti, molto interesse è stato concentrato sui tentativi di espandere le HPSC di sangue cordonale in vitro.

APPLICAZIONI TERAPEUTICHE DELLE CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI

Fulvio Porta, Arnalda Lanfranchi*, Luigi D. Notarangelo

Clinica Pediatrica, III Laboratorio*, Spedali Civili, Brescia

I trapianti da donatore aploidentico sono la terapia d'elezione nel trattamento di bambini affetti da immunodeficienze primitive e da altre malattie genetiche quando non vi è la disponibilità di un donatore compatibile. Presso La Clinica Pediatrica di Brescia sono stati realizzati più di 120 trapianti aploidentici in bambini affetti da immunodeficienza primitiva. Tuttavia il miglioramento del risultato clinico di questo tipo di trapianto è sottoteso alla realizzazione di nuove strategie nella selezione, caratterizzazione e utilizzo delle cellule staminali. Infatti appare chiaro come in questo tipo di trapianto non sia sufficiente l'infusione delle sole cellule CD34 positive, ma che un ruolo rilevante sia anche delle cellule staminali mesenchimali e dendritiche. Il midollo osseo è la maggiore sorgente di cellule staminali in quanto contiene non solo i precursori ematopoietici, ma anche cellule staminali non emopoietiche (mesenchimali). Vi è assoluta evidenza che le cellule mesenchimali sono in grado di differenziarsi in diversi stipiti cellulari quali osteoblasti, miociti, connettivo, cellule gliali etc. Le cellule mesenchimali hanno la capacità di migrare, di differenziare, sopprimono le risposte immunitarie cellulo-mediate, di indurre maturazione dei B e T linfociti, di favorire l'attecchimento. Se coltivate ed espanse, le cellule mesenchimali umane esprimono sulla loro superficie antigeni quali SH2, SH3, CD29, CD44, CD71, CD90, CD106, CD120a, CD124 mentre risultano negative per CD14, CD34 e CD45.

Sulla base di questi risultati e ipotizzando che parte degli insuccessi o delle complicanze del trapianto di midollo osseo aploidentico fosse dovuto al mancato attecchimento delle cellule staminali mesenchimali del donatore, in 4 casi sono stati coinfusi precursori mesenchimali accanto a cellule CD34 positive. In tutti i casi si è ottenuto attecchimento e piena ricostituzione immunologica. A validare il ruolo clinico dell'infusione delle cellule staminali mesenchimali inoltre, vi è l'esperienza dei 6 trapianti prenatali da noi effettuati. In 5 feti la diagnosi era di SCID (immunodeficienza combinata grave) effettuata in 20° settimana, ma mentre due feti presentavano una forma priva sia di linfociti T che di cellule NK, in 3 vi era presenza di cellule NK che determinano una certa resistenza al trapianto. In tutti i casi le cellule staminali emopoietiche sono state infuse per via intraperitoneale per due volte consecutive, ma dal momento che in due casi NK positivi vi era stato un attecchimento parziale, in un caso abbiamo realizzato la coinfusione di cellule CD34 positive accanto a cellule staminali mesenchimali. In questo caso non solo vi è stato pieno attecchimento, ma anche pronta ricostituzione immunologica.

Il sesto trapianto in utero è stato realizzato in un feto affetto da osteogenesi imperfetta che presentava una frattura di femore prenatale. L'infusione intraperitoneale consisteva di cellule staminali emopoietiche e mesenchimali della mamma. Al momento della nascita la frattura era risolta. Sono in corso indagini molecolari per valutare il chimerismo donatore-ricevente. Nella nostra esperienza l'utilizzo clinico di cellule staminali mesenchimali non determina complicanze, non incrementa il rischio di reattività donatore-ricevente, consentirà in futuro di trattare malattie genetiche non ematologiche.

“CELLULE STAMINALI SOMATICHE II”

LE CELLULE STAMINALI PER LA TERAPIA DELLE GM2 GANGLIOSIDOSI

Sabata Martino & Aldo Orlacchio

Dipartimento di Scienze Biochimiche e Biotecnologie Molecolari - Università di Perugia

La malattia di Tay-Sachs (TS) e la malattia di Sandhoff (GM2 Gangliosidosi) sono malattie genetiche da accumulo metabolico causate dalla mancanza dell'enzima lisosomiale beta-esosaminidasi (Hex). In particolare, la malattia di Tay-Sachs è causata dalla mancanza di Hex A mentre quella di Sandhoff è causata dalla mancanza degli isoenzimi Hex A e Hex B. In entrambe le malattie, la mancanza degli isoenzimi ha come conseguenza l'accumulo di glicoproteine, proteoglicani e glicosminoglicani in particolare nel sistema nervoso centrale. Il ganglioside GM2 rappresenta uno dei principali prodotti di accumulo nei lisosomi neuronali. La conseguenza di queste alterazioni metaboliche è la degenerazione selettiva delle cellule neuronali seguita da morte precoce del paziente nelle forme infantili più gravi. Al momento non esistono terapie per tali patologie.

Utilizzando la tecnologia della terapia genica, abbiamo dimostrato che per la cura della malattia di TS è indispensabile l'introduzione del gene mancante direttamente nelle cellule deficitarie. Infatti la somministrazione dell'enzima alle cellule suddette non consentiva la rimozione dell'accumulo metabolico. A ciò va aggiunto che queste procedure non sono attualmente in grado di riparare/prevenire la neurodegenerazione. Da qui la nostra idea di sviluppare un nuovo approccio terapeutico per queste malattie basato sulla combinazione delle potenzialità della terapia genica e dalla terapia cellulare.

Abbiamo perciò sviluppato due diverse strategie. La prima prevede l'uso delle cellule Staminali Neurali adulte (NSCs), la seconda, invece, prevede l'uso delle cellule Stromali di Midollo osseo (BMSCs).

L'uso delle NSCs consente di portare l'enzima mancante nonché cellule sane, direttamente nel sistema nervoso centrale. Per questo abbiamo prodotto le NSCs dalla Zona Subventricolare del cervello di topi wild-type e ne abbiamo caratterizzato il sistema della beta-esosaminidasi. I nostri risultati hanno dimostrato una diretta relazione fra attività enzimatica e differenziamento cellulare. Infatti le cellule differenziate presentavano un elevato incremento dell'attività della beta-esosaminidasi totale (A+B) rispetto alle controparti staminali controllo. Questi studi sono stati effettuati su analoghe preparazioni cellulari ottenute dai modelli animali adulti delle due patologie (TS e Sandhoff) e hanno suggerito una potenziale relazione fra progressione della malattia e variazione dell'attività enzimatica della beta-esosaminidasi.

L'uso, invece, delle BMSCs si basa sulla loro potenzialità di originare tessuti non-emopoietici. Da ciò l'idea che l'associazione delle BMSCs alle cellule staminali emopoietiche, normalmente usate per un trapianto di midollo osseo classico, potrebbe consentire il potenziamento della controparte cellulare "neurale" dopo il trapianto. Questo approccio combinato con la terapia genica consente inoltre di effettuare il trapianto di midollo autologo. A tale scopo abbiamo tradotto le BMSCs di topo TS con un vettore retrovirale codificante per il cDNA della subunità α della beta-esosaminidasi. I nostri dati *in vitro* hanno dimostrato l'efficacia della nostra strategia nel correggere il danno metabolico e inoltre hanno indicato la capacità di queste cellule di originare cellule della filiera neurale.

Questa ricerca è supportata dalla Fondazione Telethon.

NEURONI E GLIA DA CELLULE STAMINALI

Silvia Nicolis

Dipartimento di Biotecnologie e Bioscienze, Università di Milano-Bicocca

La scoperta di cellule staminali nel sistema nervoso dei mammiferi, sia nell'embrione che nell'adulto, ha importanti conseguenze per la comprensione dei meccanismi di sviluppo e di mantenimento del sistema nervoso, e fornisce una base per approcci nuovi di medicina rigenerativa. Cellule staminali neurali (CSN) sono state caratterizzate in tutto il sistema nervoso embrionale. Queste cellule mantengono (e espandono) una popolazione germinale mediante "self-renewal", e possono generare tutti e tre i tipi cellulari del sistema nervoso maturo (neuroni, astrociti, oligodendrociti). I meccanismi molecolari attivi in queste cellule (fattori trascrizionali; fattori diffusibili e "centri organizzatori"; interazioni cellula-cellula etc.), che producono una neurogenesi adeguata alle diverse regioni funzionali del sistema nervoso, cominciano ad essere investigati.

Cellule staminali persistono nel sistema nervoso adulto. Qui la neurogenesi è limitata, ed è documentata come significativa solo in poche regioni specifiche (ippocampo; bulbo olfattivo). Tuttavia, è stato osservato che l'infusione di citochine nello spazio ventricolare di topi con morte neuronale prodotta da ischemia può indurre una neurogenesi rigenerativa da parte di queste cellule residenti, che generano nuovi neuroni funzionali (proiettivi ippocampali) in regioni non normalmente soggette a turnover. Queste cellule staminali esprimono programmi genetici (fattori trascrizionali, recettori etc.) di tipo embrionale, la cui comprensione potrebbe indirizzare tentativi di terapia.

Cellule staminali neurali possono essere coltivate in vitro ed espanse (anche se forse non indefinitamente) sia dall'embrione che dall'adulto, dove possono essere isolate anche da regioni non più normalmente neurogeniche del sistema nervoso maturo. Queste colture forniscono uno strumento per investigare i meccanismi di scelta del destino cellulare e del differenziamento, e insieme una sorgente di cellule nervose a potenziale terapeutico. Queste cellule (o loro derivati) infatti, trapiantate in un cervello (o in un organismo) ospite, possono differenziare in neuroni e glia, con effetti terapeutici in modelli di malattia (Parkinson; sclerosi multipla). Inoltre, sono stati identificati segnali capaci di "pilotare" le cellule a generare, in coltura, tipi neuronali specifici (ad es. neuroni dopaminergici).

Gli esperimenti di trapianto e le colture in vitro hanno evidenziato la plasticità delle cellule staminali neurali: il loro destino differenziativo non è predeterminato dalla regione di origine. Questo concetto è stato esteso alla possibilità di generare cellule differenziate di natura molto diversa da quella neurale (muscolare, emopoietica.); la natura delle "transdifferenziazioni"

osservate, e i meccanismi (a volte insospettati, quali la fusione cellulare) sono oggi intensamente discussi.

Le CSN non sono, forse, un unico tipo cellulare: proprietà funzionali di cellule staminali neurali sono state trovate in cellule tipicamente indifferenziate, ma anche in cellule con specifiche caratteristiche differenziate (glia radiale; alcuni astrociti). Inoltre, in alcune condizioni, anche cellule terminalmente differenziate postmitotiche (oligodendrociti) possono riacquistare capacità proliferativa e pluripotenza, inclusa capacità di generare neuroni.

Le cellule staminali embrionali (ES), derivate dalla massa cellulare interna della blastocisti (di topo), possono essere propagate per un tempo indefinito in coltura, mantenendo la capacità di generare tutti i tipi cellulari differenziati dell'embrione. Basandosi sullo studio dei meccanismi molecolari dell'embriogenesi, sono stati sviluppati protocolli (comprendenti trattamenti con citochine, e/o modificazioni genetiche) per il differenziamento delle cellule ES a specifici tipi neuronali (p.es. neuroni dopaminergici) o gliali (p.es. oligodendroglia), che si sono dimostrati funzionali in modelli animali di patologia (Parkinson; sclerosi multipla).

Le cellule ES possono essere espanse in grandi numeri in coltura allo stato indifferenziato, e i geni che mantengono la loro pluripotenza cominciano a essere identificati.

Questi geni sono conservati (ed espressi) nell'uomo, in diverse linee di "cellule ES" recentemente isolate, con origine embrionale analoga a quelle di topo (p. es. blastocisti). La comparazione delle proprietà funzionali delle cellule ES umane con quelle murine è oggi attivamente perseguita.

Nel topo, mutazioni mirate dei geni endogeni ("gene targeting") sono pratica comune nelle cellule ES, fornendo la possibilità di "correggere" difetti genetici gravi (almeno alcuni). Inoltre, è stato possibile trasferire nuclei di cellule somatiche adulte in oociti enucleati, e lasciar sviluppare questi (in vitro) in blastocisti, da cui sono state derivate cellule ES in coltura. Questo crea la possibilità di avere cellule ES con il genotipo di uno specifico individuo adulto. Infine, è stata recentemente descritta la "de-differenziazione" di cellule ES in oociti, in grado di svilupparsi in seguito almeno fino allo stadio di blastocisti. Questo potrebbe eliminare, in linea teorica, la necessità di oociti "nuovi" per generare cellule ES con genotipi specifici. Se questi metodi saranno applicabili alle cellule ES umane, l'ottenimento di cellule ES "self", private, se necessario, di difetti genetici gravi, e capaci di generare cellule terapeutiche, potrà divenire una realistica speranza.

CARDIOGENESI IN CELLULE EMBRIONALI STAMINALI MURINE

Carlo Ventura, Yolande Asara, Daniela Santoni, Tiziana Pinna, Antonella Pintus, Margherita Maioli

Unità di Ricerca dell'Istituto Nazionale di Biostrutture e Biosistemi c/o Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Sassari.

La cardiogenesi, uno dei primi eventi morfogenetici nello sviluppo embrionale, rappresenta un fenomeno complesso non ancora completamente delineato a livello molecolare. Alcuni fattori di trascrizione tessuto specifici, quali l'“homeodomain” Csx/Nkx2.5 e il fattore “zinc finger” GATA-4, sono risultati essere essenziali per il normale sviluppo del cuore in diverse specie animali, uomo incluso (1-3).

