



Istituto Nazionale di Biostrutture e Biosistemi

CONSORZIO INTERUNIVERSITARIO

VIII CONVEGNO NAZIONALE

SU

SCIENZE DELLA VITA

ROMA, 23-24 OTTOBRE 2008

CNR

**ABSTRACTS PRESENTATI DA
RICERCATORI NON STRUTTURATI**

CERAMIDE SYNTHESIS IS ASSOCIATED WITH RESVERATROL-INDUCED APOPTOSIS IN K562 BUT NOT IN HSB-2 CELLS

Fabrizia Brisdelli, Gabriella Scarpone and Argante Bozzi Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche, Università degli Studi - L'Aquila

Resveratrol (*trans*-3,5,4'-trihydroxystilbene, RES), a natural polyphenol present in substantial amounts in a wide variety of plant species (red grapes, peanuts and pines), is emerging as a natural compound with potential anticancer properties. The mechanism(s) by which RES exerts its antitumoral action are not yet fully clarified but may include inhibition of ribonucleotide reductase, DNA polymerase [12] N.J. Sun, S.H. Woo, J.M. Cassady and R.M. Snapka, DNA polymerase and topoisomerase II inhibitors from *Psoralea Corylifolia*, *J Nat Prod* 61 (1998), pp. 362–366. Full Text via CrossRef | View Record in Scopus Cited By in Scopus (132), protein kinase C, cyclooxygenase-2 activities and cell cycle alteration. The observation that RES is an efficient oxygen radicals scavenger suggests a further mode of action of its anticarcinogenic activity. Finally, several papers have reported that cancer chemo-preventive, -protective activity of RES is related to its ability of triggering apoptosis (1). Recently, resveratrol was shown to promote intracellular accumulation of ceramide in breast and prostate cancer cells (2). The aim of our study was to provide experimental data supporting the hypothesis that the induction of ceramide synthesis is involved in this regulatory mechanisms of apoptotic pathway induced by resveratrol. To this purpose, human chronic myeloid (K562) and acute lymphoblastic (HSB-2) leukemia cells were treated with resveratrol (25 μ M, a concentration higher but not far from that reached in plasma of subjects following a mediterranean diet), alone or in combination with either L-cycloserine (an inhibitor of the key enzyme involved in the *de novo* ceramide synthesis), or with desipramine and GW 4869 (inhibitors of sphingomyelin hydrolysis). The results obtained show that any of the inhibitors used treatments did not affected RES-induced apoptosis in HSB-2 cells. On the contrary, in K562 cells after 72 h of treatment, L-cycloserine significantly reduced the percentage of apoptotic cells (from 34 % with resveratrol alone to 18 % with resveratrol plus L-cycloserine). In addition, spectrofluorimetric analysis of caspase(s) activity, showed that L-cycloserine was also able to inhibit caspase-activation induced by resveratrol. Co-incubation with a serine palmitoyltransferase (SPT) inhibitor, could significantly counteract resveratrol-mediated effects. These data suggest that in K562 cells ceramide *de novo* synthesis, but not hydrolysis of sphingomyelin, is involved in resveratrol-induced apoptosis whereas in HSB-2 cells, the synthesis of ceramide does not seem directly implicated in the apoptotic pathway triggered by resveratrol.

References

1. Luzi C, Brisdelli F, Cinque B, Cifone G, Bozzi A. *Biochem Pharmacol*, **68**: 2019-2030, 2004.
2. Signorelli P, Ghidoni R. *J Nutr Biochem*, **16** : 449-466, 2005.

MOLECULAR CLONING OF THE *RIGIDOPORUS LIGNOSUS* LACCASE GENE AND STRUCTURAL-FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF RECOMBINANT ENZYME

E. Pechkova^a, M. T. Cambria^{bc}, F. Barbieri^a, A. Cambria^c.

^aNanoworld Institute, Università di Genova, Corso Europa 30 16131 Genova, ^b Dipartimento di Scienze Chimiche, Università di Catania, Viale A. Doria 6 95125 Catania, ^cI.N.B.B, University of Catania.

Laccases (benzodiol:oxygen oxidoreductase E.C.1.10.3.2) are glycosylated polyphenoloxidases widely distributed in plants, fungi, insects and bacteria. These enzymes catalyze the one electron oxidation of a wide range of organic substrates, including mono-, di- and polyphenols, substituted phenols, aromatic amines and lignines with the concomitant four-electron reduction of molecular oxygen to water. Several of these enzymes have been purified and characterized biochemically (1) and a lot of the genes encoding the protein have been cloned and expressed in heterologous organisms. Recently, we reported the crystal structure of fully copper complemented laccases from white-rot fungus *Rigidoporus lignosus* (RIL) (2). Because of their remarkable ability to catalyse the oxidation of a wide range of organic substrates, laccases have potential applications in industrial processes such as in the removal of aromatic wastes in effluents and in biodegradation of different types of hazardous organic compounds such as polycyclic aromatic hydrocarbons (3). Moreover, a high sensitivity amperometric biosensor for phenols determination, using monomolecular layer of RIL laccase as biorecognition element, have been developed (4).

Here, we describe the optimization of cloning, expression and purification of recombinant RIL laccase produced by *Escherichia coli* cells. The plasmid, *carrying the DNA sequence encoding laccase*, was modified at the ends of encoding fragment and was used as template for PCR. The PCR product was extracted and purified by Quiagen column chromatography. RIL laccase. The pEF28b vector, containing a nucleotide sequence encoding the 6xHis affinity tag, was used for expression of recombinant protein in E.coli. Recombinant pET28b plasmid has been extracted, purified and then used to transform the supercompetent E.coli strain BL21(DE3). The BL21 cells were inoculated in Luria-Bertani medium and grew until O.D.₆₀₀ reached about 0.6. The protein expression was induced by adding IPTG (1mM). The cell suspension was harvested by centrifugation and the pellet stored at -80°C. The biomass was defrosted and resuspended in lysis buffer containing lisozyme (1mg/ml) and incubated on ice for 30 min. The suspension has been added of proteases inhibitor PMSF (1 mM), sonicated with repeated duty cycle and subordinate to centrifugation. Supernatant was collected and applied to a HiTrap chelating HP5 column. Laccase was eluted from the column and all the fractions obtained from FPLC purification were analysed by 10% SDS. Fractions corresponding to the correct molecular weight (50 kDa) were pooled and concentrated to 0.5 ml (protein concentration 0.2 mg/ml).

Structural and functional characteristics of the recombinant laccase were analyzed by Spectrophotometric assay, Circular dichroism (CD) spectra, cyclic voltammetry and kinetic analysis. Recombinant laccase has strong absorbances at 610 nm and 330 nm due to the T1 and T3 coppers respectively. The experimental CD spectra, processed to estimate the contribution of different secondary structure, are in agreement with theoretical model of structure obtained from molecular modelling. Cyclic voltammetric assays confirm that recombinant laccase has catalytic activity. Kinetic studies show that the enzyme has a specific activity of 0,275 U/mg.

In conclusion, cloning of the RIL laccase gene, followed by heterologous expression may provide high yields and may permit to produce the enzyme with desired properties for biotechnological application.

- 1) Cambria, M.T., Cambria, A., Ragusa, S., Rizzarelli, E. Prot. Express.Purif. 2000, 18, 141- 147.
- 2) Garavaglia, S., Cambria, M.T., Miglio, M., Ragusa, S., Iacobazzi, S., Palmieri, F., D'Ambrosio, C., Scaloni, A., Rizzi, M . J.Mol.Bol. 2004, 342, 1519-1531.
- 3) Cambria, M.T., Minniti, Z., Librando,V., Cambria, A. Appl.Biochem. Biothechnol. 2008, 149,1-8.
- 4) Vianello, F., Cambria, A., Ragusa, S., Cambria, M.T., Zennaro, I., Rigo,A. Biosens. Bioelectron. 2004, 20, 315-321.

POTASSIUM RIBOSATE EFFECT ON CANCER CELL LINE

S. Croci^{1,2}, *L. Bruni*^{1,2}, *S. Bussolati*³, *M. Castaldo*¹, *I. Ortalli*^{1,2}.

1-Dipartimento di Sanità Pubblica-Sezione di Fisica- Università degli Studi di Parma

2- Istituto Nazionale Biosistemi e Biostrutture – Parma

3- Dipartimento di Produzioni Animali, Biotechnologie Veterinarie, Qualità e Sicurezza degli Alimenti - Università degli Studi di Parma

Potassium cation (K^+) is a critical regulator for cell metabolism control, as evidenced in cellular apoptosis. It is the main cytoplasmatic cation, and it acts like a catalyzer with enzymes and proteins through a particular process called reversible salification of the aminic (NH_2) groups in a subacid environmental ¹. Free radicals, that are the main cause of cell oxidative stress, can induce cell degeneration becoming one of major sources of carcinogenesis. Reactive Oxygen Species (ROS), for instance, at high concentrations can be important mediators of damage to cell structures, including lipids, membranes, proteins and nucleic acids². The harmful effects of ROS are balanced by the antioxidant action of non-enzymatic antioxidants in addition to antioxidant enzymes ³.

In previous works we have shown the antioxidant effect on red cells oxidation^{4,5} of Potassium Ascorbate (KAsc), a salt obtained from ascorbic acid and potassium carbonate in water solution. Moreover KAsc seems able to carry potassium inside the cells. Then the effect of Potassium Ribosate (KRib) has been tested, since Ribose is a penta-sugar with a furanoid structure (like Ascorbic Acid) and is a fundamental element of the cell metabolism and pathways. The ribose choice is due to two different aspects: one, as mentioned before, is the ascorbate like structure, the other is the length of ribose half-life respect to ascorbate.

The study of KRib effect was extended on a more complex system such as cancer cell lines, in particular on the tumour canine cell line A72.

In-vitro KRib effects such as cell proliferation, cell viability and morphology are followed.

At the beginning, 0.15mM, 1.5mM, 75mM and 150mM concentrations of KRib have been assayed after 24h, 48h and 72h. The cell curve proliferation and the effect of KRib have been valuated with MTT and WST assay. The MTT yellow salt (3-(4, 5- dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) is reduced in metabolic active cells from deidrogenase to form NADH and NADPH. The cell reduction product, also called formazan, show purple colour; it can be quantified spectroscopically after solubilization. The WST light red salt (4-(3,4-iodiophenyl)-2-(4-nitrophephenyl)2H-5-tetrazolio)-1,3-benzene disulphonate) is reduced in metabolic active cells from deidrogenase to form NADH. The cell reduction product, also called formazan, show red dark colour is more soluble than MTT formazan. It can be quantified spectroscopically like MTT “formazan”.

