



Istituto Nazionale di Biostrutture e Biosistemi

CONSORZIO INTERUNIVERSITARIO

VIII CONVEGNO NAZIONALE

SU

SCIENZE DELLA VITA

ROMA, 23-24 OTTOBRE 2008

CNR

UNITÀ DI RICERCA

DEL

CONSORZIO INTERUNIVERSITARIO

“ISTITUTO NAZIONALE BIOSTRUTTURE E BIOSISTEMI”
(in ordine alfabetico del nome del Responsabile Scientifico)

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

UNITA' DI RICERCA INBB
Napoli

Responsabile Scientifico

Paolo Abrescia

Linea di Ricerca

Studio del ruolo dell'aptoglobina nel trasporto inverso del colesterolo e nell'immunosoppressione

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Abrescia Paolo. PA paolo.abrescia@unina.it

Non Aderenti INBB

Cigliano Luisa. RU luisa.cigliano@unina.it
Salvatore Alfonso DR
Pugliese Regina Carmela DR
Maresca Bernardetta DR

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento delle Scienze Biologiche, Università di Napoli Federico II

Indirizzo via Mezzocannone 8, 80134 Napoli

Telefono 081 2535095 – 081 2535094

Fax 081 2535090

E-mail paolo.abrescia@unina.it

Sezione INBB di appartenenza

Napoli

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

La ricerca sviluppata precedentemente al 2006 ha permesso di accertare alterazioni dello stato redox plasmatico in pazienti con ipertensione, sindrome coronaria acuta ed artrite reumatoide: queste patologie hanno in comune deficienze nel trasporto inverso di colesterolo ed elevati livelli di aptoglobina, di cui abbiamo dimostrato il ruolo di effettore negativo sull'attività dell'enzima LCAT (stimolato dall'apolipoproteina A-I e responsabile della rimozione dell'eccesso di colesterolo dalle cellule periferiche). Gli obiettivi della ricerca sviluppata nel triennio 2006-2008 erano i seguenti:

1. dimostrare l'azione antiossidante degli eritrociti, che si aggregano quando aumentano i livelli di proteine della fase acuta (tra cui quelli dell'aptoglobina);
2. dimostrare che l'azione inibitoria dell'aptoglobina sull'attività di LCAT è associata a vantaggi antiossidanti per il processo di trasporto inverso del colesterolo;
3. dimostrare che, durante l'infiammazione acuta (es. in psoriasi), esistono isoforme di aptoglobina diverse da quelle normali;
4. dimostrare che strutture glicaniche specifiche dell'aptoglobina, sintetizzate durante l'infiammazione, svolgono ruoli nell'immunosoppressione ed in malattie neurodegenerative.

Risultati ottenuti

Gli eritrociti umani sono risultati bersaglio dell'ossido nitrico e, in risposta a tale segnale, riciclano la forma ossidata della vitamina C nella forma ridotta.

L'aptoglobina lega e protegge l'apolipoproteina A-I (e la funzione delle HDL) da danni ossidativi associati all'infiammazione: la protezione è associata alla limitazione temporanea dell'attività di LCAT solo nelle condizioni transienti della fase acuta.

L'aptoglobina presenta isoforme, nel plasma di pazienti infiammati, che hanno limitata capacità di legare l'emoglobina e l'apolipoproteina A-I: tali isoforme hanno probabilmente strutture glicaniche specifiche.

Sono state isolate glicofornie di aptoglobina da pazienti normali o con malattie neurodegenerative o con malattie cardiovascolari: sono state cimentate con macrofagi e cellule nervose in coltura. I risultati non sono disponibili, in quanto vincolati da accordo di segretezza con partner dell'industria.

Pubblicazioni più significative nel periodo 2006-2008

- 1) M. S. Spagnuolo, A. Carlucci, L. Cigliano, P. ABRESCIA. Nitric oxide stimulates the erythrocyte for ascorbate recycling. *Nitric Oxide*, 14:272-277, 2006.
- 2) A. Salvatore, L. Cigliano, E. M. Bucci, D. Corpillo, S. Velasco, A. Carlucci, C. Pedone, P. ABRESCIA. Haptoglobin binding to apolipoprotein A-I prevents damage from hydroxyl radicals on its stimulatory activity of the enzyme lecithin-cholesterol acyl-transferase. *Biochemistry*, 46:11158-11168, 2007.
- 3) L. Cigliano, B. Maresca, A. Salvatore, M. Nino, G. Monfrecola, F. Ayala, A. Carlucci, R. C. Pugliese, C. Pedone, and P. ABRESCIA. Haptoglobin from Psoriatic Patients Exhibits Decreased Activity in Binding Hemoglobin and Inhibiting LCAT Activity. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, 22:417-425, 2008.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Nei prossimi tre anni, un obiettivo primario sarà quello di progettare ed adoperare peptidi mimetici dell'apolipoproteina A-I o molecole organiche per spiazzare l'aptoglobina dalle HDL e ripristinare la normale stimolazione dell'apolipoproteina A-I sull'enzima LCAT: a saggi biochimici in vitro seguiranno saggi con colture cellulari ed esperimenti in topi e conigli. L'analisi dei glicani dell'aptoglobina consentirà di stabilirne il ruolo nei diversi processi in cui le isoforme di questa proteina, sintetizzate nella fase acuta, sono implicate. L'analisi della rimozione del colesterolo nel Sistema Nervoso Centrale e della risposta di neuroni e cellule gliali all'aptoglobina forniranno informazioni per definire quadri diagnostici ed individuare target per interventi terapeutici.

Collaborazioni internazionali in atto

Deutsches Rheumaforschungszenter, Berlino, Germania

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Sistema HPLC (5 pompe, con rivelatori UV-diode array-fluorimetrico-coulometrico)

Camera sterile (con incubatori, microscopi, cappe ed autoclavi)

Parole Chiave

Aptoglobina, Colesterolo, HDL, Infiammazione, Stress ossidativo

UNITA' DI RICERCA INBB
Napoli

Responsabile Scientifico

Lucia Altucci

Linea di Ricerca

Epigenetic impact in human diseases

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Altucci Lucia	PA	lucia.altucci@unina2.it
---------------	----	-------------------------

Non Aderenti INBB

Nebbioso Angela	A	angela.nebbioso@unina2.it
Franci Gianluigi	A	Gianluigi@franci@unina2.it
MariaRosaria Conte	DR	Mariarosaria.conte@unina2.it

Sede Unità di Ricerca

Dept Patologia di Patologia generale, SUN

Indirizzo via de Crecchio 7 80138 NA

Telefono 081 5667569

Fax 081 2144840

E-mail lucia.altucci@unina2.it

Sezione INBB di appartenenza

Napoli

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Area: Trasduzione del segnale applicata all'Oncologia molecolare in sistemi bio-medici

Focus: Meccanismo molecolare di regolazione della crescita indotta da differenziazione e dell'apoptosi indotta da retinoidi e da modulatori epigenetici in diversi sistemi neoplastici

La vita e la morte cellulare sono governate da programmi genetici che sono virtualmente essenziali in tutti gli aspetti degli organismi multi-cellulari, dalla riorganizzazione del corpo durante lo sviluppo embrionale all'eliminazione di cellule non più richieste come nel caso dell'involuzione della ghiandola mammaria durante la lattazione o di cellule differenziate in modo terminale o potenzialmente pericolose perché mutate. Si crede che questi programmi dipendano dall'equilibrio esistente fra sopravvivenza e morte cellulare programmata essendo esse stesse regolate da "networks" genici che riflettono le condizioni intra- ed extra-cellulari della cellula o dell'organismo.

La mammella e l'utero sono organi in cui la vita e la morte cellulare sono sotto lo stretto controllo di ligandi appartenenti alla super-famiglia dei recettori nucleari. La capacità proliferativa degli estrogeni in cellule di cancro della mammella può essere efficientemente contrastata da anti-estrogeni che sono alla base della terapia endocrina nel cancro della mammella. Purtroppo, però, le basi molecolari della capacità anti-proliferativa e pro-apoptotica degli anti-estrogeni restano, ad oggi, poco chiare.

In aggiunta alla regolazione vita-morte in cellule "normali", anche la trasformazione maligna è frequentemente associata con l'alterazione o l'abrogazione di vie di trasduzione del segnale essenziali per il mantenimento della normale funzionalità cellulare e/o per il controllo della vita e della morte cellulare. Di conseguenza, un approccio fondamentale per la cura del cancro è riportare aberranti vie di trasduzione del segnale alla normalità tramite l'eradicazione di cellule neoplastiche che eludono i normali programmi apoptotici forzandole selettivamente al "suicidio". Candidati promettenti per questo tipo di terapia sono i retinoidi a cui spesso ci si riferisce come "terapia differenziante del cancro". I retinoidi, ligandi dei recettori dell'acido retinoico che appartengono alla famiglia dei recettori nucleari, possono indurre differenziazione terminale di alcuni tipi di cellule neoplastiche seguita da apoptosi post-maturazione. L'obiettivo della ricerca della Dott. Altucci è l'identificazione e la caratterizzazione dei dettagli molecolari delle vie di trasduzione del segnale con cui i recettori degli estrogeni (per lo più stimolatori della crescita) e dei retinoidi (inibitori della proliferazione) controllano la proliferazione, la differenziazione e la morte cellulare in sistemi neoplastici. Questa ricerca ha portato ad importanti scoperte scientifiche (pubblicate sulle più prestigiose riviste internazionali) e potrà in futuro rappresentare un valido aiuto per la lotta contro il cancro. Inoltre, negli ultimi anni la Dott.ssa Lucia Altucci si è interessata del potenziale uso di molecole attive come modulatori epigenetici (inibitori delle istone deacetilasi o delle DNA methyltransferasi) come farmaci antineoplastici, studiandone l'azione biologica e molecolare in sistemi leucemici e di tumori solidi. Questi studi, finanziati grazie al supporto di programmi di ricerca

comunitari, hanno portato all'evidenziazione di importanti vie di traduzione del segnale molecolare in cellule neoplastiche e potranno rappresentare la base per studi in diversi modelli o studi preclinici. Questi studi stati pubblicati sulla rivista Nature Medicine (due articoli) e sono stati riportati dai maggiori quotidiani nazionali (Repubblica, Corriere della Sera, etc etc) nonché dalla televisione pubblica (RAI TRE).

Pubblicazioni più significative nel periodo 2006-2008

1: Souto JA, Conte M, Alvarez R, Nebbioso A, Carafa V, Altucci L, de Lera AR. Synthesis of Benzamides Related to Anacardic Acid and Their Histone Acetyltransferase (HAT) Inhibitory Activities. *ChemMedChem*. 2008 Jun 9. [Epub ahead of print] PMID: 18537201 [PubMed - as supplied by publisher]

2: Verdina A, Cardillo I, Nebbioso A, Galati R, Menegozzo S, Altucci L, Sacchi A, Baldi A. Molecular analysis of the effects of Piroxicam and Cisplatin on mesothelioma cells growth and viability. *J Transl Med*. 2008 May 22;6:27. PMID: 18498639 [PubMed - in process]

3: Su H, Altucci L, You Q. Competitive or noncompetitive, that's the question: research toward histone deacetylase inhibitors. *Mol Cancer Ther*. 2008 May;7(5):1007-12. PMID: 18483291 [PubMed - in process]

4: Sbardella G, Castellano S, Vicidomini C, Rotili D, Nebbioso A, Miceli M, Altucci L, Mai A. Identification of long chain alkylidenemalonates as novel small molecule modulators of histone acetyltransferases. *Bioorg Med Chem Lett*. 2008 May 1;18(9):2788-92. Epub 2008 Apr 11. PMID: 18434144 [PubMed - in process]

5: Mai A, Perrone A, Nebbioso A, Rotili D, Valente S, Tardugno M, Massa S, De Bellis F, Altucci L. Novel uracil-based 2-aminoanilide and 2-aminoanilide-like derivatives: histone deacetylase inhibition and in-cell activities. *Bioorg Med Chem Lett*. 2008 Apr 15;18(8):2530-5. Epub 2008 Mar 22. PMID: 18381238 [PubMed - indexed for MEDLINE]

6: Mai A, Cheng D, Bedford MT, Valente S, Nebbioso A, Perrone A, Brosch G, Sbardella G, De Bellis F, Miceli M, Altucci L. epigenetic multiple ligands: mixed histone/protein methyltransferase, acetyltransferase, and class III deacetylase (sirtuin) inhibitors. *J Med Chem*. 2008 Apr 10;51(7):2279-90. Epub 2008 Mar 19. PMID: 18348515 [PubMed - indexed for MEDLINE]

7: Manzo F, Nebbioso A, Miceli M, Conte M, De Bellis F, Carafa V, Franci G, Tambaro FP, Altucci L. TNF-related apoptosis-inducing ligand: Signalling of a 'smart' molecule. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007 Dec 28. [Epub ahead of print] PMID: 18243765 [PubMed - as supplied by publisher]

8: de Lera AR, Bourguet W, Altucci L, Gronemeyer H. Design of selective nuclear receptor modulators: RAR and RXR as a case study. *Nat Rev Drug Discov*. 2007 Oct;6(10):811-20. Review. PMID: 17906643 [PubMed - indexed for MEDLINE]

9: Altucci L, Leibowitz MD, Ogilvie KM, de Lera AR, Gronemeyer H. RAR and RXR modulation in cancer and metabolic disease. *Nat Rev Drug Discov*. 2007 Oct;6(10):793-810. Review. PMID: 17906642 [PubMed - indexed for MEDLINE]

10: Manente L, Perna A, Buommino E, Altucci L, Lucariello A, Citro G, Baldi A, Iaquinto G, Tufano MA, De Luca A. The *Helicobacter pylori*'s protein VacA has direct effects on the regulation of cell cycle and apoptosis in gastric epithelial cells. *J Cell Physiol*. 2008 Mar;214(3):582-7. PMID: 17786942 [PubMed - indexed for MEDLINE]

11: Mai A, Jelacic K, Rotili D, Di Noia A, Alfani E, Valente S, Altucci L, Nebbioso A, Massa S, Galanello R, Brosch G, Migliaccio AR, Migliaccio G. Identification of two new synthetic histone deacetylase inhibitors that modulate globin gene expression in erythroid cells from healthy donors and patients with thalassemia. *Mol Pharmacol*. 2007 Nov;72(5):1111-23. Epub 2007 Jul 31. PMID: 17666592 [PubMed - indexed for MEDLINE]

12: Bontempo P, Mita L, Miceli M, Doto A, Nebbioso A, De Bellis F, Conte M, Minichiello A, Manzo F, Carafa V, Basile A, Rigano D, Sorbo S, Castaldo Cobianchi R, Schiavone EM, Ferrara F, De Simone M, Vietri M, Cioffi M, Sica V, Bresciani F, de Lera AR, Altucci L, Molinari AM. Feijoa sellowiana derived natural Flavone exerts anti-cancer action displaying HDAC inhibitory activities. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(10):1902-14. Epub 2007 May 25. PMID: 17604209 [PubMed - indexed for MEDLINE]

13: Altucci L, Balducci L, Irminger-Finger I. Cancer therapy: new drugs are emerging based on molecular targeting but still many challenges. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(7-8):1278-9. Epub 2007 Mar 25. No abstract available. PMID: 17548227 [PubMed - indexed for MEDLINE]

14: Mai A, Valente S, Rotili D, Massa S, Botta G, Brosch G, Miceli M, Nebbioso A, Altucci L. Novel pyrrole-containing histone deacetylase inhibitors endowed with cytodifferentiation activity. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(7-8):1510-22. Epub 2007 Apr 4. PMID: 17482499 [PubMed - indexed for MEDLINE]

15: Mai A, Valente S, Cheng D, Perrone A, Ragno R, Simeoni S, Sbardella G, Brosch G, Nebbioso A, Conte M, Altucci L, Bedford MT. Synthesis and biological validation of novel synthetic histone/protein methyltransferase inhibitors. *ChemMedChem.* 2007 Jul;2(7):987-91. No abstract available. PMID: 17458842 [PubMed - in process]

16: Pérez-Balado C, Nebbioso A, Rodríguez-Graña P, Minichiello A, Miceli M, Altucci L, de Lera AR. Bispyridinium diones: histone deacetylase inhibitors with selective activities. *J Med Chem.* 2007 May 17;50(10):2497-505. Epub 2007 Apr 21. PMID: 17447750 [PubMed - indexed for MEDLINE]

17: Ricci G, Cacciola G, Altucci L, Meccariello R, Pierantoni R, Fasano S, Cobellis G. Endocannabinoid control of sperm motility: the role of epididymus. *Gen Comp Endocrinol.* 2007 Aug-Sep;153(1-3):320-2. Epub 2007 Feb 12. PMID: 17395184 [PubMed - indexed for MEDLINE]

18: Mai A, Rotili D, Tarantino D, Ornaghi P, Tosi F, Vicidomini C, Sbardella G, Nebbioso A, Miceli M, Altucci L, Filetici P. Small-molecule inhibitors of histone acetyltransferase activity: identification and biological properties. *J Med Chem.* 2006 Nov 16;49(23):6897-907. PMID: 17154519 [PubMed - indexed for MEDLINE]

19: Spugnini EP, Cardillo I, Verdina A, Crispi S, Saviozzi S, Calogero R, Nebbioso A, Altucci L, Cortese G, Galati R, Chien J, Shridhar V, Vincenzi B, Citro G, Cognetti F, Sacchi A, Baldi A. Piroxicam and cisplatin in a mouse model of peritoneal mesothelioma. *Clin Cancer Res.* 2006 Oct 15;12(20 Pt 1):6133-43. PMID: 17062690 [PubMed - indexed for MEDLINE]

20: Mai A, Massa S, Rotili D, Simeoni S, Ragno R, Botta G, Nebbioso A, Miceli M, Altucci L, Brosch G. Synthesis and biological properties of novel, uracil-containing histone deacetylase inhibitors. *J Med Chem.* 2006 Oct 5;49(20):6046-56. PMID: 17004718 [PubMed - indexed for MEDLINE]

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Studio del meccanismo di indicibilità di TRAIL

Identificazione e caratterizzazione di nuovi modulatori epigenetici

Collaborazioni internazionali in atto

Manel Esteller, CNIO, ES

HG Stunnenberg, Radbaud University, NL

H Gronemeyer, IGBMC, FR

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Real-time PCR

FACS

Ultracentrifughe

Facility per colture cellulari

Facility per manipolazione di radioisotopi

Parole Chiave

Cancro, epigenetica, trasduzione del segnale, modulatori epigenetici

UNITA' DI RICERCA INBB
Pavia

Responsabile Scientifico

Vittorio Bellotti

Linea di Ricerca

Studio dei meccanismi molecolari responsabili della deposizione fibrillare di proteine amiloidogeniche

titolo

Basi molecolari delle amiloidosi sistemiche: dalla biochimica delle proteine alla realizzazione di modelli biologici.

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Bellotti Vittorio

PO

vbellot@unipv.it

Stoppini Monica

PA

stoppini@unipv.it

Non Aderenti INBB

Mangione Palma

RU

p.mangione@unipv.it

Giorgetti Sofia

RU

s.giorgetti@unipv.it

Raimondi Sara

BC

sara.raimondi@unipv.it

Marchese Loredana

DR

marlor@unipv.it

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Biochimica – Università di Pavia

Indirizz: via Taramelli, 3b - 27100 Pavia

Telefono: 0382 987932

Fax: 0382 423108

E-mail: emdip99@unipv.it

Sezione INBB di appartenenza

Milano

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

- Studio degli eventi molecolari responsabili dell'aggregazione fibrillare di due proteine umane amiloidogeniche: la β 2-microglobulina (2-m) e l'ApolipoproteinaA-I (ApoA-I).
- Caratterizzazione dell'attività citotossica dei vari intermedi che si formano durante il processo di conversione fibrillare.
- Caratterizzazione di piccoli ligandi o macromolecole biologiche capaci di legare la β 2-m e di solubilizzare fibrille preformate o di inibire la fibrillogenesi in condizioni che mimano l'ambiente fisiologico.

Risultati ottenuti

Gli studi condotti sulla forma ricombinante di diverse isoforme del peptide amiloidogenico 1-93 dell'ApoA-I, corrispondenti al peptide wild type e a forme mutate rappresentative delle otto mutazioni patologiche identificate nei pazienti, hanno dimostrato che in tutte le isoforme la conversione nello stato fibrillare viene innescata dall'acidificazione del tampone e comprende diverse fasi. In una prima fase il peptide si trova in uno stato random coil, successivamente acquisisce una conformazione elicoidale instabile, che si converte rapidamente in una struttura cross-beta tipica delle fibrille amiloidi. Tutti questi peptidi sono citotossici ed in particolare le specie tossiche sono composte da monomeri/dimeri del peptide, ma non da oligomeri di elevate dimensioni. Le fibrille naturali estratte da tessuti, non mostrano nessun effetto citotossico o citostatico.

Per quanto riguarda la β 2-m, il costituente proteico più abbondante dei depositi amiloidi presenti nei pazienti emodializzati affetti da dialysis related amyloidosis, abbiamo dimostrato che il collagene e l'eparina sono potenti promotori del processo di fibrillogenesi a 37°C e pH 6.4. L'eparina induce una rapida oligomerizzazione della β 2-m, e la concentrazione di questi oligomeri è direttamente correlata con la cinetica di formazione delle fibrille. Nell'ambito dello studio riguardante ligandi capaci di interferire sul processo di fibrillogenesi, stiamo sperimentando l'attività di 12 anticorpi monoclonali di cammello anti- β 2-m. Questi anticorpi riconoscono epitopi conformazionali della β 2-m ed alcuni di essi sono in grado di inibire il processo di fibrillogenesi. Abbiamo, inoltre, dimostrato che la doxiciclina e suoi analoghi sono in grado di favorire la depolimerizzazione delle fibrille di β 2-m e di inibire la formazione de novo di fibrille.

Pubblicazioni più significative nel periodo 2006-2008

1. Pepys MB, Hirschfield GM, Tennent GA, Gallimore JR, Kahan MC, Bellotti V, Hawkins PN, Myers RM, Smith MD, Polara A, Cobb AJ, Ley SV, Aquilina JA, Robinson CV, Sharif I, Gray GA, Sabin CA, Jenvey MC, Kolstoe SE, Thompson D, Wood SP. Targeting C-reactive protein for the treatment of cardiovascular disease. *Nature* (2006) 440:1217-21
2. Relini A, Canale C, De Stefano S, Rolandi R, Giorgetti S, Stoppini M, Rossi A, Fogolari F, Corazza A, Esposito G, Gliozzi A, Bellotti V Collagen plays an active role in the aggregation of beta 2-microglobulin under physio-pathological conditions of dialysis-related amyloidosis. *J Biol Chem.* (2006) 281: 16521-9
3. Piazza R, Pierno M, Iacopini S, Mangione P, Esposito G, Bellotti V. Micro-heterogeneity and aggregation in beta(2)-microglobulin solutions: effects of temperature, pH, and conformational variant addition. *Eur Biophys J.* (2006) 35:439-45
4. Mimmi MC, Jorgensen TJ, Pettirossi F, Corazza A, Viglino P, Esposito G, De Lorenzi E, Giorgetti S, Pries M, Corlin DB, Nissen MH, Heegaard NH. Variants of beta-microglobulin cleaved at lysine-58 retain the main conformational features of the native protein but are more conformationally heterogeneous and unstable at physiological temperature. *FEBS J.* (2006) 273:2461-74.
5. Di Gaetano S, Guglielmi F, Arciello A, Mangione P, Monti M, Pagnozzi D, Raimondi S, Giorgetti S, Orru S, Canale C, Pucci P, Dobson CM, Bellotti V, Piccoli R. Recombinant amyloidogenic domain of ApoA-I: Analysis of its fibrillogenic potential. *Biochem Biophys Res Commun.* (2006) 351:223-8.
6. Obici L, Franceschini G, Calabresi L, Giorgetti S, Stoppini M, Merlini G, Bellotti V. Structure, function and amyloidogenic propensity of apolipoprotein A-I. *Amyloid.* (2006) 13:191-205.
7. Fogolari F, Corazza A, Viglino P, Zuccato P, Pieri L, Faccioli P, Bellotti V, Esposito G. Molecular dynamics simulation suggests possible interaction patterns at early steps of {beta}2-microglobulin aggregation. *Biophys J.* (2007) 92:1673-81
8. Giorgetti S, Stoppini M, Tennent GA, Relini A, Marchese L, Raimondi S, Monti M, Marini S, Ostergaard O, Heegaard NH, Pucci P, Esposito G, Merlini G, Bellotti V. Lysine 58-cleaved beta2-microglobulin is not detectable by 2D electrophoresis in ex vivo amyloid fibrils of two patients affected by dialysis-related amyloidosis. *Protein Sci.* (2007) 16:343-9.
9. Bellotti V, Nuvolone M, Giorgetti S, Obici L, Palladini G, Russo P, Lavatelli F, Perfetti V, Merlini G. The workings of the amyloid diseases. *Ann Med.* (2007) 39:200-7
10. Carazzone C, Colombo R, Quaglia M, Mangione P, Raimondi S, Giorgetti S, Caccialanza G, Bellotti V, De Lorenzi E. Sulfonated molecules that bind a partially structured species of beta2-microglobulin also influence refolding and fibrillogenesis. *Electrophoresis.* (2008) 29:1502-10.
11. Esposito G, Ricagno S, Corazza A, Rennella E, Gümral D, Mimmi MC, Betto E, Pucillo CE, Fogolari F, Viglino P, Raimondi S, Giorgetti S, Bolognesi B, Merlini G, Stoppini M, Bolognesi M, Bellotti V. The controlling roles of Trp60 and Trp95 in beta2-microglobulin function, folding and amyloid aggregation properties. *J Mol Biol.* (2008) 378:885-95.
12. Relini A, De Stefano S, Torrassa S, Cavalleri O, Rolandi R, Gliozzi A, Giorgetti S, Raimondi S, Marchese L, Verga L, Rossi A, Stoppini M, Bellotti V. Heparin strongly enhances the formation of beta2-microglobulin amyloid fibrils in the presence of type I collagen. *J Biol Chem.* (2008) 283. 4912-20

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre

- Studio dei meccanismi di fibrillogenesi in vitro della β 2-m e dell'ApoA-I. Verranno studiati i cambiamenti strutturali della β 2-m durante il processo di fibrillogenesi in condizioni fisiologiche in presenza di cofattori naturali favorevoli all'aggregazione come il collagene e l'eparina. Per l'ApoA-I si studierà il ruolo delle mutazioni nella modulazione della cinetica di formazione delle fibrille.
- Realizzazione di modelli biologici nei quali il processo di aggregazione di proteine amiloidi può avvenire in condizioni simili a quelle fisiologiche. Verrà esplorata la possibilità di over-esprimere la β 2-m e una sua isoforma altamente amiloidogena in organismi invertebrati come il *C. Elegans*.

Collaborazioni internazionali in atto

Prof. Mark Pepys, FRS Centre for Amyloidosis and Acute Phase Proteins - Royal Free and University College Medical School- Londra

Prof. Lode Wyns, VIB Department of Molecular and Cellular Interactions, Vrije Universiteit Brussel

Prof. Chris Dobson, Department of Chemistry, University of Cambridge

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Spettrofluorimetro Perkin Elmer LS50 e spettropolarimetro Jasco 710

Sistema di analisi delle interazioni biomolecolari BIACORE

Apparato a flusso interrotto (Bio-Logic SFM-300) per misure spettrofluorimetriche e spettropolarimetriche

Calorimetro Nano ITC III (Setaram)

Spettrometro di massa MALDI TOF e sistema liquido massa ibrido quadrupolo tempo di volo connesso con sistema HPLC capillare (Waters)

Parole Chiave

Amiloidosi; β 2-microglobulina; Apolipoproteina A-I; misfolding proteico; citotossicità.

UNITA' DI RICERCA INBB
Parma

Responsabile Scientifico

Saverio Bettuzzi

Linea di Ricerca

Ruolo biologico della clusterina (clu).

Clu e nclu (forma nucleare) come fattori oncosoppressivi nel cancro della prostata.

Attività anti-tumorale delle catechine del tè verde.

Meccanismo d'azione delle catechine del tè verde.

Chemioprevenzione del cancro prostatico.

Gene profiling del cancro prostatico.

Studio degli effetti benefici per la salute umana di metaboliti secondari e di antiossidanti di origine vegetale.

