CONSORZIO INTERUNIVERSITARIO

Istituto Nazionale Biostrutture e Biosistemi

VII CONVEGNO NAZIONALE

SU

SCIENZE DELLA VITA

ROMA, 19-20 OTTOBRE 2006

VII CONVEGNO NAZIONALE I.N.B.B.

Comitato Scientifico

Prof. Damiano Gustavo Mita

Prof. Edon Melloni Prof. Vittorio Tomasi

Segreteria Organizzativa

I.N.B.B.
Viale delle Medaglie D'Oro, 305
00136 Roma
Tel 06/35340153 Fax. 06/35451637
inbbamm@inbb.it
www.inbb.it

ORGANI DEL CONSORZIO I.N.B.B.

Presidente INBB

Prof. Damiano Gustavo Mita

Direttore INBB

Dott. Paolo Occhialini

Consiglio Direttivo INBB

Prof.Enrico Rizzarelli

Prof. Alberto Cangiano

Prof.ssa Rita Casadio

Prof. Carlo Di Benedetta

Prof. Carlo Frediani

Prof. Leonardo Gaspa

Prof. Gaetano Irace

Prof. Giulio Magni

Prof. Marco Mascini

Prof. Edon Melloni

Prof. Damiano Gustavo Mita

Prof. Claudio Nicolini

Dott. Paolo Occhialini

Prof. Riccardo Pierantoni

Prof. Adelio Rigo

Prof. Luigi Rossi

Prof. Giuseppe Rotilio

Prof. Vittorio Tomasi

Prof. Paolo Viglino

Prof. Carlo Ventura

Prof. Saverio Bettuzzi

Collegio dei Revisori

Dott.ssa Liana Meucci

Dott.ssa Daniela Procaccia

Dott.ssa Marina Tesauro

Giunta Esecutiva INBB

Prof. Carlo Di Benedetta

Prof. Marco Mascini

Prof. Edon Melloni

Prof. Damiano Gustavo Mita

Dott. Paolo Occhialini

Prof. Riccardo Pierantoni

Prof. Vittorio Tomasi

Prof. Paolo Viglino

Laboratorio Nazionale

Direttore

Prof. Leonardo Gaspa

INDICE

Programma VII Convegno Nazionale	Pag. 5
Relazione introduttiva del Presidente Prof. D.G. Mita	Pag. 9
Abstract comunicazioni	Pag. 15
Abstract poster	Pag. 47
Unità di Ricerca INBB	Pag. 85

VII CONVEGNO NAZIONALE I.N.B.B. Programma

GIOVEDI' 19 OTTOBRE

h. 10,30 Registrazione dei partecipanti

h. 11,00 Apertura dei Lavori e Saluti

RAPPRESENTANTI ISTITUZIONALI

h. 11,00 Introduzione

PROF. DAMIANO GUSTAVO MITA

h. 11,30 Tavola Rotonda

"Ricerca ed Università: priorità politica rispettata?"

Coordina:

PROF. DAMIANO GUSTAVO MITA (Presidente INBB)

Partecipano:

PROF. ALESSANDRO FINAZZI AGRÒ (Rappresentante CRUI)

PROF. ENRICO GARACI (Presidente Istituto Superiore Sanità)

DOTT. ROBERTO GRADNIK (Presidente Assobiotec)

PROF. FABIO PISTELLA (Presidente CNR)

ON. WALTER TOCCI (VII Comissione Camera)

SEN. GIUSEPPE VALDITARA (VII Commissione Senato)

DOTT. SERGIO VETRELLA (Presidente ASI)

h. 13,30 Lunch

h. 14,30 Sessione "Stress ossidativo ed antiossidanti"

Chairman: Prof Giuseppe Rotilio

PROF. ADELIO RIGO – Univ. di Padova "Polifenoli naturali e bioattività"

PROF.SSA ROSA MARIA CIRIOLO – Univ. di Roma "Tor Vergata" "Superossido dismutasi a Cu e Zn e funzionalità mitocondriale: un legame critico per la neurodegenerazione"

PROF. GIORGIO LENAZ – Univ. di Bologna "Supramolecular organization of mitochondrial respiratory complex I in health and disease"

PROF..SERGIO PAPA – Univ. di Bari "Complex I of the respiratory chain. Functional aspects and genetic dysfunctions"

PROF.SSA FRANCA ESPOSITO – Univ. di Napoli "Federico II" "Ruolo di Trap-1, una HSP mitocondriale, nella risposta adattativa allo stress ossidativo e nella chemioresistenza"

h. 16,30 Coffee Break

h. 16,45 Sessione "Malattie neurodegenerative"

Chairman: Prof.SSA A.M. GIUFFRIDA STELLA

PROF. VITTORIO TOMASI – Univ. di Bologna "Prion protein and caveolin-1 interaction in a neuronal cell line precede signal transduction regulating cell survival"

PROF. FEDERICO LICASTRO – Univ.di Bologna "Profili multipli di rischio genetico pro infiammatorio associati al decadimento cognitivo e la demenza di tipo Alzheimer"

PROF. PIERO PUCCI- Univ. di Napoli "Federico II" "Analisi conformazionale di proteine amiloidogeniche"

PROF. MASSIMO STEFANI – Univ. di Firenze "Cell membranes as primary sites of protein aggregation and key targets of aggregate cytotoxicity"

PROF. VITTORIO CALABRESE – Univ. di Catania "Molecular chaperons and cellular stress response in aging and neurodegenerative disorders: a redox proteomics approach"

h. 18,45 Chiusura dei lavori della giornata

VENERDI' 20 OTTOBRE

h. 9,15 Sessione "Interferenti Endocrini, Biorisanamento e Biosensori"

Chairman: PROF. MARCO MASCINI

PROF.SSA OLIANA CARNEVALI – Univ. di Ancona "Effetto del di-(2-etilesil) ftalato sulla fecondità di zebrafish (Danio rerio)"

PROF.SSA MARIA MARINO – Univ. di Roma 3 "Meccanismi alla base degli effetti antiestrogenici dei flavonoidi: l'esempio della naringenina"

Dott.ssa Valentina Grano – Consorzio INBB "Biorisanamento di acque inquinate da distruttori endocrini: il caso del Bisfenolo A"

PROF.SSA DANILA MOSCONE – Univ. di Roma "Tor Vergata" "Misura del bisfenolo A tramite un nuovo biosensore elettrochimico"

h. 11,15 Coffee break

h. 11,30 Sessione "Chimica nei Sistemi Biologici"

Chairman: Prof. Enrico Rizzarelli

PROF. FABIO ARNESANO – Univ. di Bari "Interazione dell'Ubiquitina con il rame: effetti sulla stabilità della proteina e possibili implicazioni per la poliubiquitinazione su Lys 63" PROF. RUVO MENOTTI – Univ. di Napoli "Synthetic peptide libraries as a source of a new protein ligands"

PROF. SILVIO AIME – Univ. di Torino "Lanthanide-based probes for MR-molecular imaging investigations"

PROF.ANDREA SCOZZAFAVA – Univ. di Firenze "Sviluppo di nuovi farmaci e diagnostici antitumorali e di nuovi processi industriali di biocatalisi e biorisanamento dallo studio di metalloenzimi"

PROF.SSA GRAZIELLA VECCHIO – Univ. di Catania "Porphyrin Galactose conjugates"

h. 13,30 Lunch

h. 14,30 Sessione "Nanobiotecnologie e Bioinformatica"

Chairman: PROF.SSA CECILIA SACCONE

PROF. ENZO MEDICO – Univ. di Torino "Oncogenomics: from genome exploration to personalized treatments"

PROF. CLAUDIO NICOLINI – Nanoworld Institute Univ. di Genova "Gene Leaders in Biomedicine"

PROF. SILVIO CAVALCANTI – Univ. di Bologna "Il laboratorio di ingegneria cellulare e cellulare

per lo studio dei bionanosistemi"

PROF. GRAZIANO PESOLE - Univ. di Milano "Computational detection of alternative splicing isoforms of human genes"

PROF.SSA RITA CASADIO – Univ. di Bologna "Bioinformatics for Systems and Synthetic Biology"

h. 16,30 Coffee Break

h. 16,45 Tavola Rotonda

(in collaborazione con la Federazione Italiana Società Biologiche - FISBi)

"La Ricerca Scientifica nelle Università: Legge Finanziaria e ruolo dei consorzi interuniversitari"

Coordina:

DOTT. PAOLO OCCHIALINI (Direttore INBB)

Partecipano:

PROF. FRANCO CUCCURULLO (*Presidente CIVR*)

PROF. ALESSANDRO FINAZZI AGRÒ (Rappresentante CRUI)

PROF. LUIGI FRATI (Presidente Conferenza Presidi Medicina)

PROF. DANTE GATTESCHI (Consorzio INSTM)

PROF. MAURO MAGNANI (Consorzio CIB)

PROF. DAMIANO GUSTAVO MITA (Presidente INBB)

PROF. ENRICO RIZZARELLI (Membro Commissione FIRB)

PROF.SSA MARIA SVELTO (Membro Commissione Garanti PRIN)

Interviene:

ON. FABIO MUSSI (Ministro dell'Università e della Ricerca Scientifica)

h. 18,30 Chiusura del Convegno

RELAZIONE INTRODUTTIVA

Siamo all'inizio di una nuova legislatura e mai come ora sembrerebbe giusto guardare con speranza al mondo in cui, come docenti e come ricercatori, vorremmo operare, sia nel contesto generale, che in quello dei nostri atenei e della nostra particolare esperienza consortile.

Nel programma dell'attuale maggioranza politica si leggeva che per rilanciare l'azienda Italia occorreva ricollocare "il sapere" tra le priorità della politica, dell'economia e della società. E' una bella e assolutamente condivisibile affermazione ed invero, quasi tutto il mondo politico negli ultimi tempi si è affannato a sostenere che non c'è progresso economico e sociale per un paese, se non si sostiene la cultura e non si sviluppa il capitale umano e quindi l'Università e la Ricerca.

Ma......come al solito, tra il dire ed il fare.....c'è di mezzo il mare. Al momento della presentazione di ogni legge finanziaria abbiamo visto per anni e anni nelle priorità fissate da Governi e Parlamento la "debolezza" del settore, debolezza che si traduceva in "tagli" di poste di bilancio o, quando andava bene, in risorse stabili il che, in termini reali, significava riduzione di risorse.

Il combinato disposto tra la considerazione, da una parte, che il nostro tessuto industriale riusciva a mantenere quote di mercato internazionale anche senza innovare costantemente e la valutazione, dall'altra, che il mondo dell'Università e della Ricerca scientifica non rappresentava nell'opinione pubblica una priorità nell'agenda sociale, ha indotto la classe politica a sottovalutare l'incidenza negativa che nel lungo periodo ha portato la depauperazione del nostro sistema pubblico di produzione della conoscenza avanzata.

L'"inerzia culturale" nel comprendere per tempo la pervasività del processo di globalizzazione, il perdurare del nostro sistema industriale basato sulle PMI, tendenzialmente restie a crescere in dimensione e ad investire in R&S, l'esplosione delle economie asiatiche e la nostra atavica incapacità di modernizzare la PA ricercando con strumenti seri e permanenti efficacia ed efficienza, hanno determinato la progressiva perdita di competitività del Paese nello scenario internazionale, come stanno a dimostrare tutte le analisi di comparazione degli ultimi anni.

Se avessimo deciso consapevolmente di rappresentare nel panorama internazionale il nostro Paese come il Paese dove sostanzialmente si mangia bene e ci si veste ancor meglio, dove possiamo beneficiare e far beneficiare delle bellezze artistiche e naturali, e se si fosse contemporaneamente deciso di smettere di produrre beni industriali, non avremmo dovuto porci obiettivi molto diversi da quelli delle politiche miopi fin qui perseguite nello sviluppo del capitale umano, della ricerca e dell'innovazione.

Invece la presenza, e la volontà di permanenza, tra i primi paesi industrializzati del mondo ci impone, ora come non mai, di prendere atto che "conoscenza e innovazione" sono i veri fattori di sviluppo.

E allora constatiamo amaramente i fatti e le statistiche che ci dicono che per quel che riguarda le risorse finanziarie impegnate in R&S siamo ben al di sotto di quanto previsto dalla conferenza di Lisbona, e, cosa ancor più grave, non possiamo non constatare che negli ultimi anni ci è parso di assistere ad un trend in discesa senza accenni di cambio di direzione.

Ho usato volutamente l'espressione "ci è parso di assistere" perché mai come in questi ultimi anni i numeri hanno assunto valori diversi a seconda di chi li enunciasse. Ricordo sui numeri dei fondi messi a disposizione un dibattito molto acceso tra il Senatore Asciutti ed il Senatore Modica, allora rispettivamente Presidente e membro autorevole della Commissione Cultura del Senato. Si era a Napoli, due anni fa, in occasione dell'ultimo Convegno del nostro Consorzio.

Numeri a parte, quel che conta sono i dati reali e questi ci dicono che abbiamo un numero di ricercatori per unità di lavoro che è la metà di quello europeo ed un terzo rispetto a quello degli Stati Uniti. Cito dall'intervento del Ministro Mussi in audizione alla Commissione Cultura della Camera il 4 luglio ultimo scorso. Se guardiamo all'Università il 42% dei nostri docenti ha un'età superiore ai 50 anni, la percentuale sale all'80% tra i professori ordinari, dei quali oltre il 40 % ha

più di 60 anni. Se non si interviene con urgenza, fra poco, al massimo fra quindici anni, avremo un buco di personale, nonostante i tanti giovani che vorrebbero far ricerca in Italia e che, non trovandone le occasioni, sono costretti ad emigrare dando origine a quel processo conosciuto come "fuga dei cervelli". Sono i migliori che fuggono, noi li prepariamo e gli altri li utilizzano.

Credo che l'età media per diventare ricercatore, almeno per alcune discipline scientifiche, sia intorno ai 38 anni. Questo rende impossibile la vita dei nostri precari che sono costretti ad abbandonare i sogni di una carriera scientifica ed intanto l'Italia perde in competitività.

Come ha detto il Ministro Mussi il mondo non si ferma per aspettare l'Europa e l'Europa non si ferma per aspettare l'Italia. E' nostro parere, anzi, che l'Italia debba correre di più per superare il terreno perduto. Se l'Italia corresse alla stessa velocità dell'Europa, il divario attuale rimarrebbe identico – e quindi negativo. Noi dobbiamo correre di più, solo così incominceremo ad annullare il gap che ci separa dai nostri concorrenti.

La profonda anomalia in Italia è la quota di investimenti della ricerca privata. Ora il nostro sistema produttivo investe in ricerca e sviluppo meno dello 0,4 % del PIL. Stati Uniti e Giappone, per contro, investono 5 volte più di noi, ossia il 2% della loro ricchezza nazionale. Il Governo deve stimolare un maggiore interesse del mondo industriale verso la ricerca, innescando un processo virtuoso, ad esempio detassando gli utili reinvestiti in ricerca e concedendo incentivi in favore di ambiziosi progetti di innovazione tecnologica. Le proposte della Confindustria, da quando vengono formulate dal Vicepresidente Pistorio, appaiono assolutamente condivisibili e realistiche e purtroppo fin ad ora sono state in gran parte ignorate, anche quando rappresentavano l'unico terreno di reale intesa con il sindacato.

Questo però non vuol dire che la buona ricerca è solo quella finalizzata, volta al mercato. E' necessario convogliare la ricerca su grandi tematiche e su problematiche emergenti, ma non per questo bisogna soffocare l'autonomia dei ricercatori e con essi la ricerca di base o "curiosity driven", che non è e non deve essere considerata, come spesso avviene, un lusso, ma che rappresenta il punto di partenza di studi i cui risultati, prima o poi, possono avere applicazioni pratiche. A proposito della ricerca di base sarebbe importante aumentare le risorse a disposizione, quelle degli attuali fondi FIRB e PRIN, allargandone l'ammissibilità anche ai ricercatori degli enti di ricerca, molti dei quali, nei fatti, collaborano già con le attuali unità operative, senza avere responsabilità e riconoscimenti scientifici ed economici. A proposito dei PRIN e di altre forme di finanziamento: che senso ha pretendere il cofinanziamento, se altri soldi per attività di ricerca non ci sono o comunque sono pochissimi? Avere possibilità di cofinanziare un progetto non è automatica garanzia della sua bontà, ma costituisce solo titolo per dare fondi a chi già li possiede negando soprattutto ai giovani la possibilità di partecipare ad una competizione. E' un meccanismo che va certamente rivisto, come pure il fatto che proprio i consorzi interuniversitari, per il PRIN, non possano essere soggetti ammissibili.

Se allarghiamo lo sguardo all'orizzonte europeo, ci apprestiamo a cimentarci in un quadro di riferimento promettente, quello del VII Programma quadro che prevede investimenti per oltre 53 miliardi di euro. A parte l'interesse per l'aumento dei fondi, il segnale importante è che una parte di questa dotazione andrà a finanziare ricerche di base, programmate e presidiate, si spera, per il loro valore oggettivo in sede di Consiglio Europeo delle Ricerche, nato nonostante le contrarietà del precedente Governo. Se il Paese aumenterà la propria capacità di sviluppare ricerca avanzata, sicuramente terminerà il fenomeno del "bilancio finanziario" negativo tra il Paese e l'Unione Europea in R&S.

Quindi occorrono più risorse, più ricercatori, più docenti, ma occorre anche una maggiore selettività nelle scelte ed una valutazione continua dell'attività svolta e dei risultati ottenuti per la corretta riallocazione delle risorse pubbliche. Occorre più capacità di programmazione perché la ricerca non può vivere nella continua precarietà e nel cambiamento continuo di strutture e di procedure. Occorre una politica seria di valutazione comparativa quanto più si vuole continuare a garantire la giusta politica di autonomia degli atenei e degli EPR.

Programmazione, qualità della ricerca e dell'alta formazione, meritocrazia (e bando ai nepotismi), produttività scientifica secondo gli usuali criteri internazionali, devono essere gli indicatori di riferimento e quelli su cui valutare la carriera delle persone. Queste verifiche non ci spaventano e vorremmo che non fossero solo sbandierate, ma che fossero implementate, presidiate e riconosciute con puntualità e rigore.

Il CIVR ha svolto bene il suo compito, ma se vogliamo veramente rilanciare il Paese ogni istituzione ai vari livelli dovrebbe avere al suo interno il suo "CIVR personale", senza fuorvianti ed assolutorie "autovalutazioni", per essere pronto a reali verifiche comparative.

Le misure contenute nella Legge Finanziaria ed anche nel precedente ddl interministeriale sull'innovazione (che significativamente il Ministro Bersani ha voluto titolare "Industria 2015") ci sembrano andare nella direzione giusta, con molti "segnali positivi", anche se soffrono di risorse ancora scarse, legate ad una eredità pesante nei nostri conti pubblici che speriamo possa essere superata presto.

Una razionalizzazione dei Fondi a disposizione per la ricerca e l'innovazione, lo sblocco delle assunzioni per i ricercatori contestuale ad un piano straordinario di assunzioni, un credito d'imposta per le imprese che arriva al 15% se prevede il coinvolgimento di centri universitari e di EPR ci sembrano interventi di un quadro strategico coerente (che speriamo il Ministro Mussi ci possa presentare di persona nella seconda giornata), che potrà ancor più dispiegare buoni risultati quando implementato con risorse adeguate, che per quest'anno sembrano veramente esigue.

Le due tavole rotonde previste nel Convegno serviranno ad approfondire questi interventi a cominciare dalla importante proposta di una Agenzia nazionale di valutazione degli Atenei.

Il quadro che abbiamo fin qui delineato non intende essere di pessimismo perché, nonostante gli scarsi investimenti di questi anni passati, i ricercatori italiani nel complesso si sono difesi abbastanza bene in diverse discipline (e quello delle Scienze della Vita è uno di questi) presentando una produttività quantitativa e qualitativa comparabile a quella di molti paesi che investono più di noi in ricerca. Siamo tra le prime otto potenze economiche mondiali, ma investiamo in percentuale del prodotto nazionale lordo la metà della media europea, un terzo rispetto a Stati Uniti e Giappone, un quarto rispetto a Svezia e Finlandia. Proviamo ad immaginare quel che succederebbe se gli investimenti dello Stato italiano aumentassero in modo tale da allinearsi a quelli della media europea. Non so se vedremo mai realizzarsi questo sogno, ma visto che i sogni non costano...ci si lasci almeno sognare, e sperare che in questa legislatura si possa davvero cambiare rotta.

Siamo all'inizio della legislatura e vogliamo chiedere ai nostri governanti: ritenete veramente prioritaria la ricerca e c'è la volontà condivisa per farne una priorità del Paese? Siete realmente convinti che senza ricerca non ci possa essere innovazione e sviluppo economico? Saranno rispettate le priorità promesse in campagna elettorale?

* * * * *

In questo contesto gli atenei italiani riflettono, con diverse luci e molte ombre, tutte le negative condizioni dovute ad una politica contraddittoria. Infatti dagli anni novanta gli atenei hanno goduto di una legittima autonomia, ma nello stesso tempo, non potendo usufruire di fondi adeguati soprattutto per attività di ricerca, in linea di massima non hanno più garantito, con indubbie eccezioni, eccellenza, meritocrazia e senso di responsabilità nei processi gestionali, come se questi valori di riferimento non dovessero essere "naturali" del mondo accademico che, per sua natura, è tenuto a confrontarsi con il panorama internazionale.

Da tempo si sente il bisogno di un nuovo sistema di *governance* degli atenei e del mondo accademico che porti a correggere gli errori fatti e ridia coerenza di comportamenti verso obiettivi strategici prefissati e condivisi. Gli interventi del "pacchetto serietà" del Ministro dell'Università e della Ricerca sono significativi per la loro emblematicità e ci piacerebbe che il Ministro Mussi ce li chiarisse durante il suo intervento previsto per domani.

I Consorzi Interuniversitari sono tenuti a svolgere il loro ruolo istituzionale in questo quadro contribuendo ad aumentare le capacità di svolgere attività di ricerca del sistema accademico e rafforzando le relazioni e le collaborazioni tra gruppi di ricerca affini e nelle stesse filiere di ricerca.

Anche i consorzi interuniversitari, in assenza di un sistema di valutazione e di trasparenti criteri di distribuzione delle risorse pubbliche a loro destinate, hanno cercato di assolvere la loro missione nel modo più serio possibile, ma certamente con molte difformità nella loro azione. Talvolta svolgendo una funzione complementare alle università, talvolta coprendo ruoli di supplenza, talvolta sfruttando una maggiore flessibilità istituzionale nel rapporto di collaborazione con le imprese, talvolta rispondendo, forse con una eccessiva proliferazione, più a logiche particolari che di interesse generale.

Nel momento che si sta definendo per i prossimi anni una nuova strategia complessiva per il mondo della ricerca pubblica e privata, i consorzi interuniversitari devono essere disponibili a valutare il proprio ruolo e a ridefinire la propria missione. L'INBB, con l'esperienza accumulata in questi anni difficili, è pronto a dare il proprio contributo insieme ad altri consorzi, specie a quelli che hanno caratteristiche simili alle nostre, chiedendo unicamente che le scelte da prendere siano discusse ed assunte in modo più condiviso possibile, dopo un confronto aperto.

* * * * *

Veniamo ora brevemente all'attività del nostro Consorzio in questo ultimo anno ed alle linee programmatiche a cui intendiamo ispirarci nel futuro immediato, linee che possono solo rappresentare dei "desiderata" visto che al momento non abbiamo ancora idea dell'entità della dotazione ordinaria per il corrente anno da parte del Ministero, dotazione che negli anni scorsi ha premiato la nostra gestione per gli investimenti fatti, per la nostra produttività e per l'impegno continuo e crescente nell'attività di formazione. Al momento stiamo "operando" non sapendo se potremo onorare alcuni impegni presi.

Nel corso dell'ultimo anno abbiamo stipulato nuove convenzioni di collaborazione scientifica con la Regione Lazio e la Regione Campania, in linea con la scelta di porre attenzione al crescente impegno degli Enti locali in ricerca. Stiamo seguendo, inoltre, le iniziative dei Distretti tecnologici sia nel Lazio che in Sicilia. Siamo diventati titolari di nuovi progetti di ricerca in ambito nazionale (FIRB) ed in ambito Europeo, come pure abbiamo sottoscritto nuovi contratti di ricerca con PMI e con aziende multinazionali.

Abbiamo dato vita a "gruppi di interesse scientifico omogeneo", interni al Consorzio che vedono la partecipazione di una serie di Unità di Ricerca INBB e di colleghi di altre istituzioni come ISPESL, Istituto Superiore di Sanità, CNR. Tra questi gruppi di interesse ricordiamo nell'ordine quello sulla amiloidosi e le malattie neurodegenerative, quello sugli interferenti endocrini e quelli, in fase di sviluppo, sulle cellule staminali e sulla biosensoristica.

Frutto di queste iniziative sono stati il convegno internazionale a Bologna sulle cellule staminali ed il convegno (con un seguente workshop di approfondimento) sugli interferenti endocrini tenutosi a Roma. Sempre nell'ambito degli interferenti endocrini ci piace ricordare la giornata di studio prevista in gennaio-febbraio 2007 presso l'Istituto Superiore di Sanità.

Con l'adesione degli atenei di Roma Tre e di Salerno è aumentato il numero delle Università consorziate, ora 26, ed inoltre è aumentato il numero di aderenti con adesioni qualificate provenienti da tutto il territorio nazionale.

Abbiamo continuato a tenere attivo il Laboratorio INBB di Osilo-Sassari e stiamo cercando di favorire nuove iniziative.