At lower KRib concentration, 0.15mM and 1.5mM, there was no evident difference from control. Indeed at higher concentration, 75mM and 150mM, the absorbance was much higher than control, indicating a high proliferation, but it was clear at microscope image that the cells were not viable. Therefore the optical results are not reliable. It is possible to suppose the interaction between potassium ribosate and the metabolic pathways of NADH and NADPH during the salts reduction (MTT and WST assay).

After that, we tested the effects of Potassium Ribosate at 0.05mM, 0.5mM and 5mM concentrations after 24h, 48h and 72h. We evaluated the cell proliferation and morphology analysing the digital photos with MCID program because MTT and WST assay are not reliable. Preliminary results show an evident KRib effect at 0.05mM and 5mM, after 48h treatment. In particular the cell population growth seems blocked and the cell morphology not apparently differ to control. This salt could act like cytostatic but not cytotoxic.

The research will continue studying this treatment on human cancer cell lines prolonging to 96h. We will perform others proliferation tests like with tritiated thymidine.

- 1 - G. Paoli *The biomagnetic nature of cancer and the role of potassium ascorbate and ribose against cellular degeneration*. J. New Energy, 7(3), 114-119, 2003.
- 2 S. Toyokuni *Molecular mechanisms of oxidative stress-induced carcinogenesis: from epidemiology to oxygenomics* - IUBMB Life 60, 441-7, 2008.
- 3 - M. Valko, C.J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, M. Mazur - *Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer* - Chemic Biological Interaction 160,1-40, 2006.
- 4 - Croci S, Pedrazzi G, Paoli G, Monetti D, Ortalli I - *Potassium ascorbate as protective agent in the oxidation of the red blood cells*. - Hyperfine Interaction 143, 241-244, 2002.
- 5 - S.Croci, G.Pedrazzi, R.DelSignore, G.Passeri, I.Ortalli. - *Red cell Hb oxidation of healthy subjects compared to breast cancer patients*. - Anticancer Research 22, 2903-2906, 2002.

REALIZZAZIONE DI UN BIOSENSORE OTTICO CON ENZIMA GLUCOSIO OSSIDASI IMMOBILIZZATO IN SOL-GEL

B. Della Ventura^{a,b}, M. Lepore^{a,b}, M. Portaccio^{a,b}, O. Stoilova^c, N. Manolova^c, I. Rashkov^c, D.G. Mita^{a,b}

^aConsorzio Interuniversitario INBB, Sezione di Napoli

^bSeconda Università di Napoli, Dipartimento di Medicina Sperimentale, Napoli,

^cLaboratory of Bioactive Polymers - Institute of Polymers - Bulgarian Academy of Sciences, Sofia

Negli ultimi anni, con l'avanzare della tecnologia e con lo sviluppo di nuove tecniche è stato possibile realizzare sensori ottici precisi, specifici e selettivi per il substrato da analizzare.

In questo lavoro è stato realizzato un biosensore ottico avente come componente biologica l'enzima glucosio ossidasi immobilizzato in sol-gel. Per la realizzazione del supporto sono stati eseguiti numerosi esperimenti al fine di rendere la tecnica riproducibile, affidabile e adatta per gli esperimenti da eseguire.

La formazione del sol-gel segue due fasi; la fase di idrolisi che può avvenire sia in ambiente acido che in quello basico e consiste nella reazione dei gruppi tetrametossisilano (TMOS) con acqua e con catalizzatori quali HCl o NaOH per la formazione di silanoli, a questa segue la condensazione che avviene aggiungendo tampone in soluzione provocando così la formazioni di catene Si-O-Si. Ciò che determina la trasparenza del sol-gel è la reazione di idrolisi che quando avviene in ambiente acido ci mostra un sol-gel trasparente a differenza dell'idrolisi in ambiente basico che invece ne rovina ampiamente le caratteristiche ottiche.

Il pH finale della fase di condensazione è quello che determina, invece, altre caratteristiche fisiche del supporto, infatti, gli studi effettuati sul sol-gel hanno dimostrato che a pH 5,5 il sol-gel si presenta meno compatto e condensa a velocità ben 50 volte minori rispetto ad un pH pari a 7,5 il quale invece lo rende dall'aspetto vetroso. Bisogna dire che agendo, quindi, in ambiente acido per quanto riguarda l'idrolisi e ponendosi ad un pH intermedio pari a 6,5 durante la fase di condensazione il sol-gel si presenta sempre consistente e trasparente rendendosi così adatto ad analisi spettrofluorimetriche e spettrofotometriche. Nel supporto ottimale dal punto di vista ottico, è stato fatto immobilizzare tra le sue maglie l'enzima glucosio ossidasi semplicemente aggiungendolo alla soluzione di tampone in fase di condensazione.

Sono state eseguite, quindi, prima misure spettrofotometriche utili a verificare l'immobilizzazione dell'enzima e la mancanza di interferenze dovute al supporto, successivamente sono state eseguite misure spettrofluorimetriche per l'analisi della fluorescenza stazionaria.

Il campione è stato eccitato a due lunghezze d'onda diverse corrispondenti a quella del triptofano nella regione dell'UV a 295nm ed a quella del FAD nella regione visibile a 450nm. Sono state preparate diverse concentrazioni di glucosio e sono state fatte reagire con la glucosio ossidasi immobilizzata nel supporto per analizzare i cambiamenti di fluorescenza al variare della

concentrazione di glucosio. Elaborando i dati ottenuti si è ottenuta una Michaelis – Menten la quale dimostra che all'aumentare della concentrazione di glucosio aumenta il segnale di fluorescenza sia per quanto riguarda il triptofano che per il FAD fino ad arrivare ad un punto di saturazione.

Infine si è visto che la stabilità del supporto rimane invariata nel tempo consentendo di effettuare numerose misure sempre con lo stesso biosensore.

Le prospettive future per questo tipo di biosensore sono ampie ed è nostro obiettivo quello di effettuare misure di fluorescenza utilizzando fibre ottiche accoppiate direttamente al sol-gel con l'enzima immobilizzato.

REALIZZAZIONE DI UN BIOSENSORE AMPEROMETRICO PER LA DETERMINAZIONE DEL BISFENOLO A

Di Tuoro D., Manco I., Bianco M., Portaccio M., Mita D.G.

Seconda Università degli Studi di Napoli, Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sant'Andrea delle Dame, Napoli
Istituto Nazionale Biostrutture e Biosistemi (I.N.B.B.) – Consorzio Interuniversitario - Viale medaglie d'Oro, Roma

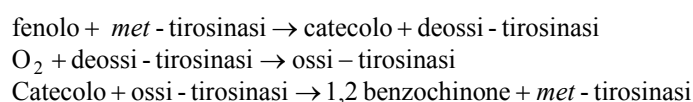
Parole chiave: biosensore amperometrico, bisfenolo A, tirosinasi

E' stato realizzato un biosensore amperometrico per la determinazione del bisfenolo A (BPA). L'interesse verso questo analita è giustificato dal fatto che il BPA è un distruttore endocrino contenuto nei policarbonati plastici e nelle resine epossidiche. Queste resine sono usate in numerosi prodotti che includono anche plastiche per uso alimentare. È pertanto molto utile usare un biosensore per determinare le concentrazioni di BPA in soluzioni acquose.

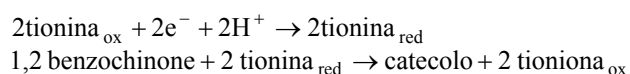
Gli esperimenti sono stati condotti a temperatura ambiente (25°C) in tampone fosfato 0.1M, pH 6.5, (contenente 0.1 M KCl) in un volume di reazione di 10 mL, utilizzando un sistema a tre elettrodi. L'elettrodo di lavoro è di polvere di grafite, quello di riferimento è di Ag/AgCl ed il contro elettrodo è di platino.

Sono stati costruiti tre diversi elettrodi di lavoro a polvere di grafite modificati con tirosinasi, che differiscono solo per la diversa concentrazione di tionina (0 - 1mM - 10mM). La tionina è un mediatore enzimatico in molte reazioni di ossidoriduzione dal momento che il suo potenziale formale è compreso tra 0.08 e -0.25 V, valore vicino al potenziale redox di molte biomolecole.

Il meccanismo elettrocatalitico della tirosinasi, usando come substrato il fenolo, è il seguente:



In presenza della tionina questa elettrochimicamente si riduce sull'elettrodo ed interagendo con il prodotto enzimatico 1,2-Benzochinone si ossida nuovamente portando ad un aumento della corrente catodica e una diminuzione di quella anodica per ogni coppia di tionina. Questo riflette lo stabilirsi di un veloce processo di trasferimento di 2 elettroni tra il chinone e la superficie dell'elettrodo attraverso il catalizzatore redox. Lo schema della reazione è il seguente:



Si genera quindi una corrente proporzionale alla concentrazione di substrato presente in soluzione. Fissando la concentrazione di BPA il segnale di corrente ottenuto usando l'elettrodo realizzato con tionina 1 mM presenta valori maggiori sia rispetto all'elettrodo privo di tionina, sia rispetto a quello realizzato con tionina 10 mM.

Focalizzando quindi l'attenzione sull'elettrodo senza tionina e su quello con tionina 1 mM e lavorando ad un potenziale di -150 mV, abbiamo studiato la risposta del biosensore al variare della concentrazione di BPA. Abbiamo trovato un limite di rilevabilità pari a 0.15 μM ed un range di risposta lineare tra 0.15 e 4 μM per entrambi gli elettrodi usati mentre la sensibilità è di 52 nA/ μM per l'elettrodo senza tionina e di 84 nA/ μM per l'elettrodo con tionina 1 mM. Dai risultati è chiaro che il sensore modificato con tionina presenta una sensibilità migliore e quindi più utile il suo utilizzo per monitorare la concentrazione di BPA in soluzioni contaminate. Inoltre la tionina migliora anche stabilità dell'elettrodo e permette di ottenere un segnale riproducibile per circa 15 giorni.