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Saverio Bettuzzi

PO

saverio.bettuzzi@unipr.it

Daniele De Rio

RU

daniele.delrio@unipr.it

Non Aderenti INBB

Federica Rizzi

DR

federica.rizzi@nemo.unipr.it

Maria Giovanna Troglio

PT

mariagiovanna.troglio@unipr.it

Marco Friggeri

PT

marco.friggeri@unipr.it

Alessandro Silva

DR

alessandro.silva@nemo.unipr.it

Mariangela Coletta

DR

mariangela.coletta@nemo.unipr.it

Daisy Corvetta

DR

daisy.corvetta@nemo.unipr.it

Ileana Ramazzina

BC

iramazzi@nemo.unipr.it

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Medicina Sperimentale,

Sezione di Biochimica, Biochimica Clinica e Biochimica dell'Esercizio Fisico

Indirizzo Via Volturno, 39- 43100 PARMA

Telefono 0521-903803; Fax 0521-903802

E-mail: saverio.bettuzzi@unipr.it

Sezione INBB di appartenenza

Milano

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Comprendere il ruolo biologico di CLU e delle sue isoforme nel controllo della proliferazione normale e patologica dell'epitelio prostatico e nell'apoptosi. Dissezione molecolare dello sviluppo e della progressione del cancro della prostata. Messa a punto di nuovi approcci diagnostici e terapeutici per la malattia. Gli studi sono condotti in modelli sperimentali *in vitro* (linee cellulari immortalizzate, neoplastiche e in colture primarie) e *in vivo* (prostata di ratto e di topo), in modelli transgenici (topi TRAMP che sviluppano il cancro prostatico) e in contesto clinico (campioni di cancro prostatico umano). I dati molecolari su CLU e nCLU sono integrati con quelli ottenuti valutando l'espressione di altri geni come: istone H3 (marcatore della fase S del ciclo cellulare); Gas1 (marcatore della fase di quiescenza cellulare); geni regolatori del metabolismo delle poliammine (ODC, AdoMetDC, SSAT, OAZ). Gli effetti biologici (proliferazione/apoptosi) sono studiati anche mediante trasfezione transiente o stabile con vettori di espressione per CLU, nCLU o con RNA antisense. Comprendere il meccanismo d'azione anti-tumorale delle catechine del tè verde. Identificare e studio delle eventuali proprietà biologiche dei metaboliti delle catechine in modelli animali ed umani.

Risultati ottenuti

- 2006: dimostrazione clinica che la somministrazione di un estratto purificato e standardizzato di catechine del tè verde inibisce la progressione del cancro della prostata in soggetti ad alto rischio di sviluppo della malattia;
- 2006: validazione di una "gene signature" con metodo Real-Time qPCR per la prognosi molecolare del cancro prostatico nel modello TRAMP;
- 2007: dimostrazione che l'attività anti-tumorale, anti-motilità ed anti-invasione di nCLU è mediata dalla modificazione dell'organizzazione del citoscheletro attraverso l'interazione con alfa-actinina;

- 2008: dimostrazione che l'effetto anti-tumorale dell'estratto purificato e standardizzato di catechine del tè verde nei confronti della progressione del cancro della prostata non è citostatico ma citotossico, perché il beneficio per i pazienti rimane tale anche 2 anni dopo la sospensione del trattamento. Questo risultato ha permesso di formulare l'ipotesi che le catechine svolgano un'azione terapeutica citotossica contro le fasi iniziali di trasformazione neoplastica.

Pubblicazioni più significative nel periodo 2006-2008

1. "Nuclear clusterin accumulation during heat shock response: implications for cell survival and thermo-tolerance induction in immortalized and prostate cancer cells" A.E. Caccamo, S. Desenzani, L. Belloni, A. F. Borghetti, and S. Bettuzzi *Journal of Cellular Physiology* 207, 208-219, 2006 IF 3.638
2. "Chemoprevention of Human Prostate Cancer by Oral Administration of Green Tea Catechins (GTCs) in High Grade PIN Volunteers: a Preliminary Report from a 1 Year Proof-of-Principle Study" S. Bettuzzi, M. Brausi, F. Rizzi, G. Castagnetti, G. Peracchia, and A. Corti *Cancer Research*, 66, 1234-1240, 2006 IF 7.656
3. "Molecular classification of green tea catechins-sensitive and -resistant prostate cancer in the TRAMP mice model by quantitative real-time PCR gene profiling" M. Scaltriti, L. Belloni, A. Caporali, P. Davalli, D. Remondini, F. Rizzi, S. Astancolle, A. Corti and S. Bettuzzi *Carcinogenesis*, 27: 1047-1053, 2006 IF 5.366
4. "Colonic fermentation of indigestible carbohydrates contributes to the second meal effect. Brighenti F, Benini L, Del Rio D, Casiraghi C, Pellegrini N, Scazzina F, Jenkins DJ, Vantini I. *American Journal of Clinical Nutrition* 83: 817-822, 2006 IF: 5.853
5. "Clinical relevance of the inhibitory effect of Green Tea Catechins (GTCs) on prostate cancer progression in combination with molecular profiling of catechin-resistant tumors: an integrated view". S. Bettuzzi, F. Rizzi, L. Belloni. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 10: 57-60, 2007
6. "Epigenetic DNA methylation regulation of genes coding for lipid rafts associated components: a role for rafts proteins in cell transformation and cancer progression" S. K. Patra and S. Bettuzzi (Review), *Oncology Reports* 17:1279-1290, 2007 .IF 1,567
7. "B-MYB is hypophosphorylated and resistant to degradation in neuroblastoma: implications for cell survival" R. Schwab, A. Caccamo, S. Bettuzzi, J. Anderson and A. Sala *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 39: 263-271, 2007 IF 2.678
8. "Green tea catechins suppress the DNA synthesis marker MCM7 in the TRAMP model of prostate cancer" S. McCarthy, A. Caporali, S. Enkemann, M. Scaltriti, S. Eschrich, P. Davalli, A. Corti, A. Lee, J. Sung, T. J. Yeatman and S. Bettuzzi *Molecular Oncology* 1: 196-204, 2007
9. "Differential regulation of growth and motility of both non-malignant and malignant prostate epithelial cells by secreted Clusterin and nuclear Clusterin, a new α -Actinin binding protein: possible implications in prostate tumorigenesis" R. M. Moretti, M. Montagnani Marelli, S. Mai, A. Cariboni, M. Scaltriti, S. Bettuzzi, and P. Limonta *Cancer Res*, 67:10325-10333, 2007 IF 7,656
10. "Demethylation of (Cytosine-5-C-methyl) DNA and regulation of transcription in the epigenetic pathways of cancer development" S. K. Patra, A. Patra, F. Rizzi, T. C. Ghosh and S. Bettuzzi *Cancer and Metastasis Reviews* 2008, in press IF 6,155
11. "Food selection based on Total Antioxidant Capacity is able to modify antioxidant intake, systemic inflammation and liver function without altering markers of oxidative stress" Valtueña S, Pellegrini N, Franzini L, Bianchi Ma, Ardigò D, Del Rio D, Piatti PM, Scazzina F, Zavaroni I, Brighenti F.. *American Journal of Clinical Nutrition* 2008, in press IF: 5.853
12. "Chemoprevention of human prostate cancer by oral administration of green tea catechins: two years later. A follow-up update" M. Brausi, F. Rizzi and S. Bettuzzi. *Eur Urol* 2008, in press .IF 4.850

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Definizione del ruolo biologico e del meccanismo d'azione di CLU/nCLU nello sviluppo del cancro della prostata (CaP). Studio della struttura delle isoforme di CLU. Studio integrato dell'espressione di CLU e dei geni del metabolismo delle poliammine. Studio del comportamento biologico del CaP. Definizione del profilo di espressione associato a inizio, progressione e prognosi del CaP. Definizione del profilo di espressione genico associato alla risposta terapeutica alle catechine del tè verde (CTV). Studio della attività anti-tumorale delle CTV anche in altre neoplasie. Studio del metabolismo delle CTV, identificazione dei cataboliti e studio delle loro eventuali proprietà biologiche.

Collaborazioni internazionali in atto

Dr. Arturo Sala,

Senior Lecturer, Molecular Haematology and, Cancer Biology Unit, Institute of Child Health, 30 Guilford Street,, London WC1N 1EH, UK., tel 44-020-7905-2714, fax 44-020-78138100 a.sala@ich.ucl.ac.uk

Prof. Norman J. Maitland

YCR Cancer Research Unit, Department of Biology, University of York, PO Box 373, York YO1 5YW, U.K. njm9@york.ac.uk

Prof. Alan Crozier

Plant Products and Human Nutrition Group, Division of Environmental and Evolutionary Biology, Faculty of Biomedical and Life Sciences, University of Glasgow, Glasgow G12 8QQ, U.K.

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Microscopio a Fluorescenza

Nucleic Acid Prep station

Real-Time qPCR

Personal Arrayer per lo spottaggio di DNA chip custom-made

HPLC interfacciato a spettrometro di massa a triplo quadrupolo (Waters Quattro Micro API)

Spettrofluorimetro LS-55 Perkin Elmer

Parole Chiave

Clusterin; Prostate Cancer; Green Tea Catechins; Gene Expression; Bioavailability.

UNITA' DI RICERCA INBB
L'Aquila

Responsabile Scientifico:

Argante Bozzi

Linee di Ricerca:

- 1- Struttura e funzione di peptidi ad attività antimicrobica
- 2- Polifenoli e flavonoidi naturali come agenti chemopreventivi

Titoli:

- 1- Studi sul meccanismo d'azione di biopeptidi antimicrobici in membrane artificiali e biologiche
- 2- Studi sul meccanismo d'azione di polifenoli (resveratrolo) ed isoflavonoidi (quercetina) di origine alimentare in cellule tumorali umane

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Bozzi Argante	PO	bozzi@cc.univaq.it
---------------	----	--------------------

Non Aderenti INBB

Di giulio Antonio	PA	antonio.digiulio@cc.univaq.it
Brisdelli Fabrizia	RIC	fabrizia.brisdelli@cc.univaq.it
Coccia Cristina	DR	cristina_coccia@yahoo.it
Di Placido Giuseppe	DR	

Sede Unità di Ricerca:

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche, Università L'Aquila

Indirizzo: Via Vetoio, Coppito 2, 67100 L'Aquila

Telefono: 0862-433472

Fax: 0862-433472

E-mail: bozzi@cc.univaq.it

Sezione INBB di appartenenza:

Roma

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Linea di ricerca 1: Struttura e funzione di biopeptidi ad attività antimicrobica: Negli ultimi tre anni abbiamo focalizzato i nostri studi sugli aspetti strutturali e funzionali di peptidi provenienti da pelle di rana (temporine e bombinine) o da sezioni di proteine batteriche (Vitr-p-13, da Hb da vitreoscilla). Tali peptidi sono abbastanza corti (13-20 aa), hanno una carica netta positiva (da +1 a +3), presentano una percentuale variabile di struttura ad alfa-elica e una natura anfipatica. L'interazione con modelli di membrana (monolayers e liposomi di diversa natura e costituzione lipidica) e con membrane di cellule batteriche e fungine è stata esaminata con differenti metodologie.

Linea di ricerca 2: Polifenoli e flavonoidi naturali come agenti chemopreventivi: Studi recenti condotti presso i nostri laboratori utilizzando un polifenolo (resveratrolo, RES) e un flavonoide (quercetina, Q), presenti in quantità discrete in bevande ed alimenti tipici della dieta mediterranea, hanno evidenziato la loro capacità di indurre morte cellulare programmata (apoptosi) in due linee di cellule tumorali umane in coltura: la leucemia cronica mieloide (K562) e la leucemia linfoblastica acuta (HSB-2). L'apoptosi è stata monitorata mediante dosaggio e rivelazione dei più comuni markers di membrana, citoplasmatici e mitocondriali. Inoltre sono stati misurati i livelli di substrati ed enzimi coinvolti nell'innescamento e propagazione della cascata apoptotica.

Risultati ottenuti:

Linea di ricerca 1: Struttura e funzione di biopeptidi ad attività antimicrobica: Tra le temporine studiate, la temporina L si è rivelata come la più potente ad indurre fuoriuscita di soluti a diverso peso molecolare da liposomi di varia natura. Studi paralleli hanno dimostrato inoltre la sua marcata attività antibatterica sia contro ceppi Gram+ che Gram-. Le caratteristiche della temporina L sembrano correlate alla sua elevata propensione ad assumere una conformazione ad alfa elica in solvente organico.

Linea di ricerca 2: Polifenoli e flavonoidi naturali come agenti chemopreventivi: Il RES induce apoptosi in entrambe le linee cellulari testate ma con maggiore potenza nelle cellule HSB-2. La cascata apoptotica dipende da una aumentata espressione di Bax e da un maggiore rilascio di citocromo c. L'elevato contenuto di glutatione ridotto (GSH) riscontrato nelle cellule K562 non sembra la causa principale della maggiore resistenza al RES esibita da queste cellule. Al contrario, il trattamento con Q induce una marcata inibizione della crescita ed una estesa apoptosi (caspasi-3 e cyt c-

dipendenti) solo nelle cellule della linea K562. Tale risultato sarebbe da imputare alla maggiore concentrazione intracellulare di GSH e alla formazione di addotti tossici Q-gruppi tiolici prevalentemente nelle cellule K562.

Pubblicazioni più significative nel periodo 2006-2008

1. A.C.Rinaldi, A.Bonamore, A.Macone, A.Boffi, A.Bozzi, A.Di Giulio. Interaction of *Vitreoscilla* Hemoglobin with membrane Lipids. *Biochemistry* 45; 4069-4076, 2006.
2. A.Giacometti, O.Cirioni, R.Ghiselli, F.Mocchegiani, F.Orlando, C.Silvestri, A.Bozzi, A.Di Giulio, C.Luzi, M.L.Mangoni, D.Barra, V.Saba, G.Scalise and A.C.Rinaldi. Interaction of antimicrobial peptide Temporin L with lipopolisaccaride *in vitro* and in experimental rat models of Gram-negative septic shock. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50; 2478-2486, 2006.
3. G.D'Andrea, A.R.Lizzi, S.Venditti, L.Di Francesco, A.Giorgi, G.Mignogna, A.Oratore and A.Bozzi. Proteins pattern alteration in AZT-treated K562 cells detected by two-dimensional gel electrophoresis and peptide mass fingerprinting. *Proteome Sci.* 4; [PubMed - in process], 2006.
4. V. Carnicelli, A. Di Giulio, R. Strom, A. Bozzi and A. Oratore. Effect of 3'-azido-3' deoxythymidine (AZT) of protein kinase activity in erythroleukemic cell line K562. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 99; 317-322, 2006.
5. F.Brisdelli, C.Coccia, B.Cinque, M.G.Cifone and A.Bozzi. Induction of apoptosis by quercetin: different response of human chronic myeloid (K562) and acute lymphoblastic (HSB-2) leukemia cells. *Mol. Cell. Biochem.* 296; 137-149, 2007.
6. A.R.Lizzi, A.M.D'Alessandro, A.Bozzi, B.Cinque, A.Oratore and G.D'Andrea. Pattern expression of glycan residues in AZT-treated K562 cells analyzed by lectin cytochemistry. *Mol. Cell. Biochem.* 300 (1-2); 29-37, 2007.
7. A.Bozzi, C.Coccia, A.Di Giulio, A.C.Rinaldi, A.Amadei, G.Mignogna, A.Bonamore, A.Fais, and M.Aschi. Folding propensity and biological activity of peptides: New insights from conformational properties of a novel peptide derived from *Vitreoscilla* haemoglobin. *Biopolymers* 87 (1); 85-92, 2007.
8. G.D'Andrea, F.Brisdelli and A.Bozzi. AZT: An old drug with new perspectives (Review). *Current Clinical Pharmacology* 3 (1); 20-37, 2008.
9. A.Bozzi, M.L.Mangoni, A.C.Rinaldi, G.Mignogna and M.Aschi. Folding propensity and biological activity of peptides: The effect of a single stereochemical isomerization on the conformational properties of bombinins in aqueous solution. *Biopolymers* 89 (9); 769-778, 2008.
10. A.Giuliani, G.Pirri, A.Bozzi, A.Di Giulio, M.Aschi and A.C. Rinaldi. Antimicrobial peptides: natural templates for synthetic membrane-active compounds. *Cell. Mol. Life Sci.* 65; 2450-2460, 2008.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Chiarire il meccanismo d'azione dei peptidi antimicrobici in vista di un loro potenziale impiego come agenti sostitutivi o cadiuvanti degli antibiotici convenzionali sempre più soggetti al fenomeno della resistenza.

Contribuire alla comprensione del ruolo dei polifenoli-flavonoidi, normali costituenti di cibi e bevande tipici della dieta mediterranea, quali agenti induttori di apoptosi in differenti linee di cellule tumorali umane e di un loro possibile impiego nella prevenzione della cancerogenesi.

Collaborazioni internazionali in atto

Laboratory of the Department of Dental Basic Science, Section Oral Biochemistry, Academic Centre for Dentistry (ACTA), Amsterdam, Dr. Enno Veerman.

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

- Apparato per formazione di liposomi di varia natura e composizione
- Spettrofotometro UV/VIS, termostato e computerizzato Perkin Elmer λ 19
- Spettrofluorimetro Perkin Elmer LS 50B
- Apparati HPLC ed FPLC
- Apparati per EFor mono- bidimensionale
- Apparati per blotting (Western, Northern e Southern)

Parole Chiave

Antimicrobial peptides; liposomes; resveratrol; quercetin; apoptosis

UNITA' DI RICERCA INBB
Napoli

Responsabile Scientifico

Giovanna Cacciapuoti

Linea di Ricerca

Caratterizzazione strutturale e funzionale di purine nucleoside fosforilasi da archaea ipertermofili, enzimi con interessanti potenzialita' applicative nella terapia genica diretta contro i tumori.

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Cacciapuoti Giovanna
Porcelli Marina

PO
PO

giovanna.cacciapuoti@unina2.it
marina.porcelli@unina2.it

Non Aderenti INBB

Peluso Iolanda
Napoli Daniela

DR
DrR

Iolanda.pelus@unina2.it
Daniela.napoli@unina2.it

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Biochimica e Biofisica "fF Cedrangolo"

Indirizzo Via Costantinopoli, 16

Telefono 081-5667519.

Fax 081-5667519

E-mail giovanna.cacciapuoti@unina2.it

Sezione INBB di appartenenza

Napoli

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Le purine nucleoside fosforilasi (PNP) sono enzimi ubiquitari che svolgono una importante funzione nel riciclaggio delle basi puriniche. In aggiunta al loro intrinseco ruolo biochimico, le PNP rivestono anche un notevole interesse biomedico. In primo luogo, la PNP umana è considerata un importante bersaglio per interventi farmacologici dal momento che la deficienza di PNP è una alterazione genetica del metabolismo purinico associata ad una immunodeficienza dei linfociti T. In secondo luogo, le PNP di varie fonti, soprattutto batteriche, sono state largamente utilizzate per la sintesi enzimatica di nucleosidi con potenziali attività antivirale e antineoplastica. Infine, differenze in specificità di substrato tra PNP da *E. coli* e l'enzima umano sono state sfruttate per lo sviluppo della terapia genica diretta contro i tumori. Numerosi fattori possono contribuire al miglioramento dell'approccio della terapia genica correntemente impiegata. Tra questi l'individuazione di nuove PNP con attività catalitiche e specificità di substrato del tutto nuove che possano essere utilizzate per l'attivazione di profarmaci con maggiore specificità e minore tossicità. A tale scopo le attuali ricerche sono rivolte allo studio delle caratteristiche strutturali e funzionali di PNP da *Bacteria* e *Archaea*. Tali enzimi, infatti, sono caratterizzati da specificità di substrato diversa e a più ampio spettro rispetto a quelle degli omologhi enzimi umani.

Risultati ottenuti

L'analisi della sequenza genomica dell'archaeon ipertermofilo *Pyrococcus furiosus*, ha evidenziato, accanto alla 5'-metiltioadenosina fosforilasi (PfMTAP), un secondo gene, codificante una ipotetica purina nucleoside fosforilasi (PfPNP). Il gene della PfPNP è stato clonato ed espresso. La proteina ricombinante, un esamero di 160 kDa, è notevolmente termofila, termostabile ed estremamente resistente all'azione proteolitica e alla denaturazione chimica anche ad elevate temperature. PfPNP, in analogia con la PNP da mammiferi è strettamente specifica per le basi 6-oxo puriniche. L'analisi comparativa della PfPNP e della PfMTAP ha evidenziato importanti sostituzioni amminoacidiche al livello del sito attivo che giustificano il diverso ruolo funzionale dei due enzimi. La PfPNP, contiene 2 ponti disolfuro intrasubunità importanti per la stabilità dell'enzima e un motivo strutturale CXC nella regione C-terminale che potrebbe giocare un importante ruolo nel folding ossidativo della proteina.

Pubblicazioni più significative nel periodo 2006-2008

1. M. Porcelli, L. Concilio, I. Peluso, A. Marabotti and G. Cacciapuoti.
Pyrimidine specific ribonucleoside hydrolase from the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. Biochemical characterization and homology modeling.
THE FEBS JOURNAL, 275, 1900-1914, 2008.
2. G. Cacciapuoti, C. Manna, D. Napoli, V. Zappia and M. Porcelli
Homocysteine-induced endothelial cell adhesion is related to adenosine lowering and is not mediated by S-adenosylhomocysteine
FEBS Letters, 581, 4567-4570, 2007.
3. G. Cacciapuoti, M. Porcelli, M.A. Moretti, F. Sorrentino, L. Concilio, V. Zappia, Z-J. Liu, W. Tempe, F. Schubot, J.P. Rose, Bi-C. Wang, P.S. Brereton, F.E. Jenney, and M.W.W. Adams
The first agmatine/cadaverine aminopropyl transferase: biochemical and structural characterization of an enzyme involved in polyamine biosynthesis in the hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus furiosus*
J. Bacteriol. 189, 6057-6067, 2007.
4. G. Cacciapuoti, S. Gorassini, M. F. Mazzeo, R. A. Siciliano, V. Carbone, V. Zappia and M. Porcelli
Biochemical and structural characterization of mammalian-like purine nucleoside phosphorylase from the archaeon *Pyrococcus furiosus*
FEBS J. 274, 2482-2495, 2007
5. Y. Zang, M. Porcelli, G. Cacciapuoti and S.E. Ealick
The crystal structure of 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine phosphorylase II from *Sulfolobus solfataricus*, a thermophilic enzyme stabilized by intramolecular disulfide bonds.
J. Mol. Biol., 357, 252-262, 2006

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Il programma di ricerca si inquadra in un progetto finalizzato allo studio delle purine nucleoside fosforilasi da archaea ipertermofili attraverso una caratterizzazione strutturale e funzionale che permetta da un lato di acquisire nuove conoscenze sulle strategie molecolari alla base della estrema stabilità delle proteine ipertermofile e dall'altro di esplorare il potenziale applicativo delle purine nucleoside fosforilasi ritenute attualmente un attraente bersaglio per il disegno di agenti terapeutici selettivi per la soppressione della immunità cellulare. Il programma di ricerca prevede la caratterizzazione della stabilità termodinamica di due purine nucleoside fosforilasi da Archaea ipertermofili, attraverso la determinazione quantitativa dei cambiamenti nelle funzioni di stato associate con il processo di denaturazione, (\square_dG , \square_dH , \square_dS e \square_dCp). Tale studio verrà effettuato utilizzando la calorimetria differenziale a scansione (DSC). Verrà inoltre effettuato uno studio di *molecular modelling* comparativo finalizzato all'ottenimento di informazioni sia sulla struttura tridimensionale che sulla diversa specificità di substrato delle due purine nucleoside fosforilasi. Verrà infine indagato il possibile ruolo giocato dal motivo strutturale CXC nel *folding* ossidativo.

Collaborazioni internazionali in atto

Collaborazione scientifica con la Section of Biochemistry, Molecular and Cell Biology della Cornell University, Ithaca, New York.

Collaborazione con il Department of Biophysics, Institute of experimental Physics, University of Warsaw, Polonia

Collaborazione scientifica con il Department of Biochemistry & Molecular Biology della University of Georgia

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

- Spettrometro a scintillazione liquida Perkin-Elmer, modello 1400.
- Termociclatore per PCR in tempo reale (Bio-Rad I-Cycler iQ) completo di software "Beacon Designer" per il disegno di primers e probes.
- HPLC (Agilent LC 1100 series) con trappola a ioni (Ion Spray-LC-MSD trap)
- Strumentazione per la rivelazione quantitativa di marcatori in fluorimetria, polarizzazione di fluorescenza, fotometria, etc (Perkin Elmer Wallac 1420 completo di computer e software (vs 3.0)
- Sistema per PCR in tempo reale High Throughput (Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System)

Parole Chiave

Purine nucleoside fosforilasi, stabilità delle proteine, ponti disolfuro, Archaea ipertermofili, terapia genica

UNITA' DI RICERCA INBB
Napoli

Responsabile Scientifico

Pietro Pucci

Linea di Ricerca

1. Proteomica Funzionale: interazioni proteina-proteina *in vivo*
2. Meccanismi molecolari nel processo di fibrillogenesi delle proteine.

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Leila Birolo	PA	birolo@unina.it
Angela Amoresano	RU	angamor@unina.it
Maria Monti	RU	montimar@unina.it
Marianna Cozzolino	DR	cozzolinom@ceinge.unina.it
Viviana Pisa	BC	visa@ceinge.unina.it

Non Aderenti INBB

Andrea Carpentieri	BC	acarpent@unina.it
Chiara Giangrande	BC	Chiara.giangrande@unina.it
Angelo Chianese	BC	Angelo.chianese@unina.it

Sede Unità di Ricerca

Laboratorio di Proteomica, CEINGE Biotecnologie Avanzate e Dipartimento di Chimica Organica e Biochimica
Indirizzo Via Comunale Margherita 482
Telefono 081-3737896; 081-674318
Fax 081-3737808; 081-674313
E-mail pucci@unina.it

Sezione INBB di appartenenza

Napoli

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

- Fibrillogenesi

La conversione delle proteine globulari in aggregati fibrillari insolubili richiede significative variazioni conformazionali come ad es. la conversione della struttura secondaria da Alfa a Beta. Un approccio sistematico di esperimenti di proteolisi limitata e scambio H/D integrato con metodologie avanzate di spettrometria di massa può essere usato per identificare le regioni più esposte e flessibili che possono dar luogo a interazioni intermolecolari. Dal momento che la topologia superficiale delle proteine è influenzata dalle variazioni conformazionali, quando questi esperimenti vengono condotti in parallelo sulla proteina nativa e sugli interedi amiloidogenici si ottengono mappe peptidiche differenziali da cui è possibile individuare le regioni proteiche interessate dalle variazioni. Inoltre, la stessa strategia può essere utilizzata per analizzare le fibrille amiloidi in modo da definire le regioni proteiche coinvolte nella formazione del core altamente strutturato delle fibrille.

- Proteomica funzionale

Un contributo fondamentale all'identificazione di proteine interagenti in complessi funzionali nei sistemi cellulari può essere fornito da metodologie basate sulla cromatografia di affinità. La filosofia del metodo consiste nella possibilità di esprimere la proteina di interesse in forma ricombinante modificata con una specifica marcatura (tag) che può essere utilizzata come un'esca per isolare selettivamente i suoi partners specifici da un intero estratto cellulare. L'isolamento degli interi complessi proteici funzionali può quindi essere effettuato utilizzando opportuni sistemi di riconoscimento specifico del "tag" iobilizzati su supporti insolubili e dotati di elevata capacità di legame.

Alternativamente, il gene codificante per la proteina esca modificata con un epitopo per il quale sono disponibili buoni anticorpi è trasfettato ed espresso in una appropriata linea cellulare. I complessi formati nell'estratto cellulare sono immunoprecipitati con l'anticorpo specifico contro il tag. I componenti proteici sono frazionati mediante SDS-PAGE e le singole proteine identificate mediante differenti metodologie di spettrometria di massa.

Risultati ottenuti

Fibrillogenesi

1. *Sulfolobus solfataricus* Acylphosphatase

L'acilfosfatasi da *Sulfolobus solfataricus* forma due tipi di aggregati fibrillari: (1) aggregati iniziali enzimaticamente attivi e (2) oligomeri con caratteristiche simili alle protofibrille amiloidi, questi ultimi originati dalla riorganizzazione delle strutture iniziali. Diverse AcP varianti sono state studiate utilizzando differenti metodologie biofisiche che hanno consentito di identificare le regioni della sequenza proteica e i meccanismi che promuovono la fase di aggregazione iniziale. Inoltre è stato possibile dimostrare che la seconda fase consiste in una conversione cooperativa che coinvolge l'intero fold della proteina.