Abbiamo studiato il processo della cardiogenesi in cellule GTR1, una linea di cellule embrionali staminali (ES) murine derivate dalla linea pluripotente R1 (4). Le cellule GTR1 sono state ingegnerizzate in maniera da esprimere un gene di resistenza alla puomicina sotto il controllo del promotore di “alpha myosin heavy chain”. La presenza di questo gene chimerico consente di realizzare un approccio di “gene trapping” per la selezione in presenza di puomicina di una popolazione virtualmente pura di cardiomiociti derivati da cellule ES. Abbiamo in precedenza dimostrato che il gene della prodinorfina era in grado di orchestrare il differenziamento cardiaco in una linea murina di cellule di carcinoma embrionale (5). Nel presente studio, abbiamo riscontrato l'espressione del gene della prodinorfina in cellule GTR1 indifferenziate. La trascrizione di questo gene delle endorfine, come anche la sintesi e la secrezione di un suo prodotto biologicamente attivo, la dinorfina B, erano marcatamente aumentate sia a livello dei corpi embrioidi che dei cardiomiociti derivati dalle cellule GTR1 (6). Il differenziamento cardiaco era associato alla stimolazione autocrina di recettori oppioidi kappa della membrana plasmatica da parte della dinorfina B secreta nel corso della cardiomiogenesi (6). Questi eventi coinvolgevano complesse dinamiche di redistribuzione subcellulare di specifiche isoforme della protein kinasi C (PKC). L'uso di antagonisti selettivi dei recettori oppioidi rimodulava significativamente il profilo di localizzazione subcellulare di alcuni isoenzimi della PKC, riducendo la resa del processo cardiogenetico (6). L'analisi immunostochimica con microscopia confocale ha rivelato la presenza di densi accumuli perinucleari di dinorfina B nel corso del differenziamento cardiaco delle cellule GTR1, suggerendo la possibilità di una azione intracellulare di tale endorfina (7).

Sono stati identificati specifici recettori oppioidi nel nucleo di cellule ES indifferenziate, con un aumento considerevole dei valori di B_{max} in nuclei isolati da cardiomiociti originati da cellule ES (7). L'esposizione alla dinorfina B di nuclei isolati da cellule indifferenziate ha prodotto un'induzione tempo- e dose-dipendente della trascrizione dei geni cardiogenetici GATA-4 ed Nkx-

2.5 e dello stesso gene della prodinorfina (7). Queste risposte trascrizionali erano associate ad un marcato aumento dell'attività PKC nucleare.

Nel complesso, questi risultati indicano la stretta dipendenza del fenomeno della cardiogenesi da eventi autocrini e intracrini orchestrati da un sistema endorfinergico.

Bibliografia

1. Lints TJ, Parsons LM, Hartley L, Lyons I, Harvey RP. Nkx-2.5: a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and their myogenic descendants. *Development*. 1993;119:419-431.
2. Schott JJ, Benson DW, Basson CT, Pease W, Silberbach GM, Moak JP, Maron BJ, Seidman CE, Seidman JG. Congenital heart disease caused by mutations in the transcription factor Nkx-2.5. *Science*. 1998;281:108-111.
3. Benson DW, Silberbach GM, Kavanaugh-McHugh A, Cottrill C, Zhang Y, Riggs S, Smalls O, Johnson MC, Watson MS, Seidman JG, Seidman CE, Plowden J, Kugler JD. Mutations in the cardiac transcription factor Nkx-2.5 affect diverse cardiac developmental pathways. *J Clin Invest*. 1999;104:1567-1573.
4. Nagy A, Rossant J, Nagy R, Abramow-Newerly W, Roder JC. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90:8424-8428.
5. Ventura C, Maioli M. Opioid peptide gene expression primes cardiogenesis in embryonal pluripotent stem cells. *Circ Res*. 2000;87:189-194. Ventura C, Maioli M. Opioid peptide gene expression primes cardiogenesis in embryonal pluripotent stem cells. *Circ Res*. 2000;87:189-194.
6. Ventura C, Zinellu E, Maninchedda E, Fadda M, Maioli M. Protein kinase C signaling transduces endorphin-primed cardiogenesis in GTR1 embryonic stem cells. *Circ Res*. 2003;92:617-622.
7. Ventura C, Zinellu E, Maninchedda E, Maioli M. Dynorphin B is an agonist of nuclear opioid receptors coupling nuclear protein kinase C activation to the transcription of cardiogenic genes in GTR1 embryonic stem cells *Circ Res*. 2003;92:623-629.

POSTER

RECOMBINANT CYTOCHROME P450S IMMOBILIZATION FOR BIOSENSORS APPLICATIONS

Cristina Paternolli, Mirco Antonini*, Paola Ghisellini and Claudio Nicolini

Department of Biophysical M&O Sciences and Technologies, University of Genova.

Due to the very attractive pleiotropic properties of the heme-enzymes, several cytochrome P450s isoforms have been utilized to optimize biodevice assembly. Langmuir-Blodgett films of cytochromes P4501A2, P4502B4, and P450SCC were developed in order to obtain well ordered structures. The thin films were prepared and characterized by utilizing various techniques such as: UV-vis spectrophotometry, nanogravimetry, Circular Dichroism, and electrochemical study in order to identify the optimal conditions of immobilization. Results show that it is possible to employ cytochrome P450s thin films as sensitive elements to detect the interaction with organic substrates such as fatty acids, drugs, and toxic compounds.

LA DEPLEZIONE DELLE POLIAMINE NELLE CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI DI RATTO INIBISCE L'ATTIVITA' CASPASICA BASALE E STIMOLATA DA TNF- α

Bonafe' F, Stanic I, Flamigni F, Muscari C, Gamberini C, Guarnieri C, Caldarera CM

Dipartimento di Biochimica "G. Moruzzi", Universita' degli Studi di Bologna

L'apoptosi delle cellule staminali rappresenta uno stimolo fisiologico che controbilancia il loro naturale processo di proliferazione. Le caspasi, enzimi chiave coinvolti nel processo apoptotico, sono inoltre considerate come indispensabili regolatori della macchina replicativa e, in alcune cellule staminali, sembrano influenzare anche il loro destino differenziativo. Le poliamine naturali, putrescina, spermidina e spermina, oltre a favorire i processi di crescita cellulare, sono state piu' recentemente studiate anche come fattori di regolazione dell'apoptosi, specialmente in quelle cellule che mostrano un'intensa attivita' proliferativa. Lo scopo di questa ricerca e' stato quello di valutare l'eventuale variazione dell'attivita' caspasi in cellule staminali mesenchimali (MSCs), modificandone il contenuto intracellulare di poliamine. Le cellule del midollo osseo di ratto sono state estratte mediante irrigazione del canale femorale con una soluzione contenente α -MEM, 10 % FBS e una miscela di antibiotici. Da questa popolazione cellulare venivano successivamente isolate le MSCs, identificabili come cellule aderenti alla piastra, e fatte crescere per 10 giorni nel mezzo precedentemente descritto. Al fine di ridurre drasticamente la concentrazione di poliamine cellulari, le MSCs sono state fatte crescere per altri 2 giorni in presenza di 1 mM difluorometilornitina (DFMO) e 1 μ M CGP48664, entrambi specifici inibitori di due enzimi chiave della sintesi delle poliamine. L'analisi HPLC confermava che questo trattamento riduceva marcatamente la concentrazione intracellulare di poliamine. La velocita' di crescita delle MSCs, valutata mediante analisi spettrofotometrica della riduzione mitocondriale del metiltetrazolio (MTT), era inoltre significativamente ridotta dalla deplezione di poliamine, suggerendo che esse sono in grado di stimolare la proliferazione anche in questo tipo di cellule staminali. L'attivita' basale delle caspasi, determinata misurando la fluorescenza emessa dal substrato specifico Ac-DEVD-AMC, si riduceva di quattro volte nelle MSCs in seguito alla deplezione poliaminica. Un effetto simile si poteva evidenziare anche in presenza di DFMO e CGP48662 aggiunti singolarmente al terreno di coltura. L'influenza della deplezione poliaminica sull'attivita' caspasi veniva inoltre valutata stimolando l'apoptosi delle MSCs con Tumor Necrosis Factor alfa (TNF- α), alla concentrazione di 500 U/ml, in presenza di 5 μ M MG-132 per annullare l'effetto antiapoptotico contemporaneamente innescato dal fattore di trascrizione NF- κ B. La deplezione poliaminica aboliva completamente l'incremento di circa tre volte dell'attivita' caspasi indotto dal TNF- α . Al contrario, l'aggiunta di 100 μ M putrescina o 100 μ M spermidina alle MSCs deplete di poliamine consentiva alle caspasi di mantenere elevata la loro attivita' stimolata da TNF- α .

Questi dati suggeriscono quindi che le poliamine naturali sono strettamente coinvolte nella regolazione dell'attivita' caspasi, sia basale che stimolata da TNF- α , delle MSCs di ratto e come il processo di apoptosi possa essere contrastato dalla deplezione delle poliamine.

Si ringraziano la Compagnia di San Paolo, Torino e il M.I.U.R., Roma, per il finanziamento di questa ricerca, e la Casa farmaceutica NOVARTIS per avere fornito il composto CGP48662.

MECCANISMI CELLULARI E MOLECOLARI COINVOLTI NELLO SVILUPPO DEI NEURONI DOPAMINERGICI MESENCEFALICI

Caiazzo M.¹, Perrone Capano C.², Consales C.¹, Volpicelli F.¹, Di Porzio U.¹

¹ IIGB, CNR, Naples, Italy; ² Univ. of CZ, Dept. of Pharmacobiology, CZ, Italy

I precursori neurali dopaminergici (DA) mesencefalici (MES) si differenziano in neuroni DA tramite l'azione di due segnali diffusibili, Sonic hedgehog (SHH) e Fibroblast growth factor 8 (FGF8). Questi fattori attivano cascate di segnali intracellulari e fattori trascrizionali (TF) che innescano il differenziamento DA. Nurr1 è tra i primi TF attivati; esso è essenziale per il differenziamento dei neuroni DA. Abbiamo dimostrato che durante l'ontogenesi del MES ventrale di ratto, l'espressione di Nurr1 è regolata nello sviluppo e i suoi livelli mostrano un picco tra il giorno embrionale (E) 13 ed E 15, quando la maggior parte dei neuroni DA differenziano. In colture primarie di MES ventrale da ratto E13, Nurr1 ha un'espressione temporale simile a quella osservata *in vivo*. L'espressione del gene *Nurr1* appare plastica *in vitro*. Infatti in seguito a stimolazione mediante depolarizzazione in queste colture si osserva un aumento significativo sia dell'mRNA che della proteina di Nurr1. Quest'effetto è altamente selettivo per Nurr1 se paragonato ad altri marcatori DA testati. L'effetto depolarizzante è anche rilevato in colture arricchite in neuroni DA mediante l'utilizzo combinato di SHH e bFGF. Quest'ultimo determina una notevole proliferazione dei neuroblasti, mentre SHH induce (come in vivo) il fenotipo DA, con conseguente considerevole aumento di questi neuroni (colture "espansive"). L'effetto di SHH è abolito in presenza di anticorpi anti-SHH. Così, in condizioni di coltura stringenti, si può generare un alto numero di neuroni DA, (le cellule DA ottenute da un singolo MES embrionale sono arricchite almeno sette volte) che acquisiscono le proprietà di neuroni DA MES maturi.

IMPROVING THE DETECTION OF PROTEIN REMOTE HOMOLOGUES USING SHANNON ENTROPY INFORMATION

E. Capriotti , P. Fariselli, I. Rossi and R. Casadio

Dept. of Physics/CIRB, University of Bologna, Italy, - Dept. of Biology/CIRB, University of Bologna, Italy.

We analyze the quality of the alignment generated by the profile-profile alignment comparison algorithm known as BASIC [1] and compare the results with those obtained with a structural alignment code. By this we compute that a Shannon entropy value > 0.5 gives a sequence to sequence alignment of the target/template couple comparable to that obtained with the structural alignment performed with CE.

In our fold recognition/threading code *Tangram*, the BASIC profile-profile alignment is implemented as follows:

1. The composition profiles P_A and P_B for the target and template are generated by multiple alignment of the sequences obtained from a three-iteration PSI-BLAST [2] search on the Non-Redundant database (the inclusion threshold is $E=10^{-3}$).
2. the dot matrix (D) for the profile comparison of two protein sequences $D = P_A^T S P_B$, (with $S=BLOSUM62$ [3] substitution matrix) is computed using linear algebra routines.
3. the D matrix is searched for high-scoring alignment by means local Smith-Waterman dynamic programming algorithm [4].

The test set used for the evaluation is composed by 185 template/target couples of PDB structures that share the same SCOP label, but have less than 30% sequence identity

When the top-scoring alignments for each target protein in the test set is considered, our BASIC implementation detects the full SCOP label for 125 couples (68%) and generates 114 (62%) alignments with a MaxSub [5] score ≥ 1 .

Interestingly, it is found that nearly all of the high-quality alignments share a common feature: the average Shannon entropy for the profile sections aligned together is greater than 0.5 for both the template and the target.

If only the top scoring alignments for which this condition holds are considered, a subset of 119 alignments is selected, and for 116 of them (97%) the full SCOP label can be assigned to the target, while 108 (91%) gets a nonzero MaxSub score, with an average score of 4.6 MaxSub on the subset. On the same 119 couples, the structural alignment program CE [6] computes a nonzero MaxSub score for 116 of them, with an average of 5.7 points.