Per finire ricordiamo nell'ambito di un progetto complessivo di formazione, le numerose borse di studio, sia brevi che annuali, assegnate nel corso di questo ultimo anno, ed il contributo di idee e di docenti all'attivazione di un Master di secondo livello su molecole di interesse farmacologico, in collaborazione con la Seconda Università di Napoli, con alcuni Istituti del CNR dell'area napoletana e con alcune aziende del territorio.

E veniamo al Convegno che ci vede riuniti oggi a Roma. A differenza degli anni passati, il Comitato scientifico ha ritenuto opportuno per il Convegno 2006, per il quale ringraziamo i partecipanti e la staff dell'INBB per i rispettivi contributi scientifici ed organizzativi, organizzare i lavori su tematiche comuni, piuttosto che sulla rigida schematizzazione dei settori di ricerca in cui è catalogata l'afferenza degli aderenti al consorzio. Nessuna delle anime del Consorzio, comunque, è stata ignorata e vedremo se questa scelta risulterà felice, così come ci auguriamo.

Ed ora uno sguardo al futuro, per il quale nutriamo qualche preoccupazione. Si sta ipotizzando un trasferimento del capitolo finanziario per il funzionamento dei Consorzi Interuniversitari nel capitolo degli Enti di ricerca. Era nostro desiderio originario diventare Ente pubblico di ricerca, ma non siamo in grado di capire al momento ciò cosa comporti. Qualunque cosa possa significare questo passaggio, crediamo che esso debba essere accompagnato da una valutazione e da un riconoscimento pubblico del ruolo dei consorzi. Ciò presuppone, secondo noi, la definizione preventiva di alcuni criteri di merito "premianti" e tra questi è prevedibile ci siano l'attività di ricerca ben più robusta di quella legata alla dotazione ministeriale, l'attività di formazione e di borse di studio, ed il raggiungimento di una sempre più qualificata massa critica.

E' nostra opinione che, mentre non abbiamo alcunché da temere sui primi due criteri, il terzo invece possa procurare qualche preoccupazione. Per superare questa preoccupazione il modo operativo più semplice è quello di confrontarci, prima, e federarci, dopo, con i Consorzi a noi più vicini per cultura e tematiche di ricerca. Una prima parte esplorativa da parte di questa Presidenza è stata già avviata e sta riscuotendo un certo interesse. Speriamo che, anche con la collaborazione di tutti gli aderenti al nostro Consorzio, questa fase iniziale possa dare i suoi frutti assicurando al nostro settore di ricerca la giusta rappresentanza nel panorama scientifico nazionale.

Grazie a tutti per l'attenzione

Damiano Gustavo Mita Presidente I.N.B.B.

Roma, 19 ottobre 2006

ABSTRACT DELLE COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE

Sessione "Stress ossidativo ed antiossidanti"

SUPEROSSIDO DISMUTASI A Cu E Zn E FUNZIONALITÀ MITOCONDRIALE: UN LEGAME CRITICO PER LA NEURODEGENERAZIONE

Maria Rosa Ciriolo Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"

Lo stress ossidativo rappresenta un concetto largamente conosciuto ed utilizzato per spiegare, almeno in parte, diversi processi patologici in particolare durante l'invecchiamento del sistema nervoso centrale e in diverse malattie neurodegenerative. Nonostante le numerose evidenze a favore della teoria dei radicali liberi nell'invecchiamento "free radical theory of aging" mancano però dirette evidenze sperimentali del loro coinvolgimento nei processi di invecchiamento. Inoltre, non è ancora ben definito se lo stress ossidativo è il fattore iniziale oppure il risultato di altri processi patologici che caratterizzano le neurodegenerazioni. In questo ambito, tuttavia, alcune certezze si stanno delineando: da una parte l'alterazione della funzionalità mitocondriale e i processi infiammatori sembrano essere tra i responsabili del processo di invecchiamento mentre lo stress ossidativo appare coinvolto nella propagazione del danno cellulare che caratterizza la neurodegenerazione. Negli ultimi anni, infatti, numerosi lavori sulle malattie caratterizzate da stress ossidativo hanno evidenziato un ruolo fondamentale per la funzionalità mitocondriale quale principale fattore di causa. I mitocondri rappresentano i maggiori produttori di specie radicaliche e nello stesso tempo sono facilmente suscettibili alla tossicità mediata da queste specie; una diminuzione di attività dei complessi della catena di trasporto degli elettroni, un aumento del danno ossidativo ed alterata attività degli enzimi antiossidanti rappresentano i principali segni dell'invecchiamento e delle malattie neurodegenerative. La difesa antiossidante dei mitocondri è perciò particolarmente efficiente e ben articolata ed è rappresentata in prima analisi dagli enzimi superossido dismutasi sia a Cu e Zn, presente nello spazio intermembrana, sia della forma a Mn propriamente della matrice. Tra queste specie la forma a Cu e Zn (SOD1) è la più abbondante nella cellula ed è localizzata principalmente nel citosol dove è presente in concentrazioni µM pur avendo una attività catalitica tra le più efficienti (K_{cat}=10⁹ M⁻¹ s⁻¹). Il ruolo fisiologico di questo enzima, cioè la dismutazione dell'anione superossido, è ancora oggetto di studio e di discussione specialmente per quanto riguarda la correlazione tra l'efficienza catalitica e la bassa concentrazione del substrato. Un altro aspetto che contribuisce alla diatriba su questo enzima è dato dal fatto che la sua over-espressione, così come la down-regolazione, in alcuni casi, sono fonte di danno e neurodegenerazione. In questa sede saranno presentati dati a favore di un nuovo ruolo per la SOD1 quale enzima necessario al mantenimento della funzionalità mitocondriale, non strettamente connesso alla sua attività enzimatica ma, piuttosto, come modulatore della stabilità e dell'azione antiapoptotitca della proteina Bcl-2. Si discuteranno, infine, le possibili connessioni tra questa funzione e l'invecchiamento o la neurodegenerazione.

Questi studi sono stati finanziati dal MIUR e Ministero della Salute.

RUOLO DI Trap-1, UNA HSP MITOCONDRIALE, NELLA RISPOSTA ADATTATIVA ALLO STRESS OSSIDATIVO E NELLA CHEMIORESISTENZA

Franca Esposito

Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università di Napoli Federico II, Via Pansini 5, 80131, Napoli

Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) svolgono un importante ruolo nella regolazione di numerosi processi biologici. Da alcuni anni, il nostro gruppo si è rivolto allo studio della regolazione redox dell'espressione genica, con particolare riguardo all'identificazione e caratterizzazione degli effetti dei ROS su alcuni fattori trascrizionali e sul ruolo svolto da tali specie nella regolazione della trasduzione mitogenica. Più recentemente, il nostro principale interesse si è focalizzato sui meccanismi molecolari coinvolti nell'adattamento cellulare allo stress ossidativo e sul ruolo di tale processo nell'induzione della chemioresistenza: è stato infatti dimostrato che la resistenza di cellule tumorali allo stress ossidativo e all'apoptosi rappresenta un importante meccanismo coinvolto nello sviluppo della chemioresistenza. Cellule Saos-2 di osteosarcoma umano sono state adattate a crescere in condizioni di blanda ossidazione indotte dal dietilmaleato (DEM), un depletore di glutatione ridotto (GSH). I profili di espressione genica di cellule adattate e di controllo sono stati analizzati mediante la tecnica del differential dispaly. Tra i diversi geni la cui espressione era aumentata nelle cellule adattate al DEM abbiamo focalizzato la nostra attenzione su Trap-1 una heat shock protein (HSP75) mitocondriale. Dati di letteratura suggeriscono che Trap-1 possa svolgere un ruolo antiapoptotico ed alcune nostre osservazioni preliminari dimostrano che l'espressione di questa proteina diminuisce in condizioni di apoptosi indotta dal cisplatino solo nelle cellule di controllo, ma non in quelle adattate; abbiamo quindi ipotizzato che la degradazione di Trap-1 potesse essere responsabile, almeno in parte, dell'induzione del processo apoptotico. A tale scopo sono stati generati in cellule Saos-2 cloni stabili iperesprimenti la proteina: tali cellule risultano più resistenti al danno al DNA indotto da H₂O₂ e all'apoptosi indotta da cisplatino e DEM. Al momento sono in corso di caratterizzazione i meccanismi coinvolti nella regolazione dell'espressione di Trap-1: risultati preliminari suggeriscono che la diminuzione di Trap-1 in seguito al trattamento con cisplatino è ostacolata dall'attivazione di JNK, dal momento che l'inibizione di tale chinasi, sia farmacologica che mediante trasfezione del dominante negativo di SEK-1, accelera la degradazione di Trap-1 indotta dal cisplatino. Allo scopo di identificare i domini responsabili della funzione antiapoptotica, sono sati generati numerosi mutanti e sono in corso esperimenti per valutare il loro effetto sulla prevenzione dell'apoptosi, rispetto alla proteina wild type. Un interessante meccanismo riguarda una possibile regolazione post-trascrizionale di Trap-1 da parte delle regioni 3'UTR: da un'analisi in banca dati abbiamo osservato che l'mRNA di Trap-1 condivide 59 nucleotidi con l'mRNA di DNasi I, un effettore apoptotico, nella regione del 3'UTR, dal momento che i due geni si localizzano entrambi sul cromosoma 16, ma su filamenti opposti. Sono in corso esperimenti per caratterizzare il ruolo svolto da tali regioni, nonchè da alcuni micro RNA che presentano putativi siti di legame nelle regioni di omologia al 3' UTR di entrambi i geni, nella regolazione dell'espressione di queste due proteine. Questo meccanismo di regolazione dell'espressione di Trap-1 e DNasi I, due geni con funzioni cellulari opposte (pro e anti-apoptotica) è ulteriormente supportata da una loro inversa tessuto-distribuzione.

Infine, allo scopo di far luce sulle correlazioni tra adattamento allo stress ossidativo e chemioresistenza, i livelli di proteina Trap-1 sono stati analizzati in cellule resistenti a vari agenti chemioterapici antitumorali (tra cui 5-fluorouracile e derivati del platino e del taxolo). Risultati preliminari suggeriscono che Trap-1, i cui livelli sono aumentati anche nelle cellule chemioresistenti, possa svolgere un ruolo di rilievo nella resistenza ai trattamenti antineoplastici, utile pre-requisito per il disegno di nuove molecole capaci di contrastare il fenomeno della chemioresistenza.

SUPRAMOLECULAR ORGANIZATION OF MITOCHONDRIAL RESPIRATORY COMPLEX I IN HEALTH AND DISEASE

Giorgio Lenaz*, Cristina Bianchi, Maria Luisa Genova Dipartimento di Biochimica, University of Bologna, Via Irnerio 48, 40126 Bologna, Italy *Corresponding author: giorgio.lenaz@unibo.it

Mitochondrial Complex I (NADH Coenzyme Q oxidoreductase) is a very large enzyme catalyzing the first step of the mitochondrial electron transport chain. The total number of subunits in the bovine enzyme is 46 for a molecular mass of about 1000 KDa. The molecular mechanism of catalysis of this enzyme is not completely understood and the main reason is lack of detailed structural information. Recent structural and kinetic evidence suggests that Complex I is associated with a Complex III dimer in the form of a super-complex that may provide obligatory channelling of electrons via bound Coenzyme Q (CoQ) molecules. By application of metabolic flux analysis to NADH cytochrome c reductase activity in a reconstituted mitochondrial fraction from bovine heart, enriched with Complexes I and III, we have found that at high protein to phospholipids ratio these Complexes are associated in the form of a super-complex, whereas at low ratio they behave as independent units functionally linked by the CoQ pool. Peroxidation of the phospholipids used for reconstitution induces dissociation of the super-complex, with important implications for aging and age-related diseases where oxidative stress is an important pathogenic feature.

COMPLEX I OF THE RESPIRATORY CHAIN. FUNCTIONAL ASPECTS AND GENETIC DYSFUNCTIONS.

S. Papa^{1,2}

¹Department of Medical Biochemistry, Biology and Physics, University of Bari, Italy ²Institute of Bioenergetics and Biomembrane, Italian Research Council, Bari

NADH-ubiquinone oxidoreductase is the largest (46 subunits in humans, 7 encoded by the mitochondrial genome) of the respiratory chain complexes, the main contributor for protonmotive energy transfer, a major producer of ROS in mitochondria, a control site by post-translational modification (phosphorylation, acylation, glutathionylation) [1-2]. cAMP dependent phosphorylation is involved in mitochondrial import of a nuclear encoded subunit of the complex (NDUFS4, 18kDa subunit) [3], complex assembly, modulation of respiratory function and ROS generation by the complex [4-5].

One research line in our laboratory is addressed to characterize mutations in nuclear genes of complex I (NDUFS4, NDUFS1 genes), splicing and stability of gene transcripts, pathogenic mechanisms in Leigh like neurological disorders. Different mutations in NDUFS4, which appears to be a hot-spot for mutations, result in disappearance of the subunit encoded by the gene, appearance of alternative abortive alternative transcripts, impairment of the assembly of the complex and full suppression of its functional activity. A Q522K replacement in the NDUFS1 gene resulted in a reduced level of the complex, partial inhibition of the normal NADH-ubiquinone oxidoreductase activity of the complex and large production of oxygen free radicals. These effects where reversed by cell treatment with cAMP[6].

Another research line is directed to study the impact on mitochondrial function of mutations in the gene PTEN-induced kinase (PINK-1) associated with early onset hereditary Parkinsonism. A W437X nonsense mutation in PINK-1 has been found to result in a much reduced level and activity of complex I, depressed mitochondrial respiration, loss of the Pasteur effect and large overproduction of glycolytic ATP [7].

Reference

- 1.S. Papa, V. Petruzzella and S. Scacco Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology, 3rd Edition Gary Gibson and Gerald A. Dienel editors Kluwer Academic/Plenum Publishers 2006
- 2. S. Papa, Biochim. Biophys. Acta 1555, 147-153 (2002).
- 3. D. De Rasmo, D. Panelli, A.M. Sardanelli, S. Papa, Abstract volume SIB 2006
- 4. V. Petruzzella, R. Vergari, I. Puzziferri, D. Boffoli, E. Lamantea, M. Zeviani and S. Papa Human Molecular Genetics 10, No. 5, 529-535 (2001).
- 5. F. Bellomo, C. Piccoli, T. Cocco, S. Scacco, F. Papa, A. Gaballo, D. Boffoli, A. Signorile, A. D'Aprile, R. Scrima, A.M. Sardanelli, N. Capitanio, and S. Papa Antioxidants & Redox Signaling 8 (3-4), 495-502 (2006)
- 6. C. Piccoli, S. Scacco, F. Bellomo, A. Signorile, A. Iuso, D. Boffoli, R. Scrima, N. Capitanio, S. Papa FEBS Letters 2006 in press.
- A. Iuso, S. Scacco, C. Piccoli, F. Bellomo, V. Petruzzella, R. Trentadue, M. Minuto, M. Ripoli, N. Capitanio, M. Zeviani, and S. Papa The Journal of Biological Chemistry Vol. 281, NO. 15, pp 10374-10380 April 14 2006.
- A.M. Sardanelli, et al., Manuscript in preparation

POLIFENOLI NATURALI E BIOATTIVITÀ

Adelio Rigo

Dipartimento di Chimica Biologica-Sezione INBB - Università di Padova

Obiettivo generale dell'attività del nostro gruppo in questo settore è la comprensione del ruolo dei polifenoli naturali nell'alimentazione umana, in particolare delle antocianine e dei flavonoli presenti nella frutta e negli ortaggi,. Questi composti fanno parte della categoria dei cosiddetti antiossidanti a cui classicamente vengono attribuite varie funzioni fra cui la possibilità di bloccare i radicali liberi altamente reattivi, l'inibizione della perossidazione lipidica, la capacità di chelare ioni di metalli pesanti e l'attività riduttiva.

La ricerche che stiamo conducendo intendono mettere in luce i vari aspetti dell'attività biologica aspetti che vanno dai metodi di valutazione dell'attività antiossidante ai meccanismi molecolari con cui questi composti agiscono, alla bio-disponibilità, alla modifica dello stato redox (signalling), all'influenza sul metaboloma e proteoma. I risultati di queste ricerche potranno aiutare a formulare su basi razionali l'impiego dei polifenoli in campo farmacologico, nel settore degli integratori e delle tecnologie alimentari.

In questa relazione verranno presentati alcuni dei risultati ottenuti nello studio del comportamento dei polifenoli come inibitori della perossidazione lipidica in due distretti e cioè nell'apparato digerente, dove non esistono problemi di bio-disponibilità e nel sangue ed in particolare sulla possibilità di valutare la loro attività in termini di capacità ed efficienza e dei possibili fenomeni di sinergia.

A partire dallo schema generale delle reazioni che sono coinvolte nella inibizione della perossidazione lipidica in condizioni fisiologiche, abbiamo risolto in modo rigoroso le relative equazioni cinetiche ottenendo delle relazioni che interpretano correttamente i dati sperimentali e permettono di valutare per i vari antiossidanti, per le loro miscele e per gli alimenti in cui sono presenti sistemi complessi di questi composti, la quantità di radicali perossidici bloccati e l'efficienza del processo di inibizione. Questi parametri sono collegati alla stechiometria e alle costanti cinetiche delle reazioni di inibizione cioè a grandezze che non sono note per la maggior parte dei singoli antiossidanti. Sulla base di questi parametri è stato possibile mettere in luce la presenza di aspetti sinergici nei sistemi complessi, cioè di una attività molto più elevata di quella aspettata sulla base della somma dei contributi dei soli singoli composti. Le determinazioni dell'attività antiossidante sono stata integrate da misure di risonanza elettronica di spin che oltre a confermare la presenza dei fenomeni sinergici, ha permesso di ottenere informazioni su alcuni dei meccanismi molecolari coinvolti. Verranno infine presentate possibili applicazioni di queste metodologie alla valutazione di alimenti, integratori dietetici e farmaci.

Sessione "Malattie neurodegenerative"

MOLECULAR CHAPERONS AND CELLULAR STRESS RESPONSE IN AGING AND NEURODEGENERATIVE DISORDERS: A REDOX PROTEOMICS APPROACH

Calabrese V.¹, Sultana R.², Poon F.², Guagliano E.¹, Ravagna A., Sapienza M.¹, Scapagnini G.¹, Butterfield D.A.² Giuffrida Stella A.M.¹

Dept. of Chemistry¹, Univ. of Catania, Italy; Dept. of Chemistry² Univ. of Kentucky, USA.

Many molecular chaperones are also known as heat shock proteins because they are synthesised in increased amounts after brief exposure of cells to elevated temperatures. They have many cellular functions and are involved in the folding of nascent proteins, the re-folding of denatured proteins, the prevention of protein aggregation as well as in assisting the targeting of proteins for degradation by the proteasome and lysosomes¹⁻³. They also have a role in apoptosis and are involved in modulating signals for immune and inflammatory responses⁴⁻⁵. During stress, cellular proteins undergo denaturation and sequester heat shock proteins bound to HSF, which is then able to become transcriptionally active. The induction of heat shock proteins is impaired during aging and there is also a decline in chaperone function. Aberrant/damaged proteins accumulate with age and are implicated in several important age-related conditions (e.g. Alzheimer's disease, Parkinson's disease, SLA, MS and Fredreich's ataxia)⁶. Therefore, the balance between damaged proteins and available free chaperones may be greatly impaired during aging. Activation of antioxidant pathways is particularly important for neural cells with relatively weak endogenous antioxidant defenses⁷⁻⁹. We have recently focused our research on the role of acetylcarnitine (LAC) in the defense mechanisms against cellular stress and neurodegeneration⁶ and, consistently, have developed a redox proteomic approach to investigate cellular stress responsive genes, such as heme oxygenase (HO-1), Hsp70 and mitochondrial SOD in rat aging brain as compared to that of adult brain in the absence or presence of treatment with acetylcarnitine. In particular, we have measured mRNA expression and protein synthesis of Hsps and the oxidant status in adult (12 months) and senescent (28 months) rats, and the effect of LAC treatment in senescent rats for 4 months (from 24 to 28 months). Hsp expression increased in senescent rats compared to adults in all brain regions examined; the maximum increase was observed in the hippocampus followed by cerebellum, cortex, and striatum. Hsps increase was associated with significant changes in glutathione (GSH) redox state, carbonyls and HNE content. Interestingly, treatment with LAC resulted in a marked increase of heme oxygenase-1 (HO-1), Hsp70, and mtSOD expression, of GSH content, and a decrease of HNE and protein carbonyl contents, in the hippocampus, striatum, cortex and cerebellum. These results were also confirmed by in situ hybridization experiments. We used also a parallel redox proteomic approach⁴⁻⁸ to identify the proteins that are oxidized in aged rat brain and those proteins that are protected by LAC treatment. Redox proteomics analysis of HP and CX, brain regions in which all indices of oxidative modification are elevated in brain aging showed that the specific carbonyl levels of three proteins, hemoglobin (HMG), cofilin 1 (COF 1) and b-actin (ACT), are significantly increased in HP of senescent rats. Carbonyl levels of these proteins are reduced by LAC administration in old rats brains. In the CX of senescent rats, the specific carbonyl levels of eight proteins were increased. These proteins are heat shock protein 70 (Hsp70), glyoxylase 1 (GOL 1), b-actin (ACT), 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (MPST), peroxiredoxin 1 (PDX), phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1 (PPRPS1), and fumarase (FUM). LAC administration reduced the specific carbonyl levels of all these protein in the CX of senescent rats. The proteins identified in our study are involved in three processes which are impaired in aged brains: antioxidant defence, mitochondrial function and plasticity. LAC treatment might improve the decline of these functions. We posit that LAC should be considered as a potential therapeutic contributor for the treatment of cognitive decline in aging and age-related neurodegenerative disorders. In conclusion our results sustain a role for a redox-dependent modulation of Hsp expression occurring in aging brain. Increased heat shock protein expression, by promoting the functional recovery of oxidatively damaged proteins, protects brain cells from progressive agerelated cell damage⁸⁻¹⁰. Therefore, therapeutic strategies focussing on acetylcarnitine treatment, by up-regulating HO-1 and Hsp70 signal pathways may represent a crucial mechanism of defence against free radical-induced damage of critical proteins occurring in aging brain and in neurodegenerative disorders 11-12. This finding is relevant to potential pharmacological strategies pointing to maximize cellular stress resistance in vulnerable tissues such as the brain and thus providing neuroprotection^{1,2,12}.

References:

¹Halliwell B. (2006) *J Neurochem* 97,1634; ³Calabrese et al (2006) *Antiox. Redox Signal* 8,362; ⁵Calabrese et al (2006) *Antiox Red Signal* 8,404; ⁷Calabrese et al (2006) *J. Neurosi. Res.* 84, 418; ¹¹Calabrese et al (2006) *J. Neurosi. Res.* 84,398;

²Calabrese et al (2005) J Neurochem 92,749; ⁴Calabrese et al (2006) *Neuroscience* 138,1161; ⁶Calabrese et al (2006) *J. Nutr Biochem.* 17,73 ⁸Calabrese et al (2006) Neurochem. Int. 48,318; ⁹Calabrese et al (2006) *Antiox. Redox Signal* 8,444; ¹⁰Calabrese et al (2006) *Antiox Red Signal* 8,381; ¹²Ignarro et al (2006) *PNAS* 103, 10479.

PROFILI MULTIPLI DI RISCHIO GENETICO PRO INFIAMMATORIO ASSOCIATI AL DECADIMENTO COGNITIVO E LA DEMENZA DI TIPO ALZHEIMER

Federico Licastro

Dipartimento di Patologia Sperimentale, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Via S. Giacomo 14, 40126 Bologna.

La malattia di Alzheimer è al forma più frequente di demenza, è una malattia complessa e ne esistono diverse forme cliniche. Ad esempio una più rara, meno del 5% dei casi, ha esordio prima dei 65 and 1'altra più frequente, oltre il 90% dei casi insorge dopo i 65 anni. Nella prima forma familiare sono state riscontrate mutazioni dominanti che interferiscono nel metabolismo della amyloid procursor protein (APP), quali mutazione della stessa APP, della preselenina 1 (PS1) e PS2. Nella forma più frequente non sono state riscontrate mutazioni dominanti, ma fattori gnetici giocano comunque un ruolo non secondario. Ad esempio è noto da tempo che l'allele $\varepsilon 4$ del gene dell'apoplipoproteina E (APOE) e un fattore di rischio per questo tipo di malattia. I segni neuropatologici caratteristici degli stadi terminali della malattia sono la presenza diffusa di placche in numerose aree encefaliche, la presenza di matasse neurofibbrillari amiloidi extracellulari intraneuronali e la perdita diffusa di sinapsi e neuroni. Da alcuni anni si è osservato che coesistono nell'encefalo segni di attivazione e proliferazione delle cellule accessorie cerebrali quali gli astrociti e la microglia. Queste cellule producono molecole ad attività infiammatoria quali citochine e neurotossine ed è stata avanzata l'ipotesi che questa condizione definita neuro-infiammazione cronica contribuisca all'insorgenza e alla progressione della malattia. Questa ipotesi è stata rinforzata da studi epidemiologici che mostravano che l'incidenza della demenza era più bassa in soggetti che avevano fatto uso di farmaci anti-infiammatori non steroidei per periodi sufficientemente lunghi. Altri studi focalizzati sulla genetica di molecole infiammatorie hanno mostrato che polimorfismi allelici (SNP) di citochine e interleuchine erano associati con un rischio elevato di sviluppare le demenza di tipo Alzheimer (DA). Ma un singolo SNP o un singolo gene non può dare che un contributo minimo alla malattia. In questa presentazione si tratterà in modo sistematico dell'associazione di molecole infiammatorie con la DA. In particolare si presenteranno i dati di un nuovo approccio integrato volto a verificare se la presenza concomitante di diversi SNP presenti su diversi geni di tipo infiammatorio possano costituire una base razionale per poter predire il rischio di DA. I polimorfismi utilizzati sono situati su i seguenti geni: APOE, IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-10, ACT, HMGCR, TNFα e IFN-γ.