SVILUPPO DI SCAFFOLD FIBROSI IBRIDI A BASE DI PLLA E NANOIDROSSIAPATITE E RISPOSTA BIOLOGICA DI CELLULE STAMINALI STROMALI DI MIDOLLO OSSEO

*Mariaserena Dottori¹, Ilaria Armentano², Barbara Bozzo³, Alessandra Bianco³, Sabata Martino⁴,
Francesco D'Angelo⁴, Aldo Orlacchio⁴ e Josè Maria Kenny²*

¹ Istituto Nazionale Biosistemi e Biostrutture e Centro di Ingegneria dei Materiali, Università di Perugia, Italia

² Centro di Ingegneria dei Materiali, UdR INSTM, NIPLAB, Università di Perugia, Perugia, Terni, Italia

³ Dipartimento di Scienza e Tecnologie Chimiche, Università Tor Vergata, Roma, Italia

⁴ Dipartimento di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche, Sezione di Biochimica e Biologia Molecolare, Università di Perugia, Perugia, Italia

mariaserena.dottori@unipg.it

I recenti progressi nella scienza e tecnologia dei materiali hanno permesso di ingegnerizzare biomateriali innovativi che cercano di riprodurre il grado di complessità di molte strutture biologiche tra le quali la matrice extra-cellulare [1]. Nei prodotti biopolimerici di elettrofilatura, le dimensioni sub-micrometriche delle fibre prodotte sono comparabili con quelle presenti nella matrice extra-cellulare, riproducendone la tridimensionalità e la topografia fibrosa [2]. L'elettrofilatura è una tecnologia di produzione per substrati fibrosi assai promettente che permette di raggiungere buoni livelli di biomimesi con la struttura della matrice extra-cellulare [3]. Nel presente studio, membrane ibride a base di polilattide (PLLA) e nanopolveri di idrossiapatite (HAp) sono state ottenute mediante elettrofilatura. Le nanopolveri HAp sono state addizionate all'1% in peso rispetto alla quantità di polimero. La presenza di nanoparticelle di HAp incrementa le proprietà meccaniche e può migliorare l'osteconduttività nel sistema ibrido. La microstruttura dei substrati elettrofilati è stata valutata al microscopio SEM. L'effetto della presenza di nano-HAp sulle transizioni termodinamiche di fusione e cristallizzazione del PLLA è stato valutato mediante analisi calorimetriche (DSC). Sono state eseguite analisi dinamo-meccaniche (DMTA) per valutare l'effetto delle nanoparticelle di HAp sul comportamento viscoelastico del materiale, in particolare, l'aumento del modulo a taglio rappresenta un effetto di rinforzo meccanico.

L'interazione cellulare è stata investigata tramite cellule staminali stromali di midollo osseo (hBMSCs). Il presente lavoro dimostra che le cellule hanno buona adesione e proliferazione su tutti i substrati analizzati sia a 3 che a 7 giorni. Lo studio morfologico al microscopio elettronico ad emissione di campo (FESEM) ha permesso di osservare un rivestimento cellulare più esteso sui substrati ibridi rispetto ai substrati di solo PLLA. Inoltre, le hBMSCs su PLLA differenziano verso tessuto osseo e adiposo. Lo studio al microscopio FESEM rende visibili immagini ad elevato ingrandimento delle interazioni dei substrati con le hBMSCs.

Tra gli sviluppi futuri risulta prioritario quantificare gli eventi di interazione cellulare e stabilire modelli di risposta cellulare alle proprietà meccaniche e chimiche del substrato fibroso per sostenere le possibili applicazioni cliniche.

References

- [1] Y. C. Toh, S. Ng, Y. M. Khong , X. Zhang , Y. Zhu , P. C. Lin , C. M. Te , W. Sun , C. Hanry. Cellular responses to a nanofibrous environment, *Nanotoday*, 2006, 1 (3), 34.
- [2] B. S. Kim, D. J. Mooney. Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering. *Trends Biotechnol*, 2001, 16, 224.
- [3] S. Ramakrishna, J. Venugopal. Applications of polymer nanofibres in biomedicine and biotechnology, *Applied biochemistry and biotechnology*, 2005, 125, 147.

A NEW BIFACIAL AUTOLOGOUS PLATELET-RICH FIBRIN MATRIX (PRFM) FOR CELLS TRANSPLANTATION

Barbara Dozza, Enrico Lucarelli, Roberto Beretta, Giuseppina Tresca, Sean O'Connell, Stefano Squarzoni, Davide Donati.

Platelet-rich plasma (PRP) is used clinically in liquid, or gel form, to promote tissue repair. It is used in orthopaedic surgery where accelerated autogenous bone graft healing. PRP is not simple to handle when it is used in clinical settings in which it has to be implanted securely in a specific site, or where released growth factors could be washed out by body fluids during an operation, because it has poor mechanical properties.

In our work we investigated whether PRP mechanical properties could be improved. We obtained a PRP based disk shaped that we named PR-fibrin matrix (PRFM). We characterized the mechanical properties of PRFM and tested whether PRFM could be seeded with cells suitable for tissue engineering purposes. The PRFM obtained had a tear elastic modulus of 163 ± 11 , a tear load of 267 ± 36 , and maintained its mechanical properties for at least 18 days. We also tested whether the PRFM could be used as a scaffold for cell delivery showing that PRFM supported the culture and the delivery of mesenchymal stem cells.

In conclusion, we identified a novel PRP based matrix with optimal mechanical properties that make it a membrane easy to be handled and provide a solid scaffold for cell application that can contribute to bone and tissue regeneration.

NANOPARTICELLE DI ARGENTO E NANOCOMPOSITI BIODEGRADABILI: SISTEMI PER APPLICAZIONI ANTIBATTERICHE

E. Fortunati¹, I. Armentano¹, J.M. Kenny¹, S. Rinaldi², L. Latterini², F. Elisei²

¹Materials Engineering Center, UdR INSTM, NIPLAB, University of Perugia, Terni, Italy

²Department of Chemistry and CEMIN, University of Perugia, Perugia – Italy

Introduzione

L'argento è stato usato per secoli per prevenire e trattare una varietà di malattie, soprattutto le infezioni. L'argento ha proprietà antimicrobiche molto potenti, dal momento che basta la presenza di una parte su 100 milioni di argento elementare in soluzione per avere un'efficace azione antimicrobica. Per ottenere un effetto battericida, gli ioni argento devono essere disponibili in soluzione sulla superficie batterica e l'efficacia dipende dalla concentrazione in acqua di questi ioni. Gli ioni argento sembrano distruggere i microrganismi all'istante, bloccando il sistema respiratorio enzimatico (cioè la produzione di energia), e alterando il DNA microbico e la parete cellulare, mentre non hanno effetti tossici sulle cellule umane in vivo [1].

Oggi la medicina utilizza l'argento come antimicrobico in applicazioni come il trattamento delle ustioni o il trattamento delle infezioni degli occhi dei neonati ed è stato riscontrato anche un minor arrossamento infiammatorio delle lesioni che dimostra, quindi, la proprietà antinfiammatoria dell'argento.

Le nanoparticelle d'argento, in particolare, grazie alle dimensioni nanometriche ed alle proprietà completamente differenti rispetto al materiale tradizionale, hanno attirato un notevole interesse per la loro capacità di rilascio controllato, che a sua volta conduce ad una potente attività antibatterica contro un ampio spettro di batteri [2].

Lo scopo dell'attività sperimentale è stato quello di mettere a punto un processo di produzione e poi caratterizzazione di nanocompositi a matrice polimerica biodegradabile rinforzati con nanoparticelle di argento commerciali che poi potesse essere adattato anche alle nanoparticelle sintetizzate in laboratorio.

Materiali E Metodi

Le nanoparticelle di argento sono state sintetizzate in presenza di uno stabilizzatore polimerico tramite riduzione selettiva di ioni Ag^+ .

Come matrice polimerica per il nanocomposito è stato utilizzato un copolimero biodegradabile il PLGA (viscosità inerente 0.95-1.20dl/g) fornito dalla Absorbable Polymers-Lactel mentre le nanoparticelle di argento commerciali, P203, con dimensioni comprese tra 20 e 70 nm sono state acquistate dalla Cima Nano Tech.

I nanocompositi sono stati prodotti con la tecnica del solvent casting utilizzando il cloroformio come solvente e diverse percentuali di nanoparticelle di argento (1 wt%, 2wt%, 5wt% and 7wt%) ottenendo così film polimerici di 0.3mm di spessore.

Al fine di valutare la dispersione del rinforzo aggiunto, parametro che influenza direttamente le proprietà finali del materiale, i campioni sono stati sottoposti ad analisi morfologica eseguita tramite microscopia elettronica a scansione (FESEM), microscopia confocale (CLSM) e microscopia a forza atomica (AFM). Si sono inoltre valutati gli eventuali cambiamenti conseguenti all'introduzione di un rinforzo nanometrico alle proprietà termiche (tramite analisi termogravimetrica e calorimetria a scansione differenziale) e dielettriche della matrice polimerica.

Risultati

Si sono sintetizzate nanoparticelle di argento di dimensioni e forme diverse ottenute variando i rapporti tra i reagenti e la concentrazione dello stabilizzatore polimerico. Si sono quindi eseguiti test antibatterici utilizzando colture di *E. Coli* che hanno evidenziato un buon effetto antibatterico esercitato dalle nanoparticelle. I risultati migliori si sono ottenuti nel caso delle nanoparticelle con dimensioni più ridotte (15nm).

Per quanto riguarda i nanocompositi di PLGA e argento commerciale i risultati evidenziano un buon grado di dispersione del rinforzo nella matrice nonché la presenza di una struttura porosa superficiale attribuibile all'effetto di evaporazione del solvente (diametro dei pori: 10 μ m). L'introduzione delle nanostrutture comporta un incremento della rugosità superficiale ed induce scissioni di catena avvalorate dai risultati ottenuti dall'indagine delle proprietà termiche. L'aggiunta inoltre di un rinforzo metallico si riflette sulle proprietà dielettriche del polimero provocando un incremento della parte reale della permittività all'aumentare della concentrazione di nanoparticelle utilizzate.

References

1. Jose Ruben Morones, Jose Luis Elechiguerra, Alejandra Camacho, Katherine Holt, Juan B Kouri, Jose Tapia Ramirez and Miguel Jose Yacaman; *Nanotechnology* 16 2005 2346–2353;
2. Chen B.; Sun K.; *Science* 2005, 24, 978;
3. Asta Šileikaitė, Igoris Prosyčevs, Judita Puišo, Algimantas Juraitis, Asta Guobienė; *Materials Science*, Vol. 12, No. 4. 2006.