These results indicate that the Shannon entropy value can be used to discriminate a subset of

sequence profile-profile alignments of quality comparable to that obtained by means of a structural alignment program

Riferimenti bibliografici:

- a) Rychlewski J. et al. (1998) Fold and function predictions for *Mycoplasma genitalium* proteins. *Fold. Des.* **3**, 229-238
- b) Altschul S.F. et al. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25** (17), 3389-3402
- c) Henikoff, S. et al. (1998). Superior performance in protein homology detection with the BLOCKS database server. *Nucleic Acids Res.* **26**, 309-312.
- d) Smith T. S. and Waterman M. S. (1981) Identification of common molecular subsequences. *J. Mol. Biol.* **147**, 145-147
- e) Siew N. et al (2000) MaxSub: an automated measure for the assessment of protein structure prediction quality. *Bioinformatics* **16**(9) 776-785.
- f) Shindyalov I. N. and Bourne P. E. (1998) Protein structure alignment by incremental combinatorial extension (CE) of the optimal path *Prot. Eng.* **11**(9) 739-747

METHODS TO FABRICATE NANOCONTACTS FOR ADDRESSING SINGLE-MOLECULES

Sandro Carrara^a, Enrico Stura^{a,b}, Valter Bavastrello^{a,b}, Jason Riley^c Claudio Nicolini^{a,b,d}

^aDepartment of Biophysical M&O Science and Technologies, University of Genoa, Corso Europa 30, 16132 Genoa, Italy

^bFondazione EL.B.A, Via delle Testuggini, 00143, Rome, Italy

^cSchool of Chemistry, University of Bristol, Bristol BS8 1TS, U.K.

^dPolo Nazionale di Bioelettronica, Via delle Testuggini, 00143, Rome, Italy

Recently, nanotechnology had entering the field of biosensors and bioelectronics. In particular, it is interesting to investigate how sensitivity, selectivity, and switching may be improved contacting directly the single molecules. Nanometric sized contacts are necessary to address the single molecules. The aim of the work is to review the various methods proposed in literature to fabricate electrical contacts at nanometric level, namely nanocontacts.

VARIAZIONI DI ESPRESSIONE GENICA IN CELLULE ENDOTELIALI UMANE PORTATRICI DELLA MUTAZIONE G972R

Consoli C., D'Adamo M., Federici M., Lauro R.

Università di Roma "TorVergata", Dipartimento di Medicina Interna.

L'endotelio è un tessuto-organo in quanto secerne una serie di molecole che hanno effetti contrapposti nella regolazione dell'omeostasi vascolare. Le disfunzioni endoteliali consistono in modificazioni della produzione di tali molecole, come l'aumento delle molecole di adesione e dei fattori di coagulazione e alterazioni dei fattori vasodilatatori e vasocostrittori.

Queste disfunzioni sono tra i fattori di rischio per le malattie cardiovascolari, come l'aterosclerosi. Questa consiste in un processo infiammatorio della parete vascolare in cui intervengono elementi cellulari e lipidici, che portano allo sviluppo di placche aterosclerotiche. Alla base della patologia ci sono una serie di fattori di rischio: disfunzioni endoteliali, ipertensione, fumo, obesità, diabete.

Tra gli elementi che contribuiscono allo sviluppo del diabete di II tipo (non insulino-dipendente) ci sono la deficienza insulinica e l'insulino-resistenza. Quest'ultima è dovuta a varie cause tra cui le mutazioni della molecola substrato del recettore dell'insulina, IRS-1. Tra i suoi polimorfismi il più comune è G972R (Gly - Arg), che riduce l'attivazione di due molecole importanti nel processo di trasduzione del segnale dell'insulina, la PI3-k e AKT, con conseguenti alterazioni nel rilascio dell'insulina e nel metabolismo del glucosio. Inoltre, IRS-1 è un gene candidato per le malattie delle arterie coronarie, infatti è stata dimostrata una relazione tra la mutazione G972R e i soggetti con elevata predisposizione allo sviluppo di tali malattie.

Lo scopo della ricerca è stato quello di valutare eventuali variazioni di espressione di geni coinvolti nella regolazione delle funzioni endoteliali in cellule HUVEC, che presentano la mutazione G972R di IRS-1.

E' stata fatta l'estrazione di RNA totale da colture cellulari di HUVEC WT e mutate per G972R (MUT) non stimulate con insulina e stimulate overnight con insulina (5×10^{-7} nM). L'RNA estratto è stato utilizzato nella tecnica del Microarray (Atlas Clontech) per la sintesi di cDNAs. Quest'ultimo, marcato con [α^{32} P]dCTP, è stato ibridizzato con membrane di nylon contenenti cDNA di 600 geni del sistema cardiovascolare. Le membrane sono state sottoposte ad un'analisi densitometrica per misurare l'intensità della marcatura.

Lo stesso RNA è stato usato per la sintesi di cDNA amplificato con una PCR REAL TIME (Applied Biosystems), utilizzando la TaqMan Universal PCR Master Mix e i primers per i geni selezionati con il Microarray e per l'housekeeping β -actina.

L'analisi densitometrica con il software AtlasImage, che consente di comparare l'intensità di marcatura degli spottini di cDNA delle diverse membrane, ha rivelato una differenza nella

marcatura di diversi geni come CD9, CD34, TFPI, ACE e il gene del Tissue plasminogen activator (t-PA), tra il MUT stimolato e il WT. Mentre i campioni WT e MUT non stimolati non hanno mostrato differenze.

L'analisi dei risultati della PCR REAL TIME per i diversi geni normalizzati con la β -actina mostra una differenza di espressione solo per l'RNA messaggero di t-PA. In particolare, nel MUT non stimolato la sua espressione è dell'86% maggiore rispetto al WT; il trattamento con insulina riduce l'espressione genica di t-PA del 60% nel WT e del 21% nel MUT rispetto allo stesso campione non stimolato, ma permane una maggiore espressione del 39% nel MUT rispetto al WT.

La mutazione G972R di IRS-1, presente nel modello sperimentale proposto, sembra aumentare l'espressione genica di una proteina coinvolta nel meccanismo della fibrinolisi (t-PA) e sembra diminuire di circa il 40% la capacità dell'insulina di ridurre l'espressione genica di questa molecola. Si può ipotizzare che questo ultimo effetto sia dovuto ad una ridotta attivazione del cascata del segnale dell'insulina, poiché la mutazione potrebbe diminuire l'attivazione della proteina AKT o della via alternativa delle MAPK, entrambe coinvolte nella regolazione dei fattori per la trascrizione genica.

PLACENTAL LACTOGEN HORMONE (PL) SIGNAL TRANSDUCTION PATHWAYS IN PANCREATIC BETA-CELLS

F.DeAngelis, L.Bova, D.Lauro, M.Federici, P.Sbraccia, G.Sesti, R. Lauro, G.Donadel .

Laboratorio di Medicina Molecolare, Dipartimento di Medicina Interna, Universita' di Roma TorVergata

The placental lactogen hormone (PL), known also as chorionic somatomammotropin (CS), the growth hormone (GH) and the prolactin (PRL) are part of a large family of polypeptide homologous hormones common to different species, from primates to teleostei fishes. PL is produced by the placenta uniquely during pregnancy and is the factor responsible for the mass increase of pancreatic islets and of their function during pregnancy. The PL has stronger mitogenic action on the pancreatic beta-cell than GH and PRL. These evidences support a potential role of PL to increase survival and function of islets after transplantation. Our interest is to study the signal trasduction mechanism and the possible anti-apoptotic role of hPL in the pancreatic beta-cell. Preliminary results conducted on murine (β TC-1) and rat (RIN-1046-38) insulinoma cell line stimulated with 500ng/ml of hPL recombinant protein, produced in our laboratory, and commercial hGH, used as a control, shown that: 1) both hormones stimulated tyrosine phosphorylation of proteins JAK/STAT, IRSs, MAPK (p44/ p42) and p38. Interestingly, hPL appeared to stimulated signal transduction molecules at later time points than hGH. 2) cytofluorimetric results indicated an anti-apoptotic action of hPL on insulinoma cell line confirmed by the activation of the AKT molecule. Based on our results, PL possibly have a biological role mediating the signal wich induce pancreatic beta cell-survival.

INFLUENZA DEI CAMPI ELETTROMAGNETICI SULL'ATTIVITA' DI ENZIMI LIBERI ED IMMOBILIZZATI. LA PEROSSIDASI COME ENZIMA MODELLO.

Portaccio M.¹, De Luca P.¹, Durante D.¹, Di Martino S.^{1,2}, Rossi S.², Lepore M.¹, Mita D.G.^{1,2}.

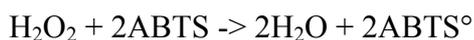
¹Dip. Medicina Sperimentale, Seconda Università di Napoli

²Istituto di Genetica e Biofisica "A. Buzzati Traverso"- CNR - Napoli

L'effetto dei campi elettromagnetici sui sistemi biologici ha sollevato da sempre molto interesse in ambito scientifico. Il nostro lavoro di ricerca è stato rivolto ad indagare il possibile effetto di campi elettromagnetici a frequenza industriale (50 Hz) sull'attività enzimatica in vitro.

Come enzima è stato scelto la perossidasi da rafano. Abbiamo studiato gli effetti del campo magnetico sia sull'enzima libero che su quello immobilizzato inteso come modello per il funzionamento degli enzimi che in vivo si presentano o intrappolati nel citoplasma o immobilizzati nel doppio strato lipidico.

La perossidasi (POD) è un enzima che catalizza la reazione di ossidazione di substrati organici in presenza di H₂O₂. In particolare, utilizzando l'ABTS come substrato si ottiene la seguente reazione:



Il prodotto della reazione è il radicale ABTS[°] una sostanza colorata la cui concentrazione può essere valutata spettrofotometricamente.

Gli esperimenti sono stati effettuati sia sull'enzima in soluzione che sull'enzima immobilizzato. In quest'ultimo caso, sono state preparate 4 differenti membrane. Le prime due membrane sono state ottenute intrappolando l'enzima in un gel di gelatina che in un caso era alla concentrazione del 10% e nell'altro alla concentrazione del 20%. La terza membrana è stata ottenuta immobilizzando il POD su membrane di nylon (Immunodyne) preattivate dalla casa fornitrice. La quarta membrana era ottenuta immobilizzando l'enzima covalentemente su membrane di Nylon che precedentemente abbiamo modificato mediante la tecnica del grafting chimico.

Le misure dell'attività enzimatica sono state condotte simultaneamente su due campioni, uno esposto al campo e l'altro di controllo non esposto. I tempi di esposizione utilizzati sono stati di 1h, 2h e 3h.

I risultati sono stati elaborati mediante il test statistico del t-Student appaiato.

Per quanto riguarda l'enzima libero i risultati hanno mostrato una maggiore diminuzione di attività del campione esposto al campo rispetto al campione di controllo. La diminuzione di attività era maggiore quanto maggiore era il tempo di esposizione dell'enzima al campo elettromagnetico. Si è trovato, inoltre, che la diminuzione di attività era proporzionale al numero di molecole enzimatiche presenti.

Con l'enzima immobilizzato, non si è riscontrata alcuna differenza apprezzabile rispetto ai campioni di controllo, né si misurava diminuzione dell'attività catalitica nel tempo dell'esperimento. Questo risultato può essere spiegato considerando, in primo luogo, che il processo di immobilizzazione rende l'enzima più stabile e inoltre che il numero delle molecole di enzima immobilizzate potrebbe essere insufficiente per rilevare l'influenza del campo elettromagnetico sull'attività enzimatica.

Dai risultati ottenuti è possibile concludere che la presenza del campo elettromagnetico produce una inattivazione dell'enzima nella forma solubile, mentre nessun effetto è osservato quando l'enzima è immobilizzato sia per intrappolamento che mediante legame covalente.

Considerando il nostro sistema come un modello di ciò che avviene in vivo, si può concludere che, probabilmente, campi elettromagnetici simili a quelli utilizzati per la nostra ricerca, non hanno alcun effetto sul funzionamento degli enzimi in vivo.

BIOREATTORI NON ISOTERMI PER IL DISINQUINAMENTO DI ACQUE REFLUE DELL'AGRICOLTURA INQUINATE DA UREA MEDIANTE UREASI IMMOBILIZZATA SU MEMBRANE DI NYLON

S. Di Martino¹, N. Diano¹, A. De Maio^{1,2}, V. Grano^{1,2}, S. Rossi², U. Bencivenga², M. Cermola², A. Attanasio², Mita D.G.^{1,2}

¹ Dip. Medicina Sperimentale, Seconda Università degli Studi di Napoli

²Istituto di Genetica e Biofisica "A. Buzzati Traverso"- CNR

Al fine di ridurre la concentrazione dell' urea, un inquinante presente nelle acque reflue dell' agricoltura, è stata preparata una membrana idrofobica e catalitica immobilizzando ureasi su nylon trattato con cicloesilmetacrilato. Esametilendiammina e glutraldeide sono stati usati come spaziatore ed agente legante, rispettivamente. Con riferimento alla controparte solubile, nel caso dell' ureasi immobilizzata è stato trovato:

- g) spostamento dell' optimum di pH verso valori più acidi;
- h) spostamento dell' optimum di temperatura, verso temperature più elevate;
- i) valori più alti di Km.

Quest'ultimo risultato indica un'apparente perdita di affinità dell'ureasi verso l'urea. Il recupero di affinità è stato ottenuto impiegando le membrane catalitiche in un bioreattore operante in condizioni non isoterme.

In queste condizioni la membrana catalitica mostra una velocità di reazione maggiore ed un valore della Km minore di quelli ottenuti sotto condizioni isoterme.

Di conseguenza, si osservano incrementi percentuali dell' attività enzimatica e una riduzione dei tempi di produzione proporzionali alla differenza di temperatura applicata.

I risultati sono discussi con riferimento al processo di termodialisi.

La tecnologia dei bioreattori non isotermi conferma la sua utilità anche nel disinquinamento di acque agricole inquinate da urea.

ROMANZO L-ASPARAGINASE DAL ATROSEPTICUM DI PECTOBACTERIUM: CLONAZIONE DEL GENE, OVEREXPRESSION NELLA E.COLI, PURIFICAZIONE DELLA DESCRIZIONE ENZIMATICA E FISICO-CHIMICA RECOMBINANT DELLE PROTEINE

M.A Eldarov 1, A.A Zhgun 1, Yu.V.Gervaziev 2, S.S. Alexandrova 2, N.M.. Omel'yanuk 2, A.A. Borisova 2, A.I. Archakov 2, K.G. Skryabin 1 e N.N. Sokolov2.