2. Apo A-1

Alcune malattie amiloidogeniche sono associate alla presenza di aggregati fibrillari originati dalla porzione N-terminale dell'Apo A-1 che si formano attraverso processi molecolari in gran parte sconosciuti. Il frammento ApoA-I 1-93 è stato prodotto in forma ricombinante e sottoposto ad analisi conformazionale. In analogia con il frammento isolato ex vivo, una variazione di pH da 7 a 4 induce una rapida transizione conformazionale reversibile ad uno stato elicoidale che rappresenta un intermedio chiave del processo fibrillogenico. Esperimenti di proteolisi limitata hanno suggerito che il frammento C-terminale del peptide 1-93 è coinvolto nella formazione della struttura elicoidale. Infine il frammento ricombinante è in grado di formare fibrille a pH 4 su una scala di tempi comparabile con il frammento nativo.

Proteomica funzionale

1. Meccanismi molecolari di frameshifting.

La decodificazione del messaggio genetico avviene secondo uno schema di regole che va sotto il nome di *recoding*. Il meccanismo di espressione del gene codificante la α -L-fucosidase nell'archeobatterio *Sulfolobus solfataricus* che è suddiviso in due ORFs separate da un -1 frameshifting. L'espressione ricombinante in *E. coli* del gene nativo discontinuo ha portato alla produzione di una proteina completa con un'efficienza del 5% mediante un meccanismo di frameshifting. Mutazioni nel sito di regolazione dove avviene il processo di "shift" hanno dimostrato che l'espressione di questo gene in vivo è regolata. Inoltre, Further, in vitro è stato dimostrato che anche in *S. solfataricus* l'espressione di questo gene avviene secondo un meccanismo programmato di -1 frameshifting.

2. Traffico intracellulare di SUMF1

SUMF1 è la proteina attivatrice delle solfatasi le cui mutazioni sono responsabili di severe patologie. In collaborazione con la Dr.ssa MP Cosma (TIGEM, Napoli) si sta conducendo uno studio sui meccanismi di folding, traffico e sulle funzioni di SUMF1. Sono state identificate le proteine PDI, ERp44 e ERGIC-53 il cui ruolo sembra cruciale nel controllo della ritenzione e dell'uscita di SUMF1 dall'ER.

Pubblicazioni più significative nel periodo 2006-2008

1. G. Fiore, C. Di Cristo, G. Monti, A. Amoresano, L. Columbano, P. Pucci, F. A. Cioffi, A. Di Cosmo, A. Palumbo, M. d'Ischia. Tubulin nitration in human gliomas. *Neurosc. Lett.* **394** (2006) 57-62.
2. G. Plakoutsi, F. Bemporad, M. Monti, D. Pagnozzi, P. Pucci, F. Chiti. Exploring the Mechanism of Formation of Native-like and Precursor Amyloid Oligomers for the Native Acylphosphatase from *Sulfolobus solfataricus*. *Structure* **14** (2006) 993-1001.
3. L. Garzia, C. Roma, N. Tata, D. Pagnozzi, P. Pucci and Zollo M. H-prune-nm23-H1 protein complex and correlation to pathways in cancer metastasis. *J. Bioenerg. Biomemb.* **38** (2006). 205-213.
4. S. Di Gaetano, F. Guglielmi, A. Arciello, P. Mangione, M. Monti, D. Pagnozzi, S. Raimondi, S. Giorgetti, S. Orru, C. Canale, P. Pucci, C.M. Dobson, V. Bellotti and R. Piccoli. Recombinant amyloidogenic domain of ApoA-I: analysis of its fibrillogenic potential. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **351** (2006) 223-228.
5. Cobucci-Ponzano B, Conte F, Benelli D, Londei P, Flagiello A, Monti M, Pucci P, Rossi M, Moracci M. The gene of an archaeal alpha-L-fucosidase is expressed by translational frameshifting. *Nucleic Acids Res.* **34** (2006) 4258-4268.
6. S. Giorgetti, M. Stoppini, G.A. Tennent, A. Relini, L. Marchese, S. Raimondi, M. Monti, S. Marini, O. Ostergaard, N.H. Heegaard, P. Pucci, G. Esposito, G. Merlini and V. Bellotti. Lysine 58-cleaved beta2-microglobulin is not detectable by 2D electrophoresis in ex vivo amyloid fibrils of two patients affected by dialysis-related amyloidosis. *Prot. Sci.* **16** (2007) 343-349.
7. E. Zito, M. Buono, S. Pepe, C. Settembre, I. Annunziata, E.M. Surace, T. Dierks, M. Monti, M. Cozzolino, P. Pucci, A. Ballabio and M.P. Cosma. Sulfatase modifying factor 1 trafficking through the cells: from endoplasmic reticulum to the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* **26** (2007) 2443-2453.

8. A. Amoresano, G. Chiappetta, P. Pucci., M. D 'Ischia and G. Marino. Bidimensional Tandem Mass Spectrometry for Selective Identification of Nitration Sites in Proteins. *Anal. Chem.* 79 (2007) 2109-2117.
9. G. Erbs, A. Silipo, S. Aslam, C. De Castro, V. Liparoti, A. Flagiello, P. Pucci, R. Lanzetta, M. Parrilli, A. Molinaro, M.A. Newman and R.M. Cooper. Peptidoglycan and muropeptides from pathogens agrobacterium and xanthomonas elicit plant innate immunity: structure and activity. *Chem Biol.* 15 (2008) 438-448.
10. A. Fraldi, E. Zito, F. Annunziata, A. Lombardi, M. Cozzolino, M. Monti, C. Spampanato, A. Ballabio, P. Pucci, R. Sitia and M.P. Cosma. Multistep, sequential control of the trafficking and function of the Multiple Sulfatase Deficiency gene product, SUMF1 by PDI, ERGIC-53 and ERp44. *Hum Mol Genet.* 2008 (in press)

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

1. Identificazione dei componenti del complesso cap in Drosophila

Il complesso cap della *Drosophila* è stato isolato mediante cromatografia di affinità ed i singoli componenti identificati in collaborazione con il Prof. Verrotti (CEINGE, Napoli). Tra gli interattori, si focalizzerà lo studio sullo chaperone Hsp83 ed il repressore trascrizionale Cup con l'intento di dimostrare che *hsp83* e *cup* interagiscono geneticamente e che le due proteine colocalizzano. Questo potrebbe suggerire una funzione comune delle due proteine. Studi saranno anche condotti sugli altri interattori.

2. Sviluppo di un nuovo metodo per l'isolamento dei complessi di Chromobox7

In collaborazione con il Prof. A Fusco (CEINGE, Napoli) si stanno sviluppando nuove metodologie per l'isolamento in vivo dei complessi che coinvolgono il repressore trascrizionale CBX7 mediante ultracentrifugazione in gradienti di glicerolo/saccarosio. Queste procedure consentiranno di identificare eventualmente i differenti complessi funzionali cui CBX7 appartiene, svelando i possibili diversi ruoli che questa proteina sembra svolgere.

3. Ricerca di nuovi elementi di regolazione del gene CFTR.

Una certa percentuale delle mutazioni indefinite del gene CFTR (10% dei pazienti di Fibrosi Cistica) avvengono all'interno di putativi elementi di regolazione, quali le Sequenze Altamente Conservate (CSTs). In collaborazione con il Prof. G. Castaldo (CEINGE, Napoli) si stanno studiando i fattori proteici che si legano specificamente alle CSTs mutate presenti nel primo introne del gene CFTR e ne modulano l'espressione. Mediante una cromatografia di affinità utilizzando una CST mutata si selezioneranno le proteine che si legano specificamente all'esca. Queste proteine saranno frazionate mediante SDS-PAGE ed identificate mediante LCMSMS per definire i meccanismi di controllo del gene CFTR.

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

1. Spettrometro di Massa LC-MS/MS Waters Q-TOF con HPLC capillare.
2. Spettrometro di Massa LC-MS/MS Agilent CHIP-MS basato su cromatografia su CHIP con HPLC capillare e analizzatore Ion Trap.
3. Spettrometro di Massa MALDI reflectron Applied Biosystems VOYAGER DE PRO
4. Spettrometro di Massa MALDI linear Applied Biosystems VOYAGER DE.
5. Serquenziatore di Proteine Applied Biosystems PROCISE 491

Parole

1. Proteomica Funzionale
2. Fibrillogenesi
3. Interazioni Proteina-proteina
4. Proteolisi limitata
5. Spettrometria di Massa Biomolecolare.

UNITA' DI RICERCA INBB
Padova

Responsabile Scientifico

Adelio Rigo

Linea di Ricerca

Struttura-funzione di biomolecole coinvolte nelle reazioni di ossido-riduzione

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Rigo Adelio	PO	adelio.rigo@unipd.it
Vianello Fabio	PA	fabio.vianello@unipd.it
Di Paolo Maria Luisa	RU	marialuisa.dipaolo@unipd.it
Zennaro Lucio	RU	lucio.zennaro@unipd.it
Rossetto Monica	BC (Assegno di ricerca)	monica.rossetto@unipd.it
Vanzani Paola	BC (Assegno di ricerca)	paola.vanzani@unipd.it

Non Aderenti INBB

Veronica De Marco	BC	veronica.demarco@unipd.it
-------------------	----	---------------------------

Sede Unità di Ricerca

Università di Padova Dipartimento di Chimica Biologia.

Indirizzo Via G. Colombo 3

Telefono 049-8276107

Fax 049-8073310

E-mail adelio.rigo@unipd.it

Sezione INBB di appartenenza

Padova

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Lo scopo delle attività di ricerca svolte negli ultimi anni è stato quello di ottenere informazioni sulla funzione e sulla struttura di alcune biomolecole in particolare di alcune coinvolte in processi di ossido riduzione. L'obiettivo finale è quello di riuscire ad individuare sia le correlazioni fra attività e struttura delle biomolecole che i fattori bio-chimico-fisici che modulano la loro funzione. Tali obiettivi sono di primaria importanza per:

- mettere in luce i vari tipi di interazioni che controllano il "docking" di molecole (substrati ed inibitori) con il sito catalitico di alcuni metallo-enzimi (ammino ossidasi, etc.);
- chiarire i meccanismi dei processi in cui sono coinvolte molecole dotate di "attività antiossidante" e capacità di scambio di elettroni;
- ottenere le informazioni da utilizzare per l'impiego di queste molecole in campo bio-tecnologico, in particolare per lo sviluppo di sistemi di trasduzione, amplificazione dell'informazione e per la creazione di nuovi dispositivi e/o sistemi per la conversione dell'energia.

Risultati ottenuti

I risultati ottenuti possono essere suddivisi in base ai settori in cui si articola l'attività di ricerca.

- Ammino ossidasi. Sono stati oggetto di studio due diverse ammino ossidasi contenenti lo ione rame: una purificata da plasma bovino ed una da adipociti umani. Per individuare le correlazioni struttura-funzione, sono state utilizzate come sonde del sito attivo substrati ed inibitori caratterizzati da diverse strutture chimiche e/o distribuzioni di carica e nel caso della ammino ossidasi bovina si è riusciti a cristallizzare complessi di questo enzima con inibitori e successivamente a determinarne la struttura 3D mediante cristallografia a raggi X. Inoltre grazie a studi di meccanica e dinamica molecolare si è riusciti a correlare la struttura del sito attivo di queste ammino ossidasi ai risultati degli studi cinetici e individuare i residui importanti nel meccanismo catalitico e in particolare del processo docking.

- Antiossidanti. Sono stati oggetto di studio alcune di queste molecole, quali flavonoidi e tioli, molto diffuse in natura, caratterizzate da una notevole capacità antiossidante, ed in grado di catturare radicali liberi altamente reattivi. Sono stati sviluppati e messi a punto metodi per valutarne le proprietà antiossidanti ed i meccanismi con cui intervengono nei processi di "scavenging" di radicali liberi ed in particolare dei possibili effetti sinergici. E' stata inoltre messa in luce in alcuni alimenti la presenza di radicali liberi stabili che sono spesso indice di una elevata capacità antiossidante di questi alimenti.

- Sistemi di trasduzione, amplificazione dell'informazione. Fra i vari sistemi sviluppati e messi a punto in questo periodo è da menzionare biosensori basati sulla formazione di strati mono-molecolari di enzimi che permettono di

determinare la presenza di tracce di inquinanti nelle acque reflue e nell'atmosfera e lo sviluppo di sonde nucleari ed elettroniche di varia natura per lo studio di biosistemi da impiegare nel campo ambientale (monitoraggio di inquinanti), nel campo della bioelettronica e della biomedicina (trapianto d'organo etc.).

Pubblicazioni più significative nel periodo 2006-2008

Froner E., Adamo R., Gaburro Z., Margesin B., Pavesi L., Rigo A. & Scarpa M. (2006)

Luminescence of porous silicon derived nanocrystals dispersed in water: dependence on initial porous silicon oxidation
J. Nanoparticle Research 8, 1071-1074

Vianello F., Ragusa S., Cambria M.T. & Rigo A. (2006)

A high sensitivity amperometric biosensor using laccase as biorecognition element
Biosensor & Bioelectronics 21, 2155-2160.

Vianello F., Boscolo-Chio R., Signorini S., Rigo A. (2007).

On-line detection of atmospheric formaldehyde by a conductometric biosensor.
Biosensors & Bioelectronics. 22, 920-925.

Vianello F., Zennaro L., Rigo A. (2007).

A coulometric biosensor to determine hydrogen peroxide using a monomolecular layer of horseradish peroxidase immobilized on a glass surface.
Biosensors & Bioelectronics. 22, 2694-2699

Rossetto M., Vanzani P., Lunelli M., Scarpa M., Mattivi F., Rigo A. (2007).

Peroxyl radical trapping activity of anthocyanins and generation of free radical intermediates.
Free Radical Research. 41, 854-859

Zennaro L., Rossetto M., Vanzani P., De Marco M., Scarpa M., Battistin L., Rigo A. (2007)

A method to evaluate capacity and efficiency of water soluble antioxidants as peroxyl radical scavengers.
Archives Biochem. Biophys. 462, 38-46.

Di Paolo ML, Pesce C, Lunelli M, Scarpa M, Rigo A (2007)

N-alkanamines as substrates to probe the hydrophobic region of bovine serum amine oxidase active site: A kinetic and spectroscopic study
Archives Biochem. Biophys. 465 (1): 50-60

Holt A, Berry PD, Kaptj J S, Mithani S, Smith D, Di Paolo ML (2007)

The effects of buffer cations on interactions between mammalian copper containing amine oxidase and their substrates.
J Neural Trasm 114, 733-741

Rossetto M., Vanzani P., De Marco V., Zennaro L., Scarpa M., Rigo A. (2008)

A fast and simple method for the simultaneous evaluation of the capacity and efficiency of food antioxidants in trapping peroxyl radicals in an intestinal model system.
J. Agric. Food Chem. 56 (10): 3486-3492

Holt A, Smith DJ, Cendron L, Zanotti G, Rigo A., Di Paolo ML (2008)

Multiple binding sites for substrates and modulators of semicarbazide-sensitive amine oxidases: Kinetic consequences
Molecular Pharmacology, 73, 525-538

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

1. Determinare l'influenza di parametri fisici e strutturali del sito attivo di metallo-proteine sulla attività enzimatica.
2. Studiare la bioattività di alcune classi di antiossidanti, con particolare riguardo al loro coinvolgimento nei meccanismi redox.
3. Progettare nuovi dispositivi per la trasduzione, amplificazione dell'informazione e per la creazione di nuovi sistemi per la conversione dell'energia.

Collaborazioni internazionali in atto

Prof. M. Fuxreiter, Mount Sinai School of Medicine, New York (USA)

Prof. A. Holt, University of Alberta, Canada

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

NMR300 MHz (Bruker)

NMR a campo variabile

Microscopio STM AFM (Park)

EPR ED 200 Bruker

FTIR

HPLC con Coularray detection

Parole Chiave

Antiossidanti

Biosensori

Nanodispositivi

Proteine contenenti rame

Radicali liberi

UNITA' DI RICERCA INBB
Catania

Responsabile Scientifico

Enrico Rizzarelli

Linea di Ricerca

Misfolding Protein Diseases

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Enrico Rizzarelli	PO	erizzarelli@unict.it
-------------------	----	----------------------

Non Aderenti INBB

Arena Giuseppe	PO	garena@unict.it
Spoto Giuseppe	PO	spotog@unict.it
Vecchio Graziella	PO	gr.vecchio@unict.it
Bonomo Raffaele	PO	rbonomo@unict.it
Purrello Roberto	PO	rpurrello@unict.it
Grasso Giuseppe	A	grassog@unict.it
Pietropaolo Adriana	A	adriana.pietropaolo@gmail.com
Damante Chiara	A	chiarauni@tiscali.it
Giuffrida M. Laura	DR	mlgiuffrida@katamail.com

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Scienze Chimiche-Università di Catania

Indirizzo Viale A. Doria, 6

Telefono 095 7385070

Fax 095 337678

E-mail erizzarelli@unict.it

Sezione INBB di appartenenza

Catania

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

La ricerca è stata indirizzata al ruolo degli ioni metallici nelle patologie conformazionali e nella progettazione, sintesi ed attività di molecole multifunzionali. Considerati i dati contrastanti riportati in letteratura, l'obiettivo della ricerca è stato focalizzato sull'effetto di zinco (II) e rame (II) nel processo di aggregazione di proteine e polipeptidi coinvolti nelle patologie neurodegenerative.

Risultati ottenuti

Sono stati determinati i principali parametri chimico-fisici dell'interazione del rame (II) e dello zinco (II) con l'amiloide beta, la proteina prione e loro frammenti, ottenendo una correlazione tra specie chimica, morfologia dell'aggregato, tipo di coordinazione e tossicità in vitro. Sono stati sintetizzati coniugati del peptidi L-carnosina con capacità antiossidante, antiaggregante, antiglicante e chelante in grado di attraversare barriera ematoencefalica.

Pubblicazioni più significative nel periodo 2006-2008

1) Environmental effects on a prion's helix II domain: Copper(II) and membrane interactions with PrP180-193 and its analogues.

D. Grasso, G. Grasso, V. Guantieri, G. Impellizzeri, C. La Rosa, D. Milardi, G. Micera, K. Osz, G. Pappalardo, E. Rizzarelli, D. Sanna and I. Sovago.

Chem. Eur. J., 12, 537-547 (2006)

2) Nitrogen Oxide Interaction with copper complexes formed by small peptides belonging to the prion protein octa repeat regions. R.P. Bonomo, G. Pappalardo, E. Rizzarelli, A. M. Santoro, G. Tabbi and L. I. Vagliasindi

Dalton Transaction, 14, 1400-1408 (2007).

3) Protective effect of orally administered carnosine on bleomycin-induced lung injury.

S. Cuzzocrea, T. Genovese, M. Failla, G. Vecchio, M. Fruciano, E. Mazzon, R. Di Paola, C. La Rosa, N. Crimi, E. Rizzarelli and C. Vancheri

AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology, 292, L 1095-1104 (2007).

4) A β (25-35) and its C-and/or N-blocked derivatives: copper driven structural features and neurotoxicity.

- M.L. Giuffrida, G. Grasso, M. Ruvo, C. Pedone, A. Saporito, D. Marasco, B. Pignataro, C. Cascio, A. Copani, E. Rizzarelli.
J Neurosci. Res., 85, 623-633 (2007)
- 5) Trehalose effects on alpha-crystallin aggregates
 F. Attanasio, C. Cascio, S. Fisichella, V. G. Nicoletti, B. Pignataro, A. Savarino and E. Rizzarelli
Biochem. Biophys. Res. Comm., 354, 899-905, (2007).
- 6) Environmental factors differently affect human and rat IAPP: Conformational preferences and membrane interactions of IAPP 17-29 peptide derivatives.
 G. Pappalardo, D. Milardi, A. Magri, F. Attanasio, G. Impellizzeri, C. La Rosa, D. Grasso, E. Rizzarelli.
Chem. Eur. J., 13, 10204-10215 (2007)
- 7) Carnosine interaction with nitric oxide and astroglial cell protection.
 V.G. Nicoletti, A.M. Santoro, G. Grasso, L.I. Vagliasindi, M.L. Giuffrida, C. Cuppari, V. Spina Purrello, A.M. Giuffrida Stella, E. Rizzarelli.
J. Neurosci. Res. 85, 2239-2245 (2007).
- 8) An NMR and molecular dynamics investigation of the avian prion hexarepeat conformational features in solution.
 A. Pietropaolo, L. Raiola, L. Muccioli, G. Tiberio, C. Zannoni, R. Fattorusso, C. Isernia, D. La Mendola, G. Pappalardo, E. Rizzarelli.
Chem. Phys. Lett., 442, 110-118 (2007).
- 9) Ubiquitin stability and Lys63-linked polyubiquitinated site are compromised on copper binding.
 D. Milardi, F. Arnesano, G. Grasso, A. Magri, G. Tabbi, S. Scintilla, G. Natile, E. Rizzarelli.
Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 46, 7993-7995 (2007).
- 10) Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotective versus neurotoxicity.
 V. Calabrese, C. Mancuso, M. Calvani, E. Rizzarelli, D.A. Butterfield, A.M. Giuffrida Stella.
Nature Rev. Neurosci., 8, 766-775 (2007)
- 11) Unveiling the role of histidine and tyrosine residues on the conformation of the avian prion Tetrahexarepeat.
 A. Pietropaolo, L. Muccioli, C. Zannoni, D. La Mendola, G. Maccarrone, G. Pappalardo, E. Rizzarelli.
J. Chem. Phys. B, 112, 5182-5188 (2008)
- 12) How the binding and degrading capabilities of insulin degrading enzyme are affected by ubiquitin
 G. Grasso, E. Rizzarelli, G. Spoto
Biochim. Biophys. Acta (BBA), 1784, 1122-1126 (2008)

Collaborazioni internazionali in atto

- _ Department of Inorganic and Analytical Chemistry, University of Debrecen, Hungary (Prof. I. Sovago).
- _ Harvard Medical School, Laboratory of Oxidative Stress, USA (Prof. A.I. Bush).

UNITA' DI RICERCA INBB
Roma

Responsabile Scientifico

Giuseppe Rotilio

Linea di Ricerca

Biomolecole

titolo

Biomolecole dello stress ossidativo

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Rotilio Giuseppe	PO	rotilio@uniroma2.it
Ciriolo Maria Rosa	PO	ciriolo@bio.uniroma2.it
Battistoni Andrea	PA	andrea.battistoni@uniroma2.it
Rossi Luisa	PA	luisa.rossi@uniroma2.it

Non Aderenti INBB

Mazzetti Anna Paola	RU	anna.paola.mazzetti@uniroma2.it
Pacello Francesca	BC	francesca.pacello@uniroma2.it
D'Orazio Melania	BC	dorazio@uniroma2.it
Filomeni Giuseppe	RU	filomeni@bio.uniroma2.it
Aquilano Katia	BC	Aquilano@uniroma2.it
Ammendola Serena	BC	ammendola@uniroma2.it
Arciello Mario	DR	arciello@uniroma2.it
Capo Concetta	PT	capo@uniroma2.it

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Biologia, Università di Roma Tor Vergata

Indirizzo Via della Ricerca Scientifica 00133 Roma

Telefono 06 72594373

Fax 0672594311

E-mail rotilio@uniroma2.it

Sezione INBB di appartenenza

Roma

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Numerosi processi cellulari ed eventi patologici sono modulati da processi redox. Il nostro gruppo ha come obiettivo quello di indagare i meccanismi molecolari redox-dipendenti associati a specifiche patologie neurodegenerative, alla carcinogenesi e nei processi di virulenza batterica

Risultati ottenuti

L'UR ha svolto studi sui meccanismi implicati nella neurodegenerazione in patologie quali la sclerosi laterale amiotrofica (SLA) ed il morbo di Alzheimer (AD). Per quanto riguarda l'implicazione dell'alterazione dell'omeostasi del rame nella patogenesi dell'AD, abbiamo dimostrato che, nei liquidi cerebrospinali (CSF) solo una frazione del rame totale presente si trova associata alla ceruploplasmica (Cp), a differenza di quanto si verifica nel siero. Inoltre, il CSF dei pazienti affetti da AD è caratterizzato dalla presenza di apo-Cp e dalla diminuzione dell'attività enzimatica della proteina. Questi risultati confermano che nel sistema nervoso centrale nell'AD si verifica un'alterazione dei meccanismi che governano l'omeostasi del rame. Abbiamo anche dimostrato che i fibroblasti di pazienti AD presentano un incremento intracellulare del livello del rame, di marcatori della perossidazione dei lipidi e quindi dello stress ossidativo. Inoltre, i fibroblasti AD si sono rivelati più sensibili allo stress ossidativo indotto dal trattamento con H₂O₂, e che il polifenolo curcumina, è in grado di proteggere i fibroblasti AD dallo stress ossidativo. Questa capacità della curcumina potrebbe essere dovuta alla sua proprietà di complessare il metallo in eccesso.

L'UR ha anche approfondito il ruolo dell'enzima Cu,Zn superossido dismutasi nei processi infettivi ed intrapreso uno studio sulla rilevanza dello zinco nell'interazione ospite-patogeno. Abbiamo dimostrato che la presenza di diverse Cu,ZnSOD nel periplasma batterico può essere spiegata sulla base di differenze nella regolazione dei diversi geni e da ben distinte proprietà funzionali e strutturali delle diverse proteine. Abbiamo inoltre dimostrato che l'inattivazione del trasportatore di zinco ad alta affinità ZnuABC causa una drammatica riduzione della virulenza di *Salmonella enterica* nel topo, dovuta alla scarsa disponibilità di tale metallo in forma accessibile ai batteri all'interno dell'ospite. Inoltre, abbiamo osservato che l'infezione con ceppi privi di tale trasportatore, induce una forte e duratura immunità nei

confronti di ceppi virulenti, suggerendone l'utilizzo come efficaci vaccini anti-*Salmonella*. Il ruolo di questo enzima è stato anche studiato dal punto di vista del mantenimento dell'integrità mitocondriale. Abbiamo dimostrato una stretta correlazione tra il contenuto della Cu,Zn superossido dismutasi e il grado di ossidazione delle proteine mitocondriali in cellule di neuroblastoma umano, dando un razionale alla necessità dell'alta concentrazione della proteina a fronte di basse concentrazioni di substrato. Abbiamo anche studiate la relazione tra la Cu,Zn superossido dismutasi e l'ossido nitrico sintasi neuronale, mettendo in evidenza una relazione a livello di trascrizione.

L'UR si è anche interessata al chiarimento del ruolo dello stato redox intracellulare nella modulazione di diversi processi cellulari tra cui la morte cellulare programmata. Abbiamo studiato diversi modelli cellulari di induzione all'apoptosi in istotipi tumorali di diversa origine caratterizzando i fattori redox-sensibili responsabili dei processi di segnalazione. Abbiamo inoltre studiato i meccanismi che conferiscono resistenza allo stress ossidativo, e che sono alla base della inefficacia di terapie anticancro a base redox. Abbiamo quindi sintetizzato molecole in grado di superare tale resistenza andando ad agire direttamente a livello dei mitocondri.