STUDIO SULLE PROPRIETÀ ANTIOSSIDANTI DEL *PROPOLIS* E SULLE INTERAZIONI CON MEMBRANE MODELLO

Elena Gregoris, Roberto Stevanato

Dipartimento di Chimica Fisica, Università Ca' Foscari di Venezia

Sono note sin dai tempi antichi le proprietà benefiche del *propolis*, un prodotto dell'alveare utilizzato dalle api per la costruzione e la manutenzione delle arnie. Nonostante il largo utilizzo del *propolis* nella medicina naturale, sono pochi gli studi scientifici su questo prodotto ed in particolare sulle sue proprietà antiossidanti, mentre risultano assenti indagini che ne esaminino le interazioni con la fase lipidica delle membrane. Oggetto del presente lavoro è la misura del contenuto di polifenoli totali (TPC) su campioni di *propolis* provenienti da zone di differente tipologia territoriale (barena, campagna coltivata, bosco collinare). A tal scopo sono stati utilizzati i tre metodi Folin-Ciocalteu (FC), *quenching* del DPPH ed un saggio enzimatico messo a punto dal presente gruppo di ricerca. I risultati ottenuti, seppure dipendenti dalle caratteristiche specifiche delle tre metodiche, dimostrano inequivocabilmente un elevato contenuto di polifenoli: in termini approssimativi circa il 40% del peso del *propolis* risulta essere mediamente costituito da polifenoli (espressi come catechina equivalente). I dati ottenuti sono in sintonia con quelli risultanti da misure di inibizione della perossidazione lipidica (ossidazione, ad opera dell'ossigeno molecolare, di acido linoleico disperso in micelle di sodiododecilsolfato), dalle quali si osserva, per tutti i campioni esaminati, una straordinaria capacità antiossidante del *propolis*, paragonabile a quella della catechina assunta come riferimento. Dallo studio delle interazioni del *propolis* sui liposomi, effettuato con le tecniche di calorimetria a scansione differenziale (DSC) e di risonanza di spin elettronico (ESR), utilizzando la metodica dello *spin-label*, emerge una limitata variazione della temperatura di transizione di fase (transizione principale) e cambiamenti minimi dei profili degli spettri ESR. L'insieme dei risultati ottenuti porta alla conclusione che il *propolis*, pur non provocando significative modificazioni delle proprietà di membrana, agisce in modo molto efficace contro la loro degradazione perossidativa, in virtù del suo elevato contenuto di polifenoli.

CHIARIFICAZIONE ENZIMATICA DEL SUCCO DI MELA MEDIANTE REATTORI A LETTO IMPACCATO O FLUIDIZZATO.

Grimaldi T.^{1,2}, Rossi S.², Bencivenga U.², Diano N.^{1,2,3}

¹ Consorzio Interuniversitario “Istituto Nazionale Biostrutture e Biosistemi”, Viale Medaglie d’oro 305 00136 Roma

² Istituto di Genetica e Biofisica “A. Buzzati Traverso” del CNR - Via P. Castellino 111, 80131 Napoli, Italia.

³ Dipartimento di Medicina Sperimentale, Facoltà di Medicina Chirurgia - Seconda Università di Napoli - Via S.M. di Costantinopoli 16, 80136 Napoli, Italia.

Abbiamo investigato il comportamento catalitico di una miscela industriale di enzimi pectolitici da *Aspergillus sp* (Macer8TM FJ), covalentemente immobilizzata su diversi supporti (microsfere di vetro, beads in Poliacrilonitrile(PAN), pellets in Nylon 6/6). Inizialmente lo studio è stato condotto utilizzando un reattore batch ed una soluzione acquosa di pectina (5mg/mL) simulante il succo di mela. La resa dei supporti catalitici è stata valutata mediante i seguenti parametri: la velocità di idrolisi della pectina, il tempo (τ_{50}) in cui si riduce del 50% la viscosità iniziale della soluzione ed, infine, il tempo ($\tau_{\text{comp,depc}}$) necessario per ottenere la totale depectinizzazione.

Il miglior sistema catalitico è risultato essere quello costituito da beads PAN/Macer8TM FJ e, conseguentemente, tali supporti catalitici sono stati utilizzati come riempimento per bioreattori a letto impaccato o fluidizzato, da utilizzare per la chiarificazione del succo grezzo proveniente dalla macerazione delle mele “Annurca”.

La performance dei due reattori è stata valutata variando la velocità di ricircolo del succo di mela. Le condizioni sperimentali sono state le seguenti: pH=4.0, T=50°C, volume dei beads catalitici=20cm³, volume del succo da trattare=50mL. Non sono state osservate differenze a basse velocità di ricircolo, mentre a più alte velocità di ricircolo, il tempo necessario per ottenere la completa idrolisi della pectina, utilizzando il reattore a letto fluidizzato, è risultato essere 0,25 volte inferiore a quello del reattore a letto impaccato: 131 minuti per il reattore impaccato e 41 minuti per il reattore fluidizzato.

Abbiamo inoltre dimostrato che le proprietà del nostro succo di frutta limpido è paragonabile, se non migliore, a quelli disponibili nel mercato italiano.

FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF HUMAN SERUM CARNOSINASE CN1 IN AGING PROCESS

Francesca Guarino[^], Francesco Bellia*, Vittorio Calabrese*, Vito De Pinto*[^], Enrico Rizzarelli*[^].*

*Dip. Scienze Chimiche, Università di Catania, Italia, [^]Istituto Nazionale Biostrutture e Biosistemi, Roma, Italia

Human serum carnosinase (CN1) is a secreted carbosipeptidase which specifically hydrolyzes carnosine dipeptide (β -alanil-L-histidine). It has been reported that carnosine plays an important role as physiological buffer, ion chelating agent, free-radical scavenger in several pathological conditions. Most importantly, the neuroprotective effects of carnosine and its analogue homocarnosine (γ -aminobutyryl-L-histidine) and anserine (β -alanyl-1-methyl-L-histidine), due to the capacity of counteract both oxidative and nitrosative stress in aging process and brain dysfunction, has recently suggested a therapeutic potential of carnosine in neurodegenerative diseases. However remains still unknown whether the presence of carnosinase enzymes might compromise carnosine neuroprotective role. For this reason we are interested in understanding the cellular and molecular mechanism associated to this phenomenon, specially in defying the structural and functional features of carnosinase enzyme.

We have established a stable Hela cell line expressing recombinant human serum carnosinase CN1. In both cell lysate and cell culture medium we identified, by ELISA, western blotting and enzymatic assay the presence of a functional carnosinase. The recombinant CN1 protein was purified from cell culture media of stably transfected Hela cells by chromatography on DEAE-Sephacel and Sephadex G-100. Furthermore CN1 expression and distribution was evaluated, by ELISA assay and western blotting, into different rat brain areas derived from 12 and 26 months old rats. Significant increase of CN1 expression and carnosinase activity was interestingly found in various brain areas of senescent rats and in particular in substantia nigra. Since it is well documented that damage and alteration of substantia nigra neurons are related to progression of neurodegenerative diseases, the results might suggests a primary involvement of carnosinase enzymes and its substrate carnosine in the aging process and brain dysfunction.

Further investigation on the structure and function will allow us to clarify the biological role of carnosinase in neurodegenerative process.

EFFETTO DEGLI FTALATI SULLA FISIOLOGIA RIPRODUTTIVA DEL TELEOSTEO *DANIO RERIO*

Francesca Maradonna^{a,b}, Matteo Evangelisti^a, Damiano Gustavo Mita^b and Oliana Carnevali^{a,b}

^a Dipartimento di Scienze del Mare, Università Politecnica delle Marche, Ancona (Italia)

^b Istituto Nazionale Biostrutture e Biosistemi, viale Medaglie d'Oro 305, Roma (Italia)

Recentemente, la legislazione che regola il rilascio nell'ambiente del di(2-etilexil)ftalato (DEHP), plastificante principe del PVC, ha sancito una progressiva restrizione del suo utilizzo. La maggior parte dei dati relativi all'effetto tossico degli ftalati derivano da studi condotti sui mammiferi, dove si è osservato che i metaboliti degli ftalati possono determinare danni al fegato, ai testicoli, anomalie della steroidogenesi e nella progenie. Poche sono invece le informazioni relative all'effetto di questi interferenti endocrini (IE), tra cui il DEHP, sui vertebrati non mammiferi.

In questo studio, l'effetto del DEHP è stato analizzato in colture di epatociti isolati da maschi e femmine di zebrafish, *Danio rerio*, esposti per 48 ore a due dosi di DEHP (10 e 100 nM). Ipotizzando la natura estrogenica di questo inquinante, i dati ottenuti sono stati paragonati a quelli ottenuti con l'esposizione all'etinilestradiolo (EE2, 10 µM). Mediante Real time PCR, è stata analizzata l'espressione di geni chiave nella fisiologia della riproduzione quali la vitellogenina (*vtg1*), i recettori degli estrogeni (*ERα*, *ERβ1*, *ERβ2*), le aromatasi (*CYP19a*, *CYP19b*) e i recettori attivati dai proliferatori perossisomiali (*PPARα*, *PPARβ*), noti come target primari degli ftalati e coinvolti anche nella steroidogenesi.

I risultati ottenuti hanno evidenziato la capacità del DEHP di interferire con la fisiologia riproduttiva di *D. rerio* stimolando la trascrizione della *vtg* ed inibendo quella del *CYP19*.

Sono state osservate differenze significative tra maschi e femmine per ciò che riguarda la trascrizione dei geni *ERα*, *ERβ1*, *ERβ2* indicando una chiara risposta sesso specifica. In particolare, gli organismi maschili hanno mostrato una maggiore sensibilità all'esposizione allo ftalato

Concludendo, questo studio *in vitro* fornisce indicazioni chiare sull'effetto del DEHP a livello epatico e suggerisce l'uso dei geni qui studiati come possibili biomarkers di tossicità per il monitoraggio degli ftalati ambientali.

Data l'elevata similarità genetica tra *D. rerio* e l'uomo, questo modello sperimentale recentemente è molto utilizzato negli studi tossicologici. In questa direzione, lo studio qui presentato migliora le conoscenze del *pathway* molecolare coinvolto nella risposta epatica ad uno dei più comuni inquinanti presenti nell'ambiente.

IL FRUTTO DI *Psidium guajava* ESERCITA AZIONE ANTICANCRO MOSTRANDO ATTIVITA' INIBITORIA DELLE HISTONE-DEACETILASI (HDAC)

Mita L.(1,2,) Doto A.(3), Rigano D.(4), Nappo C.(3), Armetta I.(3), Della Pietra G.(3), Sica V.
(1,2,3), Molinari A.M.(2,3) Bontempo P.(1,2)

(1) Istituto Nazionale Biostrutture E Biosistemi (Inbb) (2)Dottorato Di Ricerca In Diagnostica Di Laboratorio:
Sviluppo Di Tecniche Cellulari E Molecolari E Di Bioingegneria E Informatica – Seconda Università Di Napoli
(3)Patologia Clinica Dipartimento Di Patologia Generale – Seconda Università Di Napoli (4)Dipartimento Di
Chimica Delle Sostanze Naturali -Università Federico Ii

Parole chiave: cancro, apoptosi, epigenetica

L'attività antineoplastica dell'estratto totale del frutto di *Psidium Guajava* (Guava) è stata dimostrata ma i composti e i meccanismi molecolari responsabili di tale attività non sono stati ancora del tutto caratterizzati. L'estratto acetonicamente totale del frutto di Guava ed in particolar modo l'estratto acetonicamente della polpa, esercita effetto antiproliferativo accompagnato da modulazione del ciclo cellulare e dell'apoptosi .