Da questo approccio integrato su circa 300 pazienti e altrettanti controlli non dementi sono state individuate 4 categorie di rischio. Alla prima appartengono i soggetti a basso rischio di DA, le altre 3 categorie rappresentano gruppi a rischio. In particolare, alla seconda categoria appartengono i soggetti con insorgenza della malattia prima dei 65 anni. Alla terza quelli che sviluppano la malattia dopo i 65 anni e in cui la presenza dell'allele APOE 4 ha un ruolo minimo. La quarta categoria è rappresenta dai soggetti che sviluppano la DA dopo i 75 anni e in cui l'allele APOE 4 ha un ruolo prevalente. L'applicazione di questo tipo di analisi integrata con carattere predittivo può individuare fra i soggetti sani quelli con elevato rischio di sviluppare la DA e permette di introdurre terapie precoci allo scopo di prevenire o ritardare la manifestazione della malattia.

ANALISI CONFORMAZIONALE DI PROTEINE AMILOIDOGENICHE

Maria Monti, Daniela Pagnozzi e Piero Pucci

Dipartimento di Chimica Organica e Biochimica e CEINGE Biotecnologie Avanzate, scarl Università Federico II di Napoli, via Comunale Margherita 482, Napoli.

Con il termine amiloidosi si intendono un gran numero di patologie, quali il morbo di Alzheimer, l'encefalopatia spongiforme, l'amiloidosi correlata ad emodialisi ecc., associate alla presenza in diversi tessuti di aggregati proteici ordinati, detti fibrille amiloidi. Il fenomeno dell'aggregazione è innescato da una parziale destrutturazione della conformazione nativa della proteina coinvolta nella patologia, che porta alla formazione di una popolazione di stati intermedi con una forte tendenza ad aggregare. In molti casi è stato dimostrato che la patologia è causata da una mutazione nel gene che codifica la proteina, ma per molti altri le motivazioni sono ancora del tutto ignote. Sebbene queste sindromi siano generate dall'aggregazione di un precursore proteico specifico per ciascuna patologia, le fibrille amiloidi generate mostrano una comune struttura supersecondaria, detta β-cross, ricca di elementi β-strands.

Uno studio a livello molecolare di questo fenomeno di fibrillogenesi necessita la caratterizzazione degli intermedi transienti e degli oligomeri fibrillari. Sebbene le tecniche diffrattometriche e di risonanza magnetica nucleare siano le uniche in grado di fornire una descrizione di strutture tridimensionali di proteine ad elevata risoluzione, tuttavia esse trovano spesso difficile applicabilità nell'analisi di campioni in condizioni quasi-fisiologiche, nella descrizione di sistemi dinamici e di stati molecolari metastabili o aggregati. In questi casi si impone il ricorso a strategie alternative nell'ambito della caratterizzazione conformazionale di proteine, come la proteolisi complementare che consente di investigare sia l'esposizione superficiale che il grado di strutturazione delle diverse regioni di una molecola proteica e/o di un complesso sovramolecolare a basse concentrazioni in condizioni fisiologiche.

Gli esperimenti di proteolisi limitata vengono condotti in condizioni controllate di pH, tempo, temperatura e rapporto E/S, in modo da indirizzare l'attività delle proteasi specificamente verso le regioni più esposte e flessibili delle molecole proteiche rispetto a quelle nascoste e/o rigide. In tali condizioni, ciascuna idrolisi dà luogo ad un unico evento proteolitico con il successivo rilascio di due peptidi complementari. I prodotti di reazione sono separati mediante cromatografia liquida ad alta prestazione a fase inversa (RP-HPLC) e successivamente identificati per spettrometria di massa "elettrospray" (ES-MS) che fornisce la massa accurata della specie in esame.

Studi di proteolisi complementare sono stati impiegati nell'analisi conformazionale delle forme solubili di β 2-microglobulina (β 2-m) e sulla sua forma troncata Δ N6 β 2-m (mancante dei primi sei amminoacidi) che si ritrovano presenti nelle fibrille nei casi di amiloidosi da dialisi (DRA). La forma troncata ha mostrato un aumento di flessibilità nelle regioni N- e C-terminali rispetto alla proteina nativa. Inoltre, il loop di connessione tra gli strands V e VI, completamente digerito nella proteina nativa, diviene mascherato nella specie Δ N6 β 2-m. Tale regione potrebbe quindi costituire l'interfaccia di oligomerizzazione nel processo di fibrillogenesi. A differenza di quanto verificato sulle forme solubili, l'analisi delle fibrille di β 2-m e di \Box N6 β 2-m ha dimostrato che in entrambe le proteine la regione compresa tra i residui 20-87 risulta completamente inaccessibile alle proteasi mentre le estremità N- e C-terminale sono molto flessibili.

Esperimenti analoghi sono stati impiegati nell'analisi dell'acilfosfatasi (AcP) da muscolo umano che in presenza di trifluoroetanolo (TFE) dà luogo ad aggregati di tipo amiloide e costituisce un ottimo modello in vitro per lo studio dei fenomeni di aggregazione. Gli esperimenti sono stati condotti in parallelo allo 0%, 10% e 25% (v/v) di TFE ed i risultati ottenuti sulla proteina in condizioni native ed in presenza del 10% di TFE rivelano una analoga conformazione caratterizzata dal braccio N-terminale e lo strand IV accessibili e flessibili, mentre il nucleo centrale risulta mascherato all'azione proteolitica. Al 25% di TFE è stato invece osservato che le regioni in corrispondenza dello strand V e del loop di connessione tra lo strand I e l'elica I sono divenute

suscettibili all'attività proteolitica. Queste due regioni esposte potrebbero costituire le "facce" di propagazione nel processo di aggregazione. In presenza di fosfato, un ligando naturale della proteina, le variazioni conformazionali indotte da 25% TFE non sono più osservabili.

Infine, sono state studiate le variazioni conformazionali dell'Acilfosfatasi da Sulfolobus solfataricus (SsAcP) che analogamente alla forma umana in presenza di TFE è in grado di convertire rapidamente in aggregati fibrillari. Data la natura idrofobica della proteina, è stato necessario sviluppare una strategia analitica alternativa alla separazione HPLC per l'analisi dei prodotti di proteolisi limitata che minimizzasse l'aggregazione dei peptidi. Tale strategia consiste nell'effettuare l'analisi dei prodotti di idrolisi direttamente mediante spettrometria di massa MALDI. Inoltre, sono stati condotti anche esperimenti di scambio H/D in combinazione con analisi di spettrometria di massa. Il processo di scambio H/D riguarda la sostituzione dei protoni ammidici con deuteroni provenienti dalle molecole di solvente circostanti. La velocità con cui un protone ammidico scambia dipende sostanzialmente da due fattori: l'accessibilità al solvente ed il coinvolgimento in legami idrogeno intramolecolari. I dati MS non sono mediati sull'intera popolazione ed è quindi possibile rivelare la presenza di specie coesistenti e monitorarne le proprietà di scambio in modo individuale. Un esperimento di scambio HD/MS viene effettuato diluendo la proteina in esame con un opportuno tampone deuterato e prelevando aliquote della soluzione a tempi diversi. La reazione viene arrestata ponendo la proteina a pH 2 e 0 °C, condizioni in cui la cinetica di scambio è molto lenta. Le aliquote vengono introdotte in un sistema RP-HPLC interfacciato ad uno spettrometro di massa ad electrospray, che misura l'incremento di massa associato allo scambio dei protoni ammidici.

I risultati degli esperimenti di proteolisi limitata condotti allo 0% ed al 25% di TFE evidenziano un'analoga distribuzione dei siti preferenziali di idrolisi, suggerendo che la conformazione dell'intermedio fibrillogenico non sia molto diversa dalla struttura nativa di SsAcP. Tuttavia, le curve ottenute dagli esperimenti di scambio H/D effettuati allo 0% e 25% di TFE dimostrano che la conformazione assunta da SsAcp in presenza del 25% di TFE incorpora un maggior numero di deuteri ed è quindi leggermente più flessibile di quella della proteina nativa. Questi dati indicano che l'aggregazione di SsAcP avviene con un nuovo meccanismo che prevede la formazione di oligomeri solubili a conformazione nativa.

CELL MEMBRANES AS PRIMARY SITES OF PROTEIN AGGREGATION AND KEY TARGETS OF AGGREGATE CYTOTOXICITY

Massimo Stefani

Department of Biochemical Sciences and Research Center on the Molecular Basis of Neurodegeneration, University of Florence, V.le Morgagni 50, Florence, Italy

One of the leading theories explaining the molecular and biochemical basis of cell impairment and death in amyloid diseases proposes that toxic amyloid assemblies impair cell viability by interacting with, and destabilizing, cell membranes. The resulting alterations of membrane biochemical functions and non-specific permeabilization with derangement of ion homeostasis and oxidative stress would eventually lead to cell death. The ion channel hypothesis first proposed by Arispe in 1993¹ has been confirmed by many data showing permeabilization of natural and artificial lipid membranes exposed to early amyloid aggregates made from several peptides and proteins. Yet less information is available on the physicochemical features favouring the interaction with membranes of peptide/protein monomers or their early aggregates. Nonetheless, several lines of evidence indicate that monomer recruitment and aggregate nucleation on, oligomer interaction with, and permeabilization of, membranes depend on membrane physicochemical features such as charge, fluidity, compressibility and curvature resulting from lipid composition^{2,3}.

We sought to provide information on this topic investigating the behaviour of either the N-terminal domain of the prokaryotic HypF (HypF-N), Ure2p or Abeta peptides. Early HypF-N amyloid aggregates were previously shown to be cytotoxic whereas Ure2p is a yeast prion whose folding variants can aggregate in vitro into native-like oligomers and fibrils or into amyloid fibrils. The early amyloid or native-like oligomers of HypF-N and Ure2p, respectively, were able to interact with, permeabilize and cross the plasma membranes of exposed cultured cells^{4,5}; as a result, these underwent rapid free Ca²⁺ and ROS increases culminating with apoptotic or, in some cases necrotic, cell death. The HypF-N oligomers were also shown to permeabilize PC/PS, but not PC-only, synthetic lipid vesicles⁶. However, only the native-like fibrils of Ure2p were able to interact with the plasma membrane of exposed cells and cytotoxic, contrary to HypF-N and Ure2p mature amyloid fibrils⁵. These data suggest that protein folding variants, either in oligomers or in fibrils, non necessarily of amyloid type, can disrupt cell membrane integrity provided they are structurally modified so as to become able to interact with, and to disassemble, the membrane. This behaviour can possibly result from the exposure, in the protein assembly, of hydrophobic patches or main chain atoms resulting from monomer misfolding allowing penetration into the hydrophobic bilayer interior where their interactions are favoured.

We also investigated the vulnerability of different cultured cell types exposed to toxic aggregates of HypF-N or Abeta peptides in relation to basal biochemical equipments such as total antioxidant capacity (TAC), Ca²⁺-ATPase activity and cholesterol abundance. The resistance to HypF-N oligomers of the differing cultured cell types was positively related to the extent of basal TAC and Ca²⁺-ATPase activity and/or to the abundance of cholesterol⁷. In particular, unpublished results on the same cell line (SH-SY5Y) either differentiated (retinoic acid, D) or undifferentiated (U) indicate that the higher resistance of D versus U cells can, at least in part, be explained with a higher level of basal TAC in the former. Finally, preliminary results on the same cells in different phases of the cell cycle indicate that S-phase cells display the highest vulnerability to the aggregates possibly, among others, as a result of a significantly reduced content in membrane cholesterol. This agrees with recent data indicating that neurons exposed to Abeta peptides re-enter cell cycle but are not able to proceed beyond the S-phase and subsequently die.

PRION PROTEIN AND CAVEOLIN-1 INTERACTION IN A NEURONAL CELL LINE PRECEDE SIGNAL TRANSDUCTION REGULATING CELL SURVIVAL

Vittorio Tomasi, Mattia Toni, Enzo Spisni, Cristiana Griffoni, Spartaco Santi, Massimo Riccio

Department of Experimental Biology, University of Bologna, 40126 Bologna, Italy; Institute of Cytomorphology, CNR, 40136 Bologna, Italy.

It has been reported that cellular prion protein (PrPc) is enriched in caveolae or caveolae-like domains with caveolin-1 (Cav-1) participating to signal transduction events by Fyn kinase recruitment. By using the Glutathione-S-transferase (GST)-fusion proteins assay, we observed that PrPc strongly interacts in vitro with Cav-1. Thus, we ascertained the PrPc caveolar localization in a hypothalamic neuronal cell line (GN11), by confocal microscopy analysis, flotation on density gradient, and coimmunoprecipitation experiments. Following the anti-PrPc antibody-mediated stimulation of live GN11 cells, we observed that PrPc clustered on plasma membrane domains rich in Cav-1 in which Fyn kinase converged to be activated. After these events, a signaling cascade through p42/44 MAP kinase (Erk 1/2) was triggered, suggesting that following translocations from rafts to caveolae or caveolaelike

domains PrPc could interact with Cav-1 and induce signal transduction events.

Copyright © 2006 Mattia Toni et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Sessione "Interferenti Endocrini, Biorisanamento e Biosensori"

EFFETTO DEL DI-(2-ETILESIL) FTALATO SULLA FECONDITÀ DI ZEBRAFISH (DANIO RERIO)

Tosti Luca, Maradonna Francesca e Carnevali Oliana Dipartimento Scienze del Mare, Università Politecnica delle Marche via Brecce Bianche, 60100 Ancona, Italy; carnevali@univpm.it

Gli ftalati sono esteri dell'acido ftalico. La loro produzione mondiale nel 2004 è stata stimata in 400.000 tonnellate. Sono una famiglia di composti chimici usati nell'industria delle materie plastiche come agenti plastificanti, cioè come sostanze aggiunte al polimero per migliorarne la flessibilità e la modellabilità. Il PVC è la principale materia plastica in cui vengono impiegati. Tra gli ftalati il di-(2-etilesil) ftalato (DEHP), o dioctil ftalato (DOP), è il plastificante principe del PVC per via del suo basso costo. In tempi recenti la Commissione Europea ha bandito l'uso del DEHP nei giocattoli e nei prodotti in PVC destinati all'uso in ambienti chiusi, mentre la Food and Drug Administration ha limitato drasticamente il suo uso in campo alimentare. Le ragioni di questi divieti sono da imputare al graduale rilascio da parte del manufatto in plastica di DEHP nell'ambiente. Il DEHP possiede un basso effetto letale ma, anche a basse concentrazioni, ha effetti su alcuni organi come i polmoni, i reni, il fegato e le gonadi. A questo riguardo, alcuni studi mostrano che il DEHP è in grado di interferire con il sistema endocrino in molti mammiferi incluso l'uomo. Non sono invece ancora chiari gli effetti degli ftalati sugli organismi acquatici.

Nel presente studio è stato valutato l'effetto dello ftalato, di-(2-etilesil) ftalato (DEHP), sulla biologia riproduttiva di femmine adulte del teleosteo di acqua dolce zebrafish (*Danio rerio*). L'attenzione è stata focalizzata sugli effetti del DEHP sulla maturazione dell'ovario, sulla fecondità e sulla vitalità degli embrioni. Femmine mature di zebrafish sono state esposte in condizioni semistatiche alle concentrazioni nominali di 0,2, 2, 20 e 40 µg/L di DEHP. Un altro gruppo di femmine è stato trattato con etinil estradiolo (EE₂, 25 ng/L) e considerato come controllo positivo. Dopo tre settimane di esposizione l'Indice Gonado Somatico (GSI) è aumentato in modo significativo, rispetto al controllo, nei gruppi esposti a 0,2, 2, 20 µg/L di DEHP e nel controllo positivo ma non nelle femmine esposte alla dose maggiore di ftalato. Paragonando la frequenza delle diverse classi di oociti negli individui trattati con quella del controllo, è stato osservato un aumento degli oociti vitellogenici ed una diminuzione di quelli pre-vitellogenici nelle femmine esposte a 2 µg/L (DEHP) e a EE₂. Alle altre concentrazioni non si sono osservate variazioni significative.

Per lo studio degli effetti dello ftalato sulla fecondità e sul tasso di schiusa degli embrioni, sette maschi non trattati e 10 femmine appartenenti a ciascun gruppo esposto alle diverse dosi di ftalato sono stati messi in vasche in assenza del contaminante per due settimane. I risultati ottenuti evidenziano una riduzione del numero di embrioni prodotti di circa il 50% alle due dosi minori, di oltre il 90 % alle dosi più elevate e di circa l'80% nei trattati con EE₂. L'effetto negativo del DEHP è stato osservato anche sul tasso di schiusa degli embrioni; sorprendentemente le dose più basse di ftalato hanno evidenziato un effetto negativo maggiore, uguale a quello osservato con EE₂.

I risultati ottenuti nel presente studio mostrano chiaramente la capacità del DEHP di interferire con la maturazione ovarica, con la fecondità e con la vitalità degli embrioni; gli effetti sono risultati molto simili a quelli ottenuti con l'estrogeno sintetico EE₂. Ulteriori studi saranno finalizzati a valutare il ruolo dello ftalato nel controllo della sintesi della vitellogenina.

BIORISANAMENTO DI ACQUE INQUINATE DA DISTRUTTORI ENDOCRINI: IL

CASO DEL BISFENOLO A
Grano V. a,c, Diano N. Attanasio A., Fraconte L., Mita L., Bencivenga U., Manco I., Mita D.G.

- ^a Dip. di Medicina Sperimentale, Biotecnologie e Sezione di Biologia Molecolare, Seconda Università degli Studi di Napoli.
- ^B Istituto Nazionale Biostrutture e Biosistemi, Roma.
- ^C Istituto di Genetica e Biofisica "A. Buzzati Traverso" CNR, Napoli.
- ^D Dip. di Patologia Generale, Seconda Università di Napoli.

Obiettivo della ricerca è stato la riduzione per via enzimatica della concentrazione di "distruttori endocrini" in soluzioni acquose. Con il termine di "distruttori endocrini" si intendono quelle sostanze che interferiscono con il sistema endocrino provocando danni irreversibili al consumatore accidentale ed alla sua progenie. Sono catalogati distruttori endocrini i composti fenolici, alcuni pesticidi organofosfati o policlorurati, ed i composti idrocarburici policiclici aromatici. Tra questi, come sistema modello è stato scelto il Bisfenolo A (BPA), un distruttore endocrino con una struttura 3D molto simile all'estradiolo.

Il biorisanamento di acque contenenti Bisfenolo A è stato perseguito con bioreattori utilizzanti membrane idrofobiche su cui era stata immobilizzata laccasi da Trametes versicolor ed operanti in condizioni isoterme e non isoterme. La laccasi da Trametes versicolor è stata immobilizzata mediante la tecnica della diazotazione su membrane di Nylon graftate con glicidilmetacrilato. La degradazione del Bisfenolo A è stata seguita con un elettrodo ad ossigeno, dal momento che la reazione enzimatica ha luogo con consumo di ossigeno. La velocità della reazione enzimatica è stata studiata in funzione della concentrazione di BPA in condizioni isoterme ed in condizioni non

Si è trovato che i valori di K_m (e quindi le affinità della laccasi immobilizzata nei confronti del BPA) diminuiscono (aumentano) all'aumentare della temperatura media ed in condizioni non isoterme. Inoltre, si sono trovati significativi incrementi percentuali dell'attività enzimatica, e quindi maggiore degradazione della concentrazione del Bisfenolo A, crescenti con la differenza di temperatura applicata. Un altro risultato interessante consiste nel fatto che i maggiori valori degli incrementi percentuali di attività enzimatica si ottengono a basse concentrazioni di BPA, cioè alle concentrazioni alle quali è presente nelle acque inquinate, data la bassa solubilità in acqua di questo distruttore endocrino. I risultati ottenuti sono discussi alla luce del processo della termodialisi che garantisce flussi addizionali di materia quando le molecole di enzima immobilizzato operano in presenza di gradienti di temperatura.

I bioreattori non isotermi utilizzanti laccasi immobilizzata sono risultati essere un sistema interessante ed efficiente nella biorimediazione di acque inquinate da "distruttori endocrini".

In stampa su: Applied catalysis: Environmental

MECCANISMI ALLA BASE DEGLI EFFETTI ANTI-ESTROGENICI DEI FLAVONOIDI: L'ESEMPIO DELLA NARINGENINA

Maria Marino

Dipartimento di Biologia, Università 'Roma Tre', V.le G.Marconi, 446 –I 00146 – Roma Italy

I flavonoidi rappresentano un grande gruppo di composti non-nutrienti prodotti dalle piante come parte dei loro meccanismi di difesa nei confronti di stress di varia natura. Questi composti, noti fin dagli anni '40 come la causa principale della sterilità che colpiva gli allevamenti di ovini in Australia, hanno recentemente attratto l'interesse dei ricercatori per il loro potenziale effetto protettivo nei confronti di diverse patologie degenerative umane. Queste evidenze hanno portato a raccomandare l'aumento del consumo di cibo contenente alte concentrazioni di flavonoidi i quali sono, attualmente, disponibili anche come prodotti da banco. Questo aumentato consumo di flavonoidi avviene nonostante il loro meccanismo di azione non sia completamente chiarito. Infatti questi composti sono stati descritti come estrogeno-mimetici o anti-estrogeni o, per alcuni effetti, indipendenti dagli estrogeni. Così la stessa molecola viene descritta come interferente endocrino, come estrogeno mimetico o come antiossidante senza nessun effetto estrogenico. In parte queste divergenze sono dovute alla complessità del meccanismo di azione degli estrogeni che agiscono attraverso due isoforme di recettore e attraverso distinte vie di traduzione del segnale.

In questo lavoro è stata valutata la capacità di diversi flavonoidi, ed in particolare della naringenina, di attivare specifiche vie di traduzione del segnale in presenza di una delle due isoforme di recettore per gli estrogeni. I risultati mostrano che la naringenina agisce come estrogeno mimetico in presenza della isoforma beta del recettore per gli estrogeni, mentre in presenza dell'isoforma alfa gli effetti di questo flavonoide sono anti-estrogenici. I meccanismi alla base di questi effetti coinvolgono il rapido distacco di questa isoforma di recettore dalla membrana e cambiamenti conformazionali che non consentono a questo recettore di associarsi con proteine ad attività chinasica importanti per la progressione del ciclo cellulare. D'altra parte il legame della naringenina con l'isoforma alfa del recettore per gli estrogeni rapidamente attiva la fosforilazione della proteina p38 attivando una cascata pro-apoptotica.

Queste vie di segnale evidenziando nuovi meccanismi alla base dell'effetto anti-estrogenico dei flavonoidi mettono in evidenza la necessità di indagare a fondo sull'azione di questi composti per la corretta predizione dei loro effetti sulla salute umana.

MISURA DEL BISFENOLO A TRAMITE UN NUOVO BIOSENSORE ELETTROCHIMICO

Danila Moscone

Dipartimento Scienze e Tecnologie Chimiche, Università di Roma Tor Vergata, Via della Ricerca Scientifica, Rome, Italy, e-mail: moscone@uniroma2.it.

Il bisfenolo A è tra i composti maggiormente impiegati a livello industriale, tuttavia è ritenuto un interferente endocrino poiché attiva lo stesso fattore di trascrizione del 17 β -estradiolo. La sua misura risulta quindi essere di grande interesse per la salvaguardia dell'ambiente e della salute.

La misura elettrochimica diretta del bisfenolo A, come per i composti fenolici in generale, è caratterizzata dalla passivazione della superficie elettrodica. Un metodo alternativo è l'utilizzo di un biosensore ottenuto utilizzando l'enzima tirosinasi, che catalizza l'idrossilazione di composti fenolici, con la conseguente ossidazione *o*-fenolo a *o*-chinone.

In questo lavoro di ricerca sono stati studiati diversi enzimi, quali tirosinasi, laccasi e perossidasi immobilizzati nella pasta di carbone. Il biosensore con la tirosinasi, in condizioni ottimizzate di pH, potenziale applicato (-150 mV) e concentrazione di enzima, ha mostrato limite di rilevabilità (LOD) di 0,2 μ M. Per ottenere una maggiore sensibilità sono state inoltre analizzate diverse tipologie di carbone: polvere di carbone vetroso, nanotubi a parete multipla e a parete singola. Il biosensore ottenuto con nanotubi a parete singola, ha effettivamente mostrato un LOD pari a 0.02 μ M (\cong 5 ppb).

Sessione "Chimica nei Sistemi Biologici"

LANTHANIDE-BASED PROBES FOR MR-MOLECULAR IMAGING INVESTIGATIONS

Silvio Aime

Department of Chemistry, University of Torino, Via P.Giuria 7 – Torino - ITALY

The development of high sensitive, targeting and responsive agents is a major challenge to enhance the role of MRI in the field of Molecular Imaging applications.

Understanding the relationships between structure and dynamics of Lanthanide(III) chelates has been fundamental for the development of high sensitive Gd(III) based agents.

From targeting Human Serum Albumin for the development of angiographic agents, our research efforts are now addressing the visualization of molecules (characterizing diseased states) that are present at much lower concentration.

The need of targeting molecules that are present at very low concentration requires the development of a novel class of contrast agents characterized by higher contrasting ability and improved targeting capabilities.

Interesting insights on nano-sized structure containing Gd(III) ions have been gained to suggest that innovative approaches to high relaxivity agents may also be possible. As far as the delivery of a large number of Gd-complexes at the targeting sites is concerned, several systems are currently under intense scrutiny, including dendrimers, liposomes and other form of lipophilic aggregates.