Pubblicazioni più significative nel periodo 2006-2008

1. Ammendola S, Pasquali P, Pistoia C, Petrucci, P., Petrarca, P., Rotilio, G., and Battistoni, A. The high affinity Zn²⁺ uptake system ZnuABC is required for bacterial zinc homeostasis in intracellular environments and contributes to virulence of *Salmonella enterica*. *Infect. Immun.* (2007) 75, 5867-5876
2. Ammendola, S., Pasquali, P., Pacello, F., Rotilio, G., Castor, M., Libby, SJ, Figueroa-Bossi, N., Bossi, L., Fang F.C., and Battistoni, A. Regulatory and Structural Differences in the Cu,Zn-Superoxide Dismutases of *Salmonella enterica* and their Significance for Virulence. *J. Biol Chem* (2008) 283, 13688-13699.
3. Aquilano, K., Baldeli, S., Rotilio, G. and Ciriolo, M.R. Role of nitric oxide synthases in Parkinson's disease: a review on the antioxidant and anti-inflammatory activity of polyphenols. *Neurochem. Res.* 16 April (2008).
4. Aquilano, K., Vigilanza, P., Rotilio, G. and Ciriolo, M.R. Mitochondrial damage due to SOD1 deficiency in SH-SY5Y neuroblastoma cells: a rationale for the redundancy of SOD1. *FASEB J.* 20, 1683-1685 (2006).
5. Capo C.R., Arciello M., Calabrese L., Squitti R., Rossini P. M., Rossi L. (2008) Features of ceruloplasmin in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. *BioMetals*, 367-372.
6. Filomeni, G. and Ciriolo, M.R. Redox control of apoptosis: An Update. *Antiox.Redox Signal* 8, 2187-2192 (2006).
7. Filomeni, G., Cerchiaro, G., Da Costa Ferreira, A.M., De Martino, A., Pedersen, J.Z., Rotilio, G. and Ciriolo, M.R. Proapoptotic activity of novel isatin-Schiff base copper(II) complexes depends on oxidative stress induction and organelle-selective damage. *J.Biol.Chem.* 282, 12010-12021 (2007).
8. Paksi, Z., Jancsó, A., Pacello, F., Nagy, N, Battistoni, A., and Gajda T. Copper and zinc binding properties of the N-terminal histidine-rich sequence of *Haemophilus ducreyi* Cu,Zn superoxide dismutase. *J.Inorg.Biochem.* (2008) May 6. [Epub ahead of print]
9. Rossi L., Squitti R., Calabrese L., Rotilio G., Rossini P. M. (2007) Alteration of peripheral markers of copper homeostasis in Alzheimer's disease patients: implications in aetiology and therapy. *J. Nutr. Health Aging*, 11, 408-417.
10. Squitti R., Barbatì G., Rossi L., Ventriglia M., Dal Forno G., Cesaretti S., Moffa F. Caridi I., Cassetta E., Pasqualetti P., Calabrese L., Lupoi D. Rossini P.M. (2006) Excess of non-ceruloplasmin serum copper in AD correlates with MMSE, CSF β -amyloid and h-tau. *Neurology*, 67, 76-82, 2006.
11. Vos, M., Battistoni, A., Lechauve, C., Kiger, L., Marden, M.; Desbois, A., Pilet, E.; de Rosny, E., Liebl, U. Ultrafast heme-residue bond formation in six-coordinate heme proteins: implications for functional ligand exchange. *Biochemistry.* (2008) 47, 5718-5723.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

I nostri principali obiettivi sono: a) contribuire a delineare i meccanismi attraverso i quali processi redox causati da alterazioni dell'omeostasi del rame promuovono la neurodegenerazione, sia in modelli cellulari e animali di sclerosi laterale amiotrofica che in modelli di patologie neurodegenerative; b) Analizzare il ruolo dello stress ossidativo nei processi di trasduzione del segnale; c) approfondire il ruolo della competizione per i metalli di transizione nell'interazione ospite-patogeno e valutare nuove strategie antimicrobiche capaci di interferire con l'omeostasi dei metalli nei batteri patogeni.

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Spettrometro NMR Bruker Avance 700 MHz

Spettrometro per assorbimento atomico Perkin Elmer

Strumentazione completa per studi di biochimica, di biologia molecolare e cellulare

Parole Chiave

Superossido dismutasi, stress ossidativo, rame, neurodegenerazione, tumori, ossido nitrico sintasi, infezioni batteriche

UNITA' DI RICERCA INBB
Bologna

Responsabile Scientifico

Mariastella Scandola

Linee di Ricerca

Le seguenti linee di ricerca sono al momento attive:

- 1) Produzione di matrici polimeriche porose (scaffolds) biodegradabili e biocompatibili che possano supportare la crescita di cellule secondo tempi variabili di degradazione in vitro e in vivo. Studio dell'influenza della struttura tridimensionale di scaffold nano-fibrosi (dimensione e orientazione delle fibre, porosità, ecc.) sulla crescita cellulare. Studi di funzionalizzazione degli scaffolds con molecole bioattive in grado favorire i processi di adesione, proliferazione e differenziamento di cellule staminali
- 2) Sintesi e caratterizzazione di ibridi organici-inorganici nanostrutturati con proprietà di radiopacità. I materiali sviluppati possono essere impiegati come 'coating' su dispositivi medico-chirurgici dei quali si voglia migliorare la tracciabilità.
- 3) Materiali polimerici 'environmentally friendly': biopolimeri e monomeri da fonti rinnovabili, interazioni tra materiale polimerico e ambiente biologico, meccanismi di biodegradazione.

Titolo

- 1) Scaffold polimerici porosi per l'ingegneria dei tessuti
- 2) Ibridi organici-inorganici nanostrutturati radiopachi
- 3) Materiali polimerici 'environmentally friendly'

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Scandola Mariastella	PO	mariastella.scandola@unibo.it
Focarete Maria Letizia	RU	marialetizia.focarete@unibo.it

Non Aderenti INBB

Gualandi Chiara	DR	c.gualandi@unibo.it
Cortecchia Elisa	DR	elisa.cortecchia2@unibo.it
Gabbani Christian	BC	biogeo@tiscali.it
Mazzocchetti Laura	A (assegnista di ricerca)	laura.mazzocchetti@unibo.it

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Chimica "G.Ciamician" Università di Bologna

Indirizzo via Selmi 2

Telefono: 051-2099577

Fax: 051-2099456

E-mail: mariastella.scandola@unibo.it

Sezione INBB di appartenenza

Bologna

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

- 1) Messa a punto di scaffold polimerici porosi bio-riassorbibili per l'ingegneria dei tessuti. La ricerca si incentra sia sulla produzione di scaffold in forma di tessuto-non-tessuto (mat) di fibre nanometriche, bio-mimetici della matrice extracellulare, che sulla fabbricazione di scaffold microporosi ottenuti mediante la tecnica della CO₂ supercritica.
- 2) Sviluppo di 'coating' radiopachi di facile deposizione su dispositivi biomedicali.
- 3) Sviluppo di polimeri e compositi polimerici a tempo di vita modulabile per applicazioni nell'ambito delle biotecnologie ambientali. Studio di nuovi polimeri sintetizzati mediante catalisi enzimatica.

Risultati ottenuti

- 1) E' stata progettata e costruita una apparecchiatura per l'elettrofilatura di soluzioni polimeriche in condizioni controllate (umidità e temperatura). Sono state ottimizzate le condizioni di elettrofilatura di varie categorie di polimeri, ottenendo fibre di dimensione mirata (micro-nanometrica), con morfologia modulabile. Nella produzione di 'scaffold' per la crescita cellulare sono stati fino ad ora utilizzati polimeri bio-riassorbibili, sia commerciali che sintetizzati 'ad hoc'. La biocompatibilità dello scaffold, la vitalità e la proliferazione di cellule staminali mesenchimali e di cellule di linea è stata valutata, ottenendo risultati positivi ed evidenza di adesione cellulare allo scaffold e di proliferazione anche al suo interno.

- 2) Si sono sintetizzati in modo semplice e riproducibile ibridi organico inorganici (oggetto di un Brevetto) con ottime proprietà di schermo alla radiazione UV, trasparenza alla radiazione visibile e opacità ai Raggi-X, oltre ad una buona adesione su substrati di varia natura (vetro, metalli, plastica, ecc.)
- 3) Si sono caratterizzate varie serie di nuovi copolimeri derivanti da sintesi enzimatica con interessanti proprietà fisico-meccaniche. Sono inoltre stati messi a punto bio-compositi, materiali di nuova generazione costituiti da matrice polimerica biodegradabile e rinforzo in fibre naturali.

Publicazioni più significative nel periodo 2006-2008

- 1) E. Zini, M. Scandola, Z. Jiang, C. Liu, R.A. Gross, "Aliphatic Polyester Carbonate Copolymers: Enzymatic Synthesis and Solid-State Characterization", *Macromolecules*, 2008, 41, 4681-4687
- 2) E. Zini, M. Scandola, P. Dobrzynski, J. Kasperczyk, M. Bero "Shape Memory Behavior of Novel (L-Lactide-Glycolide-Trimethylene Carbonate) Terpolymers", *Biomacromolecules*, 2007, 8, 3661-3667
- 3) B. Sharma, A. Azim, H. Azim, R.A. Gross, E. Zini, M.L. Focarete, M. Scandola "Enzymatic synthesis and solid-state properties of aliphatic polyesteramides with polydimethylsiloxane blocks", *Macromolecules*, 2007, 40, 7919-7927
- 4) Z. Jiang, H. Azim, R.A. Gross, M.L. Focarete, M. Scandola "Lipase-Catalyzed Copolymerization of ω -Pentadecalactone with p-Dioxanone and Characterization of Copolymer Thermal and Crystalline Properties", *Biomacromolecules*, 2007, 8, 2262-2269
- 5) E. Zini, M.L. Focarete, I. Noda, M. Scandola "Bio-Composite of Bacterial poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) reinforced with vegetable fibers", *Comp. Sci. Tech.*, 2007, 67, 2085-2094
- 6) M. Kawalec, G. Adamus, P. Kurcok, M. Kowalczyk, I. Foltran, M.L. Focarete, M. Scandola "Carboxylate-Induced Degradation of Poly(3-hydroxybutyrate)s", *Biomacromolecules*, 2007, 8, 1053-1058
- 7) L. Mazzocchetti, S. Sandri, M. Scandola, A. Bergia, G. Zuccheri "Radiopaque Organic-Inorganic Hybrids Based on Poly(D,L-lactide)", *Biomacromolecules*, 2007, 8, 672-678
- 8) L. Mazzocchetti, M. Scandola, E. Amerio, G. Malucelli, C. Marano "Preparation and Characterization of Hybrid Nanocomposites Coated on LDPE", *Macromol. Chem. Phys.*, 2006, 207, 2103-2111
- 9) G. Ceccorulli, E. Zini, M. Scandola "Study of Organic Phase Mobility in Nanocomposite Organic-Inorganic Coatings", *Macromol. Chem. Phys.*, 2006, 207, 864-869

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Nell'ambito dei materiali porosi per l'ingegneria dei tessuti si intende implementare la funzionalità degli 'scaffold' polimerici sia tramite l'introduzione di molecole bio-attive all'interno dello scaffold per un loro successivo rilascio, che mediante funzionalizzazione superficiale con bio-molecole specifiche. Tali scaffold saranno utilizzati nello studio del differenziamento di cellule staminali. Nel campo dei materiali radiopachi ibridi si studierà l'effetto di diversi componenti inorganici sulle proprietà di 'coatings' finalizzati ad applicazioni in campo endoprotesico. L'attività in ambito biotecnologico si incentrerà sulla razionalizzazione delle correlazioni tra struttura e proprietà in polimeri sia da fonti rinnovabili che da sintesi biocatalizzata.

Collaborazioni internazionali in atto

- Prof. Richard A. Gross, Center for Biocatalysis and Bioprocessing of Macromolecules della National Science Foundation, Polytechnic University, Brooklyn-Long Island, New York (USA)
- Prof. Kevin M. Shakesheff, The Centre for Biomolecular Sciences, School of Pharmacy, University of Nottingham (UK)
- Prof. Nicola Tirelli, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences University of Manchester (UK)

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

- 1) apparecchiatura per elettrofilatura con raccolta fibre in condizioni statiche e dinamiche, con controllo di temperatura e umidità
- 2) attrezzature per analisi termica (calorimetria, analisi termogravimetrica accoppiata a spettrometria di massa, spettroscopia dinamico meccanica e dielettrica)
- 3) attrezzature per diffrazione di raggi-X ad alto e basso angolo e per spettrometria NMR, IR e UV
- 4) attrezzature per microscopia ottica in luce polarizzata con tavolino riscaldante, microscopia elettronica a scansione e microscopia a forza atomica
- 5) Strumentazione per misure di angolo di contatto
- 6) Dinamometro per prove meccaniche in trazione-compressione

Parole Chiave

Ingegneria dei tessuti, scaffold polimerici, coating radiopachi, polimeri biodegradabili, biopolimeri

UNITA' DI RICERCA INBB
Messina

Responsabile Scientifico

Paolo Canciglia

Linea di Ricerca

Titolo processi di membrane artificiali e biologiche

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Canciglia Paolo PA cancigli@unime.it; pcanciglia@pharma.unime.it

Non Aderenti INBB

Romano Leonardo PA lromano@unime.it

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento Farmaco-Biologico - Facoltà di Farmacia - Università di Messina -

Indirizzo Vill. SS. Annunziata - 98168 Messina

Telefono 090/6766416

Fax 090/6766504

E-mail cancigli@unime.it

Sezione INBB di appartenenza

Catania

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

L'attività di ricerca svolta negli ultimi tre anni ha riguardato prevalentemente:

- 1) la costruzione di membrane catalitiche mediante la tecnica del grafting;
- 2) l'impiego di membrane catalitiche per uso analitico;
- 3) la progettazione e costruzione di nuovi tipi di bioreattori non isoterme;
- 4) effetti ossidativi sulla funzionalità della proteina della banda3.

Risultati ottenuti

1) *Costruzione di membrane catalitiche mediante la tecnica del grafting.*

Membrane planari di Nylon e Teflon vengono trattate chimicamente o mediante radiazioni gamma allo scopo di copolimerizzarle con opportuni monomeri acrilici e/o vinilici. Su questi supporti vengono successivamente immobilizzati gli enzimi di interesse, in presenza o in assenza di opportuni spaziatori. Una volta immobilizzati gli enzimi, le membrane vengono caratterizzate dal punto di vista biochimico (dipendenza dal pH, dalla temperatura e dalla concentrazione del substrato), dal punto di vista biofisico (permeabilità idraulica e termoosmotica), e dal punto di vista dell'aumento dell'efficienza catalitica in presenza di gradienti di temperatura.

2) *Impiego di membrane catalitiche per uso analitico.*

E' stato costruito un biosensore per la determinazione del glucosio in differenti range di concentrazione. I differenti range lineari sono stati ottenuti usando membrane di Nylon con pori di tre differenti diametri e sulle quali erano stati copolimerizzati due differenti monomeri, glicidil metacrilato e butil metacrilato.

3) *Progettazione e costruzione di nuovi tipi di bioreattori non isoterme.*

3.a) Bioreattore a fibre cave.

E' stato costruito un bioreattore a fibre cave, idrofobiche e catalitiche. Anche questo bioreattore, sperimentato con beta-galattosidasi immobilizzata, ha esibito aumenti di attività catalitica quando operante in condizioni non-isoterme. Sono state elaborate equazioni di bilancio di energia che hanno permesso di ottenere, mediante analisi computazionale, i profili di temperatura radiali ed assiali nel volume del bioreattore ed attraverso la parete della fibra cava.

3.b) Bioreattore a letto impaccato.

E' stato costruito un ulteriore bioreattore nel quale, al posto della membrana catalitica, è stato inserito un modulo discoidale riempito con pellets nei quali è legato l'enzima β -galattosidasi. Il modulo, comunque, è confinato lateralmente tra due membrane idrofobiche. Tale configurazione, pur mantenendo tutti i vantaggi della geometria planare, consente di superare la limitazione di una ridotta superficie catalitica, in quanto l'enzima viene immobilizzato su pellets che offrono una superficie di immobilizzazione assai più ampia di quella offerta da una membrana catalitica.

Tale bioreattore, presentando una buona attività specifica per unità di superficie, consente di trattare volumi elevati al fine di un'applicazione industriale ed inoltre, essendo in grado di operare in condizioni non isoterme, presenta aumenti di attività catalitica con conseguente riduzione dei tempi di produzione.

4) *Effetti ossidativi sulla funzionalità della proteina della banda3.*

Gli eritrociti costituiscono un piccolo mondo nel quale la struttura della membrana, con particolare riferimento alle sue proteine intrinseche, con il contenuto intracellulare danno luogo ad un mosaico di funzioni biologiche. Per molti anni le

ricerche condotte sui globuli rossi si sono essenzialmente concentrate sullo studio del rapido scambio $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ che svolge un ruolo centrale nei riguardi del trasporto di CO_2 nel sangue e che ha alla base un controtrasporto anionico attraverso la membrana, mediato da una proteina intrinseca nota come banda3. Sebbene in tale meccanismo di trasporto il substrato fisiologico sia rappresentato dal Cl^- e dal HCO_3^- , è stato successivamente evidenziato che la banda3 è rappresentabile anche dallo scambio dell'anione bivalente SO_4^{2-} col Cl^- e che ha quindi una funzione rilevante nel trasporto ionico.

Inoltre, considerato che le porzioni -C ed -N terminali della proteina della banda3 sporgono entrambi dal lato citoplasmatico della membrana, è stato possibile evidenziare che sulla porzione N terminale siano presenti siti di legame per diversi enzimi glicolitici (come la gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi, l'aldolasi e la fosfofruttochinasi) e per l'emoglobina, ciò ha come conseguenza che tutte o alcune vitali interazioni con la porzione CDB3 della proteina possano consentire una fine regolazione del flusso anionico.

Una ulteriore considerazione riguarda il fatto che essendo gli eritrociti cellule esposte ad un livello alto di pressione di ossigeno e ad agenti chimici ossidativi, la via metabolica dei pentosofosfati rappresenta la principale linea di difesa dei globuli rossi contro gli stress ossidativi, e la glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PDH) è l'enzima chiave nel catalizzare la prima tappa di tale via metabolica.

Gli stress ossidativi, a loro volta, possono causare un danno cellulare probabilmente dovuto ad un aumentato livello citosolico dei cationi e/o alle alterazioni dei vari meccanismi che normalmente mantengono l'omeostasi anioni/cationi che si verificano durante lo stress ossidativo.

Pubblicazioni più significative nel periodo 2004-2007

1) De Maio, M.M. El-Masry, Di Martino, S. Rossi, U. Bencivenga, V. Grano, N. Diano, P. Canciglia, D.G. Mita.

A novel packed bioreactor operating under isothermal and non-isothermal conditions

Biotechnology and Bioengineering, 2004, 86, 308-316

2) G. De Luca, T. Gugliotta, A. Scuteri, P. Romano, C. Rinaldi, A. Sidoti, A. Amato.

The interaction of haemoglobin, magnesium, organic phosphates and band3 protein in nucleated and anucleated erythrocytes. Cell Biochem. Funct., 2004, 22: 179-186.

3) Attanasio A., Diano N., Grano V., Sicuranza S., Rossi S., Bencivenga U., Fraconte L., Di Martino S., Canciglia P., Mita D.G. "Nonisothermal bioreactors in the treatments of vegetation waters from olive oil: Laccase versus syringic acid as bioremediation model". Biotechnology Progress. 2005, 21, 806-815.

4) N. Diano, G. Ettari, V. Grano, F.S. Gaeta, S. Rossi, U. Bencivenga, C. D'Alterio, G. Rocco, L. Mita, N.G. De Santo, P. Canciglia, D.G. Mita

Nonisothermal reactors for the production of pure water from peritoneal dialysis waste

Waters The International Journal of Artificial / vol. 30/ no 1.2007 pp 53-63

5) M. Portaccio, D. Durante, A. Viaggiano, S. Di Martino, P. Maturi, P. De Luca, D. Di Tuoro, U. Bencivenga, S. Rossi, P. Canciglia, B. De Luca, D. G. Mita.

Amperometric glucose determination by means of glucose oxidase immobilized on cellulose acetate film: dependence on the immobilization procedures

Electroanalysis vol. 17, pp. 1787-1793 (2007)

6) Mita D.G., Attanasio A., Diano N., Grano V., Bencivenga U., Rossi S., Canciglia P., Mita L., Portaccio M., Arduini F., Amine A., Moscone D. "Bioremediation and biodetermination of bisphenol a (BPA) in aqueous solution" In: The Endocrine Disruptors (pp. 159-179). 2007

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Le prospettive, ed i conseguenti obiettivi, per i prossimi anni, riguardano: 1) lo scale-up dei bioreattori attualmente in uso, bioreattori di dimensioni da laboratorio, a prototipi di tipo industriale; 2) la preparazione di membrane catalitiche sempre più efficienti e realizzate mediante la tecnica del grafting con plasma; 3) la costruzione di supporti biocompatibili, caricati con inibitori di proteasi, da utilizzare durante la circolazione extracorporea per ridurre i danni da proteolisi indotti dalle proteasi in circolo; 4) la progettazione e costruzione di biosensori da utilizzare nella diagnostica clinica e/o on line in impianti di tipo industriale.

Collaborazioni internazionali in atto

Department of Polymers and Pigments - National Research Council - Dokki - Cairo - Egitto

Food and Bioprocess Engineering Group - Agricultural University - Wageningen - The Netherlands

Department of Pure and Applied Biochemistry - Chemical Center- Lund University - Sweden

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Gamma-cell; Spettrofotometri; Assorbimento atomico; Gascromatografo

Parole Chiave Enzimi immobilizzati; Biotecnologie; Bioreattori; Biosensori; Laccasi; Glucosio Ossidasi; Trappole per proteasi; Campi elettromagnetici; Globuli rossi; Proteine della banda3.

UNITA' DI RICERCA INBB
Ferrara

Responsabile Scientifico

Maria Capovilla

Linea di Ricerca

Lo sviluppo del cuore della *Drosophila* come modello di studio delle proprietà molecolari di fattori di trascrizione implicati nelle malattie cardiache congenite.

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Maria Capovilla

cpvmra@unife.it

Non Aderenti INBB

Tevy Maria Florencia

BC

flortevy@yahoo.com.ar

Buontempo Francesca

BC

bntfnc@unife.it

Tosi Elisabetta

BC

etosi@dti.telethon.it

Traina Concetta

BC part-time

concettatraina@yahoo.it

Sede Unità di Ricerca

Dip. di Biologia ed Evoluzione, Università di Ferrara

Indirizzo via Borsari 46

Telefono 0532/455700/455719.

Fax 0532/455715.

E-mail cpvmra@unife.it

Sezione INBB di appartenenza

Bologna

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

La cardiogenesi di *Drosophila* è un modello per comprendere le funzioni molecolari di fattori di trascrizione coinvolti nelle malattie cardiache congenite umane (CHDs), poiché la morfogenesi cardiaca è un processo complesso regolato da fattori di trascrizione e da molecole segnale conservati nell'evoluzione. *Drosophila* possiede un tubo cardiaco suddiviso in una porzione anteriore chiamata "aorta" ed una posteriore chiamata "cuore", in grado di pulsare autonomamente. Esperimenti di attivazione ed inattivazione del gene Hox *abdominal-A* (*abd-A*), espresso solo nel cuore, hanno mostrato che *abd-A* controlla l'identità del cuore. Per comprendere i meccanismi attraverso i quali i geni Hox esercitano la loro funzione, abbiamo l'obiettivo di identificare le sequenze *cis*-regolatorie (*enhancers*) cuore-specifiche dei geni bersaglio di *abd-A*. E' altamente probabile che tali geni siano bersaglio anche dei fattori di trascrizione richiesti per lo sviluppo del cuore i cui omologhi umani sono responsabili dei CHDs (NKX2-5, TBX5, GATA4 e TBX20), di cui potremo studiarne la funzione.

Risultati ottenuti

Nella nostra ricerca di geni bersaglio regolati da *abd-A* nel cuore, abbiamo dapprima identificato tramite ibridazione *in situ* sette geni espressi specificatamente nei cardiomiociti contrattili del cuore. Inoltre, tramite *microarrays*, abbiamo identificato 221 geni che sono espressi in queste stesse cellule almeno 1,5 volte più che nell'aorta. Otto di questi geni sono stati saggiati per ibridazione *in situ* e sono risultati essere espressi specificatamente nel cuore. Questo indica che l'approccio con i *microarrays* è risultato molto preciso. Successivamente, abbiamo sviluppato un programma informatico che ha consentito l'analisi di 15 di questi geni bersaglio di *abd-A*, per identificarne gli *enhancers* cuore-specifici. 18 sequenze evolutivamente conservate e contenenti gruppi di siti di legame per Abd-A e per gli altri fattori di trascrizione richiesti per lo sviluppo del cuore sono state clonate a monte di un promotore minimo dirigente l'espressione del reporter nGFP e i costrutti sono stati inseriti nel genoma di *Drosophila* tramite transgenesi. Tre delle diciotto sequenze testate sono in grado di dirigere l'espressione del gene reporter nGFP specificatamente nei cardiomiociti contrattili del cuore, in un pattern corrispondente a quello del relativo gene endogeno.

Pubblicazioni più significative nel periodo 2006-2008

- Monier, B., Tevy, M.F., Perrin, L., Capovilla, M., and Sémériva, M. (2007) Downstream of Homeotic genes: in the heart of *Hox* function. *Fly* 1, 59-67.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Per determinare se gli *enhancers* cuore-specifici identificati sono regolati dal gene Hox *abd-A*, ne indagheremo l'attività in mutanti nulli per *abd-A* e in embrioni esperimenti *abd-A* ectopicamente. Inoltre, determineremo *in vitro* i siti di legame di Abd-A su queste sequenze, tramite esperimenti di *footprinting* e li muteremo tramite mutagenesi sito-mediata. L'effetto di tali mutazioni sarà studiato in moscerini transgenici e confrontato con l'effetto delle mutazioni nei siti per Abd-A predetti tramite bioinformatica per determinare se l'approccio bioinformatico è stato in grado di identificare i siti di legame funzionalmente più importanti.

Infine, determineremo l'attività degli *enhancers* in embrioni mutanti per altri fattori di trascrizione i cui omologhi umani sono implicati nei CHDs (*midline* e *H15* - omologhi a TBX20, *Doc1-3* - omologhi a TBX5/TBX6 e *pnr* - omologo a GATA4).

Collaborazioni internazionali in atto

- 1) Michel Sémériva, UPR6216 du CNRS, Marseille (Francia)
- 2) Stein Aerts, Laboratory of Neurogenetics, Dept. of Molecular and Developmental Genetics, University of Leuven (Belgium)
- 3) David Brook, School of Biology □ Institute of Genetics □ Queen's Medical Centre □ Nottingham (UK)

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

1 termociclatore, 1 spettrofotometro, 3 alimentatori, 2 stereomicroscopi, 1 microscopio con ottica Hoffmann.

Parole Chiave (max 5)

Drosophila, cuore, trascrizione, malattie cardiache congenite

UNITA' DI RICERCA INBB
Napoli

Responsabile Scientifico

Maria Carteni

Linee di Ricerca:

Titoli

1. Valutazione della permeabilità intestinale in condizioni normali e patologiche
2. Studi struttura-funzione di nuovi peptidi bioattivi derivati di VIP, bombesina e GRP
3. Ricerca di marker evolutivi dalle displasie al cancro in situ
4. Studio delle proprietà biologiche della proteina SVIV

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Maria Carteni	PO	maria.carteni@unina2.it
---------------	----	-------------------------

Non Aderenti INBB

Salvatore De Maria	BC	salvatore.demaria@unina2.it
Alessandra Braca	DR	alessandra.braca@unina2.it
.Paolo Rega	A	kratos79@libero.it
Patrich Robberecht	PO	probe@ulb.ac.be
Paola Stiuso	RU	paola.stiuso@unina2.it
Laura De Magistris	PA	laura.demagistris@unina2.it
Anna Sapone	BC	anna.sapone@unina2.it
Ernesto Farina	BC	ernesto.farina@unina2.it
Angelo Facchiano	A	angelo.facchiano@isa.cnr.it
Gabriele Pontoni	RU	gabriele.pontoni@unina2.it

Sede Unità di Ricerca

Indirizzo Via De Crecchio 7, 80139 Napoli

Telefono 081-5665867

Fax 081-5667658

E-mail: maria.carteni@unina2.it

Sezione INBB di appartenenza

Napoli

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Linea di Ricerca 1

E' in corso da vari anni in collaborazione con i colleghi gastroenterologi della Seconda Università di Napoli e dell'Università Federico II di Napoli per lo studio della permeabilità intestinale (PI), che utilizza il test di PI, messo a punto nel nostro laboratorio che si avvale della tecnica analitica HPAEC-PAD (cromatografia ad alta pressione combinata con rivelazione ad amperometria pulsata). Viene analizzata la PI in soggetti normali in varie situazioni fisiologiche e in pazienti affetti da diabete mellito, in celiaci, in pazienti con disturbi del comportamento alimentare, in epatopatici e recentemente in autistici. In collaborazione col Prof. Alessio Fasano dell'Università del Maryland, Baltimora, USA viene effettuato anche il dosaggio della zonulina sierica.. E' in programma per il 2008 la messa a punto del dosaggio dei peptidi urinari in un modello animale di danno epatico tramite HPLC Dionex

Linea di Ricerca 2

I peptidi bioattivi costituiscono un'importante area di ricerca in campo biomedico. Il programma di ricerca si avvale della collaborazione del gruppo di ricerca del Prof. Patrich Robberecht dell'Université Libre de Bruxelles. L'interesse per questa classe di composti è dovuto al ruolo che essi svolgono nella comunicazione tra cellule in veste di ormoni, neurotrasmettitori o immunomodulatori. In particolare, il nostro interesse è focalizzato su neuropeptidi come il VIP (vasoactive intestinal peptide), il GRP e la bombesina. E' stato ipotizzato che il VIP, oltre alle altre già note funzioni, svolge anche un'azione modulante sulla risposta cellulosa mediata anti-tumorale. La bombesina, sembra dotata di attività stimolante dose-dipendente sulle cellule NK. E' stato suggerito l'uso topico di GRP per la cicatrizzazione di ferite da bruciate, lesioni traumatiche, ulcere croniche, e nei trapianti di pelle sulla base dello stimolo esercitato da questo peptide sulla crescita dei cheratinociti.