Come primo passo per la caratterizzazione delle basi molecolari dell'azione apoptotica del frutto di Guava abbiamo precedentemente dimostrato che il trattamento con esso induce un'over-espressione di p21 e p16 e aumento dell'espressione delle caspasi 3/7 e della caspasi 8 e 9 nelle cellule responsive. Essendo tutti i target molecolari investigati inducibili epigeneticamente, abbiamo voluto verificare se l'estratto agisse attraverso modulazione epigenetica ed identificare ulteriori effettori molecolari dell'attività pro-apoptotica di *Psidium Guajava*.

L'attività antineoplastica dell'estratto totale dei frutti di *Guava*, ottenuto mediante estrazione acetonica, è stata testata in linee cellulari leucemiche ed in colture *ex vivo* di blasti di pazienti affetti da leucemia mieloide acuta (AML). Per ottenere la soluzione d'uso, il residuo secco è stato risospeso con poche gocce di DMSO e PBS, tamponato a pH 7.5 ed utilizzato alla concentrazione di 1,5 mg/ml . Mediante Western blotting è stata analizzata la variazione dell'espressione proteica e l'acetilazione.

I risultati ottenuti hanno dimostrato che l'estratto acetonicamente di Guava è capace di modificare i livelli di acetilazione di target istonici e non istonici come si evince dalla iperacetilazione dell'istone H3 e dell' α tubulina, e up-regolazione di FAS e di TRAIL, target ben conosciuto degli inibitori delle istone-deacetilasi (HDACi's), sia a livello del mRNA che a livello della proteina indicando il coinvolgimento di queste vie nel processo apoptotico.

Infine il saggio enzimatico sull'attività delle HDAC1 ha dimostrato che il frutto di guava determina inibizione dell'HDAC stesse, questa azione biologica potrebbe essere correlata all'induzione dell'apoptosi e alla regolazione dell'espressione genica. L'inibizione delle

HDAC da parte dei composti presenti nel frutto potrebbe essere molto interessante dal punto di vista farmacologico.

I risultati da noi ottenuti gettano una nuova luce sugli effetti benefici esercitati dall'estratto di *Psidium Guajava* ed indicano che il potenziale anticancro di questo frutto potrebbe essere dovuto alla sua capacità di esercitare modulazione epigenetica in cellule responsive.

PREDICTING PROTEIN THERMOSTABILITY CHANGES FROM SEQUENCE UPON MULTIPLE MUTATIONS.

Ludovica Montanucci, Piero Fariselli, Pier Luigi Martelli and Rita Casadio

Biocomputing Group, University of Bologna, Via Iriero 42 40126-Bologna

www.biocomp.unibo.it

Motivation: A basic question in protein science is to which extent mutations affect protein thermostability. This knowledge would be particularly relevant for engineering thermostable enzymes. In several experimental approaches, this issue has been serendipitously addressed. It would be therefore convenient providing a computational method that predicts when a given protein mutant is more thermostable than its corresponding wild-type.

Results: We present a new method based on support vector machines that is able to predict if a set of mutations (including insertion and deletions) can enhance the thermostability of a given protein sequence. When trained and tested on a redundancy-reduced dataset, our predictor achieves 88% accuracy and a

correlation coefficient equal to 0.75. Our predictor also correctly classifies 12 out of 14 experimentally characterized protein mutants with enhanced thermostability. Finally, it correctly detects all the 11 mutated proteins whose increase in stability temperature is $> 10^{\circ}$ C.

Availability: The dataset and the list of protein clusters adopted for the SVM cross-validation are available at the web site <http://lipid.biocomp.unibo.it/~ludovica/thermo-meso-MUT>.

DISINQUINAMENTO DI ACQUE INQUINATE DA INTERFERENTI ENDOCRINI: IL DMP COME MODELLO DI FTALATI.

Nicolucci C.^{1,2}, Caputo L.^{2,3}, Cermola M.², Mita D.G.^{1,2,3}

¹ Consorzio Interuniversitario "Istituto Nazionale Biostrutture e Biosistemi", Viale Medaglie d'oro 305 00136 Roma

² Istituto di Genetica e Biofisica "A. Buzzati Traverso" del CNR - Via P. Castellino 111, 80131 Napoli, Italia.

³ Dipartimento di Medicina Sperimentale, Facoltà di Medicina Chirurgia - Seconda Università di Napoli - Via S.M. di Costantinopoli 16, 80136 Napoli, Italia.

Il disinquinamento di acque inquinate da Dimetilftalato (DMP), scelto come modello di interferente endocrino, è stata realizzata mediante bioreattori utilizzando membrane idrofobiche su cui è stato immobilizzato l'enzima lipasi da *Candida rugosa*. In particolare la lipasi è stata immobilizzata via diazotazione su membrane di polipropilene attivate mediante un reattore plasmico-chimico.

La velocità della reazione enzimatica è stata studiata sia per l'enzima libero che per l'enzima immobilizzato in modo da conoscere le modifiche introdotte dal processo di immobilizzazione. Si è trovato che il processo di immobilizzazione non modifica significativamente la dipendenza dell'attività enzimatica dal pH, mentre determina uno shift dell'optimum della temperatura verso temperature maggiori.

Per quel che riguarda l'enzima immobilizzato, poi, abbiamo studiato la dipendenza della velocità di reazione dalla concentrazione del substrato in un bioreattore operante in condizioni isoterme ($T=25^{\circ}\text{C}$) ed in condizioni non isoterme ($T=25^{\circ}\text{C}$ e $\Delta T=10, 20$ e 30°C).

Nel caso dei bioreattori non isotermi, si sono trovati incrementi percentuali dell'attività enzimatica, e quindi maggiore degradazione della concentrazione del DMP, crescenti con la differenza di temperatura applicata.

Inoltre è interessante evidenziare che la biodegradazione del DMP mediante bioreattori non isotermi è risultata essere più alta a concentrazioni più basse, come quelle presenti nelle acque reflue, considerando la bassa solubilità in acqua di questo composto.

Il vantaggio nell'utilizzo dei bioreattori operanti in condizioni non isoterme, inoltre, è stato discusso in termini di riduzione dei tempi di disinquinamento.

TESTING THE EFFICACY OF AN RNA INTERFERING CONSTRUCT TARGETED AT THE TRICOTHECENE BIOSYNTHESIS GENE *TRI6* IN *FUSARIUM CULMORUM*

M. Orrù¹, B. Scherm¹, V. Balmas¹, E. Azara², T.M. Hammond³, N.P. Keller³, Q. Migheli¹

¹Dipartimento di Protezione delle Piante - Centro interdisciplinare di eccellenza per lo sviluppo della ricerca biotecnologica e per lo studio della biodiversità della Sardegna e dell'area mediterranea, Università degli Studi di Sassari, Via E. De Nicola 9, I-07100 Sassari, Italy; ²CNR Istituto di Chimica Biomolecolare, Sezione di Sassari, Traversa La Crucca 3, Località Baldinca, Li Punti, I - 07040 Sassari; ³Department of Plant Pathology, University of Wisconsin, Madison, USA

Post-transcriptional regulation of eukaryotic genes through interception and degradation of mRNA is known as RNA silencing. Silencing is initiated when dsRNA is processed into small RNAs, 21-26 nucleotides (nt) in length, by the RNaseIII enzyme Dicer. These small RNAs are then incorporated into silencing-effector complexes, which they guide to complementary nucleic-acid targets. Aim of this study was to test the efficacy of an RNA silencing construct to suppress mycotoxin production in the plant pathogen *F. culmorum* (W.G. Smith) Sacc., incitant of crown and foot rot on wheat.

Transformation of a highly virulent strains of *F. culmorum* with IRT containing sequences corresponding to the trichothecene biosynthesis gene *tri6* was achieved by using the hygromycin B resistance gene *hph* as selectable marker in PEG-mediated co-transformation of fungal protoplasts.

The pattern of integration indicates that most transformants underwent homologous recombination events with partial deletion of the endogenous *tri6* gene. The *tri6*-specific IRT did not alter physiological characteristics, such as spore production, pigmentation, and growth rate on solid media.

Pathogenicity assays carried out to evaluate whether impairment in deoxynivalenol (DON) production in the *tri6*-IRT strains correlates with a loss of virulence, showed decreased disease indices (20-50%) for 13 of the 22 tested strains.

Gene expression profiles of *tri6* and *tri5* and production of deoxynivalenol in vitro by Fc21 wild and Fc21nit in culture were evaluated during a time course of 2-16 days by means of quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR) analysis and LC/MS, resulting in an expression peak of *tri6* and *tri5* after 7 days and maximum DON production after 14 days. Based on these results for all transformants and controls qRT-PCR was carried out after 7 days and LC/MS analysis was performed after 14 days in culture.

Work funded by the Ministry of University and Research (PRIN 2005: Fusarium crown and foot rot of wheat: effect of plant defence mechanisms on pathogenicity and on mycotoxin production; PRIN 2007: Transposon tagging and RNA silencing in the wheat pathogen *Fusarium culmorum*)

TARGETING PROTEIN FLEXIBILITY OF THE ESTROGEN RECEPTOR BY COMPUTATIONAL SIMULATIONS

Francesca Spyarakis,^{1,2} Francesca Fanelli,³ Andrea Mozzarelli,^{4,2} and Pietro Cozzini^{1,2}

¹Laboratory of Molecular Modelling, Department of General Chemistry, University of Parma, Parma, Italy; ²Istituto Nazionale di Biostrutture e Biosistemi (INBB), Consorzio Interuniversitario, Rome, Italy; ³Department of Chemistry, University of Modena and Reggio Emilia, Modena, Italy; ⁴Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Parma, Parma, Italy.

Proteins are inherent flexible molecules and their flexibility is essential for function [1]. The estrogen receptor (ER), member of the nuclear receptor superfamily, represents an emblematic example of structure-flexibility-activity relationship, since the activation of the transcriptional machinery, and the related estrogenic action, depends on ligand-induced conformational transitions. The motions experienced by the receptor can be classified as two different types: a micro flexibility, involving the fine tuning of the residues lining the steroid binding pocket, and a macro flexibility, associated to the macroscopic adjustment of helix 12, able to move from an extended state to either a “mouse trap”/agonist-like position or a “charge clamp”/antagonist-induced site [2].