Much attention is currently devoted to CEST agents that represent an emerging class of MRI contrast media of huge potential. They act as negative agents by reducing the signal intensity of water protons through a saturation transfer mediated by chemical exchange. The great potential of CEST agents lies on the possibility of switching on and off the contrast at will, making possible the detection of more agents, each uniquely characterized by specific frequency of their mobile protons. Marked sensitivity improvements have been obtained by using as source of mobile protons the water molecules contained in the inner cavity of liposomes, properly shifted by the addition of a shift reagent.

INTERAZIONE DELL'UBIQUITINA CON IL RAME: EFFETTI SULLA STABILITÀ DELLA PROTEINA E POSSIBILI IMPLICAZIONI PER LA POLIUBIQUITINAZIONE SU Lys 63

Fabio Arnesano^a, Simone Scintilla^a, Giovanni Natile^a, Danilo Milardi^b and Enrico Rizzarelli^b
^a Dipartimento Farmaco-Chimico, Università di Bari, via E. Orabona 4, 70125, Bari;
e-mail: arnesano@farmchim.uniba.it

^b Dipartmento di Chimica, Università di Catania, e Istituto di Biostrutture e Bioimmagini-CNR, v.le A. Doria 6, 95125, Catania

Un indicatore del danno neuronale in pazienti affetti da malattie neurodegenerative è la comparsa di aggregati contenenti ubiquitina, che non possono essere degradati dal proteasoma. Negli amiloidi è stata inoltre riscontrata la presenza di cationi divalenti, ed in particolare di ioni Cu(II). Lo studio dell'interazione tra cationi divalenti e ubiquitina (Ub) è quindi di estrema importanza per l'identificazione di cambiamenti conformazionali indotti dai metalli, che possono causare una destabilizzazione della struttura della proteina e dare inizio a fenomeni di aggregazione.

Misure di calorimetria differenziale a scansione mostrano che la stabilità termica di Ub viene influenzata in maniera diversa dai cationi divalenti: Cu(II) causa la destabilizzazione di Ub rispetto alla denaturazione termica, mentre non si osserva nessun effetto nel caso di cationi come Zn, Ni e Cd. Misure di light scattering non mostrano oligomerizzazione della proteina fino ad un rapporto 6:1, Cu(II):Ub. Tuttavia con il tempo si osserva la formazione di aggregati su scala microscopica, probabilmente originati dall'interazione del rame con molecole di proteina parzialmente denaturata. Spettri di massa a ionizzazione electrospray registrati su campioni di proteina in presenza di rame in rapporti crescenti Cu(II):Ub indicano il legame di un primo e di un secondo ione Cu(II), in accordo con gli spettri EPR a pH neutro che mostrano due gruppi di segnali caratteristici, che corrispondono a due siti tetragonali di Cu(II) di tipo II.

La titolazione di Ub con Cu(II) può essere seguita mediante spettroscopia NMR utilizzando un campione di proteina marcata isotopicamente con ¹⁵N e ¹³C. Gli esperimenti NMR indicano che il primo ione Cu(II) si lega ad un sito comprendente la regione N-terminale della proteina (residui 1-3) ed alcuni aminoacidi spazialmente vicini ad essa (residui 16-18 e 64), come dedotto dagli allargamenti di riga e dagli effetti di shift di pseudocontatto dovuti al paramagnetismo dello ione Cu(II). L'aggiunta di Cu(II) oltre il rapporto 1:1 produce cambiamenti spettrali nella regione intorno a His 68. Il dicroismo circolare (CD) nella regione del lontano UV indica cambiamenti minimi nella struttura secondaria della proteina in seguito al legame di Cu(II), mentre le bande CD nel vicino UV forniscono un'ulteriore conferma del legame del metallo all'NH₂ terminale. Dal momento che i primi aminoacidi sono coinvolti nella formazione di un □-strand, Cu(II) potrebbe destabilizzare la proteina a partire dalla regione N-terminale. In particolare, Met 1 è coinvolta in due legami a idrogeno: il primo intercorre tra il gruppo NH₂ terminale ed il CO di Val 17, ed il secondo tra lo zolfo della catena laterale di Met 1 e l'NH ammidico di Lys 63. Questo dato suggerisce che l'interazione di Cu(II) con Ub potrebbe interferire con processi di signaling in vivo regolati dalla poliubiquitinazione su Lys 63, tra cui la degradazione nei lisosomi di proteine di membrana e di canali ionici.

SYNTHETIC PEPTIDE LIBRARIES AS A SOURCE OF NEW PROTEIN LIGANDS

Menotti Ruvo

Istituto di Biostrutture e Bioimmagini, CNR, via Mezzocannone, 16 – 80134 Napoli Email: menotti.ruvo@unina.it

The generation and screening of large arrays of peptides obtained by synthetic as well as biological methods, is a valuable approach to identify new protein ligands (Verdoliva et al. 2005; Meyer et al. 2006), new antibody epitopes (Hamby et al. 2005; Feinmesser et al. 2006), new enzyme inhibitors (Jose J et al. 2005), new imaging agents (Kelly et al. 2006) and more in general, new active compounds (Link et al. 2006; Marino et al 2001).

We currently use this approach to select new molecule acting as antagonists of receptors involved in a number of diseases or as affinity ligands for the purification of proteins of therapeutic interest. Peptide libraries are produced by solid phase synthesis applying combinatorial methods to produce huge, but rational mixtures of linear, cyclic or branched structures. The mixtures are then characterized by mass spectrometry techniques and iteratively screened in a deconvolution process using a variety of ELISA-based assays. Examples comprising IgG's and a1-antitrypsin peptide ligands and Cripto, Flt-1 and Gadd45beta antagonists will be presented and discussed, preceded by a short overview on general methods for libraries preparation, characterization and screening.

References

- Feinmesser M, Raiter A, Hardy B. Int J Oncol. 2006 Oct;29(4):911-7.
- Hamby CV, Llibre M, Utpat S, Wormser GP. Clin Diagn Lab Immunol. 2005 Jul;12(7):801-7.
- Jose J, Betscheider D, Zangen D. Anal Biochem. 2005 Nov 15;346(2):258-67. Epub 2005 Sep 1.
- Kelly KA, Clemons PA, Yu AM, Weissleder R. Mol Imaging. 2006 Jan-Mar;5(1):24-30.
- Link AJ, Vink MK, Agard NJ, Prescher JA, Bertozzi CR, Tirrell DA. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Jul 5;103(27):10180-5. Epub 2006 Jun 26.
- Marino M, Ruvo M, De Falco S, Fassina G. Nat Biotechnol. 2000 Jul;18(7):735-9.
- Meyer SC, Gaj T, Ghosh I. Chem Biol Drug Des. 2006 Jul;68(1):3-10.
- Verdoliva A, Marasco D, De Capua A, Saporito A, Bellofiore P, Manfredi V, Fattorusso R, Pedone C, Ruvo M. Chembiochem. 2005 Jul;6(7):1242-53.

SVILUPPO DI NUOVI FARMACI E DIAGNOSTICI ANTITUMORALI E DI NUOVI PROCESSI INDUSTRIALI DI BIOCATALISI E BIORISANAMENTO DALLO STUDIO DI METALLOENZIMI.

Andrea Scozzafava, Dipartimento di Chimica, Universita' di Firenze

Il mio gruppo di ricerca si occupa dello studio e caratterizzazione di metalloenzimi. Intendo nella mia presentazione riportare in breve alcuni tra i risultati piu' significativi raggiunti in questi anni, che riguardano l'anidrasi carbonica, le clorodiossigenasi e le laccasi.

L'anidrasi carbonica (CA), che converte l'anidride carbonica in bicarbonato, e' uno zinco enzima su cui noi lavoriamo da lungo tempo, di cui sono finora note ben 16 isoforme (15 nel nostro organismo) e i cui inibitori erano principalmente usati nella terapia antiglaucoma. (1-3) Negli ultimi anni si e'pero' avuto uno sviluppo inaspettato con la scoperta che in molti tumori (es del rene) si ha una overespressione dell'isoenzima CA IX. Pertanto la CA attraverso questo isoenzima e' divenuto il bersaglio di nuovi mezzi diagnostici e terapeutici per la cura del tumore, che stiamo attualmente sviluppando (4,5).

La capacita' dei sistemi viventi di utilizzare l'ossigeno atmosferico per idrossilare sostanze aromatiche e' un qualcosa di estremamente affascinante per noi chimici che conosciamo le difficolta' sintetiche connesse con tali ossidazioni. Per questo ci siamo occupati di diossigenasi idrossilanti e di quelle cosiddette "ad apertura di anello" con lo scopo di creare nuove metodiche biosintetiche per l'ottenimento di "fine chemicals" (6) Tra l'altro siamo riusciti a risolvere le prime strutture, e tutt'ora le uniche in letteratura, delle diossigenasi competenti per l'apertura dei clorocatecoli variante sostituiti (3 e 4 clorocatecoli), clorocatecoli che si generano durante la biodegradazione dei cloroaromatici e che inibendo gli ulteriori step biodegradativi costituiscono un grosso problema ambientale. (7,8)

Infine la possibilita' di imitare la natura che accoppia l'azione dei batteri a quello dei funghi per la degradazione delle sostanze aromatiche ci ha condotto piu' recentemente alla caratterizzazione di molte laccasi. (9) Aspetti applicativi di questi enzimi, ad esempio alla decolorazione delle acque di tintoria dell'industria tessile, sono attualmente allo studio.

Referenze

- 1) Scozzafava A. et al Carbonic anhydrase inhibitors. Med Res Rev. 2003 Mar;23(2):146-89.
- 2) Supuran, C.T.; Scozzafava, A.; Conway J. Eds., Carbonic Anhydrase Its Inhibitors and Activators, CRC Press, Boca Raton (FL), USA, 2004, pp. 1-364
- 3) Scozzafava A. et al Therapeutic potential of sulfamides as enzyme inhibitors. Med Res Rev. 2006 May 18
- 4) Scozzafava A. et al. Hypoxia activates the capacity of tumor-associated carbonic anhydrase IX to acidify extracellular pH. FEBS Lett. 2004 577(3):439-45.
- 5) Scozzafava A. et al. Carbonic Anhydrase Inhibitors: Hypoxia-Activatable Sulfonamides Incorporating Disulfide Bonds that Target the Tumor-Associated Isoform IX. J Med Chem. 2006, 49(18):5544-5551.
- 6) Scozzafava et al. Efficient polycyclic aromatic hydrocarbons dihydroxylation in direct micellar systems. Biotechnol Bioeng. 2001, 74(3):240-8.
- 7) Scozzafava A, et al Crystal structure of the hydroxyquinol 1,2-dioxygenase from Nocardioides simplex 3E, a key enzyme involved in polychlorinated aromatics biodegradation. J Biol Chem. 2005, 280(22):21144-54.
- 8) Scozzafava A. et al. Crystal structure of 3-chlorocatechol 1,2-dioxygenase key enzyme of a new modified orthopathway from the Gram-positive Rhodococcus opacus 1CP grown on 2-chlorophenol. J Mol Biol. 2006, 360(4):788-99
- 9) Scozzafava et al. Crystallization and preliminary structure analysis of the blue laccase from the ligninolytic fungus Panus tigrinus. Acta Crystallograph Sect F Struct Biol Cryst Commun. 2005 61(Pt 2):205-7

PORPHYRIN GALACTOSE CONJUGATES

Antonino Puglisi, Roberta D'Agata, Valeria Lanza, Giuseppe Spoto, Graziella Vecchio, *Dipartimento di Scienze Chimiche, University of Catania, V.le A.Doria 6, 95125 Catania, Italy.*

Lectins are a class of proteins which specifically recognize mono, oligo or polysaccharide structures. [i] In the recent years it has been shown that some animal lectins, galectins, are important mediators in inflammatory diseases and are related to tumor transformation. [ii, iii]

The important role lectins play in recognition processes has prompted efforts to synthesize glycoconjugates of small molecules [iv' v] or proteins, such as albumin or SOD, [vi] to be specifically bound to a selected lectin. One of the objectives has been to develop certain carbohydrate conjugates, which could target the galectins known for their high expression in a variety of malignant tissues or the asialoglycoprotein widely exploited for liver targeting.

The porphyrins are very investigated systems in different fields: supramolecular, bioinorganic, analytical and medicinal chemistry. A number of porphyrin conjugated with carbohydrates have been reported in the Literaturevii with different applications. Generally the sugars have been added to modulate lypophobicity of the molecules.

In this perspective, we report here on the synthesis, the characterization and the study of the affinity to the *Ricinus Communis Agglutinin* (RCA I) lectin, of porphyrin derivatives of galactose. Particularly we have synthesized the 5,10,15,20-tetra-hydroxyphenyl-porphyrin (THPP) conjugated with one or more galactose unit. The ligands have been characterized by NMR, MS and their interaction with the lectin RCA I have been investigated by SPR. The calculated values for the interaction of porphyrin derivatives and the RCA I range between 8.0 x 10^6 M⁻¹ and 6.5 x 10^7 M⁻¹. Such values are in agreement with those reported for the interaction of RCA I with glycoside ligands (K_A = 1.2 x 10^7 M⁻¹) and demonstrate that the porphyrin component does not significantly modify the ability of the RCA I to interact with the galactose unit.

The SOD like activity of the manganese complexes of the water soluble conjugates have been also investigated by Fridovich method.

The new THPP-galactose conjugates are able to selectively interact with an animal lectin model and could be recognized by specific proteins. This new feature of the bioconjugates is expected to improve the therapeutic applicability of the porphyrins, as for instance the SOD like activity investigated for these systems.

References

- 1 S.Elgavich, B.Shaanan Trends Biochem. Sci. 1997, 22, 462-467.
- 1 H. J. Gabius Eur. J. Biochem. 1997, 243, 543-576.
- 1 J. Almkvist, A. Karsson *Glycoconjugate*. J. 2004, 19, 575-581.
- 1 M.Hashida, H.Hirabayashi, M.Nishikawa, Y.Takakura J.Control.Release 1997, 46, 129-137.
- 1 M. Hashida, K.Akamatsu, M.Nishikawa, F.Yamashita, Y.Takamura J. Control. Release 1999, 62, 253-262.
- 1 M.Nisikawa, H.Hirabayashi, Y.Takakura, M.Hashida, Pharm. Res. 1995, 12, 209-214
- 1 A.A.Aksenova, Y.L.Sebyakin, A.F.Mironov Russian J. Bioinorg. Chem. 29, 201-219 (2003)

Sessione "Nanobiotecnologie e Bioinformatica"

BIOINFORMATICS FOR SYSTEMS AND SYNTHETIC BIOLOGY

Rita Casadio

Biocomputing Group, CIRB/Department of Biology, University of Bologna, Via Irnerio, 42-40126 Bologna, Tel:+39-051-2094005; Fax: +39-051-242576, E-mail: casadio@alma.unibo.it, http://www.biocomp.unibo.it

Biologists for decades have adopted a reductionist approach to investigate the secret of life. In recent years however, thanks to the genome sequencing efforts, new/old disciplines gained prominence with the specific aim of studying at a global scale biological processes in terms of their molecular constituents and their functional interactions. This is the case of Systems Biology, not new in terms of name and definition that presently takes advantage of new technological developments to investigate biological processes at cell, organism or communicative level. Based on high-throughput quantitative measurements, Systems Biology adopts computational modelling, mathematical, control and optimization theories with the purpose of reconstructing cellular systems and their functioning. Even more recently, Synthetic Biology seeks to engineer complex artificial biological systems starting from molecular components to investigate natural biological phenomena for a variety of applications to come. Can Bioinformatics gap the bridge from molecular to multilevel and integrated modelling and be the link among Systems and Synthetic Biology?

One major problem in large-sequence projects is the annotation of those genes which have no counterpart in the database of presently known sequences with a given function. And then we may ask: can we contribute to the annotation process with predictive methods?

Our group has implemented machine learning-based predictors capable of performing with some success in different tasks, including the topology of membrane proteins and porins and the presence of signal peptides. All our predictors take advantage of evolution information derived from the structural alignments of homologous proteins and derived from the sequence and structure databases. We integrated our tools in suits of programs (HUNTER, MANHUNTER), which take as input the proteomes both of prokaryots and eukaryiots, predict subcellular localisation with BaCello, a new developed predictor, and then based upon predictive scores, cluster globular, inner and outer membrane proteins.

IL LABORATORIO DI INGEGNERIA CELLULARE E CELLULARE PER LO STUDIO DEI BIONANOSISTEMI

Silvio Cavalcanti[†], Marco Tartagni^{†,‡}, Emanuele Giordano[§]

- † Dipartimento di elettronica, Informatica e Sistemistica Università di Bologna
- ‡ Centro di eccellenza ARCES Università di Bologna
- § Dipartimento di Biochimica "G. Moruzzi" Università di Bologna

La conoscenza dei principi di funzionamento dei sistemi biologici, su scala cellulare e molecolare. sta ispirando l'ideazione di nuovi dispositivi e di nuove tecnologie d'interesse per l'ingegneria. In particolare, il materiale biologico che è alla base delle funzioni cellulare (DNA e proteine) ha delle proprietà notevoli, tra cui quella di svolgere operazioni e processi su scala nanometrica. Queste biomolecole rappresentano una risorsa nuova nel campo dell'ingegneri e l'integrazione di questo materiale con tecnologie già consolidate, come quelle impiegate dall'elettronica, rappresenta una innovazione di grande rilievo. Per permettere la formazione e la ricerca in questo settore è stato recentemente allestito, presso la II Facoltà di Ingegneria dell'Università di Bologna, il laboratorio di Ingegneria Cellulare e Molecolare per lo studio dei Bionanosistemi. Le ricerche in corso in questo laboratorio sono orientate allo studio di sistemi artificiali miniaturizzati che sfruttano le proprietà dei costituenti molecolari delle cellule per realizzare funzioni di interesse per la industria biomedica. La progettazione di questi sistemi richiede un approccio multidisciplinare, con l'integrazione di competenze di Ingegneria, Biochimica, Biologia e Medicina. Il laboratorio è stato costituito per favorire questo processo d'integrazione. Il laboratorio è dotato della strumentazione necessaria per la coltura e la manipolazione di linee cellulari e dei suoi costituenti molecolari ed è inserito in importanti progetti di ricerca nazionali ed internazionali nel settore delle bionanotecnologie.

Una ricerca di notevole interesse¹ che è attualmente in corso presso il laboratorio si propone di utilizzare delle proteine integrali di membrana, estratte da cellule viventi, come elemento sensibile di un dispositivo elettronico. Le proteine che si stanno utilizzando (CFTR, MthK, KvAP) sono in grado di formare canali ionici e di modificare la conduttanza del canale in seguito a stimolazione chimica o fisica, svolgendo così la funzione di sensori. Queste proteine vengono integrate in un doppio strato fosfolipidico artificiale e mediante un apposito circuito elettronico che funziona da trasduttore, si convertono i cambi di conduttanza in segnali elettrici. L'integrazione di una componente molecolare in un rivelatore elettronico rientra nell'ambito dello studio di biosensori basati su tecnologie biomorfe e mixed-domain. In questo ambito, l'utilizzo di proteine integrale di membrana come componente sensibile rappresenta un elemento di novità. Dispositivi elettronici miniaturizzati capaci di rilevare stimoli fisici o chimici mediante una componente molecolare potranno trovare rapide applicazioni in biologia, farmacologia, medicina, ambiente e sicurezza. In particolare, dispositivi in grado di rilevare l'azione specifica di macromolecole sulla componente proteica rappresentano un traguardo di fondamentale importanza per gli studi di proteomica funzionale, per la ricerca farmacologica, per il monitoraggio ambientale e per la sicurezza in ambito civile e militare. Tali dispositivi sono di particolare interesse in campo biomedico per le potenziali applicazioni alla diagnostica ed alla terapia. Sul lungo periodo, la capacità del costituente molecolare di operare un'elaborazione dello stimolo (selettività, filtraggio, amplificazione, etc) potrebbe permettere di potenziare le funzioni degli attuali processori elettronici. L'elevato parallelismo delle operazioni che possono essere svolte a livello molecolare permette di immaginare dei dispositivi ibridi ad alte capacità di calcolo e nuovi paradigmi computazionali. Queste frontiere sono ancora da esplorare e costituiscono un sfida importante per la ricerca dei prossimi anni.

¹RECEPTRONICS (CE 6th FWP IST-NMP2 Bio-sensors for Diagnosis and Healthcare) Coordinatore Marco Tartagni

ONCOGENOMICS: FROM GENOME EXPLORATION TO PERSONALIZED TREATMENTS

Enzo Medico

Institute for Cancer Research and Treatment (IRCC), University of Torino Medical School, S.p. 142, 10060 Torino (Italy)

Biomedical research is currently facing a historical change in the perspectives and modality of gathering information about biological processes and gene functions. Genome-sequencing projects reversed the conventional approach to biomedical discovery, in which understanding a certain biological function required identification of one or more genes involved in that function. The current situation is that thousands of genes have been sequenced but still wait for any functional information to be assigned to them. The fact that genes of unknown function represent over 70% of all genes suggests that current comprehension of most biological and pathological processes is by far incomplete. This is particularly true in the case of cancer, where systematic exploration of gene function is likely to yield a huge amount of information in the next years. There are several ways of gathering information about gene function, some of which have been evolving at an incredibly high pace. For example, the DNA microarray technology currently enables mRNA expression analysis in parallel for thousands of genes. Genes with restricted, tissue/tumour-specific expression are likely to play key roles in the physiological and pathological processes specifically occurring at the expression sites. In this view, we focussed on the systematic identification of genes involved in Met-driven invasive growth. In epithelial cells, members of the Hepatocyte Growth Factor (HGF) receptor (Met) superfamily activate a genetic program involving cell-cell dissociation ("scattering"), growth and invasiveness. We explored the transcriptional response of mouse liver cells to HGF and to Epidermal Growth Factor (EGF). EGF was chosen for comparison because it does not elicit in the same cells full-blown invasive growth. Two different microarray platforms were adopted, consisting respectively of high-density spotted cDNAs (Incyte) and in-situ synthesized oligonucleotides (Affymetrix). Global exploration of 25'000 gene transcripts yielded over 1500 transcriptionally regulated sequences, corresponding to genes involved in the control of the basic biological functions underlying the invasive growth program: transcription, signal transduction, apoptosis, proliferation, cytoskeleton organization, motility and adhesion. A significant portion of the regulated genes (30%) has no currently defined function. Comparison between data obtained by the two platforms allowed identification of genes with more consistent and reproducible regulation, as novel putative targets for specific antineoplastic therapy.

GENE LEADERS IN BIOMEDICINE

Claudio Nicolini

Nanoworld Institute University of Genova Italy

A new approach for medical diagnostics and therapy named "Nanogenomics" is emerging from the interplay of bioinformatics and biomolecular microarray to a previously unforeseeable level. In a recent editorial [1] we have summarized its major features with few key examples of molecular genomics application to medicine. DNA microarrays have emerged as one of the most promising methods for the analysis of gene expression [1-4]. This technique allows the study of an immense amount of genes (about 35,000) with only one experiment and therefore can draw a picture of a whole genome. Anyway, the huge number of data coming out from microarray experiments may often raise experimental complications and difficulties in the analysis. Moreover, the greatest part of genes displayed on an array is often not directly involved in the cellular process being studied. Recently a novel bioinstrumentation named DNASER was introduced for real-time acquisition and elaboration of images from fluorescent DNA microarrays [3], along with two new alternative means to produce DNA-microarray and protein-chip were also introduced, the first based on a novel biomolecular patterning on glass [4] and the second based on the nanostructuring of porous alumina matrix for biomolecular microarray [5]. The key genes involved are typically identified by iterative searches of gene-related databases, as derived also from DNA microarray experimentation, revealing and predicting interactions between those genes, assigning scores to each of the genes according to numbers of interaction for each gene weighted by significance of each interaction, and finally applying several types of clustering algorithms to genes basing on the assigned scores [6]. All clustering algorithms applied, both hierarchical and K-means, invariably selected the same six "leader" genes involved in controlling the cell cycle of human T lymphocytes [2,6,7]. The "leader" gene" search/statistics algorithm consists in (a) iteratively searching GenBank and PubMed databases to identify the genes with proven involvement in the given cellular process, (b) query of the STRING [6,7] database to establish links between the genes, (c) assigning STRING associationbased scores to each gene, and (d) clustering of gene list according to those scores to yield the final leader gene list. The leader genes algorithm is being also applied to predicting genes involved in cell cycle progression of human T lymphocytes [2,6,7], in osteogenesis [8], in inflammatory processes and in kidney graft rejection-tolerance [9]. The leader gene approach, validated by experimental analysis using DNA microarrays on a model system, suggests a more rationale approach to such experimental techniques and methods. The application of bioinformatics studies and the identification of leader genes can predict the most important genes in a particular cellular process [10]. In this way, it could become possible to design smaller microarrays, which display only the most interesting genes for a specific cellular process and thus are much easier to interpret. Similarly protein microarrays are also used for the study of protein-protein and protein-gene interactions [11].

- 1. Nicolini, C., Nanomedicine, 1,1-5, 2006
- 2. Nicolini C, et al, Journal of Cellular Biochemistry 97, 1151-1159 (2006).
- 3. Nicolini C et al *IEEE Transaction on Nanobiosciences* 1, 67-72, (2002).
- 4. Troitsky, V, et al IEEE Transaction on Nanobiosciences 1, 73-77, (2002).
- 5. Grasso V, et al Nanotechnology 17, 795-798, (2006).
- 6. Sivozhelevov V, et al. Journal of Cellular Biochemistry 97, 1137-1150 (2006).
- 7. Giacomelli L, Nicolini C. Journal of Cellular Biochemistry, in press (2006).
- 8. Covani U, et al. Bone in press (2006).
- 9. Broward S, et al ,J.Mol Biol in press
- 10. Sivozhelevov V, et al . Bioinformatics in press.
- 11. LaBaer J, et al, Current Opinion in Chemical Biology 9, 14–19 (2005).