La ricerca prevede: 1) la sintesi di nuovi peptidi bioattivi tramite modifica enzimatica di quelli naturali, in particolare VIP, bombesina, e GRP, 2) lo studio dei loro effetti biologici su modelli in vitro, 3) l'analisi della loro stabilità mediante l'uso di enzimi proteolitici, 4) l'effetto su cellule staminali mesenchimali di ratto e umane

Linea di Ricerca 3

E' in corso un ampio progetto in collaborazione con il Prof. Lorenzo Lo Muzio, Direttore della Società Italiana di Patologia e Medicina Orale, la Prof. Ada Marigliò, dell'Università Politecnica delle Marche. La ricerca è rivolta all'individuazione precoce dell'espressione di proteine che si esprimono nel momento di trasformazione da mucosa normale a displasia a cancro, in modo da proporli come marker per diagnosi precoce. Lo studio prevede l'analisi di biopsie di lesioni displastiche e cancerose del cavo orale, con i rispettivi controlli di mucosa normale. Sull'RNA estratto dalle biopsie viene eseguito:

1. Screening qualitativo della presenza di mRNA specifico di proteine di interesse (survivin, acquaporine, telomerasi, COX);
2. Real Time-PCR per la valutazione quantitativa;
3. Correlazione dei risultati con il quadro clinico dei pazienti ed individuazione di potenziali marcatori precoci per la diagnosi di peculiari patologie.

Linea di Ricerca 4

E' in corso una collaborazione con il gruppo del Prof. Metafora del CNR di Napoli e con l'Istituto di Neurobiologia e Medicina Molecolare (INMM) CNR di Tor Vergata (Roma) sulle proprietà regolatrici della proteina sv-iv, purificata dalle vescichette seminali di ratto, sulle reazioni immunitarie, infiammatorie, emostatiche e apoptotiche dell'organismo dei mammiferi.

Pubblicazioni più significative nel periodo 2006-2008

Linea di Ricerca 1

- Diabetes. 2006 (5):1443-9 Zonulin upregulation is associated with increased gut permeability in subjects with type 1 diabetes and their relatives. Sapone A, de Magistris L, Pietzak M, Clemente MG, Tripathi A, Cucca F, Lampis R, Kryszak D, Carteni M, Generoso M, Iafusco D, Prisco F, Laghi F, Riegler G, Carratu R, Counts D, Fasano A.
- Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 2006 (5):384-90, Exopolysaccharides production in Lactobacillus bulgaricus and Lactobacillus casei exploiting microfiltration. Carteni Maria, Schiraldi C, Valli V, Molinaro A, De Rosa M.

Linea di Ricerca 2

- Journal of Peptide Science 2008 1075-2617 Effect of positive charge in VIP (16)gamma-glutamyl diamino derivatives on hvpa1 and hvpa2 receptor function. Carteni Maria, De Maria S, Metafora V, Metafora S, Ravagnan G, Carteni M., Pontoni G, Facchiano A, Lepretti M, Severino B, Caliendo G, Santagada V, Langer I, Robberecht P.
- Amino Acids. 2008 0939-4451 Experimental study on vasoactive intestinal peptide (VIP) and its diaminopropane bound (VIP-DAP) analog in solution. Carteni Maria, M Caraglia, A Dicitore, D Cassese, S De Maria, P Ferranti, G Giuberti, A Abbruzzese, P Stiuso.
- Peptides 2008 Jul;29(7):1157-66. Bombesin: a possible role in wound repair. Baroni A, Perfetto B, Canozo N, Braca A, Farina E, Melito A, De Maria S, Carteni M.
- Annales of New York Academy Science 2006 1070:167-72. Effects of VIP and VIP-DAP on proliferation and lipid peroxidation metabolism in human KB cells, Carteni Maria, Caraglia M, Dicitore A, Giuberti G, Cassese D, Lepretti M, Abbruzzese A, Stiuso P.
- Biopolymers 2006 81(2):110-9. "Assessment of the conformational features of vasoactive intestinal peptide in solution by limited proteolysis experiments." Stiuso P, Marabotti A, Facchiano A, Lepretti M, Dicitore A, Ferranti P, Carteni M.

Linea di Ricerca 3

- International Journal of Oncology 2007 (6):1349-57 Prognostic value of human telomerase reverse transcriptase gene expression in oral carcinogenesis. Pannone G, De Maria S, Zamparese R, Metafora S, Serpico R, Morelli F, Rubini C, Farina E, Carteni M, Staibano S, De Rosa G, Lo Muzio L, Bufo P.
- Journal of Cancer Research and Clinical Oncology 2008 Survivin gene-expression and splicing isoforms in oral squamous cell carcinoma. De Maria S, Pannone G, Bufo P, Santoro A, Serpico R, Metafora S, Rubini C, Pasquali D, Papagerakis SM, Staibano S, De Rosa G, Farina E, Emanuelli M, Santarelli A, Marigliò MA, Lo Russo L, Lo Muzio L.
- International Journal of Immunopathology and Pharmacology 2007 20(2):317-24. Cyclooxygenase isozymes in oral squamous cell carcinoma: a real-time RT-PCR study with clinic pathological correlations. Pannone G, Sanguedolce F, De Maria S, Farina E, Lo Muzio L, Serpico R, Emanuelli M, Rubini C, De Rosa G, Staibano S, Macchia L, Bufo P.

Linea di Ricerca 4

- Federation of European Biochemical Societies Journal 2008; 275(15):3870-83. In vitro stimulatory effect of anti-apoptotic seminal vesicle protein 4 on purified peroxidase enzymes. Carteni Maria, Metafora V, Stiuso P, Ferranti P, Giannattasio A, Dicitore A, Ravagnan G, De Maria S, Pontoni G, Metafora S.
- Journal of Reproductive Immunology. 2008, 78(2):85-93 Antiapoptotic seminal vesicle protein IV inhibits cell-mediated immunity, Carteni Maria, M. P. Fuggetta, G. Lanzilli, A. Cottarelli, G. Ravagnan, Carteni M., S. De Maria, B. M. Metafora, V. Metafora, S. Metafora.
- Journal of Cellular Physiology. 2007 212: 610-625 The immunomodulatory protein SV-IV protects serum-deprived cells against apoptosis but not against G0/G1 arrest: possible implications for the survival of implanting embryo, Carteni Maria, Morelli F, Peluso G, Petillo O, Giannattasio A, Filosa S, Motta Cm, Tammaro S, Zatterale A, Calzone R, Budillon A, Carteni M., De Maria S, Costanza Mr, Nigro A, Petrazzuolo M, Buommino E, Rizzo M, Capasso G, Baiano S, Moscatiello F, Ravagnan, G, Fuggetta Mp, Tajana G, Stiuso P, Metafora Bm, Metafora V, Metafora S.

Collaborazioni internazionali in atto

Prof. Patrich Robberecht – Ordinario di Biochimica – Direttore dei Laboratori di Farmacologia dell' Università Libre de Bruxelles

Prof. Alessio Fasano – Direttore del “Mucosal Biology Research Centre” Università del Maryland, Facoltà di Medicina, Baltimore, USA

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

IQ Real-Time PCR – Biorad

Spettrofotometro Varian Mod 750

Cromatografia ad alta pressione combinata con rivelazione ad amperometria pulsata (HPAEC-PAD)

Spettrometro di Massa (ES-MS: Piattaforma Fison, Manchester, UK)

Parole Chiave

Intestinal Permeability

Biopactive Peptides

Cancer Markers

Major Seminal Vesicle protein IV

UNITA' DI RICERCA INBB
Bologna

Responsabile Scientifico

Rita Casadio

Linea di Ricerca

Bioinformatica-Biologia Computazionale

Sviluppo di tools per problem solving in Biologia Moderna

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Casadio Rita	PO	casadio@biocomp.unibo.it
Martelli Pier Luigi	RU	gigi@lipid.biocomp.unibo.it
Fariselli Piero	RU	piero@lipid.biocomp.unibo.it

Non Aderenti INBB

Gianluca Tasco	CoCoPro	gluca@biocomp.unibo.it
Michele Finelli	CoCoPro	michele@biodec.com
Andrea Pierleoni	Assegnista	andrea@biocomp.unibo.it
Marco Vassura	Assegnista	vassura@cs.unibo.it
Ludovica Montanucci	Assegnista	ludovica@biocomp.unibo.it
Lisa Bartoli	Dottorando di ricerca	lisa@biocomp.unibo.it
Remo Calabrese	Assegnista	remo@biocomp.unibo.it
Raffaele Fronza	Dottorando di ricerca	raffo@biocomp.unibo.it
Ivan Rossi	Ricercatore a progetto	ivan@biocomp.unibo.it
Priyank Shukla	Dottorando di ricerca	shukla@cs.unibo.it

Sede Unità di Ricerca

Dip di Biologia; www.biocomp.unibo.it

Indirizzo Via Irnerio 42, 40126 Bologna

Telefono 0512094005

Fax 051242576

E-mail casadio@biocomp.unibo.it

Sezione INBB di appartenenza

Bologna

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Il risultato del sequenziamento genomico su larga scala e' caratterizzato da milioni di sequenze proteiche che vengono depositate nelle banche dati in attesa di annotazione funzionale e caratterizzazione strutturale. Il nostro gruppo di ricerca si occupa dello sviluppo e dell' implementazione di tools computazionali atti a trovare soluzione euristiche al problema del folding in un ambito di genomica strutturale e funzionale.

Risultati ottenuti

Il risultato del nostro lavoro di ricerca si e' esplicito essenzialmente nello sviluppo ed implementazione di predittori disponibili al nostro sito web: www.biocomp.unibo.it, in grado di fornire predizione relativamente a caratteristiche strutturali e funzionali di sequenze proteiche. Tutti i predittori basati essenzialmente su reti neurali sono top score tra i predittori del genere. In particolare il predittore CORNET ha fornito le migliori predizioni di contatti tra residui nell'ambito delle ultime edizioni del Critical Assesment of Techniques for Protein Structure Prediction (CASP4, 2000 e CASP5, 2002).

Inoltre il sistema basato su hidden Markov models per la predizione delle zone transmembrana delle proteine "beta-barrel" di membrana presentato al Convegno internazionale "Intelligent Systems for Molecular Biology (Edmonton, Canada 2002)" ha meritato il premio SGI per il miglior articolo.

Abbiamo sviluppato un predittore che analizzando i genomi dei batteri Gram-, e' in grado di predire le proteine localizzate nella membrana esterna, tale predizione e' stata poi sottoposta ad una verifica sperimentale nel corso di una collaborazione internazionale ottenendo un notevole successo, che conferma la validità dei nostri metodi predittivi. Recentemente è stato anche implementato un predittore per la localizzazione subcellulare delle sequenze proteiche (BaCelLo), che utilizza vari metodi e risulta tra i migliori in questo settore.

Un'altra linea di ricerca riguarda l'analisi comparata di genomi di organismi termofili e mesofili, per estrarre determinanti di termostabilità; un indice, basato sulla frequenza dei codoni, e' in grado di discriminare, sia i genomi dei

termofili dai mesofili, sia le proteine appartenenti ai termofili da quelle dei mesofili, a partire dalla loro sequenza codificante.

Attualmente sono allo studio le implementazioni di varie piattaforme per la bioinformatica atte alla annotazione di sequenze proteiche

Pubblicazioni più significative nel periodo 2006-2008

Marani P, Wagner S, Baars L, Genevaux P, de Gier JW, Nilsson I, Casadio R, von Heijne G -New Escherichia coli outer membrane proteins identified through prediction and experimental verification- Protein Sci 15:884-889 (2006)

Amico M, Finelli M, Rossi I, Zauli A, Elofsson A, Viklund H, von Heijne G, Jones D, Krogh A, Fariselli P, Martelli PL, Casadio R -PONGO: a web server for multiple predictions of all-alpha transmembrane proteins- Nucleic Acids Res 34(Web server issue):169-172 (2006)

Pierleoni A, Martelli PL, Fariselli P, Casadio R -BaCelLo: a balanced subcellular localization predictor Bioinformatics 22:e408-e416 (2006)

Capriotti E, Calabrese R, Casadio R -Predicting the insurgence of human genetic diseases associated to single point protein mutations with support vector machines and evolutionary information- Bioinformatics 22:2729-34 (2006)

Pierleoni A, Martelli PL, Fariselli P, Casadio R -eSLDB: eukaryotic subcellular localization database- Nucleic Acids Res 35:D208-12 (2007)

Capriotti E, Casadio R -K-Fold: a tool for the prediction of the protein folding kinetic order and rate- Bioinformatics 23:385-386 (2007)

Bartoli L, Calabrese R, Fariselli P, Mita D, Casadio R -A computational approach for detecting peptidases and their specific inhibitors at the genome level- BMC Bioinformatics 8:S3 (2007)

Fariselli P, Rossi I, Capriotti E, Casadio R -The WWWH of remote homolog detection: The state of the art- Brief Bioinform 8:78-87 (2007)

Tress ML, Martelli PL, Frankish A, Reeves GA, Wesselink JJ, Yeats C, Olason PL, Albrecht M, Hegyi H, Giorgetti A, Raimondo D, Lagarde J, Laskowski RA, Lopez G, Sadowski MI, Watson JD, Fariselli P, Rossi I, Nagy A, Kai W, Stirling Z, Orsini M, Assenov Y, Blankenburg H, Huthmacher C, Ramirez F, Schlicker A, Denoeud F, Jones P, Kerrien S, Orchard S, Antonarakis SE, Reymond A, Birney E, Brunak S, Casadio R, Guigo R, Harrow J, Hermjakob H, Jones DT, Lengauer T, Orengo CA, Patthy L, Thornton JM, Tramontano A, Valencia A -The implications of alternative splicing in the ENCODE protein complement- Proc Natl Acad Sci USA 104:5495-54500 (2007)

Montanucci L, Martelli PL, Fariselli P, Casadio R -Robust determinants of thermostability highlighted by a codon frequency index capable of discriminating thermophilic from mesophilic genomes- J Proteome Res 6:2502-2508 (2007)

Fermani S, Sparla F, Falini G, Martelli PL, Casadio R, Pupillo P, Ripamonti A, Trost P -The molecular mechanism of thioredoxin regulation in photosynthetic A2B2-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase- Proc Natl Acad Sci USA 104:11109-11114 (2007)

Capriotti E, Arbiza L, Casadio R, Dopazo J, Dopazo H, Marti-Renom MA -Use of estimated evolutionary strength at the codon level improves the prediction of disease-related protein mutations in humans- Hum Mutat 29:198-204 (2008)

Vassura M, Margara L, Di Lena P, Medri F, Fariselli P, Casadio R. FT-COMAR: fault tolerant three-dimensional structure reconstruction from protein contact maps. Bioinformatics. 2008 May 15;24(10):1313-5. Epub 2008 Apr 1.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Generazione di piattaforme per l'annotazione di genomi. Predizione di proteine a partire dai siti di splicing alternativo. Predizione della topologia di proteine di membrana. Modelling di proteine a vario livello di collaborazione. Analisi della relazione tra instabilità proteica e malattie. Annotazione del genoma umano nell'ambito di BIOSAPIENS.

Collaborazioni internazionali in atto

1) Alfonso Valencia, Protein Design Group, Centro Nacional de Biotecnologia (C.N.B. - C.S.I.C.)
Campus Universidad Autonoma. Cantoblanco. 28049 Madrid (SPAIN)
Tel: +34-91-5854570. Fax: +34-91-5854506. e-mail: valencia@cnb.uam.es

2) Gunnar von Heijne, Dept. of Biochemistry and Biophysics, University of Stockholm
The Arrhenius Laboratories for Natural Sciences, SE-106 91 Stockholm (SWEDEN)
Tel: +46-8-16 2590. Fax: +46-8-15 3679. e-mail: gunnar@dbb.su.se

3) Gert Vriend, CMBI, University of Nijmegen
Toernooiveld 1, 6525 ED, Nijmegen (THE NETHERLANDS)
Tel: +31 24 365 3397. Fax: +31 24 365 29 77. e-mail: vriend@cmbi.kun.nl

Il gruppo di Biocomputing e' inoltre nodo della rete di eccellenza BIOSAPIENS (coordinatore BIOSAPIENS: Janet Thornton) finanziata dalla Comunita' Europea per la creazione di un Istituto virtuale Europeo per l'annotazione dei genomi (www.biosapiens.info) e formata da 25 laboratori distribuiti in 14 paesi Europei.

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Cluster con sette server (tre amd biprocessore piu' quattro xeon biprocessore)

Due server xeon biprocessore adibiti ad application web servers

Dieci workstation intel P4

Parole Chiave

-Bioinformatics

-Protein Structure Prediction

-Genome annotation

-Machine Learning

-Problem Solving Methods

UNITA' DI RICERCA INBB
Padova

Responsabile Scientifico
Andrea Cavaggioni

Linea di Ricerca
1- Biologia dei gliomi
2- Comunicazione olfattiva

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Andrea Cavaggioni	PO	andrea.cavaggioni@unipd.it
-------------------	----	----------------------------

Non Aderenti INBB

Carla Mucignat...	PA	carla.mucignat@unipd.it
Giuseppe Zagotto	PA	giuseppe.zagotto@unipd.it
Gaetano Donofrio	PA	gaetano.donofrio@unipr.it
Marco Redaelli	DR	Marco.redaelli@unipd.it

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Anatomia e Fisiologia Umana
Indirizzo Via Marzolo 3
Telefono 049 8275314
Fax 049 8275301
E-mail andrea.cavaggioni@unipd.it

Sezione INBB di appartenenza
Padova

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

1-E' stato studiato il glioblastoma in un modello di topo e ratto. Sono state usate tecniche biochimiche e di immunoistochimica.
2-Abbiamo studiato l'evoluzione nel tempo del profilo olfattivo di tracce orinarie di topo con tecnica di "solid phase mass extraction"-GC-MS e l'evoluzione nel tempo del rilascio di mediatori chimici nell'amigdala olfattiva di ratto in risposta allo stimolo.

Risultati ottenuti

1- Le cellule tumorali esprimono una subunità regolatoria delle cinasi AMP ciclico-dipendente legata al citoscheletro. Nel cervello sano questa subunità non è espressa. Fanno eccezione le cellule ependimali. Il risultato è importante perché il glioblastoma è multiforme ed infiltrante e non esistono marcatori specifici per una diagnosi istologica. L'osservazione permette di evidenziare in maniera specifica con tecnica immunoistochimica le cellule glioblastomatose nel cervello. Il risultato è importante anche perché permette di tentare vie di terapia innovative mirate alle cinasi AMP ciclico-dipendente per controllare lo sviluppo del tumore. A tale scopo abbiamo individuato un potenziale vettore genico in un herpesvirus bovino di tipo 4.
2- Sono state rilevate molecole odorose che scompaiono rapidamente dopo la deposizione della traccia ed altre a più lunga persistenza. Il rilascio di mediatori chimici nell'amigdala olfattiva in risposta all'odore delle tracce è una funzione degli odori rilasciati da una traccia nel tempo. Questo dato suggerisce che i topi siano in grado di stabilire con notevole precisione il tempo di deposizione delle tracce orinarie. Il risultato è di importanza ecologica e di rilievo per le tecniche di disinfestazione.

Pubblicazioni più significative nel periodo 2006-2008

1. Cavaggioni A., Mucignat-Caretta C, Redaelli M, Zagotto G. (2006). The scent of urine spots of male mice, *Mus musculus*: changes of chemical composition over time. *Rapid Communications In Mass Spectrometry*. vol. 20, pp. 3741-3746 ISSN: 0951-4198.
2. Donofrio G, Cavaggioni A., Bondi M, Cavarani S, Flammini CF, Mucignat-Caretta C. (2006). Outcome of bovine herpesvirus 4 infection following direct viral injection in the lateral ventricle of the mouse brain. *Microbes And Infection*. vol. 50, pp. 1-8 ISSN: 1286-4579. doi:10.1016.

3. Mucignat-Caretta C, Colivicchi MA, Fattori M, Ballini C, Bianchi L, Gabai G, Cavaggioni A., Della Corte L. (2006). Species-specific chemosignals evoke delayed excitation of the vomeronasal amygdala in freely-moving female rats. *Journal Of Neurochemistry*. vol. 99, pp. 881-891 ISSN: 0022-3042....
4. Cavaggioni A. (2006). Functional aspects of b-lactoglobulin, Major Urinary Protein and Odorant-Binding Protein. In: Bo Ackerstrom. *Lipocalins*. (pp. x-y). ISBN: 1-58706-297-6.....
5. C Mucignat-Caretta, C Bergo, Cavaggioni A., A Caretta. (2006). Distribution of detergent-insoluble cAMP-dependent protein kinase regulatory subunits differentiates glioblastoma cells from brain tissue. *Federation of the European Neuroscience Society*. Vienna. July 2006.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

1-Si metteranno a punto tecniche di diagnosi immunoistochimiche del glioblastoma su biopsie di pazienti.

Si metteranno a punto tecniche per controllare la crescita del glioblastoma in modelli animali con farmaci e terapia genica basata su herpesvirus non patogeni.

2- Si faranno delle correlazioni tra il profilo odoroso di tracce urinarie di topo nel tempo dopo la deposizione e il comportamento esplorativo e di contromarcatura. Questo per determinare se i topi usano il profilo odoroso per datare il tempo di deposizione.

Collaborazioni internazionali in atto

Dr. Krishna Persaud, UMIST, Manchester, U:K:

Il laboratorio è uno dei 27 membri del "EU-supported Network of Excellence" chiamato *GOSPEI*: General Olfaction and Sensing Projects on a European Level.

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

GC-MS, microscopio ad epifluorescenza, stabulario di allevamento, laboratorio MOGM di classe 2.

Parole Chiave

Glioblastoma, cinasi, terapia genica

Comunicazione olfattiva tra roditori

UNITA' DI RICERCA INBB
Firenze

Responsabile Scientifico

Fabrizio Chiti

Linea di Ricerca

Biomolecole

Titolo

Studio dei meccanismi di aggregazione di proteine

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Chiti Fabrizio	PA	fabrizio.chiti@unifi.it
----------------	----	-------------------------

Non Aderenti INBB

Taddei Niccolò	PO *	Niccolo.taddei@unifi.it
Ahmad Basir	BC post-doc	ahmad.basir@unifi.it
Monsellier Elodie	BC post-doc	elodie.monsellier@unifi.it
Winkelmann Julia	BC post-doc	julia.winkelmann@unifi.it
Bemporad Francesco	BC post-doc	francesco.bemporad@unifi.it
Campioni Silvia	DR	silvia.campioni@unifi.it
Soldi Gemma	DR	gemma.soldi@unifi.it
Motamedi-Shad Neda	DR	neda.m@gmx.at
Lanzilao Luisa	DR	luisa.lanzilao@unifi.it
Shalova Irina	A	shalova_irina@yahoo.com
Mannini Benedetta	A	ktomtomk@yahoo.it

Sede Unità di Ricerca

Univeristà degli Studi di Firenze, Dipartimento di Scienze Biochimiche
Viale Morgagni 50, 50134 Firenze
Telefono +39-055-4598319
Fax +39-055-4598905
E-mail fabrizio.chiti@unifi.it

Sezione INBB di appartenenza

Bologna

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Il principale obiettivo è stato lo studio del processo con cui proteine formano, a partire dal loro stato nativo, aggregati fibrillari ben definiti, caratterizzati da una struttura a foglietto β e capaci di legare coloranti specifici (note come fibrille amiloidi). Questo processo è alla base di numerose malattie umane, quali condizioni neurodegenerative, amiloidosi sistemiche e tessuto-specifiche. E' inoltre un processo biologico che in molti casi non è affatto deleterio e patologico: sono sempre di più infatti le proteine che assumano una funzione biologica quando adottano una conformazione fibrillare non distinguibile da quella associata a patologie.

Questa unità ha cercato di investigare i meccanismi di aggregazione proteica, con particolare attenzione ai fattori di sequenza e di struttura tridimensionale che determinano la propensione di una proteina ad aggregare, a partire sia da stati destrutturati che strutturati.

Un altro obiettivo è stato studiare il meccanismo di *folding* di un enzima ipertermofilo, allo scopo di caratterizzare a livello molecolare sia il principale intermedio di folding che il suo stato di transizione.

Risultati ottenuti

In questo triennio (2006-2008) sono stati determinati ulteriori fattori responsabili dell'aggregazione di proteine destrutturate in vitro, portando al raffinamento di algoritmi in grado di fare predizioni, data una sequenza a scelta, della velocità di aggregazione e delle regioni di sequenza che promuovono l'aggregazione.

Sono stati anche studiati i meccanismi di aggregazione di proteine globulari sia a partire dal loro stato nativo, correttamente ripiegato, che dal loro stato parzialmente destrutturato. Gli studi di folding hanno portato alla scoperta e alla caratterizzazione strutturale di un intermedio di folding enzimaticamente attivo, portando al concetto che enzimi possono essere funzionali anche se non ripiegati nel loro stato nativo.

Pubblicazioni più significative nel periodo 2006-2008

1. Chiti F and Dobson CM (2006). Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Ann. Rev. Biochem.* 75, 333-366.
2. Bemporad F, Taddei N, Stefani M, Chiti F (2006). Assessing the role of aromatic residues in the amyloid aggregation of human muscle acylphosphatase. *Protein Sci.* 15, 862-870.
3. Plakoutsi G, Bemporad F, Monti M, Pagnozzi D, Pucci P, Chiti F. (2006). Exploring the mechanism of formation of native-like and precursor amyloid oligomers for the native acylphosphatase from *Sulfolobus solfataricus*. *Structure* 14, 993-1001.
4. Baglioni S, Casamenti F, Bucciantini M, Luheshi LM, Taddei N, Chiti F, Dobson CM, Stefani M. (2006). Prefibrillar amyloid aggregates could be generic toxins in higher organisms. *J. Neurosci.* 26, 8160-8167.
5. Bemporad F, Calloni G, Campioni S, Plakoutsi G, Taddei N and Chiti F (2006). Sequence and Structural Determinants of amyloid fibril formation. *Accounts of Chemical Research* 39, 620-627.
6. Soldi G, Plakoutsi G, Taddei N, Chiti F (2006). Stabilization of a native protein mediated by ligand binding inhibits amyloid formation independently of the aggregation pathway. *J. Med. Chem.* 49, 6057-6064.
7. Monsellier E, Ramazzotti M, de Laureto PP, Tartaglia GG, Taddei N, Fontana A, Vendruscolo M, Chiti F. (2007). The distribution of residues in a polypeptide sequence is a determinant of aggregation optimized by evolution. *Biophys J.* 93, 4382-4891.
8. Luheshi LM, Tartaglia GG, Brorsson AC, Pawar AP, Watson IA, Vendruscolo M, Lomas DA, Dobson CM, Crowther DC (2007). Systematic in vivo Analysis of the Intrinsic Determinants of Amyloid β Pathogenicity. *PLoS Biol.* 5, e290.
9. Monsellier E. and Chiti F. (2007). Invited review titled "Prevention of amyloid-like aggregation as a driving force of protein evolution". *EMBO Reports* 8, 737-742.
10. Soldi G, Bemporad F, Chiti F (2008). The Degree of Structural Protection at the Edge β -Strands Determines the Pathway of Amyloid Formation in Globular Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 130, 4295-302
11. Bemporad F, Gsponer J, Hopcharuoho HI, Plakoutsi G, Stati G, Stefani M, Taddei N, Vendruscolo M, Chiti F (2008). Biological function in a non-native partially folded state of a protein. *EMBO J.* 27, 1525-1535.
12. Campioni S, Mossuto MF, Torrassa S, Calloni G, de Laureto PP, Relini A, Fontana A, Chiti F. (2008). Conformational properties of the aggregation precursor state of HypF-N. *J. Mol. Biol.* 379, 554-567.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

1. Analizzare il proteoma umano con algoritmi che determinano la propensione ad aggregare di proteine destrutturate
2. Identificare i determinanti del processo di aggregazione a partire da proteine globulari
3. Studiare i meccanismi di aggregazione da stati denaturati e parzialmente strutturati.
4. Studiare il rapporto tra il meccanismo di aggregazione e la struttura amiloidegenica iniziale di una proteina denaturata
5. Studiare la struttura di oligomeri prefibrillari..
6. Studiare l'effetto di macromolecole biologiche (glucosaminoglicani) sul processo di aggregazione amiloide

Collaborazioni internazionali in atto

1. Prof. Christopher M. Dobson e Dr Michele Vendruscolo (University of Cambridge, UK)
2. Ulrich Hartl (Max Planck Institute, Martinsried, Germany)
3. Marcus Fändrich (University of Halle, Germany)

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

1. Spettropolarimetro per dicroismo circolare Jasco J-810 (Tokyo, Japan) equipaggiato con strumento a flusso interrotto Bio-logic SFM-20 (Claix, France)
2. Spettrofotometro "Fourier transform Infra-red" Jasco FT/IR 4200 (Tokyo, Japan)
3. Strumento a flusso interrotto Bio-logic SFM-3 accoppiato a sistemi di rilevamento di assorbimento ottico e fluorescenza (Claix, France)
4. Strumento di light scattering dinamico e statico, Zetasizer Nano S da Malvern Instruments (Malvern, Worcestershire, UK)
5. Fluorimetro PerkinElmer LS 55 fluorimeter (Wellesley, Massachusetts, USA)
6. Accesso privilegiato alle EMBL core facilities (in qualità di membro dell'EMBO Young Investigator Programme) comprendenti microscopia elettronica, produzione di anticorpi monoclonali, etc.