Given the pathological and therapeutic relevance of the estrogen receptor, many experimental and computational studies have been performed in order to elucidate the mechanism of action, and to develop new potential drugs with both estrogenic or non-estrogenic properties [3]. How do these approaches deal with the inherent flexibility of the receptor? Do they neglect it or do they account for it in a reliable way? Unfortunately, experimental techniques like X-ray crystallography and NMR provide limited information on the accessible conformations, and are not able to predict how the interaction with different ligands may affect the conformational equilibria.

Molecular Dynamics (MD) methods represent, nowadays, one of the most suitable tool to sample the available conformational space of a macromolecule and to provide energetics-based explanations for local and global protein flexibility. Classical atomistic MD simulations in explicit solvent are only able to investigate processes occurring in the time range between 10^{-12} and 10^{-9} seconds. On the contrary, enhanced sampling MD methods together with coarse-grained and implicit solvent representations, allow the observation of rare dynamics events, forcing the system to sample a greater part of the available conformational space, thus enabling an extension of the explored time evolution. As a result, larger conformational changes like allosteric transitions, local denaturation, rigid body motions and helix-coil transitions may be observed [4].

In order to investigate the large movements experienced by H12 and to model the possible structure of the unbound receptor not yet available, we performed MD simulations by using GBSW [5] and FACTS [6] implicit water models implemented in the CHARMM program. 10ns simulations probing different intra-helix restraints were run on a putative apo form of ER α [7], generated from the X-ray model of the estradiol-ER α complex upon removal of the ligand. The first analyses

highlighted the extremely high flexibility of H12, demonstrating its capacity to sample several different conformations, partly similar to the antagonist-like form, and partly completely different from the available crystallographic structures. Moreover, simulations confirmed the possible collapsed form of the apo receptor, previously identified by Bourguet et al. for the retinoid-X receptor (RXR- α), belonging to the same nuclear receptor family [8]. Further simulations were carried out by placing into the binding cavity the endogenous ligand estradiol and two partial antagonists, i.e. tamoxifen and GW5638, known to induce slightly different conformational changes of H12. These are the first steps towards an understanding of the ER mechanism of action, and prediction of the effects of novel anti-estrogenic molecules.

1. Henzler-Wildman, K.; Kern, D. Dynamic personalities of proteins. *Nature* 2007, 450, 964-972.
2. Moras, D.; Gronemeyer, H. The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Curr Opin Cell Biol* 1998, 10, 384-391.
3. Amadasi, A.; Mozzarelli, A.; Meda, C.; Maggi, A.; Cozzini, P. Identification of xenoestrogens in food additives by an integrated in silico and in vitro approach. *Chem Res Tox* 2008, in press.
4. Adcock, S.A.; McCammon, J.A. Molecular dynamics: survey of methods for simulating the activity of proteins. *Chem Rev* 2006, 106, 1589-1615.
5. Im, W.; Feig, M.; Brooks, CL 3rd. An implicit membrane generalized born theory for the study of structure, stability, and interactions of membrane proteins. *Biophys J* 2004, 86, 3329-3331.
6. Haberthür, U.; Caflisch, A. FACTS: fast analytical continuum treatment of salvation. *J Comput Chem* 2008, 29, 701-715.
7. Tanenbaum, D.M.; Wang, Y.; Williams, S.P.; Sigler, P.B. Crystallographic comparison of the estrogen and progesterone receptor's ligand binding domains. 1998, 95, 5998-6003.
8. Bourguet, W.; Ruff, M.; Chambon, P.; Gronemeyer, H.; Moras, D. Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR- α . 1995, 375, 377-382.

RELEVANCE OF CATHEPSIN S AND D EXPRESSION FOR THE GENERATION OF TOLEROGENIC DENDRITIC CELLS FROM HEMATOPOIETIC STEM CELLS

Tiribuzi R.¹, Ciraci E.², Makrypidi G.¹, di Girolamo I.¹, D'Angelo F.¹, Bottazzo G.F.², Berardi A.C.², Martino S.¹ and Orlacchio A.¹

¹Dipartimento di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche, Sezione di Biochimica e Biologia Molecolare, Università degli Studi di Perugia.

²Laboratorio di Cellule Staminali, IRCCS, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma.

Thrombopoietin (TPO) and IL-16, combined with a conventional cocktail composed of Flt3L, GM-CSF, IL-4 and TNF- α direct the differentiation of human CD34⁺hematopoietic stem cells toward the development of tolerogenic dendritic cells. However, the molecular mechanisms by which dendritic cells are shifted away from an immune stimulatory phenotype are largely undefined.

Here, we report that TPO+IL-16-mediated signaling leads to STAT3 phosphorylation and drives specific down-regulation of cathepsins S and D, two members of the pool of proteases involved in antigen presentation. Expression of these enzymes is finely time-controlled at both transcriptional and post-transcriptional levels, and apparently linked to a concerted modulation of the endogenous cathepsin inhibitor cystatin C. Notably, CD34⁺ cells induced to differentiate toward the alloreactive pathway by the cytokine cocktail lacking TPO+IL-16 switched the course of dendritic cell differentiation from immunity into tolerance when either cathepsin gene was silenced via RNA interference. Knockdown cells displayed markedly reduced levels of MHC-II, decreased efficacy in antigen uptake and impairment of stimulatory activity toward autologous CD4⁺T cells comparable to those resulting from TPO+IL-16 treatment.

Thus, cathepsins S and D enforce a biochemical checkpoint within the immunosuppressive pathway elicited by TPO+IL-16, suggesting that either enzymes may be targeted for cell manipulation aimed at immunotherapy.

Acknowledgements: Ministero della Salute, RF-UMB-2006-339457; Fondazione Cassa di Risparmio di Perugia, 2007.0149.020.

6-OH-11-O-HYDROXYPHENANTRENE AND PPAR α LIGANDS IN COMBINATION TO INHIBIT PROLIFERATION AND INVASIVENESS IN COLON CANCER CELLS.

Alessio Papi¹, Paola Rocchi², Anna Maria Ferreri², Giovanna Bartolini¹ and Marina Orlandi¹

¹Department of Experimental Evolutionary Biology, University of Bologna, via Selmi, 3, 40126 Bologna, Italy;

²Department of Experimental Pathology, viale Filopanti, 22, 40126 University of Bologna, Bologna, Italy

Colorectal cancer are significant cause of mortality in western countries and new approaches are necessary to reduce this trend. Nuclear receptors retinoid x receptors (RXRs) and peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR α) are potential candidates as drug target for cancer prevention and treatment. We previously reported a remarkable antitumor effect of the retinoid 6-OH-11-O-hydroxyphenantrene (IIF), ligand of RXRs, on many cancer cell lines. Since PPARs bind to DNA as heterodimers with RXRs, in this study we investigated if IIF potentiates the antitumoral properties of the PPAR α ligand ciglitazone (CGZ) on three colon cancer cell lines: HCA-7, HCT-116 and HT-29.

Our results show that either IIF or CGZ inhibited cell growth and induced apoptosis, but these properties were enhanced by using IIF and CGZ in combined treatment. Since matrix metalloproteinases (MMPs) play a major role in tumor cell invasion, we analyzed the effect of IIF and CGZ on MMP2 and MMP9 activity and expression. The addition of IIF to CGZ resulted in a decrease of MMP2 and MMP9 expression level and activity, higher than when each agent was used alone. Since their activity seems to correlate with inducible form of cyclooxygenase (COX-2) the enzyme responsible of prostaglandin synthesis, we verified that both drugs reduced COX-2 expression. Furthermore, treatment with IIF and /or CGZ enhanced PPAR α expression level but both agents in combined treatment caused the maximum efficiency.

In conclusion, these findings suggest that the RXR selective retinoid IIF, in combination with the PPAR α ligand CGZ, may provide a therapeutic advantage in colon cancer treatment.

MORPHOLOGICAL ASPECTS OF HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS FROM AMNIOTIC FLUID (AFS): MAIN FEATURES BEFORE AND AFTER CARDIAC DIFFERENTIATION.

Margherita Maioli*, Pasquale Bandiera**, Andrea Montella**, Raimonda Sanna**, Antonella Pintus*, Sara Guadini*, Carlo Ventura[§]

*Department of Biomedical Sciences/ National Institute of Biostructures and Biosystems, University of Sassari, - Viale San Pietro 43/B, 07100 Sassari, Italy, Fax: 079-228523 e-mail: mmaioli@uniss.it

** Department of Biomedical Sciences, University of Sassari, I-07100 Sassari, Italy

§ Laboratory of Molecular Biology and Stem Cell Engineering, National Institute of Biostructures and Biosystems, University of Bologna, I-40138 Bologna, Italy

Adult mesenchymal stem cells (MSCs) can be isolated from different sources, including bone marrow, foetal membrane, dental pulp adipose tissue and amniotic fluid; these cells can be cultured in adhesion, thus being expanded in culture avoiding the loss of their multipotency. Moreover MSCs are able to produce and secrete a large number of molecules, among with some are immunosuppressive, highlighting the therapeutic use of allogeneic MSCs. Within this context defining new tools capable to enhance the rate of the cardiogenic differentiation, which itself is a very low efficient process, could represent a major issue for regenerative therapies. We used human MSCs obtained from amniotic fluid, (AFS) as a model of cardiogenic differentiation. AFS expresses both embryonic and adult stem cell markers. In particular they are negative for markers of the hematopoietic lineage (CD45) and of hematopoietic stem cells (CD34, CD133), while exhibit a positive stain for markers embedded with mesenchymal stem cells assessment, like CD29, CD44 (hyaluronan receptor), CD73, CD90 and CD105 (endoglin). In the experiments described here we aim at investigating the morphological changes before and after the commitment of the cardiac phenotype, induced by an ester of hyaluronan linked to both butyric and retinoic acid (HBR, *Ventura C et al., J Biol Chem. 2007; 282:14243-52*). Ultrastructural features of the cultured cells were determined using transmission and scanning electron microscopy. Immunological detection of the octamer binding protein Oct3/4 was performed with an Olympus fluorescent microscope. Ultrastructural experiments highlight the presence of two different cell types population among undifferentiated AFS, exhibiting different organization, visible at the intracellular level as well as on the extracellular membrane. Our results demonstrate a morphological plasticity of undifferentiated AFS; moreover HBR treatment was able to induce a high throughput of cardiogenic commitment.

TOWARDS AN UNDERSTANDING OF PROTEIN STRUCTURAL HETEROGENEITY: WHICH IS THE BIOLOGICAL SIGNIFICANCE OF CONFORMATIONAL SUBSTATES IN GFPmut2?