COMPUTATIONAL DETECTION OF ALTERNATIVE SPLICING ISOFORMS OF HUMAN GENES

Marina Mangiulli¹, Ernesto Picardi¹, Annamaria D'Erchia¹, Tiziana Castrignanò², Raffaella Rizzi³, Anna Anselmo⁴, Paola Bonizzoni³, and Graziano Pesole¹

¹ University of Bari, Dipartimento di Biochimica e Biologia Molecolare "E. Quagliariello", via Orabona, 4, Bari 70126, Italy

² Consorzio Interuniversitario per le Applicazioni di Supercalcolo per Universita` e Ricerca, CASPUR, Rome, Italy,

³ DISCo, University of Milan Bicocca, via Bicocca degli Arcimboldi, 8, Milan, 20135, Italy
 ⁴ University of Milan, Dipartimento di Scienze Biomolecolari e Biotecnologie, via Celoria 26, Milan 20133, Italy

Alternative splicing is now emerging as a major mechanism contributing to the expansion of the transcriptome and proteome complexity of multicellular organisms. The fact that a single gene locus may give rise to multiple mRNAs and protein isoforms, showing both major and subtle structural variations, is an exceptionally versatile tool in the optimization of the coding capacity of the eukaryotic genome.

The huge and continuously increasing number of genome and transcript sequences provides a essential information source for the computational detection of genes alternative splicing pattern. However, much of this information is not optimally or comprehensively used in gene annotation by current genome annotation pipelines.

We recently developed ASPIC, a novel algorithm for the investigation of alternative splicing of user submitted genes and a related web resource, based on comparative analysis of available transcript and genome data from a variety of species.

The ASPIC web resource provides graphical and tabular views of the splicing patterns of all full-length mRNA isoforms compatible with the detected splice sites of genes under investigation as well as relevant structural and functional annotation. The ASPIC web resource - available at http://www.caspur.it/ASPIC/ - is dynamically interconnected with the Ensembl and Unigene databases and also implements an upload facility.

The ASPIC software has been applied to a set of 340 human genes included in the 44 regions included in the ENCODE project and accounting for 1% of the entire human genome. The results we obtained show that about 90% of human genes undergo alternative splicing and that on average more than ten different transcript are generated by each gene thus expanding the transcriptome complexity of at least one order of magnitude with respect to its gene complement.

Acknowledgements

This work was supported by Fondo Italiano Ricerca di Base (FIRB) projects "Bioinformatica per la Genomica e la Proteomica" and "Laboratorio Italiano di Bioinformatica", EU STREP project TRANSCODE and by AIRC

Bibliography

- -Castrignano T, Rizzi R, Talamo IG, De Meo PD, Anselmo A, Bonizzoni P, Pesole G. ASPIC: a web resource for alternative splicing prediction and transcript isoforms characterization. *Nucleic Acids Res.* 2006 Jul 1;34(Web Server issue):W440-3.
- -Bonizzoni P, Rizzi R, Pesole G. Computational methods for alternative splicing prediction. *Brief Funct Genomic Proteomic*. 2006 Mar;5(1):46-51.
- -Castrignano T, De Meo PD, Grillo G, Liuni S, Mignone F, Talamo IG, Pesole G. GenoMiner: a tool for genome-wide search of coding and non-coding conserved sequence tags. *Bioinformatics*. 22: 497-499, 2006.
- -Bonizzoni P, Rizzi R, Pesole G. ASPIC: a novel method to predict the exon-intron structure of a gene that is optimally compatible to a set of transcript sequences. BMC *Bioinformatics*. 2005 Oct 5;6:244.

ABSTRACTS DEI POSTER

A NEW DEVICE AND METHOD TO SORT TOTIPOTENT STEM CELLS

Alviano F.¹, Roda B.², Fossati V.¹, Zattoni A.², Marchionni C.¹, Lanzoni G.¹, Di Tullio A.¹, Benedetti C.², Borgogelli E.², Bonsi L.¹, Reschiglian P.², Bagnara GP.^{1,3}

¹Department of Histology, Embryology, and Applied Biology, University of Bologna

²Departemnt of Chemistry "G. Ciamician", University of Bologna

Generally, it is still an open issue the possibility to sort/select totipotent/multipotent human stem cells, isolated from different sources, by means of a method that is relatively simple, inexpensive and which does not effect cell viability and differentiation ability.

Here we show a method to fractionate totipotent stem cells and their extended descendant including multipotent stem cells, such as Mesenchymal Stem Cells (MSCs). In particular MSCs, multipotent adherent stem cells, express a complex panel of surface antigens that is so rich and diversified to limit the possibility to precisely distinguish and define this population just on a immunophenotypical basis and probably contain not only "putative mesenchymal stem cells" but also sub population at different states of differentiation (1).

The invention consists in a new device and a high throughput method for a tag-less sorting/enrichment of human, living stem cells from different sources (2,3).

The method is able to sort cells based on their biophysical and morphological properties realizing a flow-gravity-assisted fractionation of the cell sample.

MSCs cells isolated from bone marrow and fetal membranes (amnion and chorion) are fractionated with the method above described. Fractions of viable cells with different morphological features are collected and in vitro expanded with full maintenance of integrity and viability. The fractionated cells can either be immediately employed or stored for further usage.

The fractionation of MSCs isolated from different sources, such as fetal membranes and bone marrow, shows substantial differences from source to source based on biophysical differences that can be revelatory of their in vitro specific differentiation potential.

³Interdepartmental Center for Cancer Research "G. Prodi", University of Bologna

¹ Wagner W., Wein F., Seckinger A., Frankhauser M., Wirkner U., Krause U., Blake C.S., Eckstein V., Ansorge W., Ho A.D. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. Exp Hematol. 2005;33,1402-1416

² Reschiglian P., Zattoni A., Roda B., Michelini E., Roda A., TRENDS in Biotechnology (23) 9, 2005

³ Patent pending 04/05/06; RM2006A000240: Metodo e dispositivo per frazionare cellule staminali totipotente.

GENE SIGNATURE OF TRAMP MICE TUMORS FOR CLASSIFICATION OF GREEN TEA CATECHINS -SENSITIVE AND -RESISTANT PROSTATE CANCER

Saverio Bettuzzi*, Maurizio Scaltriti*, Lucia Belloni*, Andrea Caporali§, Pierpaola Davalli§, Daniel Remondini°, Federica Rizzi*, Serenella Astancolle§, Arnaldo Corti§

*Dip. di Medicina Sperimentale, Università di Parma, §Dip. Di Scienze Biomediche, Università di Modena e Reggio Emilia, °Dip. Di Morfologia Veterinaria e Produzioni Animali, Università di Bologna

Introduction and Objectives

We previously found that human prostate cancer (CaP) progression is accompanied by differential expression of a panel of 8 informative genes (CLU, ODC, OAZ, AdoMetDC, SSAT, H3, Gas-1, GAPDH) some of which are metabolically related (1,2). For a better insight into the potential of this 8-gene signature in tumor detection/classification and therapeutic response, we determined, by qPCR, the expression of these informative genes in the TRAMP mice model (3).

It is known that administration of GTCs inhibits CaP development in this model (4), but fails in 20% of cases (5).

In this study we challenged the 8-gene signature alone to see whether the method could generate enough information for molecular classification of tissue specimens on the basis of the presence or absence of tumor.

In addition, the same approach was used for discrimination of GTCs-responsive from GTC-resistant CaP.

Materials and Methods

<u>Chemoprevention</u>: Mice were given 0.3% GTC extract (total GTCs 75.7%) in tap water (4).

<u>Experimental groups</u>: (1) WT (C57BL/6); (2) TRAMP/CaP (TRAMP transgenic mice not treated with GTCs spontaneously developing CaP); (3) TRAMP/GTCs (GTC-sensitive TRAMP successfully chemoprevented); and (4) TRAMP/GTCs/CaP (GTC-resistant TRAMP in which GTCs chemoprevention failed). Groups 1-3: 9 animals were sacrificed at 12, 17 and 24 weeks of age; GTC-resistant TRAMP: 9 mice were sacrificed at 24 weeks of age. They represent the final outcome and definitive failure of chemoprevention treatment. Three prostate glands were pooled together and used for RNA extraction.

<u>RT qPCR</u>: 2 mg of total RNA extracted were retro-transcripted (30 mL final volume). Real-Time PCR was performed using 1 mL of cDNA with the QuantiTectTM SYBR® Green PCR Kit (Qiagen). The qPCR data were processed by the 2-DDCt method using HPRT as housekeeping gene (6).

<u>Statistical analysis:</u> Linear Discriminant Analysis (LDA) was performed on DCt data in order to discriminate the 4 experimental groups.

Results and Conclusions

Important variations in the level of transcription of the 8 informative genes studied occurred during CaP progression in the TRAMP model, similarly to what we previously found in human specimens (1). Validation of the mRNA level of expression data was carried out by northern blot on the same RNA preparations used for qPCR. DCt qPCR data were used for multivariate LDA. LDA discriminated benign tissue from CaP moreover, GTC-sensitive TRAMP mice were discriminated from GTCs-resistant ones. The 8-gene signature successfully discriminated the cancer of untreated TRAMP mice from that of 24 week-old TRAMP mice, in which chemoprevention failed.

	GRUPPO 1	GRUPPO 2	p
--	----------	----------	---

A	WT	TRAMP/CaP + TRAMP/GTCs + TRAMP/GTCs/CaP	<0.0002
В	WT + TRAMP/GTCs	TRAMP/CaP + TRAMP/GTCs/CaP	<0.01
С	TRAMP/GTCs	TRAMP/GTCs/CaP	<0.0001
D	TRAMP/CaP	TRAMP/GTCs/CaP	<0.0001

Summary of Fisher's linear discriminant function analysis output. N° of indipendent variabiles = 8.

If confirmed in the human model, this method could provide an useful molecular information for diagnosis and prognosis of CaP, being of help in monitoring therapeutical response and taking rational decisions on different options for the managing of CaP.

References

- 1. Bettuzzi, S. Cancer Res. (2000)
- 2. Bettuzzi, S. Cancer Res. (2003)
- 3. Greenberg, N.M. PNAS (1995)
- 4. Gupta, S. PNAS (2001)
- 5. Caporali, A. Carcinogenesis (2004)
- 6. de Kok, J.B. Lab. Invest. (2005)

ESPRESSIONE DI MARKER DI DIFFERENZIAMENTO METANEFRICO INDOTTO DA ESTERI DELL'ACIDO IALURONICO E BUTIRRICO

Bianchi Francesca, La Manna Gaetano, Claudia Cavallini*, Silvia Cantoni*, Cappuccilli Maria Laura, Scolari Maria Piera, Alberto Perbellini, Ventura Carlo*, Stefoni Sergio U.O. di Nefrologia e Dialisi, Policlinico S. Orsola – Università di Bologna *Laboratory of Molecular Biology and Stem Cell Engineering - National Institute of Biostructures and Biosystems, at the Institute of Cardiology, University of Bologna, I-40138 Bologna, Italy

La possibilità di disporre di una sorgente che ci permetta di ottenere grandi quantità di tutti i tipi cellulari dei tessuti, come quella rappresentata dalle cellule staminali, apre nuovi scenari terapeutici per l'approccio a patologie cronico-degenerative, come le patologie renali. La messa a punto di un modello di differenziamento nefrogenico in vitro costituirebbe quindi una buona prospettiva per la cura di tali patologie. La recente identificazione di fenotipi molecolari di progenitori renali del mesenchima metanefrico: Cadherin 11, CD 24, RAR-alpha, stearoyl-CoA desaturase 2, 14-3-3 θ, Ewing sarcoma homolog, ha fornito il razionale scientifico per investigare se l'utilizzo di nuove molecole sintetiche a logica differenziativa potesse indurre un trans-differenziamento di cellule staminali mesenchimali in senso nefrogenico. Sono stati utilizzati monoesteri di acido ialuronico con acido butirrico (HB) ed esteri misti di acido ialuronico, butirrico e retinoico (HBR), in base alle rispettive attività di internalizzazione, mediata dal recettore CD44, dell'acido ialuronico, di apertura della cromatina da parte dell'acido butirrico e di potenziamento dell'espressione genica dell'acido retinoico. In questo studio sono state utilizzate cellule staminali mesenchimali isolate da membrane fetali (FMhMSCs), fonte ricavabile in maniera meno invasiva rispetto alle cellule staminali mesenchimali di midollo osseo, più comunemente usate. mediante l'utilizzo di dette molecole sintetiche, valutato mediante analisi dell'espressione genica nefro-specifica.

Metodi. Le cellule sono state coltivate in monostrato in terreno di coltura supplementato con il 10% di siero fetale bovino. Per indurre il differenziamento è stato aggiunto al terreno di coltura HB a concentrazioni di 1g/l, 1.5g/l, 2g/l e 3g/l e le cellule sono state lasciate in coltura per 7 giorni. Lo stesso procedimento è stato ripetuto per HBR. Ogni esperimento è stato replicato tre volte. Dopo estrazione dell'RNA e retrotrascrizione, si è valutata, mediante Real Time PCR, l'eventuale variazione di espressione dei suddetti geni.

Risultati. L'HBR, che aveva precedentemente mostrato un'azione come agente differenziante in senso cardiomiogenico, ha confermato questa sua selettività di azione, non mostrando risultati positivi in senso nefrogenico, mentre il trattamento con HB, ad una concentrazione pari a 1g/l, ha mostrato un aumento di espressione di tutti i marker in esame, dimostrando la possibilità di utilizzare un composto chimico per modificare l'espressione genica di geni nefro-specifici. Questi risultati aprono la strada a nuovi approcci nella rigenerazione cellulare in seguito a danno renale.

UNA NUOVA TECNOLOGIA PER LA PRODUZIONE DI ACQUA ULTRA-PURA DA UTILIZZARE IN EMODIALISI PARTENDO DA ACQUA POTABILE

Bianco M. ^b, Bifulco A. ^a, Ricupito A. ^b, Diano N. ^{a,b}, Grano V. ^{a,b}, Rossi S. ^b, Mita D.G. ^{a,b}

^a Dipartimento di Medicina Sperimentale, Facoltà di Medicina e Chirurgia - Seconda Università di Napoli -Via S.M. di Costantinopoli 16, 80136 Napoli.

^b Istituto di Genetica e Biofisica "A. Buzzati Traverso"-Cnr-Via P. Castellino 111, 80131 Napoli.

Un trattamento di emodialisi prevede l'impiego di circa 120 litri di acqua ultrapura che vengono portati alle condizioni fisiologiche mediante l'aggiunta di opportuni sali (dialisato). Attualmente un impianto di produzione di acqua ultrapura per emodialisi prevede tutta una serie di processi che vanno dall'utilizzo di carboni attivi, quelli di resine a scambio ionico ed osmosi inversa. Noi proponiamo una nuova tecnologia che da sola è in grado di produrre acqua ultrapura. Questa tecnologia è basata sul processo di termodialisi, brevettato anni or sono da uno di noi.

Con il nome di "termodialisi" si intende il trasporto selettivo di materia (acqua e soluti) attraverso una membrana, porosa ed idrofobica, che separa due soluzioni di uguale o differente composizione, mantenute a diverse temperature.

La termodialisi è un processo che può trovare diverse applicazioni in campo biotecnologico, pur operando a valori di temperatura, assoluta e/o come differenza, non elevati.

Per la misura delle concentrazioni ioniche sono stati impiegati un HPLC ionico ed un conduttimetro, per la misura delle concentrazioni microbiologiche si è fatto ricorso alla conta delle Unità Formanti Colonia, mentre per la misura delle endotossine è stato utilizzato il LAL test.

In questo lavoro viene valutato l'impiego di un reattore operante in condizioni non isoterme per produrre acqua ultra pura a partire da acqua potabile, non utilizzabile tal quale per uso farmaceutico. Contaminanti chimici quali ad esempio floruri, cloruri, solfati, nitrati, zinco o rame, possono provocare casi di demenza dialitica o altre patologie da accumulo cronico quali neuropatia, miopatia, anemia, ecc. I contaminanti microbiologici, principalmente i bacilli Gram-negativi, rilasciano endotossine a loro volta responsabili di reazioni pirogeniche nei pazienti.

Abbiamo condotto esperimenti utilizzando sia un reattore a geometria planare che un reattore a fibre cave. Quest'ultima configurazione consente di aumentare notevolmente la superficie di scambio, potendo così ottenere separazioni migliori a parità di volume da trattare. I risultati hanno dimostrato che utilizzando il processo di termodialisi si ottiene un'acqua corrispondente agli standards di riferimento che sono stati da tempo diffusi dall'AAMI (Association for the Advancement of Medical Instrumentation) e dalla Farmacopea Europea (Eph).

I risultati riportati hanno dimostrato che i parametri chimici e microbiologici dell'acqua ultrapura da noi prodotta rientrano negli standards di riferimento, con un abbattimento quasi del 100% dei contaminanti inizialmente presenti nell'acqua potabile.

L'ESPRESSIONE DEL FATTORE DI TRASCRIZIONE PAX-6 È AUMENTATA E L'ESPRESSIONE DELLA POMPA DEL CALCIO SERCA2 E' DIMINUITA IN CELLULE DI CRISTALLINO DI UN PAZIENTE AFFETTO DA DISTROFIA MIOTONICA DI STEINERT

- E. Bregant¹, G. Pertile², R. Spelat³, F. Marcuzzi¹, N. Passon¹, G. Damante¹, R. Lonigro¹.
- 1. Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche, sezione di Genetica, Università degli Studi di Udine.
- 2.U.O. di Oculistica, Ospedale"Sacro cuore", Negrar, Verona.
- 3. Dipartimento di Patologia e Medicina Sperimentale e Clinica, Università degli Studi di Udine

La Distrofia Miotonica di Steinert (DM 1) è una patologia neuromuscolare dell'uomo caratterizzata da una moltitudine di sintomi come debolezza muscolare, miotonia, aritmie cardiache, disfunzioni endocrine e cataratta. Questa patologia è causata da un'amplificazione di triplette CTG al 3' non tradotto del gene DMPK.

Negli individui affetti l'amplificato può variare da poche centinaia ad alcune migliaia di ripetizioni CTG. La letteratura degli ultimi anni vede la DM come una patologia da alterazione dello splicing di una serie di messaggeri diversi anche se non sono ancora chiariti del tutto i meccanismi molecolari che ne sono alla base (Kimura et al. 2005).

E' giunto alla nostra attenzione un paziente di 33 anni affetto da DM1. Il paziente presentava un amplificato eterogeneo di ripetizioni CTG alla diagnosi, con prevalenza di una popolazione allelica di circa 600 triplette al locus del gene DMPK. Oltre ai sintomi tipici della DM1 a carico dei muscoli scheletrici, il paziente presentava cataratta. L'intervento di rimozione della cataratta ci ha fornito la capsula anteriore del cristallino da cui abbiamo stabilito una coltura primaria di cellule, allo scopo di studiare i livelli di espressione del fattore di trascrizione PAX-6 e della pompa del calcio SERCA2.

PAX-6 è importante per lo sviluppo dell'occhio ed è espresso nel cristallino adulto, nel pancreas endocrino e nel cervelletto (Richardson J.et al. 1995) e dati di letteratura lo coinvolgono in diverse patologie tra cui la cataratta.

SERCA2 è anch'esso espresso nel cristallino adulto ed è importante nella regolazione dell'omeostasi del calcio. Una disregolazione dell'espressione e/o dell'attività di questa pompa è stata coinvolta in varie patologie tra cui la cataratta (Liu L. et al. 2002)

In questo studio, dalle cellule di cristallino DM in coltura e dalle linee di controllo umane CD5A e CE11560, abbiamo estratto l'RNA totale ed analizzato l'espressione di PAX-6 e SERCA2 per RT-PCR. I risultati ottenuti dimostrano un forte incremento dell'espressione del messaggero di PAX-6 e una riduzione ad un terzo dell'espressione di SERCA2 nel cristallino DM, rispetto alle linee di controllo. Questi risultati suggeriscono che anche nell'uomo, come è già stato visto nel topo, una over-espressione di PAX-6 può causare cataratta (Duncan M. et al. 2000) ed inoltre dimostrano un effettiva implicazione del gene SERCA2 in questa patologia.

Ci siamo quindi chiesti se i dati ottenuti rappresentino due eventi indipendenti della stessa patologia o se siano in qualche modo correlati.

A questo proposito abbiamo effettuato esperimenti di RNA-interference transiente del messaggero di PAX-6 in cellule CE11560 .

Mediante RT-PCR abbiamo osservato che una riduzione di circa il 50% del messaggero di PAX-6 si accompagna ad una over-espressione (circa 150%) di SERCA2, 72 ore dopo la trasfezione.

Questi dati sembrano suggerire che l'over-espressione di PAX-6 e la riduzione di espressione di SERCA2, nelle cellule di cristallino DM, sono in qualche modo correlati.

Restano da chiarire i meccanismi molecolari alla base della disregolazione genica osservata e se questi siano in qualche modo peculiari della patologia DM o della cataratta in genere.

STRUCTURAL DETERMINANTS MODULATING THE REDOX POTENTIAL OF FUNGAL LACCASES

Maria Teresa Cambria ¹, Silvia Garavaglia², Menico Rizzi² and Antonio Cambria³

¹Dipartimento di Scienze Chimiche Università di Catania, ²DiSCAFF Università del Piemonte Orientale, Novara, ³Consorzio Interuniversitario I.N.B.B. Università di Catania.

Although laccases from the fungi Coprinus cinereus (CcL), Trametes versicolor (TvL) and Rigidoporus lignosus (RIL) are highly homologous in terms of primary sequence, backbone structure and copper coordinate geometry, they show significant variations in redox potential (E°). The problem is especially relevant because they cover a wide range of E°s from the low E° laccase of CcL (500 mV) to the high E° laccases from RIL (730 mV) and TvL (780 mV). In order to investigate if structural features play a role in justifying significant variations of the redox potential, a detailed structural comparison has been carried out. It has been observed that, in the RIL laccase, at the level of the substrate binding site, the Cu1-Nd2 coordination bond was 0.30 Å longer than in the low E° CcL. This elongated bond can be explained through a stretching between the metal cation and the ligating His-457, caused by the presence of strong hydrogen bond between Glu-459 and Ser-113. As consequence of this interaction, the small α -helix bearing the T1 coordinating His-457 is displaced away from the copper thus increasing the Cu1-----N distance (1). This has an effect on the redox potential because the contribution of electrons of nitrogen lone pair decrease rendering the copper more electron deficient destabilizing the high oxidation state. Therefore the copper redox potential should increase. To validate this hypothesis we have performed Quantum Mechanical Calculations on the redox potential of the Cu²⁺---His complex by varying the copper distance from the histidine nitrogen lone pair. On the whole, the results of our calculations indicate that the hypothesis is correct. However, the hypothesized effect occurs for much higher Cu1----N bond stretching. Therefore, we suggest that many factors other than the only Cu1----N distance can be relevant for the modulation of the redox potential in laccases (2). On the basis of recent works on metalloredox proteins others general molecular determinants of reduction potential regulation in RIL are of considerable interest. 1) Destabilization effect: the presence of hydrophobic aminoacid residues in the immediate vicinity of T1 copper site raises the Cu²⁺/Cu⁺ reduction potential by a net preferential stabilization of the less charged Cu⁺ oxidation state. Particularly, Leu-458 and Leu-462 are apolar residues sited very close to T1 copper site that prevents the access of water to the metal ion. 2) Metal-ligand interactions: Cu1 lies within the plane formed by the two nitrogen atoms and the sulphur ligands. The lack of the additional fourth ligation, present in other laccases, increases the reduction potential. 3) Electrostatic interactions: analysis of electrostatic field of RIL laccase identified a region entirely positive around the T1 copper ion which could be facilitate the electron transfer from T1 to trinuclear copper center T2/T3, through an increase of redox potential.

Garavaglia, S. et al., J.Mol.Biol., (2004), 342, 1519-1531. Cambria M.T. et al., Atti Convegno Proteine 2006, Novara, 1-3 giugno 2006

CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI UMANE E TERAPIA CELLULARE DEL MIOCARDIO

S. Cantoni, C. Cavallini, F. Bianchi, N. Cerchi, I. Frascari, E. Olivi, V. Lionetti, F.A. Recchia, I. Scarlata, L. Foroni, G. Pasquinelli, F. Alviano, G.P. Bagnara, C. Ventura Laboratorio di Biologia Molecolare e Bioingegneria delle Cellule Staminali, Istituto di Cardiologia, Ospedale S. Orsola – Malpighi, Università di Bologna.

Nel miocardio adulto, la perdita di cardiomiociti in seguito a infarto miocardico o cardiomiopatie ereditarie rappresenta un fattore causale nella progressione verso lo scompenso cardiaco. Lo sviluppo di modelli ex vivo di cardiogenesi in popolazioni appropriate di cellule staminali umane adulte si configura come un obiettivo fondamentale nella prospettiva di una terapia cellulare del danno cardiaco irreversibile. Abbiamo sviluppato esteri misti dell'acido ialuronico con acido butirrico ed acido retinoico (HBR) e abbiamo dimostrato che queste molecole agiscono come nuovi potenti agenti cardiogenetici in cellule staminali mesenchimali umane (hMSCs) isolate dal midollo osseo (BMhMSCs), e da fonti alternative quali la polpa dentaria (DPhMSCs) e le membrane fetali della placenta a termine (FMhMSCs). L'HBR aumentava in maniera estremamente notevole la trascrizione dei geni GATA-4 ed Nkx-2.5, che agiscono come trascritti promotori della cardiogenesi in diverse speci animali, uomo incluso. L'esposizione all'HBR si traduceva in una elevata resa di conversione di ciascun tipo di hMSCs in cardiomiociti esprimenti sia la catena pesante della miosina sarcomerica, sia l'alfa-actinina sarcomerica. L'effetto dell'HBR era selettivo, dal momento che tale estere misto non innescava l'espressione di geni coinvolti nella miogenesi scheletrica. L'HBR induceva anche un aumento consistente dell'espressione del gene del KDR, codificante per un recettore del VEGF coinvolto nella vasculogenesi, e portava alla formazione di cellule esprimenti vWF. Queste risposte differenziative erano considerevolmente più marcate nelle FMhMSCs, rispetto alle DPhMSCs o alle BMhMSCs. FMhMSCs trapiantate in vivo in ratti sottoposti ad infarto sperimentale si differenziavano sia in elementi miocardici che endoteliali portando ad una normalizzazione della funzionalità ventricolare sinistra. Sia il differenziamento cardiovascolare degli elementi staminali trapiantati, sia la riduzione della cicatrice post-infartuale erano marcatamente più accentuate in animali che ricevevano FMhMSCs precedentemente esposte ex vivo ad HBR. Queste osservazioni dimostrano la possibilità di manipolare chimicamente un programma genico di cardiogensi in cellule staminali umane senza dover ricorrere ad approcci di trasferimento genico e potrebbero segnare le premesse per lo sviluppo di inedite strategie di ingegnerizzazione tissutale e rigenerazione miocardica.