Parole Chiave

Misfolding, Aggregazione, Amiloide, Malattie neurodegenerative, Glucosaminoglicani

UNITA' DI RICERCA INBB
Napoli

Responsabile Scientifico

Cimino Filiberto;
Esposito Franca

Linea di Ricerca

Meccanismi molecolari coinvolti nella regolazione redox dell'espressione genica e nell'invecchiamento

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Cimino Filiberto	PO	cimino@dbbm.unina.it
Esposito Franca	PO	espositof@dbbm.unina.it

Non Aderenti INBB

Ammendola Rosario	PO	ammendola@dbbm.unina.it
Faraonio Raffaella	PA	faraonio@dbbm.unina.it
Iaccio Annalisa	A	iaccio@dbbm.unina.it
Sedia Carla	DR	sedia@dbbm.unina.it
Calise Serena	DR	calise@dbbm.unina.it

Sede Unità di Ricerca

indirizzo

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

Telefono 0817464966/7463145

Fax 0817463650/7464359

E-mail cimino@dbbm.unina.it; espositof@dbbm.unina.it

Sezione INBB di appartenenza

Napoli

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

- 1) Regolazione dell'espressione genica in cellule resistenti allo stress ossidativo e nella senescenza cellulare
- 2) Caratterizzazione di geni coinvolti nella resistenza all'apoptosi
- 3) Meccanismi molecolari coinvolti nella regolazione della NADPH ossidasi da parte di formilpeptidi in cellule non fagociti che

Risultati ottenuti

- 1) Abbiamo dimostrato che in cloni di cellule NIH3T3 resistenti allo stress ossidativo l'aumentata espressione di alcuni geni antiossidanti è correlata ad un aumento nucleare del fattore trascrizionale Nrf2. Inoltre è stato anche recentemente dimostrato che esiste un possibile crosstalk tra 2 meccanismi di regolazione coinvolti nella risposta cellulare allo stress ossidativo: uno basato su Nrf2 ed il secondo dipendente dall'attività della proteina p53, soppressore di tumori. I dati dimostrano che p53 sopprime l'espressione di geni antiossidanti Nrf2-dipendenti attraverso interazione in vivo con i promotori di tali geni e spiazzamento di Nrf2.
- 2) L'adattamento allo stress ossidativo è una delle principali cause coinvolte nello sviluppo della resistenza all'apoptosi e della chemioresistenza. Da uno screening di espressione differenziale tra cellule adattate e non al DEM, è stato selezionato il gene TRAP1 codificante per una heat shock protein mitocondriale. Abbiamo recentemente dimostrato che: i) l'espressione di tale proteina è aumentata sia in cellule di osteosarcoma umano adattate al DEM, sia in cellule di carcinoma di colon resistenti al DEM ed ad alcuni chemioterapici; ii) cellule trasfettate con un vettore di espressione per tale proteina sono più resistenti all'apoptosi indotta da vari agenti. Al momento è in corso la caratterizzazione dei meccanismi molecolari coinvolti nella funzione citoprotettiva di TRAP1.
- 3) Di recente nel nostro laboratorio è stato clonato in fibroblasti umani FPRL1, un recettore per i formil-peptidi. E' stato sinora analizzato il pathway di trasduzione intracellulare che conduce alla attivazione della NADPH ossidasi in cellule umane stimulate con formil-peptidi.

Pubblicazioni più significative nel periodo 2006-2008

1. N. Montesano Gesualdi, G. Chirico, M. T. Catanese, G. Pirozzi, and F. Esposito, (2006) AROS-29 is involved in adaptive response to oxidative stress, *Free Radical Res.*, 40 (5), 467-476
2. Faraonio R., Vergara P, Di Marzo D., Napolitano M., Russo T., Cimino F. Transcription regulation in NIH3T3 cell clones resistant to diethylmaleate-induced oxidative stress and apoptosis *Antioxid Redox Signal.* 8, 365-374, 2006
3. Faraonio R, Vergara P, Di Marzo D, Pierantoni MG, Napolitano M, Russo T, Cimino F. (2006) p53 suppresses the Nrf2-dependent transcription of antioxidant response genes. *J Biol Chem.* 281: 39776-84.
4. Iaccio A, Collinet C, Gesualdi NM, Ammendola R. Protein kinase C-alpha and -delta are required for NADPH oxidase activation in WKYMVm-stimulated IMR90 human fibroblasts. *Arch Biochem Biophys.* 2007 Mar 15;459(2):288-94.
5. Monti DM, Montesano Gesualdi N, Matousek J, Esposito F, D'Alessio G The cytosolic ribonuclease inhibitor contributes to intracellular redox homeostasis. *FEBS Lett.* 2007 Mar 6;581(5):930-4. Epub 2007 Feb 6.
6. N. Montesano Gesualdi, G. Chirico, G. Pirozzi, E. Costantino, M. Landriscina, F. Esposito. Tumor necrosis factor-associated protein 1 (TRAP-1) protects cells from oxidative stress and apoptosis. *Stress*, 2007; 10(4): 342-350
7. Iaccio A, Angiolillo A, Ammendola R. Intracellular signaling triggered by formyl peptide receptors in non phagocytic cells. *Curr Sign Transd. Therapy*, 2008; 88-96

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

I più importanti obiettivi riguarderanno:

- 1) Ruolo di alcuni microRNA nell'induzione della senescenza cellulare provocata da stress ossidativo.
- 2) Lo studio delle correlazioni esistenti tra fenotipo adattato allo stress ossidativo e quello resistente ai farmaci antineoplastici attraverso lo studio della regolazione del gene TRAP1;
- 3) L'identificazione del/i ligando/i naturale di FPRL1.

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Cappe a flusso laminare, ultracentrifughe, microscopi ottici ed a fluorescenza
iCycler iQ Real Time PCR, Work Station per analisi di gel 2D fluorescenti (DIGE)

Parole Chiave

Stress ossidativo, apoptosi mitocondriale, NADPH ossidasi, espressione genica, microRNA

UNITA' DI RICERCA INBB
Parma

Responsabile Scientifico

Pietro Cozzini.

Linea di Ricerca

Studi energetici su complessi biomolecolari mediante metodi computazionali con particolare riguardo all'interazione col solvente acquoso. Particolare interesse e' rivolto al recettore degli estrogeni sia per la progettazione di nuovi ligandi di interesse farmaceutico sia per l'interazione di questo recettore con inquinanti alimentari quali micotossine, derivati di droghe e additivi alimentari.

Titolo

Molecular engineering di sistemi biomolecolari

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Cozzini Pietro	RU	pietro.cozzini@unipr.it
Francesca Spyraakis	BC INBB	francesca.spyraakis@unipr.it

Non Aderenti INBB

Gianluigi Ingletto	PA	gianluigi.ingletto@unipr.it
Ratna Singh	DR (dal 1/1/08)	ratna.singh@nemo.unipr.it
Alessio Amadasi	DR (sino al 31/12/07)	alessio.amadasi@nemo.unipr.it

Sede Unità di Ricerca

Laboratorio di Modellistica Molecolare, Dipartimento di Chimica Generale, Università di Parma.....

Indirizzo Via G.P. Usberti, 17/A 43100 PARMA

Telefono +39 0521 905669

Fax +39 0521 905669

E-mail pietro.cozzini@unipr.it

Sezione INBB di appartenenza

Milano

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

L'obiettivo principale della ricerca e' quello della piena comprensione del meccanismo di attacco dei ligandi al sito del recettore degli estrogeni alfa e beta con l'intento di progettare nuovi ligandi di probabile interesse farmaceutico. La nota flessibilita' delle eliche 12 e la piccola flessibilita' locale della istidina 524 in funzione del tipo di molecola che si lega, agonista, antagonista o parziale agonista, pone diversi problemi nella simulazione computazionale di modelli di interazione. Gli studi sono condotti utilizzando classici metodi di docking e di consensus scoring, in particolare viene applicata la funzione di scoring empirico, HINT, basata su dati sperimentali di LogP e metodi di dinamica molecolare con solvente implicito. D'altro canto, essendo il recettore degli estrogeni coinvolti nella trasmissione del segnale tumorale, viene analizzato nei confronti di banche dati di additivi alimentari quali la WHO/JECFA per verificarne il binding e la potenziale pericolosita' di queste molecole.

Viene altresì simulata l'interazione con note micotossine e con metaboliti delle droghe più comuni che possono poi essere clatrate da beta ciclodestrine diversamente modificate per essere usate come chemosensore per il rilevamento di questi ligandi anche a bassissime concentrazioni nei cereali, nel latte ed in altri alimenti per l'uomo o gli animali sfruttando la tecnica della spettroscopia di fluorescenza.

Questa unita' di ricerca e' particolarmente interessata alla messa a punto del metodo di valutazione energetica nell'ambito della collaborazione con gli autori del software HINT della Virginia Commonwealth University.

Risultati ottenuti

I risultati ottenuti riguardano al messa a punto del software di valutazione dei modelli computazionali, HINT, in grado di considerare modelli realistici stabilendo il corretto stato di protonazione e tenendo in conto gli effetti dovuti alla presenza di molecole d'acqua. Sul piano applicativo la predizione di binding del recettore degli estrogeni nei confronti di un grande dataset estratto dalla banca dati WHO, ha portato all'identificazione di quattro sostanze normalmente utilizzate come additivi alimentari che sono poi state testate con saggi in viro e trovate positive ai test. Cio' permette di dire che comunque occorre prestare attenzione a queste sostanze e progettare ulteriori indagini sperimentali al fine di togliere ogni dubbio sulla loro potenziale pericolosita' oppure proporre l'esclusione dalla lista degli additivi permessi.

Questo tipo di attività ha fatto parte di un laboratorio della regione Emilia Romagna sulla sicurezza alimentare SIQUAL, laboratorio composto da una rete di laboratori di ricerca universitari e di aziende della quale il Laboratorio di Modellistica ha costituito il riferimento per lo studio di modelli molecolari e la predizione di binding. Altri risultati importanti si stanno ottenendo dal lato dello sviluppo rapido ed economico di chemosensori per il riconoscimento di micotossine mediante fluorescenza, riconoscimento che deve essere specifico per diverse tossine. Queste sostanze si legano al recettore degli estrogeni e sono in grado di interagire con diverse ciclo destrine che possono essere diversamente funzionalizzate ed utilizzate come sequestranti.

Alcune di queste progettate nel nostro laboratorio sono sintetizzate e testate nei laboratori della Facoltà di Agraria della nostra Università

Pubblicazioni più significative nel periodo 2006-2008

- P. Cozzini, G.E. Kellogg, F. Spyraakis, D.J. Abraham, G. Costantino, A. Emerson, F. Fanelli, H. Gohlke, L.A. Kuhn, G.M. Morris, M. Orozco, T.A. Perthinez, M. Rizzi and C. Sotriffer: "Target flexibility: an emerging consideration in drug discovery and design" *J. Med Chem. Perspective*, in press.
- A. Amadasi, A. Mozzarelli, C. Meda, A. Maggi, and P. Cozzini "Identification of xenoestrogens in food additives by an integrated in silico and in vitro approach", *Chemical Research in Toxicology*, in press.
- A. Marabotti, F. Spyraakis, A. Facchiano, P. Cozzini, S. Alberti, G.E. Kellogg, A. Mozzarelli: "Energy-based prediction of amino acid-nucleotide base recognition" *J. Comput. Chem.*, 2008, 29, 1955-1969.
- A. Amadasi, A. Surface, F. Spyraakis, P. Cozzini, A. Mozzarelli and G.E. Kellogg: "Robust classification of relevant water molecules in putative protein binding sites" *J. Med. Chem.*, 2008, 51, 1063-1067.
- O.A. Gani, O.A. Adekoya, L. Giurato, F. Spyraakis, P. Cozzini, S. Guccione, J.-O. Winberg and I. Sylte: "Theoretical calculations of the catalytic triad in short chain alcohol dehydrogenases/reductases" *Biophys. J.*, 2008, 94, 1412-1427.
- A. Tripathi, M. Fornabaio, F. Spyraakis, A. Mozzarelli, P. Cozzini, A. Mozzarelli: "Complexity in modeling and understanding protonation states: computational titration of HIV-1 protease inhibitor complexes" *Chem. Biodivers.*, 2007, 4, 2564-2577.
- F. Spyraakis, A. Amadasi, M. Fornabaio, D.J. Abraham, A. Mozzarelli, G.E. Kellogg and P. Cozzini: "The consequences of scoring docked ligand conformations using free energy correlations" *Eur. J. Med. Chem.*, 2007, 42, 921-933.
- F. Spyraakis, G.E. Kellogg, A. Amadasi and P. Cozzini. "Scoring functions for virtual screening" *Frontiers in Drug Design and Discovery*, 2007, 3, 317-379.
- F. Spyraakis, P. Cozzini, C. Bertoli, A. Marabotti, G.E. Kellogg and A. Mozzarelli: "Energetics of the protein-DNA-water interactions" *BMC Structural Biology*, 2007, 7, 4.
- F. Spyraakis, S. Raboni, P. Cozzini, S. Bettati and A. Mozzarelli: "Allosteric communication between alpha and beta subunits of tryptophan synthase: Modelling the open-closed transition of the alpha subunit" *BBA – Proteins and Proteomics*, 2006, 1764 (6), 1102-1109.
- A. Amadasi, F. Spyraakis, P. Cozzini, D.J. Abraham, G.K. Kellogg and A. Mozzarelli: "Mapping the energetics of water-protein and water-ligand interactions with the "natural" HINT forcefield: predictive tools for characterizing the roles of water in biomolecules" *J. Mol. Biol.*, 2006, 358 (1), 289-309.
- G.E. Kellogg, M. Fornabaio, D.L. Chen, D.J. Abraham, F. Spyraakis, P. Cozzini and A. Mozzarelli: "Tools for building a comprehensive modeling system for virtual screening under real biological conditions" *J. Mol. Graph. Model.*, 2006, 24 (6), 434-439.
- P. Cozzini, M. Fornabaio, A. Mozzarelli, F. Spyraakis, D.J. Abraham, and G.E. Kellogg. "Water: How to evaluate its contribution in protein-ligand interactions" *Int. J. Quant. Chem.*, 2006, 106 (3), 647-651.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Sul piano più squisitamente computazionale l'obiettivo è di riuscire a simulare l'apertura/chiusura dell'elica 12 in funzione del tipo di ligando che entra nel sito attivo e la modificazione indotta nel sito dal ligando stesso in confronto alla forma del recettore non complessata. Questa parte del progetto, che richiede l'uso di dinamica con solvente

implicito con tempi lunghi dell'ordine di diverse decine di picosecondi, verra' sviluppata in collaborazione con l'Universita' di Modena e Reggio Emilia. Sul piano sperimentale si sta cercando di cristallizzare il complesso del recettore alfa con lo Zearalenone, con alfa e beta zearalenone come con le altre quattro molecole additivi alimentari al fine di avere altre strutture di complessi.

Continuera' inoltre la scansione di altre banche dati di additivi nei confronti del recettore con tecniche di docking per trovare altri possibili ligandi.

Collaborazioni internazionali in atto

Collaborazione con Proff. DJ Abraham, G.E. Kellogg, M. Safo, Institute for Structural Biology and Drug Discovery, Virginia Commonwealth University, Richmond (VA); Accordo bilateral fra Universita' di Parma e VCU.

Nel periodo 2005-2008 il MIUR ha finanziato il progetto di internazionalizzazione fra l'Universita' di Parma, la VCU di Richmond e l'Oklahoma State University di Norman, resp. Prof. A. Mozzarelli.

Il MIUR ha finanziato per il triennio 2009-2010 il progetto di internazionalizzazione fra Universita' di Parma e VCU di Richmond, resp. Prof. P. Cozzini.

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

N. 6 workstations per molecular engineering corredate si software di modeling.

Parole Chiave

Molecular engineering, Estrogen receptor, food safety, docking/scoring

UNITA' DI RICERCA INBB
Catania

Responsabile Scientifico

Vito De Pinto

Linea di Ricerca

Sistemi proteici coinvolti nella produzione di energia e di radicali liberi

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Vito De Pinto	PO	vdpbiofa@unict.it
Giuseppe Lazzarino	PO	lazzarig@unict.it
Angela Messina	RU	mess@unict.it
Guarino Francesca	BC	paola14225@yahoo.com
Amorini Mariangela	RU	amorini@unict.it
Bellia Francesco	BC	

Non Aderenti INBB

Reina Simona	DR
Guarnera Andrea	DR

Sede Unità di Ricerca

Laboratorio di Biochimica e Biologia Molecolare della Facoltà di Scienze M.F.N., aderente al Dip. Di Scienze Chimiche dell'Università di Catania

Indirizzo viale A. Doria, 6

Telefono 095-7384244, 7384095, 7384243, 7384092

Fax 095-337036.

Sezione INBB di appartenenza

Catania

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Negli ultimi tre anni i ricercatori afferenti a questa unità di ricerca INBB hanno portato avanti le linee di ricerca schematizzate sotto:

- 1) Studi di relazione struttura-attività di peptidi disegnati sulla sequenza della porina eucariotica o VDAC (*Voltage Dependent Anion Selective Channel*). Queste sequenze vengono caratterizzate sia dal punto di vista chimico-fisico (DSC, NMR, CD) che dal punto di vista biologico tramite la produzione di chimere modificate nelle sequenze corrispondenti.
- 2) Caratterizzazione ed isolamento delle isoforme 2 e 3 del VDAC, attribuzione di un ruolo funzionale ed interazioni di esse con proteine cellulari e con farmaci antitumorali.
- 3) Purificazione e caratterizzazione della carnosinasi, l'enzima deputato alla degradazione della carnosina (beta-alanil-L-istidina), che a sua volta è un peptide con ruolo protettivo abbondantemente presente in molti tessuti.
- 4) Studio del metabolismo cerebrale in stati di sofferenza acuta nell'animale da esperimento e nell'uomo.
- 5) Valutazione del metabolismo energetico e dello stress ossidativi in vitro e in vivo.

Risultati ottenuti

- 1) Determinazione NMR della struttura dell'N-terminale del VDAC1 e caratterizzazione del suo ruolo cellulare che è risultato di rilievo per l'apoptosi
- 2) Purificazione della isoforma VDAC2 da spermatozoi di bovino. Questa è la prima volta che tale proteina è mai stata isolata e studiata al mondo.
- 3) Definizione del ruolo fisiologico delle isoforme alternative di VDAC o porina in *D. melanogaster*: risulta evidente il coinvolgimento di questi geni nello sviluppo dei tessuti germinativi dell'insetto.
- 4) Abbiamo utilizzato LDL (Low Density Lipoproteins) purificate e dializzate a cui sono state addizionate diverse concentrazioni di anserina (ANS), carnosina (CAR), omocarnosina (HCAR), beta-ciclodestrina (CD), ed altri derivati della beta-CD coniugati con carnosina. Con il nostro metodo cromatografico abbiamo potuto determinare con esattezza l'MDA senza manipolazione del campione al di fuori della semplice deproteinizzazione. I risultati ottenuti mostrano che ANS, CAR, HCAR e CD hanno un basso potere antiossidante, anche alla massima concentrazione utilizzata. Viceversa, i coniugati ciclodestrinici possiedono uno spiccato effetto antiossidante, variabile però tra i derivati. Pensiamo quindi che la coniugazione di CD in 3'-

OH causi aumenti significativi dell'attività antiossidante rispetto alle molecole parentali e che tale effetto è valido solo per i derivati di ANS e CAR.

5) E' stata dimostrata l'esistenza della finestra temporale di vulnerabilità cerebrale a seguito di un trauma cranico lieve ed è stato possibile graduare biochimicamente diversi tipi di trauma. Inoltre, in atleti concussi è stato possibile dimostrare per la prima volta che il metabolismo cerebrale (misurato attraverso la risonanza magnetica spettroscopica) subisce modificazioni reversibili post-traumatiche che si normalizzano ben oltre la normalizzazione della sintomatologia clinica tipiche della concussione.

6) E' stata dimostrata l'efficacia del trattamento con acido folico nell'ischemia e riperfusione cardiaca, attraverso la valutazione di parametri metabolici e rappresentativi di stress ossidativo.

Pubblicazioni più significative nel periodo 2006-2008

1) De Pinto V.; Tomasello F; Messina A; Guarino F; Benz R; La Mendola D; Magri A; Milardi D; Pappalardo G. (2007). Determination of the conformation of the human VDAC-1 N-terminal peptide, a protein moiety essential for the functional properties of the pore. *Chembiochem*. Vol. 8. pp. 744-756. ISSN: 1439-4227

2) Guarino F; Specchia; V; Zapparoli G; Messina A; Aiello; R; Bozzetti M. P; De Pinto V.. (2006). Expression and localization in spermatozoa of the mitochondrial porin isoform 2 in *Drosophila melanogaster*. *Biochemical And Biophysical Research Communications*. Vol. 146. pp. 665-670

3) A.M. Pappalardo, V. Ferrito, A. Messina, F. Guarino, T. Patarnello V. De Pinto and C. Tigano (2008) Genetic structure of the killifish *Aphanius fasciatus*, Nardo 1827 (Teleostei, Cyprinodontidae), results of mitochondrial DNA analysis *J. of Fish Biology*, 72, 1154-1173

4) Specchia V, Guarino F, Messina A, Bozzetti MP, De Pinto V. (2008) Porin isoform 2 has a different localization in *Drosophila melanogaster* ovaries than porin 1. *J Bioenerg Biomembr*. 2008 Aug 7. [Epub ahead of print]

5) De Pinto V, Reina S, Guarino F, Messina A (2008) Structure of the voltage dependent anion channel: state of the art. *J Bioenerg Biomembr*. 2008 Jul 31. [Epub ahead of print]

6) Takimoto E., Champion H.C., Li M., Ren S., Rodriguez E.R., Tavazzi B., Lazzarino G., Paolocci N., Wang Y., Kass D.A.. Oxidant Stress from Nitric Oxide Synthase-3 Uncoupling plays Major Role in Pathologic Remodeling to Pressure-load Cardiac Hypertrophy. (2005) *Journal of Clinical Investigation* 115:1221-1231.

7) Amorini A.M., Bellia F., Di Pietro V., Giardina B., La Mendola D., Lazzarino G., Sortino S., Tavazzi B., Rizzarelli E., Vecchio G. Synthesis and antioxidant activity of new homocarnosine beta-cyclodextrin conjugates. (2007) *Eur J Med Chem*. 42: 910-920.

8) Vagnozzi R., Tavazzi B., Signoretti S., Amorini A.M., Belli A., Cimatti M., Delfini R., Di Pietro V., Finocchiaro A., Lazzarino G. Temporal window of metabolic brain vulnerability to concussions: mitochondrial-related impairment - part I. (2007) *Neurosurgery* 61:379-388.

9) Tavazzi B., Vagnozzi R., signorette S., Amorini A.M., Belli A., Cimatti M., Delfini R., Di Pietro V., Finocchiaro A., Lazzarino G. Temporal window of metabolic brain vulnerability to concussions: oxidative and nitrosative stresses - part II. (2007) *Neurosurgery* 61:390-395.

10) Vagnozzi R., Signoretti S., Tavazzi B., Floris R., Ludovici A., Marziali S., Tarascio G., Amorini A.M., Di Pietro V., Delfini R., Lazzarino G. Temporal window of metabolic brain vulnerability to concussions: a pilot 1H-MRS study in concussed athletes – part III. (2008) *Neurosurgery* 62:1286–1296.

11) Belli F., Amorini A.M., La Mendola D., Vecchio G., Tavazzi B., Giardina B., Di Pietro V., Lazzarino G., Rizzarelli E., New glycosidic derivatives of histidine-containing dipeptides with antioxidant properties and resistant to carnosinase activity. (2008) *Eur J Med Chem*. 43: 373-380.

12) Moens A.L., Champion H.C., Claves M.J., Tavazzi B kaminski p.m., borgonjon d.j., van nassauw l., zyiman m., bedja d., wuyts f.l., elsaesser r.s., cos p., gabrielson k.l., lazzarino g., paolocci n., timmermans j.p., vrints c.j., kass d. High-dose folic acid pretreatment blunts cardiac dysfunction during ischemia coupled to maintenance of high-energy phosphates and reduces postreperfusion injury. (2008) *Circulation* 117: 1810-1819.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

- 1) Cristallizzazione e modelling delle isoforme VDAC2 e 3. Studi di docking con farmaci.
- 2) Analisi barcoding di sequenze marcatrici di specie di interesse alimentare.

3) Studio del metabolismo di N-acetilasparginato in vitro e in vivo e analisi approfondita del metabolismo cerebrale in atleti post-concussi

Collaborazioni internazionali in atto

Dr. Komelius Zeth, Department of Protein Evolution, Max Planck Institute for Developmental Biology, Tübingen, Germany

Prof. Rona R. Ramsay, Centre of Biomolecular Sciences, University of St Andrews, Scotland, UK

Prof. Nazareno Paolocci, Division of Cardiology, Johns Hopkins University, School of Medicine, Baltimore, MD, USA

Prof. Antonio Belli, Dept. Of Neurosurgery, National Hospital for Neurology and Neurosurgery, London, UK

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Confocal Microscope Olympus Fluo View 1000 (a disposizione, non di proprietà)

Thermoquest Finnegan HPLC con rivelatori UV e con Spettrometro di massa con probes ESI e APCI

Sistema per elettroforesi bidimensionale Bio-Rad basato su Protean 1000 IEF e vari sistemi di SDS-PAGE.

Real Time PCR Real Plex Eppendorf

Parole Chiave

Proteine canale transmembrana VDAC

Carnosinasi

DNA barcode

Trauma cranico

Ischemia e riperfusione cardiaca

Metabolismo energetico

Stress ossidativo

UNITA' DI RICERCA INBB
Napoli

Responsabile Scientifico

Alberto Di Donato

Linea di Ricerca

Biochimica ambientale, Microbiologia.

titolo

Studio di monoossigenasi multicomponente batteriche per il biorisanamento di ambienti contaminati da inquinanti aromatici

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Di Donato Alberto	PO	didonato@unina.it
-------------------	----	-------------------

Non Aderenti INBB

Cafaro Valeria	RU	vcafaro@unina.it
Notomista Eugenio	RU	notomist@unina.it
Izzo Viviana	RU	vizzo@unina.it
Scognamiglio Roberta	PT	roboscogn@unina.it
Alfieri Fabiana	PT	falfieri@unina.it
Smith Ornella	PT	osmith@unina.it
Pennacchio Francesca	DR	francesca.pennacchio@unina.it

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Biologia Strutturale e Funzionale, Università Federico II di Napoli,

Complesso Universitario Monte S'Angelo

Indirizzo via Cinthia 4 - 80136, Napoli

Telefono 081-679143

Fax 081-679233.

E-mail didonato@unina.it

Sezione INBB di appartenenza

Napoli

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

L'attività scientifica dell'unità di ricerca si è focalizzata sulla caratterizzazione biochimica e strutturale di monoossigenasi multicomponente isolate da *Pseudomonas sp. OXI*, un batterio in grado di mineralizzare numerosi composti inquinanti e per questo particolarmente indicato per interventi di biorisanamento. L'obiettivo principale consisteva nell'identificazione dei determinanti molecolari coinvolti nel rapporto struttura-funzione delle proteine in esame, al fine di procedere con la costruzione di proteine mutanti con regioselettività e specificità di substrato alterate per l'ampliamento della gamma di substrati inquinanti trasformabili da tali enzimi. L'unità di ricerca ha avuto inoltre come obiettivo quello di identificare le peculiarità strutturali della membrana esterna di *Ps. OXI* responsabili della resistenza del batterio ad ambienti inquinati. Tali conoscenze risultano fondamentali per la futura ottimizzazione di microorganismi ricombinanti utilizzabili per il biorisanamento. Infine, l'unità di ricerca si è proposta di identificare nuove attività metaboliche di interesse per il biorisanamento, isolando e caratterizzando nuovi microorganismi da ambienti inquinati.