**Pioselli, B., *Campanini, B., *Raboni, S., *Bettati, S., ^Chirico, G., ^Collini, M., ^Baldini, G. and *Mozzarelli A.*

**Dipartimento di Biochimica e Biologia Molecolare, Università degli Studi di Parma, Parma, and ^Dipartimento di Fisica, Università di Milano-Bicocca, Milano.*

The structure of a native protein is an ensemble of different conformations which constitute a craggy energy landscape. Fluctuations and relaxations inside this landscape are fundamental to the biological function. The conformational heterogeneity is even more pronounced in protein folding reactions because of the multiplicity of different orientations adopted by the unfolded polypeptide chain and the multiplicity of folding pathways. As a result, a unique funnel-like energy landscape is obtained. Encapsulation in wet nanoporous silica gel has been shown to be a powerful tool to investigate protein structural and dynamics relationship. In fact, encapsulation slows down the conformational transitions and allows the control of the distribution of species. We exploit site-directed mutagenesis and encapsulation in silica gel to characterize the conformational heterogeneity of GFPmut2, taken as a model for globular proteins. The equilibrium and kinetic unfolding of the H148G GFPmut2 mutant was monitored both in solution and in silica gel, using circular dichroism and fluorescence spectroscopy. The results are compared with previous studies carried out on GFPmut2.

ESPRESSIONE IN FORMA RICOMBINANTE DI DIFFERENTI FORME DI CLUSTERINA

Ileana Ramazzina^{1*}, Mariangela Coletta^{2*}, Federica Rizzi², Saverio Bettuzzi²

¹ Dipartimento di Biochimica e Biologia Molecolare, Università degli Studi di Parma, ²Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università degli Studi di Parma e Istituto Nazionale Biostrutture e Biosistemi, Roma

Introduzione ed obiettivi:

Il gene della Clusterina (*CLU*) è unico e si colloca nella regione centrale del braccio corto del cromosoma 8 (8p21), una regione frequentemente deleta nel cancro della prostata¹. Ad oltre vent'anni dalla scoperta di questo gene *CLU* è stata associata a numerose funzioni cellulari, come la proliferazione, il differenziamento, la migrazione e la motilità cellulare. In modo contraddittorio e talora paradossale *CLU* è stata descritta sia come *pro-survival* factor, sia come fattore antiproliferativo/pro-apoptotico, ed è stata trovata sia up-regolata, sia down-regolata nel tumore prostatico^{2,3}.

La scoperta che da un unico gene si producono più forme proteiche, con diversa localizzazione cellulare, cui corrisponde anche un diverso e talora opposto significato funzionale è servita a risolvere alcune controversie. Deve essere fatta tuttavia ancora chiarezza sul modo in cui le diverse forme proteiche vengono prodotte a partire dall'unico gene.

La traduzione dell'mRNA di *CLU* a partire dall'ATG presente nell'esone 2 produce un precursore proteico, citoplasmatico di circa 60 kDa (c*CLU*), contenente una sequenza segnale che consente l'ingresso della molecola nel lume del reticolo endoplasmatico⁴. La proteina matura destinata alla secrezione è costituita da un eterodimero □□ glicosilato di circa 75-80 kDa (s*CLU*), che si comporta come uno chaperon molecolare ATP indipendente. E' stata anche descritta una forma a localizzazione nucleare (n*CLU* o forma troncata), avente significato pro-apoptotico, del peso di 45-50 kDa.^{5,6,7}

Ad oggi nessuna di queste tre forme è stata isolata in forma cristallina e gli studi di correlazione struttura-funzione fino ad ora disponibili sono stati effettuati esclusivamente mediante tecniche computazionali predittive.

Un approccio per acquisire nuove informazioni sulle diverse forme di *CLU* é rappresentato dall'espressione in forma ricombinante in batteri, al fine di ottenere la proteina in forma solubile, pronta per la cristallizzazione, e le successive analisi spettroscopiche ai raggi X.

Materiali e metodi:

L'RNA totale estratto da fibroblasti fetali (WI38) è stato retro-trascritto utilizzando come primer oligo-dT. Il c-DNA codificante per la forma matura e troncata di *CLU* è stato ottenuto mediante PCR impiegando primer specifici. Il prodotto di amplificazione è stato sub-clonato nel vettore

intermedio TOPO-TA e ne è stata verificata la corretta sequenza nucleotidica mediante sequenziamento. L'inserto d'interesse è stato clonato nel plasmide d'espressione pET11b nei siti di restrizione *NdeI/BamHI* ed il costrutto ottenuto è stato utilizzato per trasformare differenti varianti di *E. coli* ceppo BL21 (Wild Type, Codonplus, Origami e RosettaGami). L'espressione della proteina ricombinante è stata ottenuta mediante induzione con IPTG (isopropil- β -D-tiogalattopiranoside). Le proteine ottenute sono state visualizzate mediante SDS-PAGE e WB. La solubilizzazione delle proteine di interesse è stata ottenuta mediante denaturazione in urea 8 M e successiva rinaturazione mediante dialisi.

Risultati e prospettive di ricerca:

Tutti i ceppi batterici trasformati con il vettore di espressione pET11b-CLU ottenuti producono le proteine di interesse in seguito ad induzione con IPTG. Nonostante siano state tentate varie cinetiche di induzione la CLU espressa si ritrova esclusivamente nella frazione insolubile del lisato batterico. La proteina in forma solubile è stata ottenuta mediante denaturazione e rinaturazione in dialisi. Questo approccio si è dimostrato efficace ed ha consentito il recupero di circa il 70% della proteina indotta in forma solubile e rinaturata.

Le proteine ricombinanti ottenute potranno essere impiegate per prove di cristallizzazione. La struttura tridimensionale ottenuta mediante diffrazione ai raggi X potrà essere risolta attraverso molecular replacement sulla base della struttura nota di proteina omologhe o attraverso la sostituzione di metionine presenti nella sequenza con seleniometionina.

Gli studi che verranno effettuati potranno chiarire non solo le strutture delle differenti forme, ma anche quali residui amminoacidici sono coinvolti nelle proprietà di legame. Inoltre, grazie alla preparazione di forme mutanti, si potrà correlare la variazione della funzione biologica con specifici cambiamenti conformazionali indotti dalle sostituzioni amminoacidiche.

References:

1. Wong et al, J Biol Chem (1993)
2. Scaltriti et al, Int J Cancer (2004).
3. July et al, Prostate (2002)
4. Wong et al, Eur J Biochem (1994)
5. Leskov et al, J. Biol. Chem (2003)
6. Caccamo et al, Ann. N.Y. Acad. Sci (2003)
7. Moretti et al, Cancer Res (2007)

IN VIVO BIO-ASSAY OF ANTI-OXIDANTS BY DEVELOPMENT OF A GREEN FLUORESCENT REPORTER PLASMID

Federica Rizzi¹, Marco Fois², Gianfranco Pintus², Saverio Bettuzzi¹

¹Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università degli Studi di Parma e Istituto Nazionale Biostrutture e Biosistemi, Roma

²Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli Studi di Sassari.

Reactive oxygen species (ROS) cause cell damages through protein oxidation leading to pathological processes like cardiovascular disease neurological degeneration and cancer (1). Antioxidants molecules, due to their ability to scavenge and neutralize free radicals, might play a pivotal role in the prevention of these disease. Interestingly, besides neutralizing ROS, it's now proved that some promising antioxidant molecules, including green tea polyphenols (2), induce the expression of genes involved in the cellular protection against oxidative stress (3). Regulation of these detoxifying genes expression by dietary chemopreventive compounds is mediated by the electrophile-responsive element (EpRE) (4). EpRE is a *cis-acting* regulatory sequence, involved in the coordinated transcriptional activation of genes associated with phase II biotransformation. For this reason the study of the capacity of anti-oxidants to modulate the EpRE gene battery may increase our knowledge in the regulation of cellular physiology and in mechanism of prevention of cancer. To this extent we constructed a new expression vector, cloning the minimal promoter of *NADPH quinone oxydoreductase-1* (NADPH(Q)1), comprising the EpRE element, upstream the *Zoanthus sp*, a gene codifying a green fluorescent protein, in a promoterless, commercially available, expression vector (pZSGreen1-1). When transiently transfected in the cells this expression vector acts as a molecular probe, reporting the state of activation of NADP(Q)1, in living cells in response to antioxidant substances. Preliminary results indicates that this new molecular probe could be employed for the rapid screening of novel chemopreventive molecules acting through the activation of phase II detoxifying enzymes.

References:

1. H. Lum, 2001, Am.J.Physiol.Cell.Pysiol. 280:C719-41
2. S. Bettuzzi, 2006, Cancer Res. 15:1234-40
3. C. Chen, 2000, Arch.Pharm Res. 23:605-12
4. A. Dinkova-Kostova, 2005, Chem.Res.Toxicol. 18:1779-91

DETERMINAZIONE SIMULTANEA DELLA CAPACITÀ E DELL'EFFICIENZA NELL'INIBIZIONE DELLA PEROSSIDAZIONE LIPIDICA DEL PLASMA E DELLE SUE COMPONENTI

Monica Rossetto, Paola Vanzani, Veronica De Marco, Lucio Zennaro

Dipartimento di Chimica Biologica - Sezione INBB - Università di Padova

L'attività antiossidante del plasma è un importante parametro che deve essere considerato per valutare lo stress ossidativo di un individuo, soprattutto in relazione alle patologie di tipo cardiovascolare. Una delle principali cause di queste patologie è attribuibile al metabolismo lipidico ed in particolare alla perossidazione lipidica dei grassi insaturi presenti nelle lipoproteine. A questo proposito, si è messo a punto un metodo alternativo per valutare la capacità e l'efficienza degli antiossidanti endogeni e esogeni presenti nel plasma nel bloccare i radicali perossidici. La PRTC (Peroxyl Radical Trapping Capacity) è un parametro stechiometrico che viene espresso come moli di radicali perossidici bloccati da 1 litro di plasma, mentre la PRTE (Peroxyl Radical Trapping Efficiency) è un parametro cinetico che viene espresso come l'inverso dell' IC_{50} , o volume del sistema in cui 1 litro di plasma dimezza la concentrazione dei radicali perossidici. Una rigorosa trattazione delle equazioni cinetiche che descrivono il processo di perossidazione lipidica e l'analisi dettagliata dei tracciati ossigrafici, ottenuti misurando l'inibizione del consumo di ossigeno in un sistema micellare in cui viene innescata l'ossidazione radicalica, ha fornito importanti informazioni sull'azione del plasma e delle sue componenti a basso e ad alto peso molecolare.