1. Centro di bioingegneria, RAS Accademia Russa delle Scienze, Mosca, Russia

2. V.N.Istituto di chimica biomedica, RAMS Accademia Russa delle Scienze Mediche, Mosca, Russia

L-asparaginasi microbico è usato per le decadi negli schemi della chemioterapia unita della leucemia, del lympho- e dei reticuloblastomas limphoblastic acuti. Le preparazioni attualmente natali ed immobilizzate di L-asparaginase sono isolate sforzi da chryzantemi naturale degli escherichia colonna e del erwinia. Tuttavia, l'applicazione terapeutica delle droghe di L-asparaginase è accompagnata con una vasta gamma della tossicità ospite (e.g., disfunzione e coagulazione di anima epatica, renale, splenic, pancreatica), immunosuppression e sviluppo pronounced degli anticorpi neutralizzanti. La parte degli effetti tossici del trattamento di L-asparaginase è spiegata da attività collegata di L-glutaminase. Alla ricerca di enzimaticamente attivo, immunologicamente variante distinta e non tossica di L-asparaginase microbico abbiamo isolato un gene di codificazione di L-asparaginase dal atrosepticum di Pectobacterium. Il gene di L-asparaginase di atrosepticum di Pectobacterium (PATR_LANS) è romanzo e 85% omologhi al gene rispettivo dal chryzantemi del erwinia. Vari sistemi di espressione per produzione di PATR_LANS nella E.le cellule del coli sono state costruite, rendenti enzimaticamente PATR-LANS al livello di 10-15% da proteina solubile totale. I metodi del laboratorio per isolamento e purificazione di PATR_LANS recombinant omogeneo con un'attività specifica di 650-700 IU/mg di proteina sono stati messi a punto che ci permettono di realizzare l'indagine completa sulle relative proprietà fisico-chimiche ed enzimatiche. Sulla base della massa molecolare dell'unità secondaria risolta, il punto isoelettrico, l'optimum di pH, l'attività specifica ed altre proprietà PATR_LANS recombinant è simili a erwinia descritto L-asparaginase. L'attività bassa di L-glutaminase di proteina recombinant (0.1% da attività di L-asparaginase) accerta la relativa tossicità diminuita ed è considerare come fattore estremamente importante nelle applicazioni di ECAR-LANS per gli scopi terapeutici, come giustificato dai dati dalle prove preclinical preliminari. La cristallizzazione e la determinazione della struttura 3D di PATR_LANS recombinant sono in progresso.

Sostenuto dalla concessione di ISTC # 1263

EVALUATION OF THE ANTIOXIDANT PROPERTIES OF PROPOFOL AND ITS NITROSODERIVATIVE. COMPARISON WITH HOMOLOGUE SUBSTITUED PHENOLS

Sabrina Fabris^a, Roberto Stevanato^a, Federico Momo^a, Maria Pia Rigobello^b, Guido Scutari^b, Rita Boscolo^b,
Alessandra Folda^b and Alberto Bindoli^c

^aDepartment of Physical Chemistry, University of Venice

^bDepartment of Biological Chemistry, University of Padova

^cInstitute of Neuroscience (CNR), Unit of Padova, c/o Department of Biological Chemistry

Propofol (2,6-diisopropylphenol), some substituted phenols (2,6-dimethylphenol, and 2,6-ditertbutylphenol) and their 4-nitrosoderivatives have been compared for their scavenging ability towards 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and for their inhibitory action on lipid peroxidation. These products were also compared to the classical antioxidants butylated hydroxytoluene and butylated hydroxyanisole. When measuring the reactivity of the various phenolic derivatives with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl the following order of effectiveness was observed: butylated hydroxyanisole > propofol > 2,6-dimethylphenol > 2,6-di-tertbutylphenol > butylated hydroxytoluene. In cumene hydroperoxide-dependent microsomal lipid peroxidation, propofol acts as the most effective antioxidant, while butylated hydroxyanisole, 2,6-di-tertbutylphenol and butylated hydroxytoluene exhibit a rather similar effect, although lower than propofol. In the iron/ascorbate-dependent lipid peroxidation propofol, at concentrations higher than 10 μ M, exhibits antioxidant properties comparable to those of butylated hydroxytoluene and butylated hydroxyanisole. 2,6-Di-tertbutylphenol is scarcely effective in both lipoperoxidative systems. The antioxidant properties of these molecules depend on their hydrophobic characteristics and on the steric and electronic effects of their substituents. However, the introduction of the nitroso group in the 4-position almost completely removes the antioxidant properties of the compounds. Taking into account the potential formation of nitric oxide and its derivatives in biological systems, the nitrosation of aromatic ring of antioxidant molecules and the consequent loss of antioxidant capacity, can be considered an *in vivo* occurring condition.

ACTION AND INSULIN RESISTANCE: THE DISCLOSURE OF DIFFERENT PATHWAYS OF REGULATION

Lauro D, Ferrelli F, Pastore D, Federici M, Sbraccia P, Sesti G, Tesauro M, Lauro R. *Insulin*

Università Tor Vergata, Via Montpellier 1, 00133 Roma, Tel 0672596538 -Fax 0672596535

Le disfunzioni endoteliali sono emerse come una componente chiave nella patofisiologia di diverse alterazioni cardiovascolari associate con l'aterosclerosi, il diabete, l'ipertensione e l'età. Tutte queste condizioni potrebbero essere presenti nel diabete di tipo II. Il danno endoteliale nei pazienti diabetici è dovuto principalmente all'induzione del processo apoptotico nelle cellule endoteliali, il quale potrebbe alterare l'integrità dello strato endoteliale e potrebbe contribuire ad alterazioni vascolari e all'aterosclerosi. I ROS, la cui presenza è aumentata nei pazienti diabetici, potrebbero essere importanti nella patogenesi delle complicazioni macrovascolari o nell'insorgenza dell'aterosclerosi. L'incremento della produzione dei ROS induce apoptosi, un processo di morte cellulare, e l'incremento della senescenza della cellula. Inoltre l'iperglicemia, e l'aumento dei trigliceridi, due fattori di rischio importanti per le complicazioni cardiovascolari del diabete, potrebbero indurre disfunzioni endoteliali attraverso l'apoptosi o inibendo l'azione dell'insulina. In questo contesto per comprendere meglio il segnale dell'insulina nelle cellule endoteliali abbiamo analizzato il ruolo di SGK-1 e GSK-3 in condizioni basali e dopo induzione di insulino-resistenza. In questo studio abbiamo utilizzato le cellule HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial cells), nelle quali siamo stati in grado di identificare sia il trascritto di GSK-3 α/β (mediante estrazione di RNA totale con il Trizol) che la proteina (mediante Western-Blot), siamo inoltre stati in grado di clonare GSK-3 β dalle cellule HUVEC. Abbiamo quindi analizzato l'espressione di SGK-1 e SGK-3 e, usando un saggio in vitro, abbiamo dimostrato che SGK-1 è in grado di fosforilare GSK-3 α/β ed inibire la sua attività. Le cellule sono state stimulate con concentrazioni crescenti di insulina comprese tra 1nM e 1000 nM e con concentrazioni crescenti di IGF-I comprese tra 0.1 nM e 10 nM mostrando che: GSK-3 è fosforilato dalla via della PI-3 chinasi e che la stimolazione con l'insulina è più forte nell'indurre la fosforilazione di GSK-3 rispetto alla stimolazione con IGF-I. Abbiamo poi dimostrato che IRS1 è solo parzialmente fosforilato dopo attivazione da parte dell'insulina e di IGF-I. I nostri risultati tendono ad elucidare il possibile ruolo di SGK-1 nel mediare l'azione insulinica nelle cellule endoteliali; infatti incubando le HUVEC in alto glucosio ad una concentrazione di 30 mM e con glucosamina 2.5 mM abbiamo dimostrato che in entrambi i casi c'era una riduzione della fosforilazione di SGK-1 ed un aumento non significativo della quantità plasmatica di SGK-1. In conclusione abbiamo potuto ipotizzare che l'azione dell'insulina potrebbe essere mediata in modo alternativo dalla via PI3-K-SGK-1-GSK-3 nelle cellule endoteliali.

ANTIPROTEASI IMMOBILIZZATE PER RIDURRE LA CONCENTRAZIONE DI PROTEASI RILASCIATE DURANTE L'EMODIALISI E LA CIRCOLAZIONE EXTRACORPOREA.

Grano V.^{1,2}, Diano N.¹, Portaccio M.², De Santo N.³, Di Martino S.¹, Rossi S.¹, De Santo L.S.⁴, Salamino F.⁵, Mattei A.⁶, Mita D.G.^{1,2}

¹Dip. Medicina Sperimentale, Seconda Università degli Studi di Napoli

²Istituto di Genetica e Biofisica "A. Buzzati Traverso"- CNR

³Cattedra di Nefrologia, Seconda Università di Napoli

⁴Dip. Scienze cardio-toraciche e respiratorie, Seconda Università di Napoli, Ospedale Monaldi

⁵Dip. Medicina Sperimentale, Università di Genova

⁶Dip. Scienze chirurgiche e anestesologiche, Seconda Università di Napoli

α_1 -antitripsina è immobilizzata su una membrana di polieteresulfone modificato 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. In particolare, l' α_1 -antitripsina da plasma umano è stata immobilizzata su una membrana "Supor" R della *Pall* (150 μm di spessore e con pori di diametro 0.2 μm), su cui era stato 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 proteasi da abbattere è stata scelta l'elastasi.

In un precedente lavoro è stato dimostrato il potere inibente della membrana in termini di riduzione della concentrazione di elastasi attiva in soluzioni acquose in funzione del tempo di contatto col supporto attivato. Tale studio era stato effettuato con una sola concentrazione di elastasi. In questo lavoro, l'efficienza di tale tipo di membrana è stata studiata al variare della concentrazione di proteasi ed al variare della concentrazione di antiproteasi. In entrambi i casi la concentrazione di proteasi attive diminuisce all'aumentare del tempo di contatto con la membrana attivata. In particolare, è stata trovata una condizione sperimentale in cui la concentrazione di elastasi va a zero. Tale comportamento è stato riscontrato anche con proteasi direttamente estratte da neutrofilii umani. In questo caso la membrana ha rivelato un comportamento inibente differente nei confronti dell'elastasi e della catepsina umana.

MECCANISMO DI FORMAZIONE ED ALLUNGAMENTO DI FIBRILLE AMILOIDI DI UN MUTANTE DI APOMIOGLOBINA

Clara Iannuzzi, Ivana Sirangelo, Clorinda Malmo, Antonio Mezzogiorno, Michele Papa e Gaetano Irace

Dipartimento di Biochimica e Biofisica, Seconda Università di Napoli

La mioglobina è una proteina globulare organizzata quasi esclusivamente in struttura ad α -elica. Recenti studi condotti nel nostro laboratorio hanno mostrato che la sostituzione dei due residui triptofanilici altamente conservati lungo la scala evolutiva rendono la mioglobina capace di aggregare rapidamente formando fibrille di tipo amiloide in condizioni fisiologiche. In questa comunicazione sono riportati i risultati relativi al meccanismo e alla cinetica di formazione delle fibrille amiloidi.

Il processo di aggregazione e formazione di fibrille è stato studiato facendo variare il pH da un valore debolmente acido ad uno neutro seguendo le variazioni di intensità di fluorescenza della Tioflavina T (ThT) e dell' anilina-naftalensolfonato (ANS) in funzione del tempo. Tra pH 4.0 e 6.0 l'intensità di fluorescenza della ThT non varia mentre tra pH 6.0 e 6.5 si osserva un incremento che diventa più intenso col passare del tempo indicando la formazione di fibrille amiloidi. Lo spettro di emissione del complesso ANS-proteina mutata a pH 4.0 mostra un massimo di emissione a 478 nm, simile a quello dell'ANS legato allo stato parzialmente strutturato che la proteina wild-type adotta nelle stesse condizioni sperimentali. L'aumento di pH determina una diminuzione dell'intensità di emissione ed uno shift del massimo di emissione verso lunghezze d'onda maggiori. A pH 6,5 il massimo di emissione diventa praticamente coincidente con quello dell'ANS libero in acqua. Tuttavia, nel tempo, a pH 6.5 si osserva un incremento dell'intensità di fluorescenza con spostamento del massimo a 480 nm. Questi dati indicano che l'aumento di pH da 4,0 a 7,0 porta l'apomioglobina mutata da una conformazione parzialmente strutturata ad uno stato prevalentemente destrutturato che rapidamente va incontro ad aggregazione con formazione di fibrille di tipo amiloide. Ciò è ulteriormente avvalorato dalle immagini di microscopia elettronica ottenute nel corso del tempo dopo il raggiungimento del pH fisiologico. In particolare, si osserva un'iniziale formazione di aggregati di forma granulare che, nel tempo, si traspongono in strutture fibrillari allungate.

PLASTICITA' SOMATICA DELLE CELLULE STAMINALI STROMALI DA MIDOLLO OSSEO DI RATTO ADULTO: INDUZIONE DEL DIFFERENZIAMENTO NEURONALE E RUOLO DEI GENI RB ED RB2/P130

Jori FP², Napolitano M¹, Melone M.A.B.², Cipollaro M¹, Cascino A.¹, Prockop DJ⁴, Giordano A³ e Galderisi U^{1,3}

Dip. di ¹Medicina Sperimentale, Sez. di Biotecnologie e Biologia Molecolare e di ²Scienze Neurologiche, SUN, Napoli

³College of Science Technology, Temple Univ. and Sbarro Institute, Philadelphia, PA, USA.