Risultati ottenuti

- 1) Caratterizzazione biochimica e strutturale degli enzimi ToMO e PH da *Ps. sp. OX1* e definizione del loro ruolo metabolico nella degradazione dei composti aromatici;
- 2) Produzione e caratterizzazione di mutanti dell'enzima ToMO con regioselettività alterata;
- 3) Produzione e caratterizzazione di mutanti della catecolo 2,3-diossigenasi con alterata specificità di substrato;
- 4) Caratterizzazione delle peculiarità strutturali degli LPS del batterio *Pseudomonas sp. OX1* coinvolte nei meccanismi di resistenza del batterio ad alte concentrazioni di inquinanti aromatici e di coloranti azoici nell'ambiente;
- 5) Identificazione e caratterizzazione di nuove attività metaboliche batteriche per il biorisanamento di reflui inquinati.

Pubblicazioni più significative nel periodo 2006-2008

1) Leone S, Lanzetta R, Scognamiglio R, Alfieri F, Izzo V, Di Donato A, Parrilli M, Holst O, Molinaro A. The structure of the O-specific polysaccharide from the lipopolysaccharide of *Pseudomonas* sp. OX1 cultivated in the presence of the azo dye Orange II.

Carbohydr Res. 2008 Mar 17;343(4):674-84.

2) Sazinsky MH, Dunten PW, McCormick MS, DiDonato A, Lippard SJ.

X-ray structure of a hydroxylase-regulatory protein complex from a hydrocarbon-oxidizing multicomponent monooxygenase, *Pseudomonas* sp. OX1 phenol hydroxylase.

Biochemistry. 2006 Dec 26;45(51):15392-404.

3) Leone S, Molinaro A, Alfieri F, Cafaro V, Lanzetta R, Di Donato A, Parrilli M.

The biofilm matrix of *Pseudomonas* sp. OX1 grown on phenol is mainly constituted by alginate oligosaccharides.

Carbohydr Res. 2006 Oct 16;341(14):2456-61.

4) Leone S, Molinaro A, Alfieri F, Cafaro V, Lanzetta R, Di Donato A, Parrilli M.

The biofilm matrix of *Pseudomonas* sp. OX1 grown on phenol is mainly constituted by alginate oligosaccharides.

Carbohydr Res. 2006 Oct 16;341(14):2456-61.

5) Siani L, Viggiani A, Notomista E, Pezzella A, Di Donato A.

The role of residue Thr249 in modulating the catalytic efficiency and substrate specificity of catechol-2,3-dioxygenase from *Pseudomonas stutzeri* OX1.

FEBS J. 2006 Jul;273(13):2963-76.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

L'unità di ricerca si propone di caratterizzare nuove e peculiari attività metaboliche da batteri isolati in ambienti particolarmente inquinati. La caratterizzazione di tali attività degradative verrà affiancata dallo studio degli adattamenti fisiologici dei microorganismi in esame quali, ad esempio, modificazioni strutturali della membrana e/o produzione di biofilm. L'acquisizione di tali conoscenze consentirà la futura costruzione di biocatalizzatori ottimizzati -enzimi purificati o cellule intere- che siano in grado di decontaminare reflui inquinati da miscele complesse di idrocarburi.

Collaborazioni internazionali in atto

1) Prof Steven J. Lippard, Massachusetts Institute of Technology, Boston, MA, USA .

2) Prof Matthew H. Sazinsky, Pomona College, Claremont, CA, USA

3) Prof Manuel Rico, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), 28006 Madrid, Spain

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

- Spettrofotometro Cary 100 double beam, Varian
- Spettrofotometro Cary 50, single beam, Varian
- Biacore X, GE Healthcare
- HPLC con detector a fotodiodi, 2996, Waters
- Spettrometro di massa ad elettrospray, ZQ, Waters

Parole Chiave

Biorisanamento; Monoossigenasi; Ingegneria proteica

UNITA' DI RICERCA INBB
Napoli

Responsabile Scientifico

Faraone-Mennella Maria Rosaria

Linea di Ricerca

- Sistema di poli-ADPribosilazione in archeobatteri ed eucarioti (mammiferi e cefalopodi) e utilizzo di molecole bioattive nella diagnosi di malattie autoimmuni
- Ruolo della reazione di poli-ADPribosilazione nella modulazione delle struttura cromatinica, nella risposta cellulare al danno al DNA in relazione alla trasformazione neoplastica e all'apoptosi
- Nuove strategie per una diagnosi precoce di danno biologico associato all'uso di pesticidi, in linfociti periferici umani
- Ruolo della poli-ADPribosilazione in cellule di melanoma trattate con un peptide sintetico
- Identificazione di nuovi marcatori biologici nelle piante, come precoce segnale di danni indotti da metalli pesanti
- Danneggiamento per via radicalica di proteine contenenti residui solforati e formazione di lipidi trans in membrane modello

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Farina Benedetta	PO	farina@unina.it
Faraone-Mennella Maria Rosaria	PA	faraone@unina.it e-mail
De Maio Anna	RU	andemaio@unina.it

Non Aderenti INBB

Natale Emiliana	DR	emiliana81@alice.it
Porzio Elena	DR	e.porzio@alice.it

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Biologia Strutturale e Funzionale.

Indirizzo Via Cinthia Edificio 7 Monte Sant'angelo, 80126 Napoli

Telefono 081679131-132-136

Fax 081679233

E-mail farina@unina.it, faraone@unina.it, andemaio@unina.it

Sezione INBB di appartenenza

Napoli

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Gli obiettivi principali delle linee di ricerca sono stati:

- 1- Prendere in esame le capacità antigeniche dell'enzima ADPribosilante da *S. solfataricus*, nei riguardi di anticorpi presenti nel siero di pazienti affetti da Lupus Eritematoso Sistemico
- 2- Localizzare e caratterizzare l'attività ADPribosilante nel Sistema Nervoso Centrale (SNC) di *Octopus vulgaris* e definirne il meccanismo d'azione
- 3- Studiare il rischio di sviluppo di tumori in una popolazione sana di agricoltori esposti direttamente e non- a pesticidi, in cui l'attivazione del sistema di ADPribosilazione è conseguente all'induzione di danni al DNA
- 4- Studiare il ruolo dell'enzima ADPribosilante in cellule di melanoma A375, trattate con un peptide sintetico (NBD-peptide)
- 5- Analizzare il sistema ADPribosilante nelle foglie di *Q. ilex* cresciute in siti urbani e remoti e identificare quale/quale enzimi (PARP 1 e/o PARP 2) giochino un ruolo fondamentale nelle cellule vegetali
- 6- Studiare la correlazione dell'isomerizzazione *cis/trans* dei doppi legami dei lipidi insaturi con la degradazione radicalica di proteine contenenti amminoacidi

I risultati ottenuti per le diverse linee di ricerca sono stati i seguenti:

1. Nei sieri dei pazienti affetti da LES è stato definito che il metodo immunochimico è altamente sensibile nel seguire lo stato di remissione della malattia, in seguito a trattamento terapeutico
2. Nel Sistema Nervoso di *O. vulgaris*, è stato isolato e caratterizzato l'accettore covalente di ADPR (240kDa). Esso è costituito da due componenti proteiche, vPARP ed actina, legate mediante un ponte di poliADPribosio. L'actina in forma libera rappresenta anche come accettore non covalente di poliADPR.
3. La determinazione del NAD, substrato specifico della PARP, ha rappresentato un marcatore specifico per individuare situazioni di stress cellulare in cellule linfocitarie di agricoltori sani esposti a pesticidi
4. La PARP1 ha rappresentato un utile marcatore nel seguire il processo apoptotico, indotto in cellule di melanoma A375 trattate con il peptide sintetico. Quest'ultimo è in grado di inibire l'attività del
5. La PARP1 sembra rappresentare un nuovo agente diagnostico utile ad individuare uno stato di sofferenza delle piante in una fase precoce
6. Il danneggiamento di proteine solforate provoca la formazione di specie radicaliche centrate all'atomo di zolfo, ovvero tiil radicali RS*.

Pubblicazioni più significative nel periodo 2006-2008

Torreggiani A, Tamba M, Manco I, M.R. Faraone-Mennella, Ferreri C, Chatgialloglu C. Investigation of radical-based damage of rnase a in aqueous solution and lipid vesicles. *Biopolymers*. 81, 39-50 (2006)

faraone-Mennella MR, De Maio A, Petrella A, Romano M, Favalaro P, Gambacorta A, Lama L, Nicolaus B, Farina B. The (adp-ribosyl)ation reaction in thermophilic bacteria. *res microbiol*. 157:531-537, 2006 issn: 0923-2508.

Ferreri C, Manco I, Faraone-Mennella MR, Torreggiani A, Tamba M, Manara S, Chatgialloglu C. The reaction of hydrogen atoms with methionine residues: a model of reductive radical stress causing tandem protein-lipid damage. *Chembiochem*. 2006 nov;7(11):1738-44.

Faraone Mennella M.R, De Maio A, FARINA B. (2007). Vparp-protein interactions in the central nervous system (cns) of octopus vulgaris. *European journal of histochemistry*. Vol. 51/1, pp. 73 issn: 1121-760x.

M.r. Faraone Mennella, A. De maio, E. Natale e B. Farina. Vparp-protein interactions in the central nervous system (cns) of octopus vulgaris. *Eur. J. Histochem.*, 51/1, 73 (2007)

Faraone Mennella M.R, Farina B., Lapalombella R, Marini M, Margonato V, Veicsteinas A. (2007). The poly(adp-ribosyl)action system in the testes of trained and exercising rats. *European journal of histochemistry*. Vol. 51/1, pp. 74-75 issn: 1121-760x.

Faraone Mennella M.R, Ferone A, Cardone A, Venditti P, Di Meo, S, Farina B. (2007). Hyperthyroidism and poly(adp-ribosyl)ation in rat testis germ cell differentiation. *European journal of histochemistry*. Vol. 51/1, pp. 75 issn: 1121-760x.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Confermare che il sistema immunochimico da noi adottato è utile, rispetto ad altri metodi, nella diagnosi precoce del LES

Verificare il possibile coinvolgimento della poli-ADPribosilazione nella riorganizzazione citoscheletrica durante la rigenerazione delle sinapsi nel SNC di *O. vulgaris*

Identificare altri biomarcatori, oltre al NAD, per una diagnosi precoce della trasformazione neoplastica a livello linfocitario, in una definita popolazione di agricoltori

Studiare gli effetti del peptide sintetico, in relazione alla reazione di poliADPribosilazione, su altre linee cellulari di melanoma, confrontandoli con quelli ottenuti sulle cellule A375

Verificare la relazione tra poliADPribosilazione e regolazione dell'omeostasi energetica nelle piante

Studiare la correlazione tra specie radicaliche alle proteine e i processi di degenerazione cellulari nel corso di malattie umane ed all'invecchiamento

Collaborazioni internazionali in atto

Roy Jones. AFRC Badraham Institute Cambridge U.K

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Sistema cromatografico FPLC Akta (Amersham)

Scintillatore Beckman LS 6500

Personal Molecular Imager FX (Biorad) e apparato per acquisizione ed analisi d'immagine per biologia molecolare e biochimica (ChemiDoc XRS, BioRad)

Centrifughe Beckman, Ultracentrifughe Beckman L-70

Fotomicroscopio ZEISS con sistema di analisi dell'immagine

Spettrofotometro Nanodrop (CellBio)

Centrifuga concentratrice Chrint mod.RVCZ-18

SONICATORE Branson S-250D

Apparecchio per PCR a gradiente (Thermocycler, Eppendorf)

MICROMULINO VIBRANTE FRITSCH MOD. PILVERISETTE (LevanChimica)

Parole Chiave

Poli-ADPribosilaizione, NAD, agenti tossici, apoptosi, trasformazione neoplastica

UNITA' DI RICERCA INBB
Bologna

Responsabile Scientifico

Davide Maria Donati

Linea di Ricerca

Medicina Rigenerativa in ortopedia

titolo

Rigenerazione ossea nei difetti conseguenti a patologia tumorale

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Davide Maria Donati	RU	davide.donati@ior.it
---------------------	----	----------------------

Non Aderenti INBB

Enrico Lucarelli	A	enrico.lucarelli@ior.it
Barbara Dozza	BC	barbara.dozza@ior.it
Carla Divieto	BC	carla.divieto@ior.it
Giuseppina Tresca	BC	giuseppina.tresca@ior.it

Sede Unità di Ricerca

Modulo di Rigenerazione Tissutale Ossea, Istituto Ortopedico Rizzoli di Bologna

Indirizzo Via di Barbiano 1/10

Telefono 0516366595

Fax 0516366595

E-mail brl@ior.it

Sezione INBB di appartenenza

Bologna

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Il Modulo è dedicato alla chirurgia ortopedica ricostruttiva con finalità di ricerca in rigenerazione tissutale e comprende una attività clinica associata all'attività di Laboratorio. L'attività clinica si svolge presso la V Divisione di Chirurgia ortopedico-traumatologica ad indirizzo oncologico. Il modulo è dedicato al trattamento di pazienti che necessitano di ricostruzioni biologiche a partire dalle grandi perdite di sostanza ossea ed osteoarticolare causate dalla asportazione del tessuto tumorale, fino al riempimento delle cisti o cavità causate dal curettage chirurgico. Il modulo per la particolare complessità di queste patologie ha sviluppato competenze professionali e tecnologiche realizzabili solo in una struttura altamente specializzata.

L'attività del modulo si articola in ricerca, cura ed assistenza ed è finalizzata a:

- erogare servizi di ricerca per sviluppare prodotti biologici per la ricostruzione ossea ed il loro trasferimento nella pratica clinica;
- erogare prestazioni ortopedico-riabilitative per la ricostruzione di difetti ossei ad un bacino di utenza nazionale, nell'ottica della qualità dell'assistenza dal punto di vista sia tecnico professionale che dell'utente;
- erogare prestazioni di verifica della qualità del prodotto biologico che viene utilizzato in clinica.

Risultati ottenuti

Il modulo di Rigenerazione Tissutale Ossea si occupa di sviluppare un protocollo di terapia cellulare da utilizzare nel consolidamento di grossi difetti ossei in campo clinico. Il laboratorio ha sviluppato un farmaco biologico a base di cellule staminali mesenchimali che è stato testato in tre sperimentazioni pre-cliniche. Nell'arco degli ultimi 3 anni ha sviluppato e partecipato a tre protocolli pre-clinici che utilizzano cellule staminali nella ricostruzione di grossi difetti ossei, nel conferimento della stabilità alle protesi dell'anca e all'innalzamento del seno mascellare. L'attuale compito del modulo è quello di dimostrare l'efficacia del prodotto sviluppato con una sperimentazione clinica. In tal senso ha presentato ed ottenuto l'approvazione da parte dell'Istituto superiore di Sanità alla sperimentazione di fase I/II del prodotto sviluppato.

Pubblicazioni più significative nel periodo 2006-2008

1. Di Bella C, Lucarelli E, Fini M, Giardino R, Mercuri M, Donati D., The use of fluoride cement: preliminary experimental study and clinical application. CHIR ORGANI MOV. 2008 Apr;91(3):141-6. Epub 2008 May 21.
2. Perbal B, Zuntini M, Zambelli D, Serra M, Sciandra M, Cantiani L, Lucarelli E, Picci P, Scotlandi K., Prognostic value of CCN3 in osteosarcoma., Clin Cancer Res. 2008 Feb 1;14(3):701-9. [PubMed - in process]
3. D. Davide, M. Colangeli, S. Colangeli, C. Di Bella, M. Mercuri. (2008). Allograft-Prosthetic Composite in the Proximal Tibia After Bone Tumor Resection. CLINICAL ORTHOPAEDICS AND RELATED RESEARCH. vol. Feb;466 (2), pp. 459 - 465.
4. D. Donati, C. Zolezzi , P. Tomba , A. Viganò. (2007). Bone grafting: historical and conceptual review, starting with an old manuscript by Vittorio Putti. ACTA ORTHOPAEDICA. vol. Feb, 78(1), pp. 19 - 25.
5. D. Donati, JQ Yin , M. Colangeli, S. Colangeli , C. Di Bella , P. Bacchini , F. Bertoni. (2008). Clear cell chondrosarcoma of bone: long time follow-up of 18 cases. ARCHIVES OF ORTHOPAEDIC AND TRAUMA SURGERY. vol. Feb;128(2), pp. 137 - 142.
6. D.DONATI, J.YIN, C.DI BELLA, M.COLANGELI, G.BACCI, S.FERRARI, F.BERTONI, E. BARBIERI, M.MERCURI. (2007). Local and distant control in non-metastatic pelvic Ewing'sarcoma patients. SURGICAL ONCOLOGY. vol. 96 (1), pp. 19 - 25.
7. M. Colangeli , D. Donati , MG. Benedetti , F. Catani , E. Gozzi , E. Montanari , S. Giannini. (2007). Total knee replacement versus osteochondral allograft in proximal tibia bone tumours. INTERNATIONAL ORTHOPAEDICS. vol. Dec;31(6), pp. 823 - 829.
8. Pieri F, Lucarelli E, Corinaldesi G, Iezzi G, Piattelli A, Giardino R, Bassi M, Donati D, Marchetti C. (2008). Mesenchymal Stem Cells and Platelet- Rich Plasma Enhance Bone Formation in Sinus Grafting: A Histomorphometric Study in Minipigs, JOURNAL OF CLINICAL PERIODONTOLOGY. vol. 35, pp. 539 - 546.
9. W. Chang, M. Colangeli, S. Colangeli, C. Di Bella , E. Gozzi, D. Donati. (2007). Adult osteomyelitis: debridement versus debridement plus Osteoset T pellets. ACTA ORTHOPAEDICA BELGICA. vol. Apr, 73(2), pp. 238 - 243.
10. Pasquinelli G, Tazzari P, Ricci F, Vaselli C, Buzzi M, Conte R, Orrico C, Foroni L, Stella A, Alviano F, Bagnara GP, Lucarelli E., Ultrastructural characteristics of human mesenchymal stromal (stem) cells derived from bone marrow and term placenta., Ultrastruct Pathol. 2007 Jan-Feb;31(1):23-31. [PubMed - indexed for MEDLINE]

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Una volta determinata l'efficacia del prodotto sviluppato dall'analisi dei risultati ottenuti dal trial.

Verranno svolte delle ricerche per stabilire come rendere il prodotto maggiormente efficace. Esistono due approcci strategici:

- nel primo verranno svolti degli studi per valutare se i risultati ottenuti possono essere migliorati variando la posologia, nella fattispecie aumentando il dosaggio, o variando la tempistica di somministrazione.
- Nel secondo verranno svolti studi per determinare se il pre-trattamento delle cellule con un agente differenziante possa migliorarne l'efficacia

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

2 Cappe a flusso laminare

1 centrifuga refrigerata

4 Incubatori

1 bidone di azoto liquido

1 Microscopio ottico e a fluorescenza

1 Lettore di micropiastre colorimetrico, in fluorescenza e in chemiluminescenza

Parole Chiave

Rigenerazione tissutale, rigenerazione ossea, medicina rigenerativa, cellule staminali mesenchimali, colture cellulari

UNITA' DI RICERCA INBB
Napoli

Responsabile Scientifico

Michela Galdieri

Linea di Ricerca

- 1) Espressione e il ruolo funzionale del Fattore di Crescita Epatocitario (HGF) e del suo recettore (c-met) durante lo sviluppo prenatale e postatale della gonade maschile.
- 2) Effetti della microgravità sulla fisiologia testicolare.

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Galdieri Michela	PO	michela.galdierinina2.it
Ricci Giulia	RU	giulia.ricci.unina2.it
Catione Angiolina	RU	angela.catizoneniroma1.it

Sede Unità di Ricerca

Seconda Università di Napoli, Laboratori di Istologia

Indirizzo via L. Armanni 5 Napoli

Telefono 081 5665015

Fax 081-5665014

E-mail michela.galdieri@unina2.it

Sezione INBB di appartenenza

Napoli

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Il gruppo di ricerca si ha lavorato sul rilevamento dell'espressione del Fattore di Crescita Epatocitario (HGF) e del suo recettore (c-met) e del loro ruolo funzionale durante lo sviluppo embrionale e postatale della gonade maschile. Durante il triennio è stato anche studiato l'effetto della microgravità sulla citoarchitettura dell'epitelio seminifero e sul metabolismo delle cellule del Sertoli. 3) Effetti del diabete di tipo 1 sulla spermatogenesi di ratto.

Risultati ottenuti

Nel periodo considerato è stata continuata la ricerca in corso da parecchi anni riguardante l'espressione e il ruolo funzionale del Fattore di Crescita Epatocitario (HGF) e del suo recettore (c-met) durante lo sviluppo prenatale e postatale della gonade maschile. In particolare, durante tale periodo, sono stati evidenziati i tipi di cellule della gonade maschile che esprimono il recettore per l'HGF e il ruolo del fattore durante lo sviluppo postnatale del testicolo di ratto. Durante lo sviluppo prepubere del testicolo c-met è presente sulle cellule germinali ed è attivo funzionalmente in quanto influenza positivamente la proliferazione delle cellule germinali e previene l'apoptosi delle stesse cellule (J. Endocrinol. 2006). Tale ricerca è stata continuata prendendo in considerazione le cellule interstiziali del testicolo ed hanno chiarito che c-met è espresso nel compartimento interstiziale della gonade e, in particolare, nelle cellule del Leydig. Il recettore è funzionalmente attivo come dimostrato dai diversi effetti dell'HGF su tali cellule. La produzione di testosterone delle cellule del Leydig è infatti incrementata dalla somministrazione del fattore mentre l'apoptosi di tali cellule è diminuita in maniera significativa. L'inibizione dell'apoptosi è stata rilevata sia coltivando cellule isolate sia in colture d'organo. Con esperimenti di RT-PCR e di western blotting è stato dimostrato che la diminuzione dell'apoptosi è dovuta alla diminuzione della porzione attiva della caspasi-3. Tali dati sono stati pubblicati sulla rivista J. Andrology. Durante il 2007 sono stati conclusi anche gli esperimenti riguardanti gli effetti della microgravità sulla funzioni del testicolo che hanno dimostrato che la morfologia delle cellule del tubulo seminifero non sembra influenzata dalla microgravità mentre nell'interstizio il numero di cellule picnotiche aumenta sensibilmente in condizioni di microgravità e colpisce anche le cellule del Leydig. In microgravità l'attività funzionale delle cellule del Leydig viene alterata e si rileva una maggiore quantità di testosterone nel mezzo di coltura mentre le attività funzionali delle cellule del Sertoli non sembrano alterate (J. Endocrinol. Invest. 2008).

Pubblicazioni più significative nel periodo 2006-2008

Catizone A., Ricci G., Del Bravo J., Galdieri M.: HGF modulates survival and proliferation of germ cells during postnatal testis development J Endocrinol., 189, 2006, 137-146

Ricci G., Catizone A., Galdieri M.: Expression and functional role of hepatocyte growth factor and its receptor (c-met) during fetal mouse testis development. J Endocrinol., 191, 2006, 359-370

Del Bravo J., Catizone A., Ricci G., Galdieri M.: Hepatocyte growth factor modulates rat Leydig cell functions. J Andrology 28, 2007, 866-874

Ricci G., Catizone A., Esposito R., Galdieri M.: Direct effects of microgravity on testicular function: analysis of histological, molecular and physiologic parameters. J Endocrinol Invest 31, 2008, 229-237

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Si intende continuare lo studio atto a chiarire il ruolo del del Fattore di Crescita Epatocitario (HGF) e del suo recettore (c-met) durante lo sviluppo prenatale e postatale della gonade maschile. Si pensa di terminare uno studio precedentemente iniziato sugli effetti del diabete di tipo 1 sulla spermatogenesi di ratto.

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca)

Ultracriomicrotomo Reichert

Ultramicrotomo Reichert

Microscopi fluorescenza

Attrezzature complete per colture cellulari

Congelatore -86° C

Parole Chiave

Riproduzione, spermatogenesi, epitelio seminifero, cellule di Leydig, cellule del Sertoli,

UNITA' DI RICERCA INBB
Catania

Responsabile scientifico

Anna Maria Giuffrida Stella

Linee di Ricerca

Caratterizzazione della sequenza del gene per la proteina gliale fibrillare acida (GFAP), una proteina specifica del sistema nervoso, e studio dei meccanismi che ne regolano l'espressione tessuto-specifica.

Studi genetico-molecolari di recettori per neurotrasmettitori (recettori ionotropici e metabotropici per il glutammato) e regolazione della loro espressione in vitro (colture neuronali ed astrogliali) ed in vivo.

Ruolo dei geni della risposta primaria nel processo della morte cellulare programmata neuronale

Regolazione dell'espressione genica da parte di fattori di controllo della proliferazione cellulare in colture di astrociti e neuroni e ruolo di alcuni protooncogeni rapidamente indotti dopo attivazione recettoriale.

- Studio dei meccanismi molecolari alla base del processo di invecchiamento nel sistema nervoso centrale e in colture cellulari neuronali e/o astrogliali in condizioni di stress ossidativo, e in particolare:

- Individuazione e isolamento di geni la cui espressione è modificata significativamente, tramite l'applicazione della tecnica innovativa del "mRNA differential display".

- Studi sulle interazioni tra stato redox e regolazione dell'espressione di geni correlati con meccanismi di protezione cellulare.

- Studio dell'espressione di singole subunità nucleari e/o mitocondriali degli enzimi della catena respiratoria mitocondriale, nonché di specifici fattori di regolazione trascrizionale e post trascrizionale.

- Studio dell'attività e dell'espressione degli enzimi che partecipano alle difese antiossidanti cellulari: Se- e non-Se-glutazione perossidasi, glutazione reduttasi, catalasi, Mn-SOD e Cu/Zn-SOD.

- Dosaggio dell'attività e dell'integrità della PARP (poli-ADP-ribosio polimerasi) e del suo ruolo nella protezione dalla morte cellulare programmata (apoptosi) o dalla necrosi.

- Studio della attivazione della via di trasduzione del segnale JAK/STAT in colture primarie astrogliali di ratto in risposta a citochine (IFN-gamma) e tossine batteriche (LPS) ed espressione della forma inducibile della NOS (iNOS).

Ruolo delle heat-shock proteins (HSPs) nell'invecchiamento e nei processi neurodegenerativi

- Clonaggio genico ed analisi dell'espressione di proteine delle gap junctions (connessine) nel sistema nervoso dei roditori e dell'uomo.

titolo

Basi molecolari dei processi neurodegenerativi e dell'invecchiamento

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Anna Maria Giuffrida Stella	PO	amgsbioc@unict.it
Roberto Avola	PO	ravola@unict.it
Vincenza Barresi	PA	barregi@unict.it
Vittorio Calabrese	PO	calabres@unict.it
Maria Vincenza Catania	(RU - CNR)	mcatania@area.ct.cnr.it
Daniele Filippo Condorelli	PO	condorda@unict.it
Agata Copani	PA	acopani@katamail.com
Paola Dell'albani	(RU - CNR)	dealpa@area.ct.cnr.it
Vincenzo Giuseppe Nicoletti	PA	nicovigi@unict.it
Vittoria Spina-Purrello	RU	spinavitt@unict.it

Non aderenti INBB

Antonio Berretta	DR	antonioberretta@libero.it
Carmen Catalano	DR	carmencat@virgilio.it
Monia Cavallaro	DR	mariamonia.cavallaro@tin.it
Simona D'Antoni	DR	simonadantoni@yahoo.it
Rossana Greca	DR	rossana.greca@email.it
Giliberto Salvatrice	DR	s.giliberto@inwind.it
Eleonora Guagliano	DR	eleonoraguagliano@virgilio.it,
Davide Licciardello	DR	alsali@hotmail.it

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Scienze Chimiche, Sezione di Biochimica e Biologia Molecolare
Università degli Studi di Catania
Indirizzo Via Andrea Doria, 6 – 95125 Catania
Telefono 0957384074
Fax 095336990.
E-mail amgsbioc@mbox.unict.it

Sezione INBB di appartenenza

Catania

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

- regolazione dell'espressione genica di enzimi della catena respiratoria mitocondriale in patologie neurodegenerative e durante l'invecchiamento cerebrale; effetti dello stress ossidativo in vivo ed in vitro.
- ruolo protettivo delle stress protein (HSPs) nella neurotossicità .
- ruolo dell'ossido nitrico di origine gliale nella patogenesi della morte neuronale.
- ruolo della via di trasduzione del segnale JAK/STAT nell'espressione della iNOS.