Se si analizza il profilo ossigrafico ottenuto dall'inibizione della perossidazione lipidica da parte del plasma in toto, si individuano chiaramente due fasi di inibizione. La prima fase è caratterizzata da una cinetica di inibizione di ordine zero, con 100% di efficienza nel bloccare i radicali perossidici, la seconda fase è caratterizzata invece da una cinetica di primo ordine. Considerando il contributo dei singoli antiossidanti presenti nel plasma e i valori di capacità ed efficienza delle singole fasi si evidenzia un meccanismo di sinergia che si manifesta mediante il trasferimento di attività antiossidante da parte delle componenti a basso peso molecolare, caratterizzate da una bassa efficienza, alle frazioni ad alto peso molecolare. Questo processo è dovuto principalmente all'efficiente riciclo del tocoferolo presente nelle lipoproteine, da parte del radicale ascorbico che si forma dalla reazione dell'acido ascorbico con i radicali perossidici. Il metodo messo a punto permette di individuare, da una singola misura e in maniera rigorosa, la capacità e l'efficienza di inibizione della perossidazione lipidica del plasma in toto e delle sue frazioni.

IDENTIFICATION AND FUNCTIONAL CHARACTERISATION OF GENES INVOLVED IN THE ANTAGONISTIC INTERACTION BETWEEN *TRICHODERMA HARZIANUM* AND *RHIZOCTONIA SOLANI*

Barbara Scherm^{1*}, Monika Schmoll^{2*}, Virgilio Balmas¹, Christian P. Kubicek², Quirico Migheli¹

¹Department of Plant Protection - Center for Biotechnology Development and Biodiversity Research, University of Sassari, Via E. De Nicola 9, 07100 Sassari, Italy.

²TU Vienna, Institute of Chemical Engineering, Research Area Gene Technology and Applied Biochemistry, Getreidemarkt 9/E1665, A-1060 Vienna, Austria.

Trichoderma harzianum (*Hypocrea lixii*) is a cosmopolitan fungus, well known as biocontrol agent against a range of aerial and soil-borne plant pathogens. Rapid growth and mycoparasitic activity, and the ability to produce antibiotics or extracellular hydrolytic enzymes necessary for inhibition of plant pathogens make this fungus a key factor in any agricultural biocontrol approach. In the present study, we aimed at characterising some genes specifically expressed during the antagonistic interaction between *T. harzianum* and the common plant pathogen *Rhizoctonia solani* by applying a subtractive library approach (RaSH technique). We chose stringent subtraction conditions by comparing the cDNA of the *T. harzianum* antagonist T4-67 with the cDNA of the same strain sampled during active mycoparasitic growth on *R. solani*. Two-hundred clones were analysed by a reverse Northern blotting technique, yielding 50 fragments which were significantly expressed during antagonist/pathogen interaction. These sequences were compared to the available genome sequences of the closely related fungus *H. jecorina* (*T. reesei*). Nine clones, respectively related to a NADH dehydrogenase, an hexose transporter with similarity to yeast Gal2, an acetyl-xylane esterase AXE1, the cellulase Cel61b, a serine protease, a metalloprotease, a cyclopropane fatty acylphospholipid synthase and two hypothetical proteins with transmembrane domains, seemed particularly promising and were subjected to further studies. A confrontation assay allowed us to detect 4 of these genes as strongly expressed in the *T. harzianum* biocontrol strain T4-67 compared to another *T. harzianum* strain with low biocontrol capability. These genes possibly characterise good mycoparasitic strains, and may be used as markers for the screening of *T. harzianum* strains with high biocontrol potential.

MISURA DI EFFICIENZA E CAPACITÀ DI BLOCCARE I RADICALI PEROSSIDICI DI ALCUNI ALIMENTI RICCHI IN POLIFENOLI

Paola Vanzani, Monica Rossetto, Veronica De Marco

Dipartimento di Chimica Biologica Sezione INBB – Università di Padova

L'azione antiossidante di alcuni composti presenti in frutta, verdura e in alcune bevande si esplica preferenzialmente nel tratto gastrointestinale dove, non essendoci problemi di biodisponibilità, tali composti possono raggiungere concentrazioni elevate. Simulando perciò le condizioni tipiche della parte alta dell'intestino umano, dove può svilupparsi la perossidazione lipidica, si è messo a punto un metodo per misurare in maniera rigorosa l'efficienza e la capacità di bloccare i radicali perossidici di alcuni alimenti ricchi in polifenoli. Comunemente, nel valutare l'azione antiossidante si riporta solo la capacità, raramente l'efficienza e mai entrambi i parametri.

Questo metodo invece, che si basa sulla misura del consumo di ossigeno che si verifica durante la perossidazione lipidica e sull'analisi cinetica delle reazioni di inibizione, permette di misurare contemporaneamente la capacità e l'efficienza nella cattura dei radicali perossidici. Ciò è possibile grazie al fatto che i vari alimenti esaminati si comportano come un singolo composto che reagisce con i radicali perossidici secondo una cinetica di primo ordine. Gli alimenti sono stati classificati in base all'efficienza o PRTE (Peroxyl Radical Trapping Efficiency) che è il l'inverso della quantità di cibo che dimezza la concentrazione di radicali perossidici, riconducibile alle costanti cinetiche di inibizione, e in base alla capacità o PRTC (Peroxyl Radical Trapping Capacity) che è la concentrazione di radicali perossidici bloccati da una quantità di cibo.

In base ai dati ottenuti è stata dimostrata la mancanza di una stretta correlazioni tra i valori di PRTE e PRTC. È possibile perciò classificare gli alimenti secondo differenti scale che tengono conto della capacità o dell'efficienza specifica, normalizzata in base alla quantità di polifenoli totali (PT) che caratterizza questi alimenti.

EFFETTO DI GLICOSAMINOGLICANI SUL PROCESSO DI AGGREGAZIONE AMILOIDE

Silvia Vilasi⁽¹⁾, *Simone Maddaluno*⁽¹⁾, *Marianna Portaccio*⁽²⁾, *Gaetano Irace*⁽¹⁾, *Ivana Sirangelo*⁽¹⁾

¹ Dipartimento di Biochimica e Biofisica, Seconda Università di Napoli

Via De Crecchio 8, 80138 Napoli

² Dipartimento di Medicina Sperimentale, Seconda Università di Napoli

Via De Crecchio 8, 80138 Napoli

Parole Chiave: amiloide, apomioglobina, glicosaminoglicani

Sempre maggiore interesse viene rivolto all'analisi dei meccanismi molecolari coinvolti nell'interazione tra proteine/peptidi e superfici naturali o sintetiche. L'affollato ambiente intracellulare può, infatti, influenzare profondamente le caratteristiche strutturali delle proteine e indurre la formazione di conformazioni non native tendenti all'aggregazione (1). Infatti, in esso, le molecole proteiche vengono a trovarsi a stretto contatto con altre molecole e con superfici come le membrane e strutture sopramolecolari. L'effetto di una superficie sulla conformazione di una proteina dipende dalla struttura proteica, dalla modalità di interazione con la superficie e dalle caratteristiche chimico-fisiche di questa (densità di carica, impaccamento lipidico, curvatura, rigidità, fluidità). È stato mostrato che superfici cariche, a causa del forte campo elettrostatico, possono catalizzare la formazione di aggregati amiloidi con caratteristiche strutturali e citotossicità differenti da quelli osservati sulle stesse molecole in soluzione. In particolare, i glicosaminoglicani (GAGs), come l'eparina e il destrano solfato, hanno mostrato tendenza ad indurre la fibrillogenesi, o accelerarne il processo, in diversi peptidi e proteine (2). L'identificazione di molecole in grado di catalizzare il processo di aggregazione amiloide ha importanti implicazioni terapeutiche in quanto implicherebbe la possibilità di ridurre il tempo in cui la proteina esercita il suo effetto citotossico. È infatti noto che le forme amiloide responsabili della citotossicità sono gli aggregati oligomerici prefibrillari piuttosto che le fibre mature.

In questo lavoro abbiamo caratterizzato l'effetto dell'eparina, destrano solfato, destrano e polilisina, sul processo di aggregazione amiloide e sulla tossicità degli aggregati utilizzando tre proteine amiloidogene: il mutante di apomioglobina W7FW14F, l'apomioglobina di cavallo e l'insulina. L'apomioglobina W7FW14F forma fibre amiloidi in condizioni fisiologiche (3), l'apomioglobina di cavallo a pH 9.0 e a 65°C e l'insulina a pH acido e a temperature comprese fra 60 e 70°C.

L'effetto dei glicosaminoglicani sul processo di aggregazione amiloide è stato valutato mediante fluorescenza della tioflavina T, dicroismo circolare, spettroscopia di assorbimento e spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier. Inoltre, la tossicità degli aggregati proteici generati dall'azione dei glicosaminoglicani è stata valutata mediante test di vitalità cellulare MTT.

In presenza di eparina e di destrano solfato, carichi negativamente, si osserva un aumento significativo nella velocità del processo di aggregazione e di fibrillogenesi del mutante di

apomioglobina W7FW14F. Inoltre, in presenza di eparina, la tossicità degli aggregati nelle prime fasi del processo di aggregazione sembra essere significativamente ridotta. I glicosaminoglicani neutri o carichi positivamente come la polilisina e il destrano, non influenzano il processo di aggregazione del mutante di apomioglobina W7FW14F. Nel caso dell'insulina e dell'apomioglobina di cavallo, inoltre, i glicosaminoglicani analizzati non sembrano presentare alcun effetto catalizzatore. Ciò è probabilmente da attribuire, nel caso dell'apomioglobina di cavallo, alle caratteristiche dell'interazione elettrostatica fra le fibrille e i GAGs e, nel caso dell'insulina, alle caratteristiche della sequenza proteica. Sembra, infatti, che l'eparina si leghi preferenzialmente a specifiche sequenze proteiche consenso caratterizzate dall'alternanza di residui basici e non basici e tali sequenze non sono presenti nell'insulina.

In conclusione, i nostri risultati indicano che l'azione dei glicosaminoglicani è fortemente variabile e dipende sia dalle caratteristiche dell'interazione elettrostatica proteina/GAGs che dalla sequenza polipeptidica della proteina amiloidogena coinvolta.

Referenze

- (1) Relini, A. et al. , J. Biol. Chem., 2006, 281, 16521-29
- (2) Cohlberg, J.A. et al., Biochemistry, 2002, 41, 1502-1511
- (3) Sirangelo, I. Et al., Journal of Biol. Chem. 2002, 277(48):45887-91