⁴Gene Therapy Center, Tulane Univ., New Orleans, LA, USA.

Le cellule staminali stromali (MSCs) presenti nel midollo osseo sono cellule multipotenti non-ematopoietiche capaci di differenziarsi in cellule della linea mesenchimale (cartilagine, osso, muscolo liscio). Esse posseggono, inoltre, un elevato grado di plasticità somatica essendo capaci di differenziarsi anche in cellule non di tipo mesenchimale. E' stato dimostrato, infatti, che tali cellule staminali sono capaci di differenziarsi in astrociti e/o neuroni sia *in vivo* che *in vitro*. Le MSCs sono di grande interesse poichè sono facilmente isolabili da un piccolo aspirato di midollo osseo e possono essere amplificate *in vitro* fino a 30-50 passaggi senza segni di senescenza. Per queste ragioni esse sono oggetto di intenso studio in protocolli di "Terapia Cellulare" per la cura di diverse patologie, incluse le neurodegenerazioni.

I geni della famiglia del retinoblastoma RB ed RB2/P130 sono coinvolti nel commitment e nel differenziamento di diversi tipi cellulari, in particolare rivestono una funzione chiave nello sviluppo del sistema nervoso. Pertanto noi abbiamo studiato il ruolo di RB ed RB2/P130 nel differenziamento neuronale delle MSCs.

Le MSCs sono state transdotte con adenovirus esprimenti RB, RB2/P130 o con adenovirus di controllo e successivamente sono state poste in terreni che consentono il differenziamento neuronale. L'espressione ectopica sia di RB che di RB2/P130 ha accelerato il processo di differenziamento neuronale, come dimostrato dallo studio immunocitochimico delle MSCs e dall'analisi dell'espressione di marcatori molecolari del differenziamento (neuron specific enolase e tirosina idrossilasi). RB ha mostrato, inoltre, un'azione protettiva sulle cellule in differenziamento come suggerito dalla significativa riduzione dell'indice apoptotico delle cellule transdotte con RB rispetto ai controlli. Al contrario, le cellule iperesprimenti RB2/P130 hanno evidenziato un marcato aumento dei fenomeni apoptotici. Il saggio di proliferazione cellulare (MTT test) ha dimostrato che entrambi i geni promuovono un blocco del ciclo cellulare, come confermato anche dalla colorazione immunocitochimica per PCNA.

Alcuni degli effetti biologici sopra descritti sono soppressi quando l'espressione ectopica dei geni della famiglia del retinoblastoma veniva eseguita in presenza di un inibitore (tricostatina) dell'attività delle iston-deacetilasi (HDACs), suggerendo che il ruolo di RB e di RB2/P130 nel differenziamento neuronale delle MSCs è parzialmente dipendente dal pathway delle HDACs.

I GENI ONCOSOPPRESSORI RB ED RB2/P130 MODIFICANO IL "CELL-FATE" DELLE CELLULE STAMINALI NERVOSE DI RATTO.

Galderisi U.², Jori F.P.¹, Piegari E.², Cipollaro M.², Cascino A.², Peluso G.³, Giordano A.⁴, Melone M.A.B.¹

1 Dip. di Scienze Neurologiche e

2 Dip. di Medicina Sperimentale, Sezione di Biotecnologie e Biologia Molecolare, SUN, Napoli

3 IBPE, C.N.R., Napoli

4 College of Science Technology, Temple University, Philadelphia, PA, USA

Obiettivi

Cellule staminali del sistema nervoso (NSC) sono state identificate in tutti i mammiferi, uomo compreso, sia nel cervello in via di sviluppo che in quello adulto. Queste cellule conservano la capacità di differenziare nei tre principali tipi cellulari del sistema nervoso centrale (neuroni, astrociti ed oligodendrociti) sia in vivo che in vitro. La pluripotenza delle NSC potrebbe essere sfruttata per la progettazione di interventi di terapia cellulare, sia tramite trapianto, sia attraverso la manipolazione delle NSC endogene. A tal fine è necessaria una conoscenza dettagliata dei meccanismi molecolari che regolano la proliferazione ed il differenziamento delle cellule del sistema nervoso. I geni della famiglia del retinoblastoma sono coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare, del differenziamento e dell'apoptosi in numerosi tipi cellulari. Il loro ruolo appare particolarmente importante nelle cellule del sistema nervoso. Il nostro studio è teso a determinare il ruolo svolto dai geni della famiglia del retinoblastoma pRb e pRb2/p130 nel commitment e nel differenziamento di cellule staminali del sistema nervoso ottenute da ratti neonati.

Metodi

Cellule staminali sono state ottenute dalla zona periventricolare del cervello di ratti neonati (1-2gg). In coltura, tali cellule crescono in sospensione in presenza di EGF e formano dei cluster, chiamati neurosfere, composti da vere cellule staminali e da precursori più o meno indirizzati verso un determinato fenotipo cellulare. Invece, quando vengono piastrate su poli-ornitina in mancanza di fattori di crescita, le NSC differenziano in neuroni, astrociti ed oligodendrociti. Abbiamo studiato l'effetto dell'iperespressione dei geni della famiglia del retinoblastoma, ottenuta mediante la trasduzione con vettori adenovirali, sul differenziamento delle NSC. Dapprima la trasduzione delle NSC è stata effettuata al momento dell'induzione del differenziamento, mentre in ulteriori esperimenti l'iperespressione è stata ottenuta su cellule proliferanti, che dopo tre giorni sono state indotte a differenziare. Colorazioni in immunofluorescenza sono state effettuate 4 e 10 giorni dopo l'induzione del differenziamento al fine di determinare la percentuale di neuroni (cellule Map-2⁺), astrociti (cellule GFAP⁺) ed oligodendrociti (cellule Rip⁺) presenti in coltura.

Risultati

Le colorazioni in immunofluorescenza hanno evidenziato che 4 giorni dopo l'induzione del differenziamento, le colture che iperesprimono pRb e pRb2/p130 presentano una percentuale significativamente ($p < 0,05$) minore di neuroni rispetto alle colture trasdotte col virus di controllo. Inoltre le NSC trasdotte con l'adenovirus che codifica per pRb presentano una percentuale significativamente ($p < 0,05$) maggiore di oligodendrociti. Questi effetti risultano ancor più evidenti se i geni vengono iperespressi prima dell'induzione del differenziamento.

Conclusioni

Questi risultati preliminari suggeriscono che pRb e pRb2/p130 svolgono una funzione importante nel commitment e nel differenziamento delle NSC. Inoltre, il loro ruolo appare critico durante una specifica finestra temporale.

Ulteriori esperimenti saranno condotti al fine di stabilire se questi geni agiscono modificando la capacità proliferativa e/o il destino differenziativo dei precursori presenti in coltura, oppure se essi favoriscano la sopravvivenza di un determinato fenotipo cellulare.

L'ESPRESSIONE DI UN SISTEMA ENDORFINERGICO MEDIANTE TRASFEZIONE LENTIVIRALE INDUCE CARDIOGENESI IN CELLULE STAMINALI EMBRIONALI MURINE

Margherita Maioli, Francesco Galimi, Yolande Asara, Stefania Ninniri, Daniela Santoni, Tiziana Pinna, Antonella Pintus, Carlo Ventura

Istituto Nazionale di Biostrutture e Biosistemi c/o Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Sassari

La cardiogenesi, uno dei primi eventi morfogenetici che si verificano nell'embrione, è un processo complesso che comprende una serie di eventi molecolari non ancora del tutto compresi. A tale riguardo, fattori di trascrizione quali il gene "homeobox" Csx/Nkx-2.5 e GATA-4, sono risultati essenziali per il normale sviluppo del cuore in diverse specie animali e nell'uomo, anche se rimangono da chiarire alcuni aspetti riguardanti la loro espressione.

In studi precedenti abbiamo dimostrato il ruolo di agonisti di recettori per gli oppioidi nell'induzione del differenziamento miocardico, attraverso una via endorfinergica di tipo paracrina e autocrina. Nel presente lavoro il gene della prodinorfina è stato sovraespresso in una linea di cellule embrionali staminali totipotenti murine, derivanti dalle cellule R1, mediante un vettore lentivirale di terza generazione. In cellule trasfettate si assisteva ad un significativo incremento nel numero di cardiomiociti contrattili rispetto alle cellule non trasfettate. L'analisi dell'espressione genica mediante RT-PCR mostrava un significativo incremento dei livelli dei trascritti cardiospecifici GATA-4 e Nkx-2.5. Di particolare interesse è risultata essere l'osservazione che la sovraespressione del gene della prodinorfina era in grado di indurre il processo cardiogenetico anche in presenza di Leukemia Inhibitory Factor, citochina inibitrice del potenziale differenziativo di cellule embrionali staminali murine. I nostri risultati sperimentali evidenziano che il gene della prodinorfina svolge un ruolo centrale nell'orchestrazione del processo di differenziamento miocardico, e forniscono importanti chiarimenti sugli eventi molecolari che si verificano durante lo sviluppo del cuore.

Bibliografia

Ventura C, Maioli M, Pintus G, Posadino AM, Tadolini B 1998. Nuclear opioid receptors activate opioid peptide gene transcription in isolated myocardial nuclei. *J Biol Chem.* 273:13383-13386.

Ventura C, Maioli M 2000. Opioid peptide gene expression primes cardiogenesis in embryonal pluripotent stem cells. *Circ Res.* 87:189-194.

Ventura C, Zinellu E, Maninchedda E, Fadda M, Maioli M 2003. Protein kinase C signaling transduces endorphin-primed cardiogenesis in GTR1 embryonic stem cells. *Circ Res.* 92:617-622.

Ventura C, Zinellu E, Maninchedda E, Maioli M 2003. Dynorphin B is an agonist of nuclear opioid receptors coupling nuclear protein kinase c activation to the transcription of cardiogenic genes in GTR1 embryonic stem cells. *Circ Res.* 92: 623-629.

EFFETTI CITOTOSSICI E DANNO DI MEMBRANA INDOTTI DA AGGREGATI AMILOIDI DI APOMIOGLOBINA MUTATA

Clorinda Malmo, Ivana Sirangelo, Clara Iannuzzi, Antonio Mezzogiorno, Michele Papa & Gaetano Irace

Dipartimento di Biochimica e Biofisica, Seconda Università di Napoli

La mioglobina è una proteina globulare organizzata quasi esclusivamente in struttura ad α -elica. Recenti studi condotti nel nostro laboratorio hanno mostrato che la sostituzione dei due residui triptofanilici altamente conservati lungo la scala evolutiva rendono la mioglobina capace di aggregare rapidamente formando fibrille di tipo amiloide in condizioni fisiologiche. Un'importante fase nello studio delle amiloidosi è comprendere la correlazione esistente tra struttura e attività biologica. In questa comunicazione analizziamo l'effetto dell'interazione degli aggregati amiloidi a differenti stati di formazione con fibroblasti in coltura.

La citotossicità degli aggregati è stata studiata valutando la vitalità cellulare, la permeabilità di membrana e l'organizzazione del citoscheletro misurate rispettivamente mediante saggi di metabolizzazione dell'MTT, di legame dello ioduro di propidio (PI) con il DNA e di legame della falloidina con il citoscheletro. I risultati sono stati paragonati a quelli ottenuti esponendo le stesse cellule con la proteina wild-type. I risultati relativi al saggio dell'MTT hanno evidenziato che le fibrille mature non risultano tossiche mentre gli aggregati amorfi pre-fibrillari che si osservano nelle prime fasi del processo di fibrillogenesi, sono fortemente citotossici. Inoltre, la positività al test del PI indica che l'interazione delle pre-fibrille con la membrana cellulare determina un'alterazione della sua permeabilità. Comunque, al danno di membrana non sono associate alterazioni dell'organizzazione molecolare del citoscheletro e quindi alterazioni morfologiche come evidenziato dalle immagini ottenute mediante la fluorescenza della falloidina. La citotossicità degli aggregati amiloidi pre-fibrillari potrebbe essere dovuta alla presenza di un'ampia superficie idrofobica esposta che può interagire con vari componenti cellulari. In conclusione, i dati ottenuti supportano l'idea che aggregati di proteine associate e non associate ad amiloidosi hanno un comune meccanismo di patogenesi che è legato alla loro organizzazione molecolare.

CONTROLLO DELLA PROLIFERAZIONE DEI LINFOCITI T NEONATALI: RUOLO DELLO STEM CELL FACTOR E DELLA INTERLEUCHINA 7

Marchetti Valentina

Relatori Dr. Massimo Sanchez e Prof. Enza Piccolella – Università di Roma “Tor Vergata”

Il sangue di cordone ombelicale (CB) viene attualmente utilizzato come sorgente alternativa al midollo osseo nei trapianti di cellule staminali emopoietiche. I risultati dei primi trapianti di CB hanno messo in evidenza una riduzione di alcune gravi complicazioni a cui vanno incontro i pazienti che subiscono un trapianto di midollo osseo, prima fra tutte la reazione immunitaria scatenata dalle cellule del donatore contro i tessuti del ricevente (“graft-versus-host-disease”, GVHD).

Il trapianto di CB mostra però alcune limitazioni. Infatti la riduzione della frequenza e della gravità della GVHD è, probabilmente, espressione di una immaturità di alcune componenti cellulari del sistema immunitario del CB. Questa caratteristica comporta una riduzione della reazione delle cellule trapiantate contro le cellule malate dell’ospite (“graft versus leukemia”, GVL), effetto auspicato in pazienti affetti da leucemie mieloidi e linfoidi.

La immunoterapia cellulare, come la DLI, basata sulla manipolazione *ex vivo* dei linfociti del donatore, viene considerata attualmente una strategia in grado di aumentare la forza e la specificità della GVL, pur mantenendo bassi i livelli della GVHD.