COMPARATIVE PROTEOMIC AND MICROARRAYS ANALYSIS TO IDENTIFY MOLECULAR CHANGES ASSOCIATED TO APE1/REF-1 LOSS OF EXPRESSION.

Laura Cesaratto¹, Carlo Vascotto¹, Marta Deganuto¹, Chiara D'Ambrosio², Andrea Scaloni², Sankar Mitra³, Franco Quadrifoglio¹ and Gianluca Tell¹.

¹Department of Biomedical Sciences and Technologies, University of Udine, 33100 Udine, Italy.

²Proteomics and Mass Spectrometry Laboratory, ISPAAM, National Research Council, 80147 Naples, Italy.

³Department of Human Biological Chemistry and Genetics, University of Texas Medical Branch, Galveston, TX, USA.

APE1/Ref-1 is essential for cell protection toward oxidative stress by acting as a transcriptional regulator of antioxidant genes and as a central factor in base excision repair pathways of DNA lesions. While it is known that loss of APE1/Ref-1 expression is associated to significant biological effects, the molecular mechanisms involved in these processes are still not completely known. By using conditional gene expression knockdown by RNA interference (RNAi) technology in HeLa cell line, we inspected the molecular changes associated to APE1/Ref-1 loss of expression by both proteomics and microarrays analysis. Loss of APE1/Ref-1 expression was associated with significant increase in apoptosis, stop of cell growth, accumulation of abasic DNA damage, increase in intracellular ROS formation and oxidative stress-induced cellular damage. Proteomics analysis allowed the identification of five proteins upregulated (i.e. Annexin A3, 3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase 1, ATP-dependent RNA helicase DDX39, Chloride intracellular channel protein 3) and four proteins downregulated (i.e. Rab GDP dissociation inhibitor beta, Guanine deaminase. Coatomer subunit epsilon, Microtubule associated protein RP/EB family member 1) upon APE1/Ref-1 silencing. Microarrays data analysis showed the involvement of 1126 genes whose expression was significantly altered (550 upregulated and 576 downregulated) upon APE1/Ref-1 silencing. Validation of these data by western blot analysis confirmed the reliability of the approach. This work represents the basis for future studies on the comprehension of the causal role played by APE1/Ref-1 in regulating different biological mechanisms through the control of gene expression.

INIBITORI DELLE NICOTINAMIDE MONONUCLEOTIDE ADENILTRASFERASI UMANE COME POTENZIALI AGENTI CHEMIOTERAPICI.

F. Cimadamore¹,S. Scotti, L. Sorci e G. Magni¹

¹Istituto di Biotecnologie Biochimiche, Università Politecnica delle Marche, Ancona.

L'enzima nicotinamide mononucleotide adeniltrasferasi (NMNAT) catalizza la reazione NMN + ATP = NAD + PPi. Si tratta della tappa conclusiva comune sia alle vie di recupero che alla via biosintetica *de novo* del NAD, uno dei più noti ed importanti metaboliti cellulari.

Nell'uomo sono state identificate, clonate e purificate tre isoforme dell'NMNAT e gli enzimi ricombinanti sono stati caratterizzati in maniera estensiva da un punto di vista molecolare e biochimico. Le tre isoforme si distinguono per attività specifica, proprietà cinetiche, struttura quaternaria e localizzazione subcellulare.

A parte il ruolo centrale giocato dalle NMNAT nella biosintesi del NAD, l' interesse per questi enzimi è accresciuto dal loro coinvolgimento nel metabolismo intracellulare di una classe di potenti agenti chemioterapici il cui capostipite è rappresentato dalla tiazofurina (Tr). Questi composti vengono convertiti intracellularmente dalla nucleoside chinasi e dalle NMNAT in analoghi del NAD capaci di esplicare la loro azione oncolitica tramite una potente inibizione dell'IMP deidrogenasi, enzima chiave nella biosintesi delle purine. È stato però ampiamente dimostrato che scarsi livelli di attività NMNATasica in linee tumorali sono strettamente associati ad una forte resistenza ai trattamenti con tiazofurina dovuta all'impossibilità di convertire intracellularmente il profarmaco nel principio attivo. Delle tre NMNAT umane, abbiamo dimostrato che solamente l'isoforma 1, l'enzima più attivo della famiglia ed il principale responsabile della sintesi di NAD, è capace di utilizzare Tr con efficienza. La valutazione dell'espressione di quest'enzima è quindi predittiva dell'efficacia di una terapia a base di tiazofurina. È altamente probabile che tumori Trresistenti siano vulnerabili a trattamenti con inibitori delle NMNAT capaci di abbattere completamente l'attività trasferasica residua dovuta alle restanti NMNAT (2 e 3) così da tagliare completamente i rifornimenti di NAD alle cellule tumorali. Una terapia di questo tipo avrebbe anche il vantaggio di essere scarsamente citotossica nei confronti delle cellule sane in quanto bassi dosaggi di un buon inibitore sarebbero sufficienti per la morte del tessuto patologico. Lo sviluppo di efficaci inibitori delle NMNAT è quindi altamente auspicabile per la messa a punto di un approccio terapeutico di questo tipo. Abbiamo quindi progettato e saggiato sulle NMNAT ricombinanti l'efficacia di analoghi polifosfato del NAD e del NaAD (NADP3, NaADP3, NADP4 e NaADP4) in cui le porzioni purinica e piridinica sono collegate da un linker tri- o tetra-fosfato in modo da mimare lo stato di transizione della reazione trasferasica. I citati composti si sono rivelati inibitori per le tre NMNAT con Ki significativamente basse e rappresentano quindi un buon punto di partenza per la razionale progettazione di inibitori ancora più efficaci. La disponibilità delle strutture tridimensionali delle NMNAT è uno strumento potente per la valutazione dell'interazione di ipotetici inibitori con questi enzimi. NMNAT-2 è l'unico membro della famiglia la cui struttura 3D non è stata ancora risolta quindi, sfruttando la tecnica dell'homology modeling abbiamo predetto in silico una struttura da poter usare nella progettazione di inibitori..

L'INFLUENZA DELLA CLUSTERINA NEL TRATTAMENTO CON EGCG IN CELLULE EPITELIALI PROSTATICHE IMMORTALIZZATE CON SV40 (PNT1A)

Davoli S., Fregni G., Davalli P., Astancolle S., Corti A.

Sono da tempo noti gli effetti antiossidanti, anti-infiammatori e di inibizione della crescita cellulare che le catechine del tè verde esercitano in numerosi sistemi in vitro e in vivo. Per tali composti è stata quindi ipotizzata un'azione chemopreventiva nei confronti della patologia tumorale. L'EGCG è la catechina presente in quantità maggiore nel tè verde ed è quella a cui sono attribuiti la maggior parte degli effetti biologici.

Abbiamo sottoposto al trattamento con EGCG cellule prostatiche normali provenienti da coltura primaria e vari tipi di cellule epiteliali prostatiche, sia immortalizzate, ma non tumorigeniche (PNT1A), sia tumorigeniche (PC3 e DU145). Mentre le cellule normali non sono significativamente influenzate dal trattamento con EGCG, le altre cellule trattate mostrano un aumento dell'espressione di Clusterina e l'induzione dell'apoptosi, come indicato dall'attivazione delle caspasi.

La clusterina è una glicoproteina eterodimerica altamente conservata e presente nella maggioranza dei tessuti e fluidi corporei. Questa proteina è implicata in numerosi processi biologici; in particolare, sembra svolgere un ruolo cruciale nel processo di morte cellulare programmata.

Per indagare il ruolo della Clusterina nell'apoptosi indotta da catechine, si è proceduto alla produzione di cloni stabili di PNT1A sovraesprimenti tale proteina (PNT1A-Clu). I cloni PNT1A-Clu mostrano, rispetto ai cloni PNT1A-mock (contenenti il vettore vuoto), un rallentamento del ciclo cellulare e una maggior attivazione del processo apoptotico.

Quindi abbiamo somministrato EGCG ai cloni PNT1A-mock e PNT1A-Clu. Questo trattamento provoca una modificazione del ciclo cellulare e l'attivazione del processo apoptotico in entrambi i cloni. L'analisi della curva di crescita, ottenuta trattando i due cloni con dosi crescenti di EGCG per 24 ore, indica che il clone Clu è più sensibile alle catechine del corrispondente clone mock, mostrando una IC₅₀ significativamente più bassa ed una attivazione dell'apoptosi più massiva.

Studi effettuati in altri laboratori hanno mostrato che il trattamento con EGCG è correlato a modificazioni di localizzazione e di espressione di NF-kB. Questo fattore di trascrizione è coinvolto in fenomeni di sopravvivenza cellulare e resistenza ai farmaci.

Abbiamo perciò voluto analizzare, nel nostro sistema, se NF-kB potesse essere coinvolto nelle modificazioni indotte dal trattamento con EGCG. Per determinare le variazioni di espressione di tale proteina abbiamo sottoposto gli estratti delle cellule trattate con EGCG ad analisi Western. Nei controlli, gli estratti citoplasmatici mostrano una quantità maggiore di NF-kB nei cloni Clu rispetto ai mock. Durante il trattamento con la catechina, gli estratti citoplasmatici non mostrano modificazioni dei livelli di espressione di NF-kB nei cloni Clu, mentre si assiste ad un aumento della sua espressione nei mock.

Tenendo conto che per NF-kB è cruciale entrare nel nucleo per regolare l'espressione dei geni bersaglio, i risultati ottenuti ci suggeriscono che la presenza della clusterina sia in grado di interferire con la traslocazione nel nucleo di questo fattore e quindi impedire che vengano attivati i geni di sopravvivenza sotto il suo controllo.

LA DETERMINAZIONE NMR DELLA STRUTTURA DEL PEPTIDE N-TERMINALE DELLA PORINA MITOCONDRIALE O VDAC1 CONFERMA LE PREDIZIONI STRUTTURALI

V. De Pinto¹, A. Messina¹, F. Guarino¹, D. La Mendola², A. Magri², D. Milardi², G. Pappalardo².

¹Università di Catania, Dipartimento di Scienze Chimiche, V.le A. Doria 6, Catania, Italy; ²C.N.R., Istituto di Biostrutture e Bioimmagini, Sezione di Catania, V.le A. Doria 6, Catania, Italy;

La porina mitocondriale o VDAC è la più abbondante proteina della membrana mitocondriale esterna. Mentre la struttura terziaria delle porine batteriche è stata determinata tramite cristallografia a raggi X, la struttura terziaria delle porine eucariotiche non è stata risolta e disponiamo esclusivamente di predizioni strutturali ottenute da numerosi gruppi e con diversi approcci (1). Queste predizioni concordano però nel ritenere che la porina eucariotica utilizzi filamenti beta amfipatici per formare il poro, così come è stato visto per le porine batteriche il cui poro è formato da un unico beta-barrel per subunità. Tutte le predizioni della struttura secondaria delle porine eucariotiche concordano anche nell'individuare all'N-terminale un segmento ad alfa-elica, anch'esso possibilmente amfipatico (1). Sul ruolo strutturale e funzionale di questo segmento ad alfa-elica sono stati spesi fiumi di inchiostro e sono stati proposti vari possibili ruoli per esso. Per fare chiarezza almeno su questo aspetto strutturale della porina mitocondriale, abbiamo sintetizzato il peptide Ac-AVPPTYADLGKSARDVFTK-NH2 corrispondente agli amminoacidi 2-19 del VDAC1 umano. Questo peptide è stato analizzato mediante metodi chimico-fisici quali dicroismo circolare e DSC (Differential Scan Calorimetry) e la sua struttura è stata determinata all'NMR. L'analisi strumentale dimostra che parte del peptide è in grado di formare una alfa-elica amfipatica, come predetto (1). La struttura secondaria richiede però la presenza di un ambiente idrofobico elettronegativamente carico.

Inoltre la stessa sequenza è stata deleta in vettori di espressione ed il VDAC1 privo di questa porzione è stato espresso sia in sistemi eterologhi, al fine di purificarne una maggiore quantità per studi di ricostituzione funzionale dell'attività, che in cellule eucariotiche per seguirne il destino intracellulare. Verranno illustrati i risultati ottenuti ma è possibile dire che essi globalmente indicano che il segmento N-terminale del VDAC ha un ruolo rilevante per la modulazione dell'attività della proteina.

1) Casadio, R., Iacoboni, V., Messina, A. and De Pinto, V. (2002) FEBS Lett. 520, 1-7.

APOPTOSI INDOTTA DALL'ESTRATTO TOTALE ACETONICO DEL FRUTTO DI FEIJOA SELLOWIANA (BERG) IN CELLULE LEUCEMICHE UMANE.

Doto A¹, Bontempo P¹, Altucci L¹, Nebbioso A¹, Basile A², Sorbo S², Cioffi M^{1,3}

¹Dipartimento di Patologia Generale, ²Dipartimento di Fisiologia Vegetale, ³Scuola di Specializzazione in in Patologia Clinica Seconda Università degli Studi di Napoli. Recapito telefonico del primo autore: 0815667556

Obiettivi

È stato riscontrato che le popolazioni dei paesi tropicali e subtropicali, dove i frutti di *Feijoa sellowiana* vengono abitualmente consumati, presentano una più bassa incidenza di cancro. Il frutto ha mostrato una notevole attività batteriostatica ed antiossidante in vitro. Nel nostro lavoro abbiamo studiato il potenziale anti-cancro dell'estratto totale del frutto di *Feijoa sellowiana* e caratterizzato, a livello molecolare, le sue attività apoptotiche in modelli ematologici.

L'assenza di tossicità e l'idea di ricercare composti naturali che presentino un'attività antineoplastica potenzialmente sfruttabile in terapia, rappresenta il punto di forza del lavoro proposto. *Metodi*

È stata valutata l'efficacia biologica dell'estratto totale dei frutti di *Feijoa sellowiana* ottenuto mediante estrazione acetonica. Per ottenere la soluzione d'uso, il residuo secco è stato risospeso con poche gocce di DMSO e PBS, pHato intorno alla neutralità (pH 7,5) e filtrato. L'estratto totale è stato testato sulle linee cellulari mieloidi NB4 e U937 e su blasti ottenuti da pazienti leucemici. Dopo i trattamenti è stata effettuata l'analisi del ciclo mediante citofluorimetria a flusso (FACScalibur) e l'analisi delle caspasi è stata eseguita con il programma "Cell Quest". La comparsa di specifici markers di differenziamento è stata evidenziata al citofluorimetro (FACScan, BD) mentre mediante Western blotting è stata analizzata l'espressione di p21, p16 ed Rb. *Risultati*

I risultati ottenuti hanno evidenziato l'efficacia biologica dell'estratto del frutto di *F.sellowiana* nell'induzione dell'arresto proliferativo. Tale effetto si manifesta già dopo tre giorni di trattamento alle concentrazioni di 3.0-5.0 mg/mL. L'estratto induce nelle NB4, U937 e nei blasti provenienti da pazienti leucemici, blocco della proliferazione ed arresto del ciclo prevalentemente in fase G1. La percentuale di cellule arrestate è direttamente proporzionale all'aumento delle concentrazioni di estratto utilizzate nell'esperimento. Anche la percentuale di cellule morte è sicuramente maggiore nei campioni trattati rispetto al controllo. È stata verificata una forte induzione degli inibitori del ciclo cellulare RB, p16 e p21^{WAF1} ed una attivazione del programma apoptotico evidenziato dall'aumento dell'espressione delle caspasi 3/7 e della caspasi 8. Il trattamento con l'estratto induce anche il ripristino del differenziamento evidenziato dalla comparsa di CD11c, marker di differenziamento verso la linea granulocitica.

Conclusioni

I nostri risultati preliminari hanno confermato l'effettiva attività anticancro dell'estratto totale del frutto di Feijoa. La capacità di indurre arresto proliferativo, differenziamento cellulare ed apoptosi dell'estratto del frutto di *F.sellowiana*, potrebbe costituire un grosso potenziale terapeutico. Ciò suggerisce di caratterizzare l'attività antineoplastica di Feijoa e di identificare i principi attivi responsabili di tale attività. Questo potrebbe rappresentare un'importante punto di partenza per la ricerca di trattamenti innovativi considerando l'alta percentuale degli effetti collaterali delle chemioterapie e il fallimento di diversi trattamenti medici o chirurgici applicati alla cura del cancro.

ITX EFFECTS ON PHOSPHOLIPID MODEL MEMBRANES

Roberto Stevanato, Sabrina Fabris, Federico Momo Department of Physical Chemistry, University of Venice

ITX (2-isopropylthioxanthone) is a molecule commonly used as photoinitiator of inks for food packaging. The interest on its possible biological effects and toxicity became topical since traces of ITX ranging from tens to hundreds $\mu g/l$ were recently found in a number of packaged beverages, especially milk.

A detailed report, carried out by the European Food Safety Authority [1], asserts that a possible genotoxic effect of ITX can be excluded on the basis of in vivo existing studies, but no other toxicity data are available.

At the same time, the US Environmental Protection Agency considers ITX a potential hazard for human health and environment at lower concentrations than those found in packaged milks and other drinks [2], while episodes of reddening were observed on workers, in contact with the substance, after sunlight exposure [3].

Here we present a first DSC and spin labelling study of the interactions of ITX with model membranes, with the aim of getting information on the basic modifications induced by the substance on the lipid organisation, starting from the idea that ITX is virtually insoluble in water but highly lipophilic, and the eventuality of accumulation phenomena, in particular at the level of cell membranes, should be accounted for.

performed The experiments were on multilamellar liposomes of saturated dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC, C14:0), dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC, C16:0) and distearoylphosphatidylcholine (DSPC, C18:0) and unsaturated egg yolk phatidylcholine (EYPC) phospholipids, with and without cholesterol, and demonstrated that the molecule behaves like a disordering agent in the gel state, while tends to rigidify the membrane, in a cholesterol like way, over the transition temperature. On the basis of the experimental data, we suppose that the drug is differently located inside the bilayer: in the gel state, ITX is distributed in the interfacial region between the polar and the hydrophobic sides, while the transition to the fluid state produces the repositioning of the drug deeper in the acyl chain region.

- 1. The EFSA Journal 293 (2005) 1-15.
- 2. Flexographic Ink Options Vol. 2 Appendix 3-B US EPA 744-R-02-001B.
- 3. Pesticide & Toxic Chemical News 27, 51 (1999).

Aβ PEPTIDES OLIGOMERIZATION AND TOXICITY ARE FAVOURED BY PROGLYCATING CONDITIONS

C. Cuppari^a, G. Grasso^b, G. Perticone^a, P. Dell'Albani^c, E. Rizzarelli, A. M. Giuffrida Stella^a, V. G. Nicoletti^a

Aim of research: The conformational change and toxicity of Amyloid- β peptides are typical hallmark of Alzheimer's disease (A β) (1). The present study is aimed to elucidate the microenvironmental conditions that drive peptide assembly and conformational state changes responsible of toxicity. We analyzed the effects of A β 25-35 incubation under pro-glycating conditions on its status of aggregation and toxicity.

Materials and methods: The lyophilized peptide A β 25-35 was pre-treated with hexafluoro-2-propanol (HFIP), and incubated at 37°C for 72h in PBS (pH 7,4), alone, or in the presence of copper and/or ribose. A β 25-35 conformational changes were assayed by Dot-Blot using an anti-oligomer antibody (A-11) and Circular Dicroism (CD) measurements. A β 25-35 toxicity was tested in human neuroblastoma cells (SH-SY5Y) treated for 24h with the different A β preparations measuring cell viability by MTT and LDH release.

Results and discussion: Both AGEs and $A\beta$ peptide are components of senile plaques. Ribose is known to be the best AGE-protein forming agent in terms of time and RAGE binding affinity (1). It has been proposed that Cu(2+) binds A-beta and promotes its aggregation. The analysis of CD spectra in the UV region revealed a characteristic random coil structure of not treated $A\beta$ 25-35, and a typical β -sheet conformation for $A\beta$ 25-35 incubated under proglycating conditions. Dot-Blot analysis with a specific antibody showed a strong increase of oligomers, (about +50% vs. the freshly prepared) after $A\beta$ incubation in the presence of ribose and copper. An increase of toxicity of $A\beta$ 25-35 after incubation in the presence of ribose was observed. These results are in agreement with the notion that soluble $A\beta$ oligomers and protofilaments are particularly responsible of cell death, and demonstrate that pro-glycating microenviromental conditions cause $A\beta$ 25-35 changes toward a toxic conformation (2). Both peptide aggregation and toxicity were inhibited in the presence of the dipeptide carnosine (β -alanyl-L-histidine). New tools against amyloidogenesis, like treatment with carnosine and its derivatives, can be proposed in the study of the mechanism of glycation-induced protein cross-linking and toxicity.

Acknowledgements: Ricerca Ateneo, University of Catania, FIRB RBNE 03PX83, PRIN prot. 2005054147.

^a Department of Chemical Sciences, University of Catania. Viale A. Doria 6, 95125 Catania (Italy).

^b Institute of Biostructure and Bioimagines CNR, Catania, Viale A. Doria 6, 95125, Catania (Italy).

^c Institute of Neurological Science of National Council of Research, Viale Regina Margherita 6, 95125 Catania (Italy).

¹⁾ Gong Y. et al PNAS 2003 100(18):10417-22.

²⁾ Loske C. et al Eur. J. Biochem. 2000 267(13):4171-8.

STUDIO DELLA RESA DI UN REATTORE A COLONNA IMPACCATO CON BEADS DI POLIACRILONOTRILE (PAN) ATTIVATI CON MACER 8 IN FUNZIONE DELLA VELOCITÀ DEL FLUSSO E DEL DIVERSO GRADO DI IMPACCAMENTO

Grimaldi T., Nicolucci C., Caputo P., Grano V., Diano N., Mita D.G.

- ^a Dip. di Medicina Sperimentale, Biotecnologie e Sezione di Biologia Molecolare, Seconda Università degli Studi di Napoli.
- ^b Istituto Nazionale Biostrutture e Biosistemi, Roma.

Nella produzione industriale di succhi di frutta limpidi la fase della depectinizzazione è quella su cui maggiormente si può agire per ottimizzare la resa dell'intero processo. Per ottenere succhi di frutta limpidi sono stati utilizzati beads di poliacrilonitrile (PAN) attivati con la miscela enzimatica depectinizzante commerciale *Macer 8*.

I beads attivati hanno evidenziato una attività catalitica buona e stabile nel tempo, sia quando utilizzati in batch con soluzioni di pectina 0.5% w/v in tampone acetato pH 4.0 con 10 mM di Ca⁺⁺, sia quando impaccati in un reattore a colonna per agire su succo di mela da depectinizzare messo in ricircolazione grazie ad una pompa peristaltica ad una determinata velocità. Ulteriori prove sperimentali hanno riguardato l'ottimizzazione della resa del processo di depectinizzazione sia variando la portata di alimentazione nel reattore a colonna, in quanto il tempo di contatto tra substrato ed enzima può essere influenzato dalla velocità con cui il liquido passa attraverso la colonna e variando l'impaccamento dei beads catalitici all'interno della colonna, perché questo può influenzare la superficie di contatto tra substrato ed enzima e il grado di agitazione della soluzione. Gli effetti sono stati valutati utilizzando dei test qualitativi con etanolo che mettono in evidenza le variazioni di depectinizzazione dei succhi aventi un basso grado di viscosità.

^c Istituto di Genetica e Biofisica "A. Buzzati Traverso" - CNR, Napoli.

OTTIMIZZAZIONE DEI PARAMETRI SPERIMENTALI PER LE COLTURE CELLULARI CONNESSE DI HEPG2 E HUVEC IN BIOREATTORE MULTICOMPARTIMENTALE

M.A. Guzzardi¹, A. Ahluwalia², F. Vozzi², C. Domenici¹

- 1) Istituto di Fisiologia Clinica del C.N.R., Pisa
- 2) Centro Interdipartimentale di Ricerca "E. Piaggio", Università di Pisa, Pisa

La scoperta di una nuova molecola farmacologicamente attiva apre la strada ad un lungo periodo di testing, durante il quale vengono studiate, con particolare attenzione, le sue caratteristiche farmacocinetiche e farmacodinamiche.

La ricerca farmaceutica si avvale di numerosi test, sia *in vivo* che *in vitro*, che hanno lo scopo di prevedere quale sarà il destino del farmaco una volta introdotto nell'organismo umano. I test tradizionali che usano colture cellulari, però, non sono in grado di fornire informazioni sufficientemente accurate poiché vengono eseguiti su cellule estrapolate dal loro contesto fisiologico.