Il ridotto volume di sangue cordonale limitato ad una singola donazione, che ne condiziona l’uso solo a pazienti pediatriche o di basso peso corporeo, rende inapplicabili le strategie di immunoterapia cellulare adottate nei trapianti di midollo osseo.

In questo lavoro sperimentale sono state studiate le condizioni di coltura in grado di espandere *ex vivo* la frazione cellulare mononucleata prelevata dal CB utilizzando terreni di coltura privi di siero sia di origine umana che animale ed alcune citochine che svolgono un ruolo nell’emopoiesi e nella linfoiesi [Stem Cell Factor (SCF), interleuchina (IL)-7, IL-2, IL-4] associate in diverse combinazioni.

I risultati più interessanti sono stati ottenuti utilizzando le combinazioni SCF+IL-7 e SCF+IL-7+IL-2. Con entrambe le combinazioni si è osservato un incremento significativo del numero di cellule nucleate totali. Mediante analisi fenotipica abbiamo verificato che la combinazione del SCF+IL-7 è in grado di aumentare il numero di linfociti CD4⁺, mentre la presenza della IL-2 stimola maggiormente la proliferazione delle cellule CD8⁺ tale da indurre un’inversione del rapporto in percentuale tra le cellule CD4⁺ e le CD8⁺. Sorprendentemente l’incremento della popolazione linfoide, osservato in queste condizioni di coltura, è inoltre associato ad un significativo aumento di progenitori mieloidi. L’uso delle combinazioni SCF+IL-4 e SCF+IL-4+IL-2 non produce un effetto comparabile a quello osservato con SCF+IL-7 e SCF+IL-7+IL-2, se si esclude un aumento del numero di progenitori mieloidi che si ottiene utilizzando la combinazione SCF+IL-4. L’analisi del numero di riarrangiamenti della catena β del recettore delle cellule T (TCR) espresso dalla popolazione linfoide, valutato mediante “single strand conformation polymorphism analysis (SSCP), dimostra che nella popolazione amplificata con SCF+IL-7 non solo vengono preservati i cloni preesistenti ma si osserva anche un loro aumento.

NEUROGENIN3 TRIGGERS β -CELL DIFFERENTIATION OF RETINOIC ACID-DERIVED-ENDODERM CELLS

Amedeo Vetere, Eleonora Marsich, Matteo Di Piazza, Silvia Rigo, and Sergio Paoletti

Department of Biochemistry, Biophysics and Macromolecular Chemistry, University of Trieste.

In these years there is a growing research interest for possible pancreatic stem cells to be used for the treatment of type 1 diabetes [36-42]. In this respect, however, it should be stressed that the full understanding of the hierarchy of the molecular events involved in pancreas differentiation is a necessary prerequisite to their utilization for therapeutic scopes. So far, most of the available information results from the analysis of the distribution of known transcription factors in pancreas at different times of development [31, 33, 43, 44]. This approach, albeit rich in qualitative information, is unfortunately unable to highlight the time correlation of the different transcription factors, not providing a picture of their sequential role and hierarchy. Among these factors, Ngn3 plays a central role for the commitment of embryonic endoderm into the pancreatic differentiation program and in initiating the differentiation of islet cells [15]. Neurogenin3 is a member of the basic helix-loop-helix (bHLH) family of transcription factors and it is considered to act upstream of a cascade of other transcription factors, leading to the fully differentiated endocrine phenotype. The direct observation of the sequential activation of these factors starting from Neurogenin3 had never been demonstrated so far. Moreover, despite the large number of data regarding the molecular events accompanying pancreas development and differentiation [15, 30, 32, 33], the full understanding of these events suffers from the lack of suitable cellular models.

In our study has been used as a cellular model the teratocarcinoma F9 murine cell line, an embryonic cell line that, being almost completely unable to differentiate spontaneously, propagates primarily as stem cells. Upon exposure to retinoic acid, F9 cells differentiate into primitive and visceral endoderm-like cells, resembling in many biochemical properties to the extra-embryonic endoderm of the early mouse embryo [16, 19-21]; for this reason they are often used in studies of early embryonic development.

By using retinoic acid-derived-endoderm F9 cells, our data indicates that the ectopic expression of Neurogenin3 is able to start and complete the differentiation pathway of endocrine pancreas, triggering the expression of several pancreatic transcription factors following a well defined temporal activation sequence. In transient transfected cells NgN3 leads the expression of some early transcription factors such as NeuroD, Pax 6 and Isl1, but not of mature pancreatic hormones insulin, glucagon, and somatostatin. Instead, by RT-PCR, immunohistochemistry and RIA, it is shown that when NgN3 stable transfected cells are induced to form Embryod Bodies, they complete the differentiation process by the expression of late β -cell related genes including insulin and glucagon genes are able to secret insulin in response to stimulation of physiological glucose concentrations.

SISTEMI REGOLATI E PERMANENTI PER L'ESPRESSIONE DEL hTERT IN CELLULE UMANE

Iou.A. Mechtcheriakova 1, H.S. Vishnyakova 1, M..A. Eldarov 1 e Y.E Yegorov 2.

1. Centro "Bioingegneria" , RAS Accademia Russa delle Scienze, Mosca, Russia;

2. V.A. Istituto di Biologia Molecolare, RAMS Accademia Russa delle Scienze, Mosca, Russia

La maggior parte dei somatociti umani non hanno attività di telomerase. Ciò conduce al underreplication terminale dei cromosomi e, quindi, ad invecchiare proliferative delle cellule. Abbiamo studiato le conseguenze di introduzione del gene del componente catalitico del hTERT umano di telomerase nei fibroblasti normali della pelle dell'essere umano dell'adulto. L'espressione di questo gene ha condotto all'apparenza di attività di telomerase nei fibroblasti, all'allungamento dei telomeres (al formato caratteristico delle cellule embrionali) ed al immortalization. Le cellule hanno mantenuto il loro karyotype normale. Le cellule non hanno subito i cambiamenti significativi dopo la transizione sopra il limite del Hayflick, non hanno mantenuto il tasso costante di proliferazione e non hanno assomigliato, nell'apparenza, ai fibroblasti umani diploidi giovani. Telomerized le cellule ha mantenuto la capienza normale di entrare nel resto proliferative come conseguenza di inedia del siero. Telomerization non ha eliminato l'inibizione del contatto di proliferazione ma condotta ad una densità aumentata di saturazione delle cellule, che hanno raggiunto la caratteristica di livelli per le cellule embrionali in anticipo.

Per studiare il ruolo del telomerase nel corso della riattivazione del nucleo del macrofago nei heterokaryons con i fibroblasti svizzeri telomerase-positivi immortal del mouse 3T3 ed i fibroblasti umani abbiamo costruito i vettori per l'espressione costitutiva o regolata del gene del hTERT in cellule di mammiferi. L'introduzione del gene del hTERT nei fibroblasti diploidi umani provoca l'emersione di attività di telomerase in queste cellule e nella capacità indurre la riattivazione della sintesi del DNA nei nuclei del macrofago nei heterokaryons. Gli effetti dell'espressione regolata di hTERT in questo sistema sono allo studio.

PROTEIN STRUCTURES AND THERMOSTABILITY

Gianluca Tasco, Ludovica Montanucci, Piero Fariselli, PierLuigi Martelli and Rita Casadio*

Interdepartmental Center for Biotechnological Research (CIRB) and Department of Biology,
University of Bologna

What is thermostability? This question is still unanswered in spite of several studies aiming at the determination of typical features of thermostable proteins (for a recent review see 1). We tackled the problem considering a large set of proteins from thermophilic and hyperthermophilic organisms available in the PDB with atomic resolution. A PDB derived data base was generated containing proteins from thermophiles and their counterparts from mesophiles, with the specific constraint of sequence identity >30% and difference in sequence length <20%. By this, 128 proteins from thermophiles were compared to 109 structures from mesophiles with a root mean square deviation <0.29 nm.

Residue composition, secondary structure, length of secondary structure motifs, hydrogen bonds, salt bridges, composition of solvent accessible surface were evaluated with specifically developed programs in both sets in order to perform a statistical analysis.

The results of our investigation are as follows: proteins from thermophiles are endowed with more charged residues, particularly in the exposed surfaces, with more salt bridges, that are more accessible on average as compared to those in proteins from mesophiles. However neither the content of secondary structure neither the length of secondary structure motifs was significantly different. These data, all together suggest that thermostable proteins as compared to their mesophilic counterpart are endowed with more electrostatic interactions, particularly on the protein surface to stabilize more water dipoles and compensate for thermal motion at high temperatures.

Riferimenti bibliografici

(1) Arnold FH, Wintrode PL, Miyazaki K, Gershenson A. (2001). How enzymes adapt: lessons from directed evolution. Trends Biochem Sci. 26:100-106

MONOCYTE-MACROPHAGE CELL LINE DIFFERENTIATION TOWARDS THE OSTEOCLAST PHENOTYPE

V. Nicolin, V. Grill, P. Narducci, R. Bareggi, G. Zauli

Dipartimento di Morfologia Umana Normale - Università di Trieste

Key words: *monocyte/macrophage lineage; osteoclast differentiation; RANKL; histochemistry; TEM*

Osteoclasts are multinucleated cells deriving from the hematopoietic monocyte/macrophage lineage, that originate by the fusion of mononuclear precursors. The NF- κ B ligand, RANKL, has been identified both as stimulator of osteoclast differentiation from osteoclast precursors and as activator of mature osteoclasts. One of their striking features is the ability to resorb mineralized bone, thus osteoclasts are important regulators of calcium homeostasis and contribute to a number of physiological and pathological processes. In the present investigation, we have studied the RANK-L induced differentiation of the mouse monocyte/macrophage cell line RAW264,7 (type CRL-12557) towards the osteoclast phenotype in stabilized cell culture systems. The specific osteoclast enzymatic marker, tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), is highly expressed in osteoclasts and in a subset of tissue macrophages and dendritic cells. Whenever activated for bone matrix resorption, osteoclasts polarize and form several distinct plasma membrane domains. Vesicles containing acid proteases fuse to the plasma membrane, close to mineralized matrix and form a ruffled border, i.e. the membrane domain responsible for bone matrix degradation. The ruffled border is circumscribed by a sealing zone, which has been suggested to mediate the tight attachment of the bone resorbing cell to the degraded mineralized tissue, that is endocytosed from the resorption lacuna, transported by transcytosis and secreted into the so-called functional secretory domain (1). The spatial relationship between these vesicle fusion and matrix uptake processes at the ruffled osteoclast border was demonstrated by evaluating the uptake of Cy3-labelled transferrin. Furthermore, the reorganization of the Golgi complex and exocytosis vesicles were shown by RAB-dependent intracellular membrane, positive to fluorescein conjugated secondary antibody. The amount of double-labelled positive cells was 50% of total untreated cells, whereas the 100% of total RANKL treated cells, that are differentiated by cellular response to RANKL towards the osteoclastogenic pathway: RANKL (2). TEM ultrastructural examination of osteoclasts, both in the presence and in the absence of the mineralized tissue dentine was performed. Various cytoplasmic vesicles were observed and they were identified both as lysosomes and endocytotic vesicles. While in vitro cultured in differentiated cells presented numerous pale vacuoles, lysosomes, other osteoclasts, cultured on dentinal surface, presented electrondense and lamelled coated vesicles, containing resorbed material. Osteoclast activation for dentine resorption leads to a local matrix digestion in the subosteoclastic space; intracellular events are involved in this

process, linked to drastic changes in the organization of cytoskeleton and vesicle traffic, that leads to the typical osteoclastic polarization. In this process the endocytotic pathway from the basolateral membrane and the biosynthetic pathway of the lysosomal enzymes from the Golgi are reoriented toward the mineralized surface (3).

Riferimenti Bibliografici:

- 1) Mulari MT et al. Traffic 4: 113-125; 2003.
- 2) Miyamoto T, Suda T. Keio J Med 52: 1-7; 2003.
- 3) Nesbitt SA, Horton MA. Methods Mol Med 80: 259-281; 2003.

STUDIO SUGLI EFFETTI DI FRAZIONI PLASMATICHE ARRICCHITE DI PIASTRINE (PRP) SU CELLULE MESENCHIMALI STAMINALI DA MIDOLLO OSSEO UMANO

Passaro I, Di Pasquale R, Famiglietti AR, Della Ragione F e Oliva A

Dipartimento di Biochimica e Biofisica F. Cedrangolo, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Seconda Università degli Studi di Napoli

Le applicazioni cliniche del PRP (= Platelet-Rich Plasma) nella riparazione e ricostruzione dei tessuti molli e del tessuto osseo trovano la loro giustificazione nell'alto contenuto in fattori di crescita, principalmente il Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) ed il Transforming Growth Factor-beta (TGF- β), che vengono liberati dalle piastrine in seguito alla loro degranolazione nel processo di coagulazione.

Le cellule mesenchimali staminali, MSC (= Mesenchymal Stem Cells), cellule multipotenti presenti nel midollo osseo, costituiscono i precursori delle cellule di tessuti connettivi (osteoblasti, condroblasti e adipociti), e anche, in opportune condizioni di crescita, (presenza di specifiche citochine, e/o di molecole segnale) di cellule di tessuti non-connettivi (miociti, cardiomiociti e cellule neurali). Le MSC hanno dunque enormi potenzialità sul piano terapeutico per ricostruzioni e/o sostituzioni di tessuti sia connettivi che non connettivi

Il nostro specifico interesse nei confronti delle cellule mesenchimali staminali è relativo alla loro potenzialità osteogenica e alla possibilità quindi di effettuare interventi di "bone engineering". Tale tecnica prevede l'estrazione delle MSC dal soggetto in cui si sia verificato per eventi traumatici o neoplastici un difetto osseo, la loro espansione in coltura, il trasferimento su una matrice tridimensionale biocompatibile e l'impianto della stessa nel paziente.