I test sugli animali, d'altra parte, seppur essenziali nella fase antecedente alla sperimentazione sull'uomo, oltre a presentare notevoli problemi etici, sono molto lunghi e costosi e, soprattutto, non danno la assoluta certezza che i dati ottenuti possano essere estesi anche agli esseri umani.

Negli ultimi anni, quindi, si è fatta sempre più pressante la necessità di sistemi innovativi capaci di mimare il più possibile, nelle sue funzioni, l'organismo umano, la cui risposta ai farmaci può presentare delle profonde differenze rispetto a quelle viste negli animali da laboratorio.

A questo scopo, presso i laboratori del Centro Interdipartimentale di Ricerca "E. Piaggio" della Facoltà di Ingegneria dell'Università di Pisa, è stato progettato un bioreattore multicompartimentale MCB, basato sull'utilizzo di leggi non lineari definite nel loro complesso "allometriche", le quali mettono in relazione tra loro vari parametri fisio-anatomici. Tale dispositivo è costituito da un network di camere che possono essere collegate in serie o in parallelo per mezzo di canali all'interno dei quali scorre il mezzo di coltura, spinto da una pompa peristaltica. In ogni camera possono essere seminati uno o più tipi cellulari e sottoposti a stimoli controllati sia di natura chimica (es. variazione di pH, introduzione di biomolecole) che meccanica (es. variazione della velocità di flusso). Il progetto finale prevede l'utilizzo di un sistema a quattro camere e quattro tipi cellulari quali cellule epatiche, endoteliali, pancreatiche ed adipose.

Obiettivo di questo studio è stato quello di ottimizzare le condizioni di coltura dei primi due tipi cellulari da introdurre all'interno della cella multicompartimentale, cioè le cellule endoteliali HUVEC, prelevate dai cordoni ombelicali, e le cellule epatiche immortalizzate HepG2.

I risultati ottenuti dimostrano l'esistenza di cross talk tra le cellule HepG2 e le HUVEC coltivate in MCB in regime dinamico anche in assenza di un'interazione fisica diretta. Entrambe, infatti, pur trovandosi in comparti separati, modificano il proprio metabolismo quando si trovano in coltura connessa: le HepG2, protette dagli stress meccanici del flusso tramite coating di alginato, incrementano sia la produzione di albumina (marker della funzione sintetica), che quella di urea (metabolita generalmente usato come marker della funzione metabolica epatica), mentre le HUVEC sembrano aumentare le produzione di NO, ma questo dato è meno significativo dei precedenti.

Questi primi risultati delineano la possibilità di utilizzare il bioreattore MCB per la comprensione dei meccanismi alla base della fisiologia e delle relazioni presenti tra tipi cellulari diversi e per simulare *in vitro* le cinetiche multicompartimentali che, attualmente, sono solo una razionalizzazione matematica del destino metabolico di xenobiotici all'interno dell'organismo.

EFFETTO DELL'EME SUL PROCESSO DI AGGREGAZIONE AMILOIDE E CITOTOSSICITÀ DEL MUTANTE W7FW14F DI APOMIOGLOBINA

C. Iannuzzi¹, S. Vilasi¹, M. Portaccio², G. Irace¹ e I. Sirangelo¹¹

- 1 Dipartimento di Biochimica e Biofisica, Seconda Università degli Studi di Napoli, Via L. De Crecchio 7, 80138 Napoli
- 2 Dipartimento di Medicina Sperimentale, Seconda Università degli Studi di Napoli, Via L. De Crecchio, 80138 Napoli

La mioglobina è una proteina globulare la cui conformazione è essenzialmente di tipo α -elicoidale e nella cui sequenza sono presenti due residui di triptofano, altamente conservati lungo la scala evolutiva in posizione 7 e 14, che giocano un ruolo chiave nel processo di folding. Infatti, recenti studi condotti nel nostro laboratorio hanno mostrato che la loro sostituzione determina un'alterazione del folding che rende la proteina rapidamente aggregabile in condizioni fisiologiche con susseguente formazione di fibrille di tipo amiloide [1].

In questa comunicazione sono riportati i dati relativi alla caratterizzazione degli eventi molecolari che sono alla base del processo di aggregazione amiloide del mutante W7FW14F. Nella maggior parte dei casi la formazione di fibrille amiloidi è la conseguenza della conversione della conformazione proteica da uno stato "folded" ad uno "unfolded" che, esponendo parzialmente i residui idrofobici al solvente, risulta più propenso all'aggregazione. Tuttavia, studi recenti suggeriscono che gli aggregati fibrillari possono avere origine dall'assemblaggio di proteine in una conformazione simile a quella del loro stato nativo. L'identificazione dello stato conformazionale da cui parte il processo di aggregazione dell'apomioglobina W7FW14F è stata effettuata seguendo la dipendenza temporale del processo mediante dicroismo circolare nel lontano UV e spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FTIR) e analizzando le caratteristiche del legame con il gruppo prostetico. I risultati ottenuti mostrano che l'aggregazione del mutante W7FW14F di apomioglobina parte da uno stato pseudo-nativo capace di legare il gruppo prostetico con proprietà simili a quelle della proteina wild type. Tuttavia, esso rapidamente aggrega formando fibrille amiloidi. Quando l'eme viene aggiunto alla proteina prima dell'inizio del processo di aggregazione, sebbene l'aggregazione non sia prevenuta, la fibrillogenesi risulta inibita. Inoltre, gli aggregati formati in queste condizioni, a differenza di quanto mostrato da tutte le proteine amiloidogene [2], non mostrano attività citotossica. Probabilmente, la capacità di alterare la vitalità cellulare è legata alla presenza di motivi strutturali che favoriscono l'interazione degli aggregati amiloidi con la membrana cellulare. Questi risultati contribuiscono a chiarire la relazione che intercorre tra struttura e citotossicità nelle proteine coinvolte nelle malattie amiloidi.

² C. Malmo et al. (2006) Faseb Journal 20 (2): 346-7.

¹ I. Sirangelo et al. (2002). Journal of Biological Chemistry, 277(48): 45887-91.

OMEOSTASI DELLA NICOTINAMIDE NELL'UOMO. STUDI PRELIMINARI SULL'ENZIMA NICOTINAMIDE FOSFORIBOSILTRASFERASI

C.Mancini, F.Mazzola, L.Marchegiani, N.Raffaelli e G.Magni Istituto di Biotecnologie Biochimiche, Università Politecnica delle Marche, Ancona

Oltre al ben noto ruolo di coenzima nelle reazioni redox, il NAD viene utilizzato quale substrato da una serie di enzimi che presiedono ad importanti processi cellulari. In particolare, la NAD glicoidrolasi, le PARP e le sirtuine idrolizzano il legame -N-glicosidico liberando nicotinamide (Nam) e formando metaboliti vari quali ADP-riboso, ADP-riboso ciclico e acetilADP-riboso implicati nei meccanismi di trasduzione del segnale.

E' interessante il fatto che tutti questi enzimi vengono inibiti da basse concentrazioni del prodotto comune delle reazioni, la Nam. E' chiaro quindi che i livelli intracellulari della vitamina debbano essere sottoposti ad uno stretto controllo.

L'enzima nicotinamide fosforibosiltrasferasi (Nampt) potrebbe svolgere un ruolo chiave in tale controllo. Esso consente il recupero dell'anello piridinico della Nam per la sintesi del NAD catalizzando il trasferimento del gruppo fosforibosile dal fosforibosilpirofosfato (PRPP) a Nam con conseguente formazione di nicotinamide mononucleotide (NMN), il diretto precursore del dinucleotide.

La Nampt è stata inizialmente isolata come una "cytokine-like protein" nota con il nome di PBEF (pre B-cell colony enhancing factor), in grado di promuovere la maturazione dei precursori dei linfociti B. Più recentemente è stato dimostrato che la proteina è anche un'adipocitochina (visfatina), iperespressa nel tessuto adiposo viscerale rispetto a quello sottocutaneo sia umano che murino, i cui livelli nel plasma aumentano durante lo sviluppo dell'obesità. La visfatina esercita un effetto insulino-simile in cellule in coltura e abbassa i livelli di glucosio del sangue murino. Essa è in grado, infatti, di legarsi e di attivare il recettore dell'insulina.

In questo lavoro è stata intrapresa la caratterizzazione biochimica della Nampt. A tale scopo RNA isolato da istiociti umani in coltura è stato retrotrascritto e il cDNA codificante la Nampt è stato amplificato usando primers specifici. Il cDNA è stato quindi clonato nel vettore pET15b. L'espressione in cellule BL21 di E. Coli ha consentito l'ottenimento di una significativa quantità di proteina ricombinante in forma solubile. L'attività enzimatica è stata determinata sia mediante saggio spettrofotometrico sia mediante HPLC. Un nuovo protocollo di separazione dell'NMN prodotto dalla Nam substrato, mediante cromatografia a fase inversa, ha permesso di rilevare anche quantità minime del prodotto della reazione. L'enzima è stato purificato ad omogeneità mediante cromatografia su Ni-NTA e sono attualmente in corso esperimenti di caratterizzazione cinetica. Risultati preliminari indicano che l'enzima ha un'alta affinità per la Nam, ma una velocità massima molto bassa, suggerendo la possibilità che l'enzima possa essere sottoposto a regolazione.

Allo scopo di studiare le caratteristiche dell'enzima secreto dalla cellula, il cDNA è stato clonato nel vettore pcDNATM3.1/myc-His per l'espressione in cellule COS-7. Sia l'attività enzimatica che la presenza della proteina verranno determinate nel terreno di crescita e negli estratti cellulari.

ESPRESSIONE DI SURVIVINA E DELLE SUE VARIANTI DI SPLICING IN PAZIENTI CON LEUCEMIA MIELOIDE ACUTA

Mita L^1 , Vietri $MT^{2,3}$, Improta A^2 , Parisi M^2 , Sessa M^3 , Di Napoli M^2 , Carbone P^2 , Molinari $AM^{1,2,\,3}$

¹Dottorato di ricerca in Diagnostica di Laboratorio: Sviluppo di Tecniche Cellulari e Molecolari e di Bioingegneria e Informatica, ²Patologia Clinica Dipartimento di Patologia Generale, ³Scuola di Specializzazione in Patologia Clinica Seconda Università degli Studi di Napoli. Recapito telefonico del primo autore: 0815665671

Area disciplinare: Oncologia

Obiettivi

La survivina, membro della famiglia delle IAPs, è una piccola proteina, strutturalmente e funzionalmente unica, che gioca un ruolo chiave nella regolazione dell'apoptosi ed il controllo del ciclo cellulare. Accanto al trascritto originariamente descritto, nuove isoforme sono state identificate.

Survivina-DeltaEx3 possiede, come survivina, attività antiapoptotica mentre survivina 2B presenta una marcata riduzione delle proprietà antiapoptotiche. Meno note sono le attività delle altre isoforme: survivina-3B manca dell'estremita C-terminale, survivina-2alfa è costituita da un dominio BIR tronco e manca del dominio coiled-coil, pertanto potrebbero avere funzioni diverse da survivina.

La survivina 3alfa, identificata nel nostro laboratorio, è costituita dagli esoni 1 e 2 da una porzione dell'introne 3, di 165 pb, e codifica per una proteina di 78 aminoacidi.

Alti livelli dell'mRNA di survivina e delle sue varianti, DeltaEx3 e 2B, sono stati riscontrati nel midollo osseo di pazienti con AML e ALL.

Obiettivo dello studio è stato valutare l'espressione di survivina, delle sue isoforme e della nuova variante survivina- 3α in blasti di pazienti affetti da Leucemia Mieloide Acuta (AML) e in progenitori mieloidi normali (CD34+).

Metodi

E' stato raccolto il sangue periferico o il midollo osseo di 33 pazienti affetti da AML.

Progenitori mieloidi normali (CD34+), utilizzati come controllo positivo e cellule mononucleate del sangue periferico, come controllo negativo, sono state prelevate da donatori sani.

Dai campioni leucemici e dai campioni dei donatori sani, le cellule sono state estratte con Ficoll. L'RNA è stato estratto e retrotrascritto. Per amplificare survivina e le sue varianti, sono stati utilizzati due set di primers (set A e B). Il set A amplifica survivina, survivina-2B, survivina-3B e survivina-DeltaEx3 e il set B che amplifica survivina 3B e 3alfa.

Per confermare le identità delle bande, i prodotti di PCR sono stati sequenziati.

Risultati

L'analisi dei blasti dei pazienti affetti da AML mostra la presenza di survivina e delle sue varianti di splicing già note in tutti i campioni analizzati.

Inoltre, l'espressione di survivina è predominante rispetto a survivina-2B, survivina-DeltaEx3 e survivina-3B.

Similmente alle altre varianti di splicing, la survivna-3alfa, non viene espressa nelle cellule mononucleate del sangue periferico, ma il trascritto è stato evidenziato nei controlli positivi CD34+.

Nei blasti leucemici di pazienti affetti da AML si osserva l'espressione della nuova variante, survivina-3alfa, in 29/33 (87,8%) dei pazienti studiati.

Conclusioni

Survivina e le sue varianti sono contemporaneamente espresse nei blasti e nei progenitori mieloidi normali CD34+, suggerendo un loro ruolo nella regolazione emopoietica normale e neoplastica.

DEVELOPMENT OF REAL-TIME PCR SYSTEMS FOR SPECIFIC QUANTITATIVE DETECTION OF *PHOMA TRACHEIPHILA* IN INFECTED *CITRUS*.

Marcella Orrù¹, Maria Antonietta Demontis¹, Barbara Scherm¹, Virgilio Balmas¹, and Quirico Migheli¹

¹ Unità di ricerca Istituto Nazionale Biostrutture e Biosistemi and Dipartimento di Protezione delle Piante - Università di Sassari, Via E. De Nicola 9, 07100 Sassari, Italy.

Real-time PCR assays based on SYBR® Green I and TaqMan® technologies have been developed for *in planta* detection and quantification of *Phoma tracheiphila*, incitant of "mal secco" on citrus. Primers and hybridization probe were designed based on the internal transcribed spacer (ITS) region of the nuclear rRNA genes. The real-time PCR assays were compared with a classical isolation method in separate experiments carried out on 6- and 24-months old sour orange seedlings which were artificially inoculated with a spore suspension of the pathogen. Both chemistries allowed us to follow the progression of infection by *P. tracheiphila*, enabling detection and quantification of the target fungus prior to the development of symptoms.

Compared to classical methods, real-time PCR proved easier and faster to perform and showed a higher sensitivity. These results suggest that real-time PCR, based on both chemistries, has a great potential for early diagnosis of "mal secco" disease.

NMR SOLUTION STRUCTURE OF THE ACYLPHOSPHATASE FROM ESCHERICHIA COLI

Katiuscia Pagano^a, Matteo Ramazzotti^b, Paolo Viglino^a, Gennaro Esposito^a, Donatella Degl_Innocenti^b, Niccolo` Taddei^b & Alessandra Corazza^a

^aDepartment of Biomedical Sciences and Technologies, University of Udine, Udine, Italy; ^bDepartment of Biochemical Sciences, University of Florence, Florence, Italy

Acylphosphatase (AcP) is one of the smallest enzyme known and is widely expressed in different organisms, including man [1]. It catalyses the hydrolysis of acylphosphates, both synthetic and of physiological relevance [1]. Although it has been proposed that AcP might play a role in the regulation of calcium transport across membranes or in the control of the glycolytic flux, the exact function of the enzyme remains to be established.

An AcP from E.coli was isolated and characterised very recently (manuscript submitted for publication). Despite a remarkable sequence conservation, E.coli AcP shows at least two distinctive differences compared to the AcPs from eukarya: a higher conformational stability and a dramatically reduced catalytic activity; in addition, the protein contains two cysteine residues forming a disulfide bond in the native state, an unprecedented feature in the whole AcP family. In the present work the solution structure has been determined by multidimensional 1 H and 15 N NMR, and restrained modelling calculation. In analogy with the other members of AcP family, E.coli AcP shows an \Box/\Box sandwich domain composed of four antiparallel and one parallel \Box -strand, assembled in a five-stranded \Box -sheet facing two antiparallel \Box -helices. The pairwise RMSD values calculated for the backbone atoms of E.coli and Sulfolobus solfataricus AcP [2], Bovine common type AcP [3] and Horse muscle AcP [4] are 2.18, 5.31 and 5.12 Å, respectively.

The distinctive features of this enzyme make its three-dimensional structure a fundamental prerequisite for any further study.

^[1] Stefani M, Taddei N and Ramponi G. (1997) Cell. Mol. Life Sci. 53, 141-151;

^[2]Corazza A, Rosano C, Pagano K, Alverdi V, Esposito G, Capanni C, Bemporad F, Plakoutsi G, Stefani M, Chiti F, Zuccotti S, Bolognesi M, and Viglino P (2006) *Proteins* **62**, 64-79;

^[3] Thunnissen MM, Taddei N, Liguri G, Ramponi G & Nordlund P. (1997) Structure 5, 69-79;

^[4] Pastore A, Saudek V, Ramponi G & Williams RJ (1992) J. Mol. Biol. 224, 427-440.

INHIBITORY EFFECT OF THE RETINOID IIF ON CANCER CELL INVASION MEDIATED BY THE DOWN REGULATION OF MATRIX METALLOPROTEINASES EXPRESSION IN HUMAN GLIOBLASTOMA CELLS.

A.Papi¹, M.Orlandi¹, A.M.Ferreri², P.Rocchi² G.Bartolini¹

¹Department of Experimental Evolutive Biology, ²Department of Experimental Pathology, University of Bologna, Bologna, Italy

Glioblastomas, the most malignant and prevalent brain tumors that still remain incurable, are characterized by both estensive proliferation and invasive growth. Retinoids and their derivatives are known to have a profound antitumoral effect.

In this study we examined the effect of retinoid IIF (pat.WIPO W0 00/17143) on proliferation, apoptosis and cell invasion in the human glioblastoma cell line U87MG, in comparison with all-trans retinoic acid (RA). Our results shown that both retinoids induced cell growth inhibition and apoptotic cell death, in a dose and time dependent manner, and by down regulation of the antiapoptotic protein Bcl2. We demonstrated also that the invasive ability of glioblastoma cells, investigated by Matrigel invasion assay, decreased after treatment with IIF or RA. Since cell invasion involves a complex system of tightly regulated proteases, matrix metalloproteinases (MMPs) and their specific inhibitors, tissue inhibitors of MMPs (TIMPs), we analysed the effect of IIF on MMPs and TIMPs expression, in comparison with RA. Treatment with both retinoids resulted in a marked decrease of MMP2 and MMP9 expression and activity of MMP2, as revealed by western blot analysis, by Real-time PCR and gelatin zymography. In addition, exposure to IIF caused to enhanced expression of TIMP2.

In conclusion, we demonstrated the effectiveness of both IIF and RA in inhibiting proliferation, cell migration, and invasion potential of glioblastoma U87MG cells. Furthermore IIF consistently exhibited a greater efficacy in comparison to RA as far as all the parameters tested. Therefore these findings, besides providing further evidence that IIF may be a powerful tool in the development of cancer treatments, suggest also that IIF migth have therapeutic potential against invasiveness of brain tumors.

PROBLEMS STILL OPEN IN PROTEIN CRYSTALLOGRAPHY: POSSIBLE SOLUTIONS

Eugenia Pechkova, Ph.D.

Nanoworld Institute and Eminent Chair of Biophysics, Genova University, Corso Europa 30, 16132, Genova, Italy

Fondazione ELBA, Piazza SS. Apostoli, 66, 00187, Rome, Italy

Despite of the recent progress in protein crystallography, many biomolecules of crucial scientific and biomedical importance are not yet crystallized. Without the well ordered crystalline structure the X-ray diffraction cannot be applied, because the diffracted beam cannot result in well distinct diffraction spots from the repetitive molecule grid according to the Bragg's law. According this law, by X-ray crystallography it is possible to determine the precise distance between the all atoms in the molecule up to resolution of Å.

Absence of the precise three dimensional structure of the molecules at the atomic resolution obstacle the study of their functions and mechanisms and therefore the their possible application in the drug design area.

Surely, crystallized proteins are rarely occurs in the nature and it is not simple to obtain the big, good quality and diffracting protein crystals. There are different methods for protein structure determination in solution, however, for example NMR method can have the restriction in the protein dimensions – protein with high molecular weight (more than 40 kDa) gives too complicated spectra which could hardly be resolved.

For this reason many efforts are dedicated to the protein proper expression, purification and crystallization. It is well known, that for been crystallized the protein solution should be well purified and quite homogeneous. Moreover, the concentration of the protein solution is really very important. According to the phase diagrams and solubility curves of the well known proteins, the minimum concentration is needed, because under this level crystallization never occurs.

In present report, the problems still open in protein crystallography and their possible solutions on the example of proteins of high scientific and biomedical interest are presented.

Proteins of interest:

Protein kinase CK2 Protein Kinases are the large family of enzymes, critically involved in in almost every regulatable cellular process. Protein kinase CK2 is a serine/threonine heterotetrameric protein kinase that is ubiquitously distributed among the eukaryotic cells. Despite being one of the first protein kinases to be discovered, its physiological function remains unclear. Much evidence points to the involvement of CK2 in proliferation and tumorogenesis, namely in the phosphorylation of a broad spectrum of endogenous substrates, including oncoproteins and tumour suppressors. CK2 activity indeed appears to be elevated in transformed cells and in solid human tumours. Moreover, its deregulated expression in lymphocytes of transgenic mice results in the stochastic production of lymphomas and leukemia. Indeed, this enzyme is important for cell proliferation and biomedically relevant because overexpression of its catalytic subunit can cause lymphoma. However, peculiar structure of CK2alpha catalytic subunit (45 kDa), like a presence of very mobile C-terminal end) created difficulties in this protein crystallization.

Ribosomal proteins play a significant role in protein synthesis. Particularly interesting are different initiation factors. For example, IF2, involved in the initiation step of bacterial protein synthesis, is intensively studied and its subunits are of high interest to be crystallized. Some of them are rather small (e.g. IF2beta, 16 kDa), and the crystallographic data can be compared with the structures obtained from the NMR spectra. Other subunit (IF2alpha) have rather big molecular weight for being studied by NMR (30 kDa), but crystals of this protein is too small and represent more likely nanoclusters, not ordered enough to give diffraction pattern with distinct diffraction spots.

On the other hand, molecular chaperon GroEL have an important impact since it assists protein folding *in vivo* in an ATP-dependent mechanism. GroEL is a homotetradecameric molecule, arranged radially in a double-ring structure. The structure of GroEL from some organisms has been resoved by electon microscopy, some of them were crystallized and resolved by X-ray diffraction. Instead, GroEL from bacteriophage (monomer 60 kDa, heptamer 420 kDa) gives rather big, well-shaped crystals, which give poor diffraction signal, probably because cryo-protectant inefficiency.

Cytochrome P 450 scc (56 kDa) is heme containing membrane protein structurally similar to cytochromes, but functionally is typical monooxygenase. It is sterodoidogenic enzyme associated with the inner-mitochondrical membrane of steroid-produced tissue. Its 3D structure determination is very important, since it catalyze three oxidative reactions, resulting in the cleavage of the side chain of cholesterol to produce pregnenolone. This step is important in steroid biosynthesis, since it is first and rate-limiting step and occurs in all steroidogenic tissues. Cytochrome P 450 scc is of particular interest because it display multiple pathways and unusual among its family substract specificity. Its complex with its electron transfer partner adrenodoxin can find their application in biophysical nanotechnology, namely in artificial nanocomputers and nanosensors realization. Crystallization of this protein is very tricky, because of the part, involved in the membrane is partially hydrophobous and protein solution is not really homogeneous, even with use of detergents. Bone morphogenic proteins (BNPs) represent another interesting example. The bone morphogenic proteins (BMPs) constitute a novel subfamily of the transforming growth factor type beta (TGFbeta) supergene family and play a critical role in modulating mesenchymal differentiation and inducing the processes of cartilage and bone formation. This is family of the more than fifteen protein, which play a crucial role in the bone morphogenesis. This function makes BMP proteins very promising for such a important medical application as the bone reconstruction. But among all BMPs, only few are crystallized by now. Absence of three dimensional structure at the atomic level of other proteins of this family precludes their application in the bone reconstruction trials. It is to remember that all BMPs are big proteins (more than 40 kDa), and only crystallography can solve their structure at the atomic level.

Among many methods been developed for the protein crystallization, vapor diffusion methods play most important role. This methods (hanging drop, sitting drop) have such an advantages as simplicity of the procedure (which permits also construction of the robot station for the series of the routine experiments), high reproducibility and small amount of sample requested.

However, also after been automatized, this method can failure in crystallization of some proteins, like for example, in case of some membrane proteins, which often needs the application of special method, sometimes developed for particular protein (for example lipidic cubic phases method was developed especially for the bacteriorhodopsin protein); or require long empirical search for the crystallization conditions.

Another important point is to obtain really big, single, well diffracting crystal. In many cases crystals do exist, but they are too small to be examined by normal X-ray beam. This problem can be resolved by application of the miniaturized beam (micro or nanofocus) and recent studies report than small crystals usually have more perfect order (avoiding of twining, clusters or other problems occur when the crystal keep growing) but obviously such an instrumentations have limited access. Moreover, all biological object suffer of the radiation damage. In case of the protein crystals it can obstacle the diffraction data collection because of the more or less fast decreasing of the diffraction intensity up to detection limits. This problem can be resolve by using of the protective reagents, decreasing of the beam intensity, or more sensitive detectors development. However, some crystal samples cannot anyway be examined because their low radiation resistance.