Al fine di accelerare l'espansione delle MSC e quindi la colonizzazione dello scaffold, ci è apparso particolarmente interessante l'impiego del PRP, che, oltre a costituire una fonte autologa ricca di fattori di crescita, è ottenibile in maniera rapida ed economica. Dati di letteratura relativi all'impiego clinico del PRP, ed anche studi in vitro condotti su popolazioni osteoblastiche umane, hanno confermato la capacità del PRP di stimolare la proliferazione cellulare. Inesistenti, invece, sono i dati che riguardano l'effetto del PRP sulle cellule mesenchimali staminali.

Pertanto scopo della nostra ricerca è stata la valutazione dell'effetto del PRP sulla proliferazione e sul differenziamento delle cellule osteoprogenitrici, nonché sull'espressione di alcune componenti proteiche del ciclo cellulare, in vista del loro potenziale e promettente utilizzo nel riparo e nella rigenerazione del tessuto osseo.

Il PRP viene preparato da campioni di sangue eparinizzato centrifugati a 300xg per 7 minuti in un rotore a bracci fissi. La percentuale di PRP ottenuto è pari al 20% del volume del campione di sangue di partenza.

Sia i dati di incorporazione di timidina che le conte cellulari evidenziano un incremento proliferativo di 4-8 volte rispetto al controllo, a fronte di una diminuita attività del marker precoce del fenotipo osteoblastico, la fosfatasi alcalina. Tra i risultati significativi degli immunoblotting, da menzionare l'aumento dei livelli di ciclina E e di cdk2, che sono in linea con l'incremento proliferativo. Di più difficile interpretazione i dati su p27, inibitore del ciclo, i cui aumentati livelli potrebbero essere attribuiti ad un ruolo di tale proteina nella formazione dei complessi ternari (cdk2, ciclina E e p27) necessari al progredire del ciclo cellulare.

RUOLO DELLA SGK NEL MEDIARE IL SEGNALE INSULINICO

Lauro D., Pastore D., Federici M., Sesti G., Lauro R.

Dip. Medicina Interna, Univ. degli Studi di Roma "Tor Vergata"

La crescita, la differenziazione e l'apoptosi cellulare sono regolati da differenti stimoli ambientali mediante l'attivazione di un network di proteine chinasi e fosfatasi. Fra queste la SGK (Serum Glucocorticoid Inducible Kinase) ha un ruolo importante nel mediare differenti stimoli a livello cellulare. Esistono tre differenti isoforme di SGK(1,2,3) che sono attivate dall'insulina e dall'IGF-1 e la cui trascrizione è aumentata dai Glucocorticoidi, dall'Aldosterone e dal Siero. Il dominio catalitico della SGK-1 è omologo per circa il 54% con quello della PKB-1/AKT (Protein kinase B), una chinasi coinvolta nel pathway dell'insulina. Abbiamo clonato le tre isoforme della SGK e mutato la SGK-1 ottenendo un'isoforma dominante negativa (dn). Si è studiato il ruolo della SGK-1 nel regolare il segnale insulinico mediante trasfezioni transienti in cellule HEK 293 con SGK-1 wt, SGK-1 (dn), PKB-1 wt e PKB-1 (dn). Abbiamo osservato che l'inibizione della GSK-3 α/β (proteina coinvolta nel metabolismo del glucosio), mediata dalla fosforilazione serinica, è ridotta del ~ 60%, dopo stimolazione insulinica (1 μ M), in cellule transfettate con i dominanti negativi sia di SGK-1 che PKB-1; le cotrasfezioni delle cellule HEK 293 con SGK-1 (dn) e AKT-1 (dn) riducono l'inibizione dell'attività della GSK-3 α/β di un ulteriore 20%-30%. E' stato riportato che la GSK-3 β ha un'azione proapoptotica e che quest'effetto è inibito dalla PKB-1 attraverso la via PI-3 chinasi/AKT. Per investigare il ruolo di SGK1 nel processo apoptotico e' stata indotta apoptosi nelle HEK 293 deprivandole di siero o/n o stimolandole con ceramidi con o senza stimolazione insulinica e con l'aggiunta degli inibitori PD98059 o LY294002 alla concentrazione di 30 μ M. In questa linea cellulare l'apoptosi indotta da siero deprivazione è aumentata, dopo trattamento con LY294002 e stimolazione insulinica, in cellule transfettate sia con SGK-1wt, sia SGK-1dn. Differentemente dopo trattamento con PD 98059 in cellule stimulate con insulina e transfettate con SGK-1 non si ha un incremento significativo dell'apoptosi, mentre in cellule transfettate con SGK-1 (dn) vi è un incremento del 30%-40%.

.Differentemente il Ceramide e' in grado di inibire gli effetti di sopravvivenza dovuti alla stimolazione insulinica probabilmente perche' questo e' in grado di inattivare SGK. Per quantizzare l'apoptosi si è misurata la frammentazione del DNA nucleare attraverso saggio ELISA. Mediante la metodica del saggio chinasi abbiamo dimostrato che, dopo stimolazione insulinica, SGK-1 è in grado di fosforilare eNOS mentre in esperimenti condotti con SGK-1(dn) la fosforilazione di eNOS è ridotta. In conclusione GSK-3 α/β ed eNOS sono substrati specifici per SGK-1 che ha un effetto simile a quello della PKB-1 nel mediare il segnale insulinico. L'osservazione, in cellule non stimulate, di bassi livelli d'espressione di SGK-1 suggerisce che la trascrizione di SGK-1 deve essere indotta nella regolazione del segnale insulinico e che esso è più importante nel mediare stimoli cronici, al contrario di PKB-1 che è normalmente espresso a livello cellulare e media stimoli acuti.

FROM ART TO SCIENCE IN PROTEIN CRYSTALLOGRAPHY: NANOSTRUCTURED PROTEIN TEMPLATES AND SYNCHROTRON MICROFOCUS ANALYSIS.

Eugenia Pechkova^{1,2} and Claudio Nicolini^{1,2}

¹Nanoworld Institute, Genova University, Italy

²Fondazione EL.B.A., Rome, Italy

In spite of significant progress in protein crystallography, a large number of proteins of significant fundamental and pharmaceutical relevance have so far not yet been crystallized and their three dimensional atomic structures remain unresolved. Indeed, to be crystallized, every protein requires its own specific conditions, which are often difficult to determine and that require empirical random searching. That is why protein crystallography is often called an art instead of a science.

A new method of protein crystallization based on thin-film nanotechnology proves to successfully stimulate crystal nucleation and accelerate the growth of all proteins being studied, under different crystallization conditions including those failing to lead to crystal formation by commonly used methods [1,2]. The new approach based on the use of the nanostructured protein thin film template was verified by obtaining for the first time mammalian Cytochrome P 450 SCC crystals, characterized by advances AFM technique [3]. Recently, the new method application resulted in diffraction-quality microcrystals of *Human* protein kinase CK2 α , an enzyme of high oncogenic potential, which up to day resisted the crystallization attempts by classical methods. These ultra small microcrystals (of about 20 μ m in diameter) were used for diffraction data collection by means of Microfocus ID 13 Beamline at the ESRF. The three-dimensional crystal structure of CK2 α has been determined at 2.4 Å resolution [4].

These results structure proves the unique validity of the two combined frontier technologies, namely, nanotechnology based protein crystallization and microfocus technology for extra small crystals [5]. Protein thin film template anisotropy study as well as future development of the *in-situ* controlled nanostructured-template induced nucleation and crystallization by micro-GISAXS technique [6] could highlight the physical explanation of this phenomena, which in all systems been studied makes the protein crystal growth controllable and predictable *ab initio*. Thus, new emerging nanocrystallography field [7] confirms the possibility of transition in protein crystallography from art to science by means of nanotechnology and synchrotron microdiffraction [8,9].

Riferimenti Bibliografici:

- [1] E. Pechkova and C. Nicolini. Accelerated protein crystal growth onto the protein thin film. *J. Cryst. Growth* 231:599-602 (2001)
- [2] E. Pechkova and C. Nicolini. Protein nucleation and crystallization by homologous protein thin film template. *J. Cell Biochemistry* 85:243-251 (2002)
- [3] E. Pechkova and C. Nicolini. From art to science in protein crystallization by means of thin film nanotechnology. *Nanotechnology* 13:460-464 (2002)
- [4] Eugenia Pechkova, Giuseppe Zanotti and Claudio Nicolini, Three-dimensional structure of the catalytic subunit of human protein kinase CK2, PDB code 1NA7 (2003)
- [5] S. Cusack, H. Bernali, A. Bram, M. Burghammer, A. Perrakis and C. Riekel. Small is beautiful: protein micro-crystallography. *Nat. Struct. Biol.* 5:634-637 (1998)
- [6] S. Roth et al., *Appl. Phys. Lett.* Vol.82, No12,p. 1935 (2003)
- [7] E. Pechkova and C. Nicolini. Monograph "Proteomics and Nanocrystallography", Kluwer Academic Publishers, London pp. 1-202 (2003) .
- [8] E. Pechkova and C. Nicolini. From Art to Science in Protein Crystallography by Means of Nanotechnology – one year later, invited article, *Progress in Nanotechnology Research*, Nova Science Publishers (2003) in press.
- [9] E. Pechkova and C. Nicolini. Nanocrystallography: a new approach to structural proteomics, Invited review, *Trends in Biotechnology* (2003)

COCULTURE OF MARROW STROMAL CELLS AND ADULT CARDIOMYOCYTES.

Penna C.*, Gallo MP.*, Marcantoni A.*, Levi R.*, Pagliaro P.*, Capello S.*, Alloatti G.*, Losano G.*

***: Dip. Neuroscienze – Sez. Fisiologia, Università di Torino.**

***: Dipartimento di Biologia Animale e dell’Uomo, Università di Torino.**

Marrow stromal cells (MSC) are pluripotent progenitors for a variety of cell types. Their involvement in the tissues repair is in the present object of many investigations, with promising results in particular in the damaged cardiac muscle.

When implanted into myocardium, MSC can undergo milieu-dependent differentiation to express phenotypes similar to the cells in the immediate microenvironment. However, about the MSC transplantation in the myocardium many questions remain to be clarified, in particular respect to the cellular mechanisms involved in the MSC and adult cardiocytes interactions.

The aim of this study was to simulate in vitro the microenvironment present in the MSC-implanted myocardium, by cocultivating MSC and adult cardiocytes, and to characterize the morphological and biochemical behaviour of cocultivated MSC.

MSC were obtained from the bone marrow of the femurs of 6 to 12 month- GFP-stable-transfected rats by medium flushing into the shaft of the bone, plated at 2000 cells/cm² (passage 0), grown to 90% confluency and passed at least three time until the experimental use. Confocal microscopy revealed 100% GFP-positive MSC in the pre-coculture stage.

Cardiomyocytes were obtained from young adult mouse and rat ventricles by enzymatic dissociation.

For coculture preparation about 150.000 suspended cardiocytes were plated on a glass-bottom dish with 90% confluent (about 300.000 cells/dish) GFP-positive MSC and kept in 1% serum M1018 medium plus ITS (1:1000) and BDM (10 mM).

Preliminary experiments revealed in confocal microscopy a good condition of both MSC and cardiocytes at least in the first 48 h from the start of the coculture and the appearance of a filament-like ultrastructure in MSC after 24 h.

Further investigation will be aimed to identify in cocultivated MSC expression of specific early-stage cardiac differentiation marker genes and to perform careful morphological characterization of MSC and cardiocytes interactions with confocal-deconvolution microscopy. Coculture-committed MSC cells will be also used for biochemical studies.

EFFECT OF SELECTED INDUCERS ON LACCASE BIOSYNTHESIS BY *RIGIDOPORUS LIGNOSUS*

S. Ragusa, V. Pontorno, M. T. Cambria, A. Cambria

Department of Chemical Sciences, Section of Biochemistry, University of Catania.

Laccases (benzendiol:oxygen oxidoreductase E.C.1.10.3.2) are multicopper blue oxidase which are mainly produced by fungal species and in particular by white rot basidiomycetes. In previous work, we have described an implemented process for the production and purification of laccase from *Rigidoporus lignosus* (*Rl*), a white rot Basidiomycete, which is able to synthesize, in an inexpensive medium, constitutively large amounts of this extracellular enzyme (1). Moreover, the structure-activity relationship, analysed by Fourier-transform infrared spectroscopy, indicated that the enzyme contained a large amount of β -sheets and displayed a marked thermostability, showing the T_m at 92.5 °C (2). The aim of the present work was to find selected inducers of laccase synthesis in basidiomycete *Rigidoporous lignosus* under conditions of static cultivation. Laccase induction was also detected in the cultures containing olive mill wastewater (OMW), an effluent characterized by an high content in phenolic compounds, recalcitrant organic substances, that represent a serious environmental problem, for polluting activity and toxicity towards several biological systems.

Mycelial plugs taken from a preculture samples of *Rl* were added to 500 ml Erlenmayer flasks containing 200 ml of the basal synthetic medium. The cultivation were carried out at 28°C for 24 days, under static conditions. The compounds tested as inducers were added to the flasks on the first day of cultivation, at concentration 0.26 mM and 1 mM. Samples from three replicate flasks were assayed spectrophotometrically for laccase activity at 30°C following the oxidation of 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) at 420 nm. The reaction mixture contained 1 mM ABTS, 0.2 mM sodium citrate buffer pH 3, in the final volume of 1.5 ml. Native PAGE (12%) analysis of the enzyme was performed on aliquots of culture medium at the maximum activity day. Protein bands were stained either with a solution of 0.1% Coomassie blue in 5% (v/v) acetic acid or by activity soaking the gels with 2 mM guaiacol in 50 mM sodium acetate buffer (pH 4.5).

During the growth of *Rl*, the maximum production of extracellular laccases was reached between twenty-first and twenty fourth days, after addition of inducers. Constitutive laccase specific activity was 17, in the absence of inducer; it was increased to 465 (27.3 fold) in the presence of 1 mM *p*-hydroxy-benzoic acid, used as positive control. In general, the inducers that we have investigated, showed a concentration-dependent effect on laccase synthesis, with exception of coniferyl alcohol, ferulic acid, vanillic acid and caffeic acid. Highest laccase activity was observed in culture supplemented with phenylhydrazine and polyphenols such as guaiacol, catechol, 4-methylcatechol, pirogallol, hydroquinone, at 1 mM concentration. Another group of polyphenol inducers as caffeic

acid, ferulic acid, vanillic acid, gallic acid, coniferyl alcohol, catechin, at the same concentration, induced lower level of laccase. Time courses of laccase activity, after addition of various phenolic compounds, showed that, during the growth the enzyme activity was detectable after 6 days of cultivation, then increased progressively and reached peak levels after 21th day and after 24th day, respectively, as response to the specific inducer. The results of our experiments on native PAGE analysis of laccase-induced culture of *Rl*, from the maximum activity day, showed only one protein band of different intensity which was similar in the samples with different inducers. Moreover, the zymograms of the same preparation revealed two bands with enzymatic activity, called laccase I (L1, minor band) and laccase II (L2, major band with higher electrophoretic mobility), having different intensity. The higher intensity was observed for laccase II in the presence of phenylhydrazine, catechol, 4-methylcatechol, pyrogallol and guaiacol. Therefore, the tested inducers increased differentially the synthesis of two laccase isoforms. Moreover, we have focused our attention on the valorization of OMW, containing high concentration of phenolic compounds (1.3 to 8.0 g/l), mainly polymers, having a structure similar to lignin, the natural substrate of fungal laccase. The *Rl* fungal strain tested in this work was able to growth in OMW, without any addition of nutrients and any treatment, except sterilization, and showed a remarkable capability to excrete laccase to the growth medium. Laccase induction depended on the pH and on the OMW proportion in the growth medium; higher activity was observed at 17th day, in media at pH 4.2, containing 10% of OMW in water (phenolic concentration: 220 mg/l). Therefore, this enzyme, owing to its remarkably high oxidation ability, could have potential application in various biotechnological areas, in particular for removing from OMW the phenolic compounds which cause serious environmental problems for their phytotoxic and antibacterial properties.

Riferimenti bibliografici:

1. Cambria, M.T., et al. (2000) *Protein Expr. Purif.* 18, 141-147.
2. Ragusa, S., et al. (2002) *Biochim. Biophys. Acta* 1601, 155-162.

I GENI DELLA MADS-SCATOLA ADDETTI ALL'INFLORESCENZA DEL CRISANTEMO ED ALLA DETERMINAZIONE FLOREALE DI IDENTITÀ DELL'ORGANO.

Anna V. Shchennikova 1, O.A. Shulga 1, K. G. Skryabin 1 e G. C. Angenent 2.

1. Centre of Bioengineering RAS Accademia Russa delle Scienze, Moscow, Russia

2. Business Unit Bioscience, Plant Research International, Wageningen, The Netherlands

Il crisantemo è un membro caratteristico del Compositae - una di più grandi famiglie delle piante flowering. L'inflorescenza del crisantemo, che biologicamente funziona come singolo fiore, possiede un certo numero di caratteristiche, che lo rendono attraente per gli studi inerenti allo sviluppo. Contiene i piccoli diversi ornamenti numerosi nelle fasi inerenti allo sviluppo differenti. Questi ornamenti sono organizzati in un modo indeterminato condensato, con quei esterni apertura in primo luogo.

È conosciuto ora che la formazione del fiore in più alte piante è un processo complesso controllato dai fattori genetici ed ambientali. Molto circa questo processo è stato imparato dagli studi genetici e molecolari su sviluppo floreale in *A. thaliana*, *A. majus* e *P. hybrida*. Il modello di ABCDE di sviluppo del fiore è stato proposto che è stato indicato per applicarsi anche nell'altra specie. I geni partecipano allo sviluppo del petalo e sepal, B - in petalo e nello sviluppo dello stamen, C - nello sviluppo del carpello e dello stamen, D - sviluppo dell'ovulo ed E - sviluppo del petalo e dello stamen e del carpello. È stato trovato che la maggior parte di questi geni sono appartengono alla famiglia della scatola di MADS dei fattori della trascrizione, che formano un homo- ed i heterodimers.

Questo a DNA inflorescenza-specifico di tempo due le biblioteche sono state generate: dall'inflorescenza giovane e dall'inflorescenza con gli ornamenti aperti. 8 geni integrali della MADS-scatola compreso AP1, il pi, SEP3 ed AGL8 come le famiglie del gene sono stati isolati dalle biblioteche del DNA del crisantemo e sono stati ordinati. La maggior parte dei prodotti isolati del gene direttamente è stata analizzata nel sistema GAL4 per la dimerizzazione. Di conseguenza abbiamo trovato che fra loro soltanto SEP3- ed AG-COME le proteine formano un heterodimer. La selezione delle biblioteche del DNA con Pi-come il gene del crisantemo nel sistema dell'ibrido GAL4 del lievito ha provocato un isolamento di due geni di AP3-like. Dopo la selezione delle biblioteche del DNA con il gene del crisantemo di AP1-like nel gene del sistema AGL20-like dell'ibrido GAL4 del lievito senza MADS-scatola è stato isolato. Nessun interactors è stato trovato dalla selezione delle biblioteche del DNA con AG-COME il gene del crisantemo nel sistema GAL4.

INIBITORI DI AZOLE DEL CITOCROMO P450 51A: MODELLISTICA DEI COMPLESSI E PREVISIONE DI AFFINITÀ.

Vladlen S. Skvortsov, Irina. I. Karusina, Alexis S. Ivanov, Alexander I. Archakov V.N.

Istituto di Orekhovich di chimica biomedica delle RAMS Accademia Russa delle Scienze Mediche, Mosca, Russia.

Oggi il citocromo P450 51A (tubercolosi del micobatterio) sta studiando come obiettivo probabile per le droghe di antituberculosis. Gli inibitori dei citocromi del subfamily CYP51 ora ampiamente sono usati come droghe antifungose. Un tentativo della previsione di abilità dell'inibitore del citocromo P450 51AMT per un insieme dei candidati della droga è stato fatto nel lavoro attuale. L'analisi del modo di interazione e del grippaggio degli inibitori è stata fatta usando i complessi di 7 azoles con il citocromo P450 51AMT ed i relativi mutanti. I modelli della struttura 3D di tutti i complessi sono stati costruiti hanno basato sulla struttura di cristallo del complesso di fluconazole/cytochrome P450 51AMT (identificazione di PDB: 1EA1). Parecchi parametri (valori di energia elettrostatica di interazione fra le molecole e l'entalpia schiava dell'idrogeno, la superficie sepolta del complesso, gli integrali delle proprietà di superficie differenti, delle proprietà del ligand, ecc.) sono stati calcolati per ciascuno complesso. Per concludere, abbiamo ottenuto un insieme delle equazioni statistiche basate su questi parametri che descrivono l'affinità dell'inibitore (K_s). Il valore del R^2 durante la procedura imparante non era 0.75. La procedura di crossvalidation inoltre è stata effettuata ed è stata indicata una previsione soddisfacente. La previsione usando le equazioni ottenute è stata fatta per parecchi altri azoles. Il K_s per 2 di loro è stato determinato sperimentalmente. I valori risultati erano estremamente vicino alla previsione un.

Questo lavoro è stato sostenuto in parte dai fondi del Janssen Research e da INTAS (concessione 2001-0596).

POLY(ORTHO ANISIDINE) AND POLY(ORTHO-ANISIDINE)-TiO₂ NANOCOMPOSITE CATHODES IN LITHIUM-ION RECHARGEABLE BATTERIES

Enrico Stura^a, Sandro Carrara^{a,b}, Valter Bavastrello^a, Claudio Nicolini^{a,b}

^aDepartment of Biophysical M&O Science and Technologies, University of Genoa, Corso Europa 30, 16132 Genoa, Italy

^bFondazione EL.B.A, Via delle Testuggini snc, 00143, Rome, Italy

Polyaniline derivatives are interesting materials developing consume electronic devices because of their rather high conductivity and low cost of fabrication. Poly(ortho-anisidine) (POAS) was preferred to polyaniline in this work since it is easily soluble in organic solvents like chloroform. Powder of this polymer were obtained by oxidative polymerization, and treated in two different ways, with and without purification using diethyl ether. The cathodes were realized using both the simple polymer and a nanocomposite of the polymer and titanium dioxide particles. All these four configurations were investigated with cyclic voltammetry and impedance spectroscopy, then electrolytic cells were realized with typical elements for a secondary lithium-ion battery, metallic lithium foil used as anode, porous material with liquid electrolyte solution of LP30 (1 M solution of LiPF₆ in Ethylene Carbonate : Dimethyl Carbonate 1:1). Cells were assembled using plastic containers with metallic elements as current collectors. Charge / discharge tests were conducted, and the specific capacity of the cathodes was determined for different applications, from single use (first cycle) with high current rates to continuative use (many cycles) with lower charge current. A significant part of this work was conducted in ENEA laboratories, Rome.

BUILDING A LOW RESOLUTION MODEL OF A TRANSGLUTAMINASE DOMAIN OF AN HYPOTHETICAL N-GLYCANASE FROM ARABIDOPSIS THALIANA

Gianluca Tasco, Massimiliano Della Mea, Donatella Serafini-Fracassini, Rita Casadio*

Interdepartmental Center for Biotechnological Research (CIRB) and Department of Biology, University of Bologna.

TrEMBL classifies AtPng1p (Q9FGY9) as an hypothetical protein similar to a N-glycanase peptide. This protein contains a transglutaminase-like domain which is included in the transglutaminase family by

Pfam (Protein families database). At the present, 147 proteins which share a transglutaminase/transglutaminase-like domain are included in Pfam. This family includes both animal and bacterial transglutaminases as well as other proteins of unknown function. Sequence conservation in this superfamily primarily involves three motifs that centre around conserved cysteine, histidine, and aspartate residues which form the catalytic triad in the structurally characterised transglutaminase, namely the human blood clotting factor XIIIa (PDB code 1F13, the template resolution 0.21 nm).

Also the purified recombinant protein obtained from AtPng1p gene showed a calcium-dependent transglutaminase activity (see Della Mea et al. present issue), similarly to most of the transglutaminases. The alignment was obtained by the ClustalW tool (Blosum matrix was utilised and the default values of the gap penalty were maintained); the catalytic triad was aligned by the multiple alignment provided by Pfam. Both the sequence and the structure were considered. The modelling was built up by Modeller v6.2 and validated by Procheck v3.5.

SIGNALLING THROUGH CELLULAR PRION PROTEIN IN A NEURONAL CELL LINE

Toni M.¹, Bianco M.C.¹, Spisni E.¹, Griffoni C.¹, Santi S.², Riccio M.² and Tomasi V.¹

¹**Department of Experimental Biology, University of Bologna;**

²**Institute of Cytomorphology, CNR, Bologna**

In recent years significant evidence support the notion that PrPc plays crucial roles in neuroprotection, neuronal survival and differentiation and other important neuronal events, like memory formation. Although these roles seem to be due to PrPc-dependent signalling, little is known about the constituents participating to signal transduction cascades. In this study we analysed the regulation of Fyn kinase (the nonreceptor Src-related family member p59^{Fyn}) and MAP kinase (ERK 1/2), following PrPc activation by antibody ligation in a murine hypothalamic neuronal cell line (GN11). Considering the role of PrPc as a carrier for copper ions, we analysed the effect of PrPc activation in the presence of copper. The induction of signalling pathways elicited by PrPc overexpression and by PrPc antibody activation in GN11 cells was abolished in the presence of copper. Moreover, we observed by Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) technique that copper induces a mobilisation of PrPc at plasma membrane level and in such way it could modulate elicited signals.

VARIANTI RECOMBINANT CYP2B4 E CYP1A2 CON LE MODIFICHE COSTRUITE DI PURIFICAZIONE DI AFFINITÀ: COSTRUZIONE, ESPRESSIONE, PURIFICAZIONE E PROPRIETÀ

A.A.Zhgun 1, L.I.Solodar 2, N.N.Sokolov 2, N.A, Petushkova 2, M..A.Eldarov 1, K.G.Skryabin 1

1 Centro "Bioingegneria", RAS Accademia Russa delle Scienze, Mosca, Russia

2 Istituto di chimica biomedica, RAMS Accademia Russa delle Scienze Mediche, Mosca, Russia

I citocromi p450 2B4 e 1A2 sono isoforms predominanti P450 in tessuti di mammiferi e sono responsabili di molte reazioni di metabolismo della droga importante. Per sviluppare i sistemi per produzione e purificazione efficienti di questi enzimi dalla E recombinant sforzi del coli abbiamo costruito le proteine di fusione CYP2B4 e CYP1A2 con differenti modifiche di purificazione di affinità del C-terminale di NAND. Le modifiche ottenute hanno incluso: GST-dominio del N-terminale, dominio obbligatorio della modifica della intein-chitina del C-terminale, modifica di oligohistidine del C-terminale in varie combinazioni.

L'ottimizzazione attenta degli stati di coltura ha permesso di ottenere la biomassa microbica con il soddisfare specifico P450 in su ad una coltura di 1000 nmoles/l. Le varianti Suo-etichettate CYP2B4 e CYP1A2 erano usando affinità-purificato un - o due procedure di punto rendere spettrale le proteine enzimatico-attive. La formazione del complesso funzionale-attivo fra CYP1A2 umano e la riduttasi prokaryotic di BMR dal bacillo megaterium è stata dimostrata usando le reazioni e le tecniche enzimatiche di trasferimento di energia di risonanza di fluorescenza.

Sostenuto in parte dalla concessione 2001-0596 del INTAS