The other approach to resolve these problems can be also the creation of the new crystallization methods, which can help *ab inintio* reduce the empirical search of the right crystallization

conditions, result in the larger and more radiation resistant crystals (1-2) Such a method was last several years developed in our laboratory This method based on nanotechnology (3) was successful in crystallization of proteis, never been crystallized before, for example bovine cytochrome P450scc and human protein kinase CK2alpha catalytic subunit. CK2alpha needle crystals, not very large (about 10x10x40micron), proven to be more radiation resistant to the microfocus of high intensity (ESRF) than some large protein crystals. Protein three dimensional structure resolved at the 2.4 Å resolution (4) can now be used for the neoplastic drug development.

The same work is now concluded for the group of ribosomal proteins. This study, however, reveals possibility of growing well defined crystals with pour diffraction capacity or apparently not ordered crystals with diffractions signal, which is not defined in to distinct spots. In some cases the problem can be in the low efficient cryoprotection: to reduce the radiation damage and increase the resolution, crystal sample comes normally frozen by the liquid nitrogen flux. Normally grown in the water solution, crystal can be stressed by the formed ice. For this reason the glycerol-base cryoprotectants are used to change the sample environment. On the other hand, it is well known that protein crystals are characterized by the big amount of water also in the crystal channels. When the temperature reaches the 273 K, water becomes ice, which can destruct the crystal order internally. In was proven that the lysozyme crystals grown by nanocrystallographis method have reduced amount of water molecules in comparison with crystals grown by classical method (5), and display significant radiation resistance. This study, extended to several other proteins could be of high impact because of common application of cryotechnique in crystallography. On the other hand, radiation damage of biological objects remains the one of the most critical problems for the synchrotrons of new generation. Therefore, our research is directed to obtain well ordered, diffracting, radiation resistant protein crystals. The advanced nanotechnology-based methods of crystallization together with frontier techniques of structural characterization (nanogravimetry, atomic force microscopy, synchrotron micro and nanofocus) inroduce such a new field of science as protein nanocrystallography (6.7) representing the new approach to structural proteomics and dedicated to resolve the most challenging problems of modern protein crystallography.

- 1. Pechkova E., Nicolini C. Accelerated protein crystal growth onto the protein thin film, Journal of Crystal Growth 231, 599-602, 2001.
- 2. Pechkova E., Tropiano G., Riekel C., Nicolini C., Radiation stability of protein crystals grown by nanostructured templates: synchrotron microfocus analysis, Spectrochimica Acta B 59, 1687-1693, 2004.
- 3. Pechkova E., Nicolini C., From art to science in protein crystallization by means of thin film technology, Nanotechnology 13, 460-464, 2002.
- 4. Pechkova E., Zanotti G., Nicolini C., *Three-dimensional atomic structure of a catalytic subunit mutant of human protein kinase CK2*, Acta Crystallographica D 59, 2133-2139.
- 5. Pechkova E., Sivozhelezov V., Tropiano G., Fiordoro S. and Nicolini C., *Comparison of lysozyme structures derived from thin film-based and classical crystals*, Acta Crystallographica D 61, 803-808, 2005
- 6. Eugenia Pechkova, Claudio Nicolini, Proteomics and Nanocrystallography, Kluwer Academic Press, 1-216, 2003
- 7. Pechkova E., Nicolini C., *Protein nanocrystallography: a new approach to structural proteomics*, Trends in Biotechnology 22, 117-122, 2004.

RELAZIONE TRA LE DIVERSE ISOFORME DI CLUSTERINA E L'APOPTOSI IN CELLULE TRAMP-C2

Pellacani D., Veratti E., Davalli P., Astancolle S., Corti A.

La clusterina è una glicoproteina ubiquitaria che partecipa a molti processi sia fisiologici che patologici, inclusa la patologia tumorale. Tuttavia il suo meccanismo d'azione non è stato ancora chiarito

Studi recenti hanno messo in evidenza l'esistenza di almeno due diverse forme di clusterina: una forma di secrezione, denominata s-Clu, con una azione citoprotettiva, ed una forma intracellulare, denominata n-Clu, priva della sequenza leader, che appare rimanere latente nel citoplasma della cellula, da dove può migrare nel nucleo ed esercitare un'attività proapoptotica.

Recentemente è stato dimostrato dal nostro gruppo di ricerca che i livelli di clusterina diminuiscono durante la progressione del cancro prostatico che si sviluppa in topi transgenici TRAMP (Transgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate). In questo stesso modello le catechine, polifenoli del tè verde, si dimostravano capaci di prevenire lo sviluppo tumorale nell'80% degli animali trattati. In queste condizioni i livelli di clusterina si mantenevano elevati ed erano accompagnati da apoptosi caspasi dipendente.

Nel presente studio abbiamo cercato di chiarire il tipo di interazione esistente tra clusterina ed apoptosi in cellule TRAMP-C2, un modello cellulare derivante dai tumori alla prostata dei topi TRAMP.

Si è quindi proceduto a trattare tali cellule con Fenetil Isotiocianato (PEITC), un induttore di apoptosi caspasi 3 mediata. Questo trattamento provocava un aumento dose dipendente dei livelli di clusterina e la sua traslocazione nel nucleo cellulare.

Si è poi passati a sovraesprimere transientemente la clusterina tramite due costrutti plasmidici codificanti per una proteina di fusione tra *enhanced green fluorescent protein* (eGFP) e l'isoforma *full-length* (eGFP-f-Clu) o troncata, mancante della sequenza leader, (eGFP-n-Clu) della clusterina.

Dopo aver confermato la localizzazione prevalentemente citoplasmatica della eGFP-f-Clu e quella prevalentemente pan-cellulare della eGFP-n-Clu, si è proceduto nel determinare l'attivazione dell'apoptosi in queste condizioni. I risultati ottenuti indicano che entrambi i costrutti attivano un processo apoptotico caspasi 3 dipendente.

Andando poi a trattare con basse dosi di PEITC tali cellule si rilevava una diversa localizzazione intracellulare dell'eGFP-f-Clu, che diventava prevalentemente pan-cellulare, estendendosi dal citoplasma al nucleo, ricalcando quindi il profilo presentato dall'eGFP-n-Clu.

Dai risultati ottenuti si deduce che in queste cellule di tumore prostatico murino la clusterina induce il processo apoptotico probabilmente attraverso un evento post-traduzionale di interconversione della forma s-Clu nella forma n-Clu.

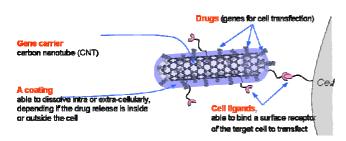
GENE THERAPY VIA CNTs-BASED ARTIFICIAL VECTORS

Vittoria Raffa ^a, Virginia Pensabene^b, Gianni Ciofani ^a, Arianna Menciassi ^a, and Paolo Dario ^a ^a CRIM lab - Research Center in Microengineering, Scuola Superiore Sant'Anna, Pontedera (PI), Italy

b IIT, University of Genova

Our research at CRIM lab of Scuola Superiore Sant'Anna is related to the development of an artificial vector for Gene Therapy¹. Our focus is to exploit nanobiotechnology for the development of a nonviral vector for safe and efficient gene delivery.

An artificial vector vs biological vector A bio-inspired approach



The vector is based on a functionalized carbon nanotube (CNT). It will be coated with genes to be transferred, and will be functionalized with a ligand, able to bind a receptor expressed by the target cells to be transfected.

A solution containing a myriad of vectors will be dispensed locally in the target tissue, e.g. via injection; each of them will localize a target cell and bind it. Two strategies of cell transfection will be investigated: 1) via endocytosis and 2) via electroporation.

Schematic of our artificial vector for gene therapy

Methods of purification, dispersion, and manipulation of single and multi wall CNTs (SWNT and MWNT) have been already developed. Dispersed CNTs solutions are fed to cell cultures in order to study cytotoxicity and dynamics of internalisation.

Preliminary in vitro tests on CNTs-mediated electroporation have been performed. Results seem to show a strong enhancement of the electrical field at CNT-cell membrane interface in electroporation mediated by CNTs.

[1] http://www.NINIVE-project.com

DNA SEQUENCING AND PHYLOGENETIC ANALYSIS ON BACTERIA ISOLATED FROM WASTEWATER SAMPLES OF AN ITALIAN STEEL INDUSTRY.

Domenico Davolos, Biancamaria Pietrangeli

Dipartimento Insediamenti Produttivi e Interazione con l'Ambiente (DIPIA), Istituto Superiore per la Prevenzione e la Sicurezza del Lavoro (ISPESL), Via Urbana, 167 - Roma.

In this contribution we summarize our results obtained from molecular and phylogenetic analysis conducted on bacteria isolated from wastewater samples, produced by an Italian steel industry, containing polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), phenols, nitrates, heavy metals and cyanides. The morphology of the strains was determined following staining and examined via phase-contrast and confocal scanning laser microscopy. The 16S rDNA and two transcription factor genes (rpoD and Rho, respectively) of the isolates have been PCR-amplified and sequenced. For inferring the evolutionary relationships, multiple sequences alignment and phylogenetic trees were obtained by using several methods. Additionally, genes encoding nitrogen oxides reductases of the denitrification pathway were analysed through PCR amplification and DNA sequencing. Finally, in a Gram-negative coccoid bacterium, identified as a taxon of the genus Acinetobacter (y-*Proteobacteria*), capable of utilizing phenol as its sole source of carbon for growth, catabolic genes for the phenol metabolism were investigated by PCR and DNA sequencing. Comparative analyses of the deduced amino acid sequences from the phenol hydroxylase gene of the Acinetobacter sp. were performed on the basis of genes present in the GenBank (NCBI) database. The amount of the gene sequences as here obtained from phylogenetically characterized pure cultures can provide insights to improve molecular methods for the culture-independent monitoring and for measuring the activity of bacterial degradation pathways in the environment.

UNO STRUMENTO PER LA PREDIZIONE DELLO SPLICING DEI GENI UMANI

F.Piva; L.Nocchi; D.Zoppi; M.Giulietti; G.Principato Istituto di Biologia e Genetica, Università Politecnica delle Marche

Il processo di splicing dei trascritti degli eucarioti superiori è il risultante di vari fattori tra cui il riconoscimento di siti di legame da parte di proteine, la competizione di più proteine per siti di legame vicini o sovrapposti, la struttura secondaria dell'RNA che impedisce il legame della maggior parte delle proteine nei tratti a doppio filamento. Banalmente le mutazioni a carico dei siti di splicing influenzano quasi sempre il corretto riconoscimento degli esoni e degli introni. Recentemente si è scoperto che anche le mutazioni genetiche che cadono fuori da tali siti, possono influenzare il processo di splicing, modificandone gli schemi e variandone l'efficienza. Più precisamente, esse posso agire alterando la successione delle proteine legate al pre-mRNA modificando sia un sito di legame sia la struttura secondaria dell'RNA. I test genetici evidenziano varie mutazioni a carico dei geni dei pazienti e la valutazione del loro effetto è un procedimento sperimentale lento e costoso a causa della difficoltà a lavorare con l'RNA. Per questi motivi c'è la necessità di avere uno strumento di predizione veloce e il più possibile affidabile. Noi abbiamo costruito un programma interrogabile via web dal sito del Gruppo di Biologia Computazionale dell'Università Politecnica delle Marche (www.introni.it) che indica le proteine legate al premRNA e i siti di splicing tenendo conto della struttura secondaria dell'RNA attraverso i risultati del programma di predizione MFOLD. Le predizioni sono particolarmente accurate perché abbiamo ricavato i siti di legame delle proteine direttamente dagli esperimenti di SELEX e non abbiamo usato le matrici di punteggio, poiché esse non tengono conto delle correlazioni esistenti tra i nucleotidi dei siti di legame e quindi restituiscono falsi positivi. Ora stiamo elaborando queste predizioni di livello molecolare per cercare di restituire una predizione globale dello splicing.

ANALISI DELLE LIPOPROTEINE DEL SIERO MEDIANTE FLFFF A FIBRA TUBOLARE POROSA

Diana Cristina Rambaldi,^a Andrea Zattoni,^a Pierluigi Reschiglian,^a Sonia Casolari,^a Myeonghee Moon,^b Byung Ryul Min,^c Dierk Roessner^d

^aDipartimento di Chimica "G. Ciamician", Università di Bologna, Via Selmi 2, 40126, Bologna. mailto:diana.rambaldi@studio.unibo.it

^bDepartment of Chemistry, and ^cDepartment of Chemical Engineering,

Yonsei University, Seoul 120-749, Korea.

Le lipoproteine sono complessi globulari di elevata M_r , le cui componenti ad alta densità (HDL) e a bassa densità (LDL), spesso definite "colesterolo buono e cattivo", rivestono importanza diagnostica in quanto la loro concentrazione è correlabile al rischio di arteriosclerosi coronarica. Le metodiche standard di analisi clinica delle lipoproteine sono lunghe e laboriose. La tecnica di frazionamento in campo di flusso-flusso a fibra tubolare porosa (HF FIFFF) è già stata applicata con successo a proteine intere e complessi proteici. Qui presentiamo la HF FIFFF per l'analisi rapida della componente lipoproteica del siero umano. Le diverse componenti lipoproteiche vengono separate e rivelate mediante colorazione selettiva per determinarne la concentrazione relativa. Le prestazioni della metodica sono state valutate su campioni di siero sia di soggetti sani che di pazienti affetti da patologie coronariche. La valutazione delle dimensioni e del peso molecolare delle diverse componenti lipoproteiche è stata ottenuta accoppiando un sistema di rivelazione multiangle laser scattering (MALS).

- 1. Reschiglian, P.; Zattoni, A.; Roda, B.; Cinque, L.; Parisi, D.; Roda, A.; Dal Piaz, F.; Moon, M. H.; Min, B.-R. *Anal. Chem.* 2005, *77*, 47-56.
- 2. Kang, D.; Moon, M. H. Anal. Chem. 2005, 77, 4207-4212.
- 3. Roda, A. Parisi, D.; Guardigli, M.; Zattoni, A.; Reschiglian, P. Anal. Chem. 2006, 78, 1085-1092.

^dWyatt Technology Europe GmbH, 56307 Dernbach, Germany

SYNTHESIS OF NANOCRYSTALLINE HYDROXYAPATITE POWDERS BY GELATIN-BASED PRECIPITATION METHOD FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS

¹A.S. Fomin, ¹ S.M. Barinov, ² C. Renghini, ² F. Rustichelli and ² V.S. Komlev

¹ Institute for Physical Chemistry of Ceramics, Russian Academy of Sciences, Russia;

A technique to synthesise nanocrystalline hydroxyapatite (HA) powders was developed; the method is based on precipitation of HA crystals in aqueous solution of gelatin with a subsequent heat treatment at 900 °C. The effect of gelatin in aqueous solution at different concentrations on the nucleation, growth of hydroxyapatite crystals was investigated. X-ray diffraction (XRD) results, combined with Small Angle X-ray Scattering (SAXS) and Transmition Electron Microscopy (TEM) indicate that the individual crystal size is in the range 5-6 nm (Fig. 1a). Scanning electron microscopy (SEM) shows that the powder is composed by nanocrystalline agglomerates (50–100 nm) particles (Fig 1b). The specific area of the powders was measured by BET method. The maximum BET specific area is about 116 m²/g. Fourier transform-infrared spectroscopy (FTIR) reveals that a certain level of carbonate substitution has taken place in all synthesized nano hydroxyapatite powders

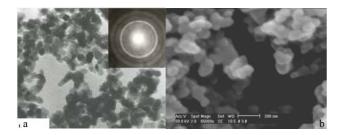


Fig. 1 TEM (a) and SEM (b) micrographs showing hydroxyapatite particles.

The powders under development can find a potential application in drug delivery systems and can be used for the preparation of nanomaterial scaffolds for allogenic and autologous cell cultures for the replacement of extensive tissue defects.

Acknowledgement

The authors wish to acknowledge the ICE project (Sviluppo di una nuova classe di rivestimenti bioceramici nanostrutturati per applicazioni biomediche), the INTAS Project (Innovative bioceramics systems for application in surgery and drug delivery: further development, production and utilisation) and the EU KMM-NOE Project (NOE 502243-2) for financial support

² Department of Sciences Applied to Complex Systems, Polytechnic University of Marche, Italy

EXPERIMENTAL DEVELOPMENT OF A NOVEL MOLECULAR TOOL FOR HUMAN PROSTATE CANCER (CAP) DIAGNOSIS BY RT-qPCR DETERMINATION OF GENE EXPRESSION SIGNATURE

EXPRESSION SIGNATURE

Bettuzzi S.¹, Rizzi F.¹, Belloni L.¹, Crafa P.², Lazzaretti M.², Remondini D.³, Ferretti S.⁴, Cortellini P.⁴, Corti A.⁵

¹Università degli Studi di Parma, Dipartimento di Medicina Sperimentale, Parma,

²Università di Parma, Dipartimento di Patologia e Medicina di laboratorio, Parma,

³Università di Bologna, Dimorfipa, Bologna,

⁴Ospedale Maggiore, Reparto di Urologia, Parma,

Università di Modena, Dipartimento di Scienze Biomediche, Modena

Introduction & Objectives

We previously found that human CaP progression is accompanied by differential expression of 8 informative genes (ODC, OAZ, SSAT, AdoMetDC, CLU, H3, Gas1, GAPDH) by Northern blot analysis (1,2). Determination of expression of these genes in the TRAMP mice model of CaP progression provided reliable diagnosis of CaP and prognostic prediction of therapeutical response to GTC chemoprevention protocol (3). Here we challenged the diagnostic power of the same 8-genes signature, detected by RT-qPCR, in tumor detection/classification of human CaP.

*Material & Methods*RT-qPCR was performed on 77 tissue specimens obtained from radical prostatectomy, immediately excised after surgery and quickly frozen. Histopatological examination classified 40 benign tissues and 37 CaPs. For RNA extraction we used RNA-Fast reagent. RNA samples were quantified and resolved on agarose gel to check quality and integrity. Retrotrascription (RT) was performed with Superscript II reverse trascriptase. On each cDNA sample, the 8-genes signature plus two housekeeper genes (PGK1 and HMBS) were determined in duplicate with optimised Sybr-Green based master mix. Raw CT data were normalized using the geometric mean of two housekeepers, PGK1 and HMBS. A Nearest Neighbour (NN) classifier was applied to normalized qRT-PCR data in order to discriminate between benign and CaP tissue. We used the same statistical method to classify the data of the CaP sub-dataset samples into several dichotomies: samples from patients whose age was \leq 65 vs >65; PSA value <10 vs \geq 10; Gleason score <7 vs \geq 7. A 10-fold cross-validation procedure was used in order to reduce the underestimation of the misclassification error due to over-fitting. All the possible combinations of the 8 genes, several numbers of neighbours (1, 3, 5, 7, 9, 11) and different distances between sample profiles (Euclidean distance, Correlation-based distance, Mahalanobis distance) were considered.

Results:

The best classification performance of normal and CaP tissues was obtained with a combination of 6 genes (Gas, SSAT, Clu, AdoMet, Oaz, Odc), using 9 neighbours and the Mahalanobis distance. The concordance between our gene signature classification and the pathological evaluation (benign Vs CaP) was 80%. Our molecular method of diagnosis has a sensitivity of 83.8% and a specificity of 78.2%. NN analysis with a combination of 7 genes (Gas, H3, SSAT, Clu, AdoMet, Oaz, Odc) correctly classified 84% of patients with regard of age, 71% with regard to Gleason score and 42% with regard to PSA.

Conclusions

RT-qPCR gene profiling based on the gene signature that we have found, appear to be an appropriate means for molecular diagnosis of presence/absence of CaP. In addition, in consideration that this approach was already successful in predicting the biological behaviour of CaP in previous experiments performed in the TRAMP mice model (3), it might became a new tool of potential prognostic value for discrimination of indolent Vs aggressive CaP. To this purpose, the follow-up of patients will continue for prognostic purposes and for possible validation of this hypothesis.

PEROXYL RADICAL TRAPPING CAPACITY AND EFFICIENCY OF ANTHOCYANINS CORRELATE WITH THE STABILITY OF THEIR FREE RADICAL INTERMEDIATE.

Monica Rossetto, Paola Vanzani

INBB - Sezione di Padova - Laboratorio di Biofisica, Dipartimento di Chimica Biologica

The inhibition by anthocyanins of the free radical-mediated peroxidation of polyunsaturated fatty acids present in membranes and LDL was studied under physiological conditions by oxygraphyc and ESR tecnique. The antioxidant activity of these polyphenolic pigments, responsible of the red and blu colors of most fruits, vegetables and flowers, derives from their structure characterized by the presence of three rings differing for the nature of the substituents.

Two fundamental aspects of the antioxidant action are: the capacity, that is number n of peroxyl radicals trapped by a single anthocyanin molecule and the efficiency that is the ability of anthocyanins to compete with other molecules for peroxyl radicals in trapping reactions. The contribution of the substituents to the efficiency is $-OH > -OCH_3 >> -H$, being the efficiency of delphinidin > petunidin > malvidin > cyanidin > peonidin > pelargonidin, while on the basis of capacity, anthocyanins may be grouped in two classes: the first one containing -OH and/or $-OCH_3$ substituents, with an higer n value (delphinidin, petunidin and malvidin) and the second one with at least one H atom in these positions with a lower n value (cyanidin and peonidin).

Under the adopted experimental conditions, the ESR spectra of the intermediate anthocyanin free radicals were detected and concentrations and spectral characteristics of these radicals were quantified. The enthalpies of formation of these free radicals from the quinoidal forms of anthocyanins were also calculated by semi-empirical quantum chemical methods.

We demonstrated that free radicals of anthocyanins are involved in the inhibition process, and that the life time of these intermediates is strictly correlated with the anthocyanin efficiency and with their heat of formation.

LA LESIONE DEL SISTEMA DOPAMINERGICO BLOCCCA L'EFFETTO SIMPATICO-MIMETICO DELLA ORESSINA A

E. Viggiano, Al. Viggiano, An. Viggiano, B. Monda, B. De Luca.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare se la lesione del sistema dopaminergico altera l'aumento della temperatura e della frequenza cardiaca che seguono la somministrazione icv di oressina A.

Ad un gruppo (gruppo 1) di 4 ratti è stata iniettata desipramina ip (25mg/Kg) + 6-OH-dopamina icv (6-OH-DA, 500μmoli) per lesionare il sistema dopaminergico (tempo 0). Dopo 24 ore è stata somministrata oressina A icv (6nmoli) e sono state registrate la temperatura rettale, la temperature del tessuto adiposo bruno interscapolare (IBAT) e la frequenza cardiaca. Lo stesso protocollo è stato seguito su altri 3 gruppi di ratti effettuando rispettivamente le seguenti somministrazioni icv al tempo 0 e dopo 24 ore: 6-OH-DA + salina (gruppo 2), salina + oressina A (gruppo 3), salina + salina (gruppo 4); la desipramina era somministrata in tutti i gruppi.

I risultati hanno dimostrato che nel gruppo trattato con salina + oressina A si ha una aumento della temperatura rettale, della temperatura del IBAT e della frequenza cardiaca. Tale effetto è completamente abolito nel gruppo trattato con 6-OH-DA + oressina A. I controlli 6-OH-DA + salina e salina + salina non hanno mostrato alcuna variazione dei parametri misurati.

Il risultato ottenuto indica che gli effetti della oressina A sono mediati dal sistema dopaminergico.

CINETICHE DI AGGREGAZIONE AMILOIDE DI APOMIOGLOBINE DI MAMMIFERO E CORRELAZIONE CON LA LORO SEQUENZA AMMINOACIDICA

- S. Vilasi¹, C. Iannuzzi¹, R. dosi², A. Parente²., G. Irace¹ e I. Sirangelo¹
- 1 Dipartimento di Biochimica e Biofisica, Seconda Università degli Studi di Napoli, Via L. De Crecchio 7, 80138 Napoli
- 2 Dipartimento di Scienze della Vita, Seconda Università degli Studi di Napoli, Via Vivaldi, 81100 Caserta

Le cosiddette malattie da misfolding o amiloidosi sono caratterizzate dalla presenza di aggregati proteici insolubili noti come depositi amiloidi. La tendenza di una determinata proteina ad aggregare e formare fibrille amiloidi dipende drammaticamente dalla sua sequenza amminoacidica. E' stato dimostrato che l'effetto intrinseco di una specifica mutazione sulla velocità di aggregazione di una catena polipeptidica destrutturata può essere correlato alle variazioni di proprietà chimicofisiche quali idrofobicità, carica e tendenza a convertire struttura alfa in struttura beta [1]. In questa comunicazione sono riportati i dati relativi alla correlazione fra la velocità di aggregazione di apomioglobine di mammifero e loro sequenza amminoacidica. L'apomioglobina, infatti, sebbene sia una proteina globulare organizzata in struttura alfa elicoidale, forma fibrille amiloidi per associazione di segmenti polipeptidici destrutturati se incubata a 65°C e a pH 9.0 [2,3]. Sono state misurate le velocità di aggregazione delle apomioglobine di bufalo, cavallo e bovino, assunta, quest'ultima, come proteina di riferimento. Queste proteine possono essere considerate mutanti naturali perché la loro sequenza differisce di pochi residui amminoacidici. Le variazioni nelle velocità di aggregazione osservate sono state confrontate con le differenze teoriche calcolate sulla base delle variazioni chimicofisiche dovute alle differenze amminoacidiche.

I risultati dimostrano che le variazioni nella cinetica di aggregazione amiloide sono correlate solo alle differenze amminoacidiche presenti nella regione N-terminale della proteina [4]. E' possibile dunque ipotizzare che la regione N-terminale sia coinvolta in modo cruciale nel processo di aggregazione amiloide dell'apomioglobina.

- [1] Chiti, F.et al. (2003) Nature 424, 805-808.
- [2] Fandrich, M. et al. (2001) Nature 410, 165-166.
- [3] Fandrich, M. et al. (2003) Proc. Natl. Acad, Sci. USA 100 (26), 15463–15468.
- [4] Vilasi, S. et al. (2006) FEBS Letters 580, 1681-1684.