- relazione tra la cNOS negli astrociti reattivi e il potenziamento della tossicità da attivazione dei recettori metabotropici del gruppo I in colture neuronali in presenza di glia.
- ruolo delle connessine nella patogenesi di diversi disordini neurodegenerativi.
- regolazione dell'espressione genica da parte di fattori di controllo della proliferazione cellulare in colture di astrociti e neuroni e ruolo di alcuni protooncogeni rapidamente indotti dopo attivazione recettoriale.

Risultati ottenuti

Durante i processi di invecchiamento è stato messo in evidenza un aumento della espressione delle HSP70, HSP32 (emeossigenasi) e delle HSP60 in diverse aree cerebrali di ratto ed una diminuzione del contenuto in Glutazione ridotto (GSH) e un aumento del Glutazione ossidato (GS-SG). Pertanto lo stato redox del glutatione sembra avere un ruolo importante nella modulazione dell'espressione genica delle HSPs.

Dopo induzione della NO sintasi in colture astrogliali mediante trattamento con LPS ed INFgamma è stato osservato:

- a) un incremento dell'espressione di enzimi della catena respiratoria mitocondriale (citocromo c ossidasi, ATP sintasi) sia a carico delle subunità proteiche che degli mRNA corrispondenti.
- b) un incremento dell'espressione delle HSP70 e delle HSP32 (emeossigenasi).

L'attivazione dei recettori mGlu del gruppo I potenzia la tossicità da NMDA nei granuli cerebellari in presenza di glia, che rilascia uno o più fattori tossici, escludendo che la NOS costitutiva espressa negli astrociti contribuisca ai fenomeni di eccitotossicità.

Una rapida attivazione della proteina STAT1 e correlazione temporale della fosforilazione delle proteine JAK2 e STAT1 e con la trascrizione del mRNA per l'IRF1 e per la iNOS, osservazione confermata tramite un inibitore specifico della fosforilazione di JAK2 in colture primarie astrogliali trattate con IFNgamma.

Per quanto riguarda l'espressione delle connessine è stata studiata la distribuzione del mRNA della connessina CX36 in aree selezionate del Sistema Nervoso Centrale umano: l'espressione più alta è stata riscontrata nell'oliva inferiore, dimostrando che l'espressione della CX36 persiste nell'adulto in neuroni specializzati.

Pubblicazioni più significative nel periodo 2006-2008

1. Barresi V, Fortuna CG, Garozzo R, Musumarra G, Scirè S, Condorelli DF. Identification of genes involved in the sensitivity to antitumour drug 17-allylamino,17-demethoxygeldanamycin (17AAG). *Mol Biosyst.* 2006 May;2(5):231-9.
2. Tomassoni D, Avola R, Mignini F, Parnetti L, Amenta F. Effect of treatment with choline alphoscerate on hippocampus microanatomy and glial reaction in spontaneously hypertensive rats. *Brain Res.* 2006 Nov 20;1120(1):183-90
3. Calabrese V, Sultana R, Scapagnini G, Guagliano E, Sapienza M, Bella R, Kanski J, Pennisi G, Mancuso C, Stella AM, Butterfield DA. Nitrosative stress, cellular stress response, and thiol homeostasis in patients with Alzheimer's disease. *Antioxid Redox Signal.* 2006 Nov-Dec;8(11-12):1975-86.
4. Copani A, Hoozemans JJ, Caraci F, Calafiore M, Van Haastert ES, Veerhuis R, Rozemuller AJ, Aronica E, Sortino MA, Nicoletti F. DNA polymerase-beta is expressed early in neurons of Alzheimer's disease brain and is loaded into DNA replication forks in neurons challenged with beta-amyloid. *J Neurosci.* 2006 Oct 25;26(43):10949-57.

5. Attanasio F, Cascio C, Fisichella S, Nicoletti VG, Pignataro B, Savarino A, Rizzarelli E. Trehalose effects on alpha-crystallin aggregates. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Mar 23;354(4):899-905.
6. Calabrese V, Mancuso C, Calvani M, Rizzarelli E, Butterfield DA, Stella AM. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat Rev Neurosci*. 2007 Oct;8(10):766-75.
7. Mudo G, Trovato-Salinaro A, Caniglia G, Cheng Q, Condorelli DF. Cellular localization of mGluR3 and mGluR5 mRNAs in normal and injured rat brain. *Brain Res*. 2007 May 29;1149:1-13. 27.
8. Calabrese V, Mancuso C, Ravagna A, Perluigi M, Cini C, De Marco C, Butterfield DA, Stella AM. In vivo induction of heat shock proteins in the substantia nigra following L-DOPA administration is associated with increased activity of mitochondrial complex I and nitrosative stress in rats: regulation by glutathione redox state. *J Neurochem*. 2007 May;101(3):709-17.
9. Nicoletti VG, Santoro AM, Grasso G, Vagliasindi LI, Giuffrida ML, Cuppari C, Purrello VS, Stella AM, Rizzarelli E. Carnosine interaction with nitric oxide and astroglial cell protection. *J Neurosci Res*. 2007 Aug 1;85(10):2239-45.
10. Campisi A, Bramanti V, Caccamo D, Li Volti G, Cannavò G, Currò M, Raciti G, Galvano F, Amenta F, Vanella A, Ientile R, Avola R. Effect of growth factors and steroids on transglutaminase activity and expression in primary astroglial cell cultures. *J Neurosci Res*. 2008 May 1;86(6):1297-305.
11. Caraci F, Battaglia G, Busceti C, Biagioni F, Mastroiacovo F, Bosco P, Drago F, Nicoletti F, Sortino MA, Copani A. TGF-beta1 protects against A beta-neurotoxicity via the phosphatidylinositol-3-kinase pathway. *Neurobiol Dis*. 2008 May;30(2):234-42.
12. Spina-Purrello V, Patti D, Giuffrida-Stella AM, Nicoletti VG. Parp and Cell Death or Protection in Rat Primary Astroglial Cell Cultures Under LPS/IFNgamma Induced Proinflammatory Conditions. *Neurochem Res*. 2008 Aug 29.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Approfondire e ampliare gli studi durante l'invecchiamento e in diversi processi neurodegenerativi sulle modificazioni dell'espressione:

- 1) dei geni nucleari e mitocondriali che codificano per proteine della catena respiratoria mitocondriale;
- 2) delle diverse proteine da stress (Heat-Shock Proteins) e in particolare delle HSP70, HSP32, HSP60;
- 3) della Poli-ADP-ribosio polimerasi (PARP);
- 4) delle connesine;
- 5) dei processi di trasduzione del segnale (JAK-STAT).

Collaborazioni internazionali in atto

- Prof. Jean De Vellis, UCLA Mental Retardation Res. Center, Los Angeles, California (USA)
- Prof. Anders Hamberger, Institute of Neurobiology University of Goteborg, Sweden.
- Prof. Alan Butterfield, Sanders-Brown Center on Aging, University of Kentucky
- Prof. John Panavelas, University College of London UK

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Apparecchiature per Southern, Northern, Western blot
 PCR quantitativa in fluorescenza
 Spettrofotometri e spettrofluorimetri
 Microscopio a fluorescenza
 Microscopio confocale
 HPLC - MS

Parole Chiave

NOS ; JAK/STAT ; HSPs; PARP; Connesine

UNITA' DI RICERCA INBB
Catania

Responsabile Scientifico

Salvatore Guccione

Linea di Ricerca

Studi Computazionali Nel Campo Delle Life.Sciences

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Guccione Salvatore

Prof. Aggr

guccione@unict.it

Non Aderenti INBB

Giurato Laura

DR

edufarm@unict.it

Balzano Federica

PT

fb@dcci.unipi.it

Uccello-Barretta Gloria

PA

gub@dcci.unipi.it

Pignatello Rosari

PA

r.pignatello@unict.it;

pignatel@unict.it.

Basile Livia

DR

liviabasile82@yahoo.it

Galvano Fabio

PA

fgalvano@unict.it

Li Volti Giovanni

PA

livolti@unict.it

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento Di Scienze Farmaceutiche, Università Di Catania

Indirizzo: Viale A. Doria 6, Ed. 2, Città Universitaria, 95125 Catania

Telefono: 095738-4020

Fax: 095-443604

E-mail guccione@unict.it

Sezione INBB di appartenenza

Catania

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Obiettivo della ricerca è stata l' applicazione di metodi computazionale e la loro integrazioni con approcci "strumentali" per studi di di interesse biologico e farmaceutico (drug design e drug delivery):

1. Studi delle relazioni attività-struttura per lo sviluppo di nuove molecole di interesse farmaceutico.
2. Identificazione e sviluppo di molecole e sistemi molecolari di interesse terapeutico o diagnostico.
3. Targeting molecolare e delivery specifico di composti bioattivi.
4. Applicazione di tecniche computazionali e chemiometriche a problemi di natura agro-alimentare ed ambientale
5. Studi combinati NMR-computazionale su enantioselettività e discriminazione chirale
6. Interazioni tra macromolecole (Proteina-Proteina e DNA-Porfirine-Dendrimeri)

Risultati ottenuti

Risultati di particolare interesse sono stati ottenuti nella definizione delle modalità e specificità di binding di inibitori delle MAO a struttura imidazolinica e di nuovi possibili targets nella terapia antitumorale quali Istone Deacetilasi , Alcol Deidrogenasi β DNA Polimerasi.

La combinazione computazionale-NMR ha chiarito i determinanti di selettività nell' inclusione in differenti ciclodestrine (α, β, γ) della Molsidomina , farmaco ad azione vasodilatatrice NO mediata.

Nel drug delivery l'obiettivo generale della ricerca è stato quello di ottimizzare il profilo formulativo, farmacocinetico e terapeutico di farmaci attraverso due strategie: 1)la preparazione di coniugati e profarmaci con residui di lipoamino acidi (LAA) e 2)l'interazione con matrici polimeriche e lipidiche usate come carrier. L' interesse per i derivati LAA della tranilcipromina, vista l' azione su modelli di neuro- degenerazione, ha portato a proseguire il lavoro verificandone la permeabilità della barriera ematoencefalica.

Le interazioni Proteina-Proteina prese in esame riguardano lo studio di fattori implicati nella regolazione del sistema immunitario, in particolare Eme Ossigenasi-1, presenti nel latte materno, liquido amniotico e le loro implicazioni per il design di farmaci .

Lo studio e la razionalizzazione delle interazioni DNA-Dendrimeri (PAMAM)-Porfirine risulta interessante per lo sviluppo di nuove terapie anticancro viste le ben note proprietà delle porfirine ad interagire con biomacromolecole ed il loro uso in terapia antitumorale (es. PDT: Photodynamic Therapy), inibitori "in vitro" della aggregazione β -amiloide e come *biomarkers*.

Pubblicazioni più significative nel periodo 2006-2008

1- Rosario Pignatello, Salvatore Guccione, Francesco Castelli, Maria G. Sarpietro, Laura Giurato, Massimo Lombardo, Giovanni Puglisi and Istvan Toth.

Enhancement of drug affinity for cell membranes by conjugation with lipoamino acids: II. Experimental and computational evidence using biomembrane models.

Int. J. Pharmaceutics 310 (2006) 53–63.

2- C. Hildmann, D. Wegener, D. Riestler, R. Hempel, A. Schober, J. Merana, L. Giurato, S. Guccione, T.K. Nielsen, R. Ficner, A. Schwienhorst.

Substrate and inhibitor specificity of class 1 and class 2 histone deacetylases,

J. Biotechnol., 124, 258-270, 2006.

3- D. Mares, C. Romagnoli, E. Andreotti, G. Forlani, S. Guccione, C.B. Vicentini.

Emerging antifungal azoles and effects on Magnaporthe grisea.

Mycological Research 110, 2006, 686-696.

4- Tadeusz Z.E. Jones, Laura Giurato, Salvatore Guccione, and Rona R. Ramsay.

Interactions of imidazoline ligands with the active site of purified monoamine oxidase A.

FEBS Journal 274 (2007) 1567–1575.

5- Osman A.B.S.M Gani, Olayiwola A. Adekoya, Laura Giurato, Francesca Spyarakis, Pietro Cozzini, Salvatore Guccione, Jan-Olof Winberg, and Ingebrigt Sylte.

Theoretical Calculations of the Catalytic Triad in Short Chain Alcohol

Dehydrogenases/ Reductases.

Biophys J., 94, 2008, 1412–1427.

6- Gloria Uccello-Barretta, Federica Balzano, Silvia Bardoni, Letizia Vanni, Laura Giurato, Salvatore Guccione.

Chiral discrimination processes by C9 carbamate derivatives of dihydroquinine: interaction mechanisms of diastereoisomeric 9-O-[(S)- or (R)-1-(1-naphthyl) ethylcarbamate]dihydroquinine and the two enantiomers of N-(3,5-dinitrobenzoyl)alanine methyl ester.

Tetrahedron: Asymmetry 19 (2008) 1084–1093.

7- Nadège Piclin, Marco Pintore, Carmela Maria Lanza, Antonio Scacco, Salvatore Guccione, Laura Giurato, Jacques R. Chrétien.

Sensory Analysis on Red Wines: Discrimination by Adaptive Fuzzy Partition (AFP).

J. Sensory Studies, 23, 4, 2008, 558-569.

8- Copani, S. Guccione, L. Giurato, F. Caraci, M. Calafiore, M.A. Sortino, F. Nicoletti.

The cell cycle molecules behind neurodegeneration in Alzheimer's disease: perspectives for drug development, Current Medicinal Chemistry, in press 2008.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Prospettiva ed obiettivo sarà la costruzione di una piattaforma *in silico-in vitro* dove attraverso l'integrazione computazionale-sperimentale sia possibile seguire tutte le fasi della scoperta del farmaco ed affrontare studi nel settore agroalimentare ed ambientale mirando ad uno sviluppo concretamente "applicativo" delle linee di ricerca nella prospettiva di ulteriori partnerships e finanziamenti per la ricerca anche attraverso lo spinoff ETNALEAD.

Collaborazioni internazionali in atto

1) Prof. Antonio Monge-Vega. Unidad de I+D de Medicamentos. CIFA. Universidad de Navarra. España.

2) Prof. Keith K. Parker, Department of Pharmaceutical Sciences Skaggs School of Pharmacy- University of Montana, Missoula, Montana, USA.

3) Prof. Rona R. Ramsay, School of Biology, Centre for Biomolecular Sciences University of St. Andrews, Scotland, U.K.

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

1) Computers (PCs e Silicon Graphics Workstations) ad alte prestazioni

2) Calorimetro a scansione differenziale Mettler;

3) Spettrometro NMR Varian Innova 200 MHz;

4) HPLC Varian ProStar;

5) Spettrofotometro FT-IR Perkin-Elmer 1600.

Parole Chiave

Chimica Computazionale/Progettazione Razionale del Farmaco/Veicolazione di Farmaci/ Interazioni Macromolecole/ Agroalimentare-Ambientale.

UNITA' DI RICERCA INBB
Napoli

Responsabile Scientifico

Gaetano Irace

Linea di Ricerca

Folding e misfolding di proteine. Studio dei meccanismi molecolari responsabili della formazione degli aggregati amiloidi e loro patogenicità.

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Gaetano Irace	PO	gaetano.irace@unina2.it
Ivana Sirangelo	RU	ivana.sirangelo@unina2.it

Non Aderenti INBB

Silvia Vilasi	DR	vilasi@fisica.unipg.it
Clara Iannuzzi	DR	clara.iannuzzi@unina2.it

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Biochimica e Biofisica – II Università degli Studi di Napoli.

Indirizzo via L. De Crecchio 7 - 80138 Napoli

Telefono Fax. 081/5665863

E-mail gaetano.irace@unina2.it

Sezione INBB di appartenenza

Napoli

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Un'intera classe di malattie legate a "misfolding" e aggregazione di proteine (amiloidosi) è associata alla presenza, in diversi tessuti, di depositi amiloidi di proteine/peptidi organizzati in fibre con una caratteristica struttura cross-beta. Sono note circa 25 diverse amiloidosi, ciascuna associata a una specifica proteina che, in varie condizioni, polimerizza in aggregati oligomericici che si organizzano in fibre amiloidi. La conversione di proteine globulari in aggregati fibrillari insolubili richiede cambiamenti conformazionali che in genere sono facilitati da mutazioni amminoacidiche che destabilizzano lo stato nativo o aumentano la flessibilità strutturale della catena peptidica; tuttavia altre proteine sono amiloidogeniche nella forma wild type. La caratterizzazione strutturale delle fibrille amiloidi e dei loro intermedi è cruciale per ottenere informazioni sulla patogenesi delle amiloidosi e per sviluppare strategie per prevenire o contrastare l'aggregazione proteica. Quest'ultimo è un processo complesso, che può originare diversi quadri di aggregazione e quindi differenti morfologie e proprietà degli aggregati.

La nostra ricerca si è focalizzata su i seguenti aspetti dell'aggregazione amiloide che utilizza quale modello proteico il mutante W7FW14F di mioglobina che ha la caratteristica peculiare di formare fibrille in condizioni fisiologiche:

1) Caratterizzazione dei meccanismi molecolari che causano la formazione di aggregati fibrillari; 2) delucidazione del rapporto struttura-citotossicità degli aggregati ed effetto di sostanze ad azione antiaggregante sul processo di aggregazione e patogenicità; 3) aspetti biochimici e cellulari della patogenicità degli aggregati amiloidi.

I risultati relativi al primo aspetto della ricerca hanno messo in evidenza che la specie molecolare da cui parte il processo di aggregazione dell'apomioglobina amiloidogena è una conformazione "native-like" con elementi di struttura alfa elicoidale in grado di legare il gruppo prostetico. Questa conformazione rivelata nei primissimi stadi del processo di aggregazione risulta poco stabile; si stabiliscono interazioni intramolecolari a cui segue la transizione in conformazione beta e il successivo formarsi delle fibrille amiloidi.

Per quanto riguarda il secondo aspetto sembra ormai evidente che le specie realmente tossiche sono gli aggregati pre-fibrillari, mentre le fibrille mature sembrano rappresentare uno stadio finale stabile e non tossico dell'aggregazione. L'importanza di tale considerazione è evidente; qualunque approccio farmacologico al trattamento delle amiloidosi non deve essere mirato ad inibire la crescita delle fibrille ma piuttosto a evitare la comparsa di monomeri "misfolded" e dei loro oligomeri tossici e/o a potenziare l'efficienza dei meccanismi di difesa contro misfolding e aggregazione. Lo studio dell'effetto di sostanze ad azione antiaggregante si sono concentrati sul trealosio, un disaccaride che sembra avere un effetto protettivo su sistemi cellulari modello. I risultati ottenuti hanno dimostrato che il disaccaride possiede la capacità di inibire il processo di fibrillizzazione (cioè la formazione delle fibrille mature) ma non il processo di aggregazione, mantenendo gli aggregati amiloidi nella forma di oligomeri che sono altamente citotossici.

Infine, per la fase del progetto di ricerca indirizzata allo studio della patogenicità degli aggregati amiloidi, i risultati hanno evidenziato che le cellule esposte agli aggregati tossici subiscono alterazioni biochimiche che portano

all'attivazione di specifiche vie di segnalazione e ad un forte stress ossidativo che innescano la morte cellulare per apoptosi.

Per lo svolgimento delle indagini di folding sono state utilizzate tecniche spettroscopiche, quali fluorescenza e dicroismo circolare, mentre per lo studio dell'aggregazione sono state impiegate metodiche di colorazione specifica, microscopia a forza atomica e light scattering statico e dinamico. Gli studi di patogenicità sono stati effettuati su cellule in coltura utilizzando saggi di vitalità cellulare, FACS e marcatori biochimici di apoptosi e ROS.

Publicazioni più significative nel periodo 2006-2008

- 1) Vilasi, S., Dosi, R., Iannuzzi, C., Malmo, C., Parente, A., Irace, G., Sirangelo, I. (2006) "Kinetics of amyloid aggregation of mammal apomyoglobins and correlation with their amino acid sequences". *FEBS Letters* 580, 1681-1684.
- 2) Iannuzzi, C., Vilasi, S., Portaccio, M., Irace, G., Sirangelo, I. (2007) "Heme binding inhibits the fibrillization of amyloidogenic apomyoglobin and determines lack of aggregate cytotoxicity." *Protein Sci.* 16(3),507-16.
- 3) Vilasi, S., Iannuzzi, C., Portaccio, M., Irace, G., Sirangelo, I. (2008) "Effect of trehalose on W7FW14F apomyoglobin and insulin fibrillization: new insight into inhibition activity." *Biochemistry* 47(6), 1789-96.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

L'attività di ricerca di questa Unità continuerà ad esaminare i meccanismi biochimici e molecolari coinvolti nella tossicità degli aggregati amiloidi. Utilizzando tecniche di proteomica, si vorrà valutare il pannello di espressione proteica in diversi modelli cellulari dopo trattamento con gli aggregati amiloidi o in sistemi cellulari che direttamente esprimono la proteina amiloide. Il riconoscimento e la caratterizzazione delle proteine differenzialmente espresse sono potenzialmente in grado di fornire delle indicazioni sulle vie biochimiche coinvolte nei meccanismi di neurodegenerazione e determinare dei marker biochimici e dei possibili target farmacologici.

Inoltre, si valuterà l'effetto della presenza di superfici sull'aggregazione proteica e sulla citotossicità degli aggregati amiloidi. L'effetto delle superfici sull'aggregazione proteica e sulla tossicità degli aggregati è un tema emergente che sta ricevendo crescente attenzione; infatti, gli studi di aggregazione in vitro devono tener conto dell'effetto delle superfici che caratterizzano l'affollato ambiente in cui le proteine vengono sintetizzate e svolgono le loro funzioni.

Il processo di aggregazione amiloide dei peptidi/proteine modello sarà studiato a livello molecolare in soluzione libera e in presenza di superfici biologiche quali glicosaminoglicani (eparina, destrano) e vescicole di membrane cellulari.

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

1. spettrofotometro Jasco V550;
2. spettrofluorimetro Perkin -Elmer Mod PE LS 55;
3. apparecchio per elettroforesi su gel di poliacrilammide accessoriatto Bio-Rad;
4. FTIR
5. Spettro polarimetro Jasco J-810
6. Calorimetro Setaram
7. FACS

Parole Chiave

Proteine: folding, misfolding e aggregazione proteica; fibrille amiloidi; patogenicità degli aggregati amiloidi.

UNITA' DI RICERCA INBB
Firenze

Responsabile Scientifico

Mario Maggi

Titolo

“Role of inflammation in RhoA/ROK pathway activation and elocalcitol vs calcitriol-dependent modulation in BPH cells”; “Effects of Elocalcitol vs calcitriol on smooth muscle cells from urethral strips”; “IL-8 and male infertility”.
(attività di ricerca BioXell Spa);
Research Project Agreement: “Erectile dysfunction (ED)” (attività di ricerca Intercept Italia Srl)

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Maggi Mario	PO	m.maggi@dfc.unifi.it
-------------	----	----------------------

Non Aderenti INBB

Filippi Sndra	RU	sandra.filippi@unifi.it
Morelli Annamaria	RU	a.morelli@dfc.unifi.it
Vignozzi Linda	A	l.vignozzi@dfc.unifi.it
Fibbi Benedetta	DR	benedetta.fibbi@unifi.it
Silvestrini Enrico	A	enrico.silvestrini@gmail.com
Chalvamane Aravinda	DR *	aravinda.chalvamane@unifi.it

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento Di Fisiopatologia Clinica Unità Di Andrologia Università Di Firenze

Indirizzo Viale G. Pieraccini, 6 50139 Firenze

Telefono 055 4271415

Fax 055 4271413

E-mail m.maggi@dfc.unifi.it

Sezione INBB di appartenenza

Bologna

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Il ligando naturale e gli agonisti sintetici del recettore della Vitamina D (VDR) sono noti per la loro capacità di regolare la proliferazione e la differenziazione di molti tipi cellulari. Il VDR è espresso, infatti, da molti tipi cellulari incluse le cellule del sistema urogenitale, quali le cellule prostatiche e di vescica. L'obiettivo della nostra ricerca è stato duplice: 1) analizzare la capacità degli agonisti del VDR nel trattamento dell'iperplasia prostatica benigna (BPH), una sindrome caratterizzata da un aumentato volume prostatico (componente statica) e da una componente dinamica responsabile dei sintomi irritativi urinari dell'iperattività vescicale; 2) analizzare il loro meccanismo di azione.

Risultati ottenuti

Dati preclinici hanno dimostrato che gli agonisti del VDR e in particolare il BXL-628 (Elocalcitol) riducono la componente statica del BPH inibendo l'attività di fattori di crescita intra-prostatici, mediante un meccanismo indipendente dal recettore androgenico. Inoltre, uno studio clinico di fase II ha dimostrato che il BXL-628 è in grado di arrestare la crescita prostatica in pazienti affetti da BPH. Inoltre, studi in vitro in cellule muscolari lisce derivate dal collo vescicale di pazienti operati per BPH (hBC) hanno dimostrato che anche la vescica può essere un bersaglio degli analoghi della Vitamina D. Infatti, l'esposizione cronica al BXL-628 previene le modificazioni fenotipiche delle cellule muscolari lisce sottostanti la iperattività vescicale. Mediante studi in vitro in cellule hBC e in modelli animali di vescica iperattiva abbiamo dimostrato che il BXL-628 inibisce il meccanismo di contrazione mediato dalla via RhoA/Rho chinasi. Successivamente abbiamo dimostrato che il BXL-628 regola i canali del calcio L-type, che insieme alla via RhoA/Rho chinasi, rappresentano il principale meccanismo contrattile coinvolto nel muscolo liscio vescicale. Tali risultati suggeriscono un possibile uso clinico degli analoghi della Vitamina D nel trattamento dell'alterata contrattilità vescicale, spesso associata ai sintomi del basso tratto urinario indotti dal BPH.

Pubblicazioni più significative nel periodo 2006-2008

1: Morelli A, Squecco R, Failli P, Filippi S, Vignozzi L, Chavalmane AK, Fibbi B, Mancina R, Luciani G, Gacci M, Colli E, Francini F, Adorini L, Maggi M.

The vitamin D receptor agonist elocalcitol upregulates L-type calcium channel activity in human and rat bladder.
Am J Physiol Cell Physiol. 2008; 294(5):C1206-14.

2: Fibbi B, Morelli A, Marini M, Zhang XH, Mancina R, Vignozzi L, Filippi S, Chavalmane A, Silvestrini E, Colli E, Adorini L, Vannelli GB, Maggi M.

Atorvastatin but not elocalcitol increases sildenafil responsiveness in spontaneously hypertensive rats by regulating the RhoA/ROCK pathway.
J Androl. 2008; 29(1):70-84.

3: Adorini L, Penna G, Amuchastegui S, Cossetti C, Aquilano F, Mariani R, Fibbi B, Morelli A, Uskokovic M, Colli E, Maggi M.

Inhibition of prostate growth and inflammation by the vitamin D receptor agonist BXL-628 (elocalcitol).
J Steroid Biochem Mol Biol. 2007; 103(3-5):689-93.

4: Morelli A, Vignozzi L, Filippi S, Vannelli GB, Ambrosini S, Mancina R, Crescioli C, Donati S, Fibbi B, Colli E, Adorini L, Maggi M.

BXL-628, a vitamin D receptor agonist effective in benign prostatic hyperplasia treatment, prevents RhoA activation and inhibits RhoA/Rho kinase signaling in rat and human bladder.
Prostate. 2007; 15;67(3):234-47.

5: Maggi M, Crescioli C, Morelli A, Colli E, Adorini L.

Pre-clinical evidence and clinical translation of benign prostatic hyperplasia treatment by the vitamin D receptor agonist BXL-628 (Elocalcitol).
J Endocrinol Invest. 2006; 29(7):665-74. Review.

6: Schröder A, Colli E, Maggi M, Andersson KE.

Effects of a vitamin D(3) analogue in a rat model of bladder outlet obstruction.
BJU Int. 2006; 98(3):637-42.

7: Penna G, Mondaini N, Amuchastegui S, Degli Innocenti S, Carini M, Giubilei G, Fibbi B, Colli E, Maggi M, Adorini L.

Seminal plasma cytokines and chemokines in prostate inflammation: interleukin 8 as a predictive biomarker in chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome and benign prostatic hyperplasia.
Eur Urol. 2007; 51(2):524-33; discussion 533.

8: Marchiani S, Bonaccorsi L, Ferruzzi P, Crescioli C, Muratori M, Adorini L, Forti G, Maggi M, Baldi E.

The vitamin D analogue BXL-628 inhibits growth factor-stimulated proliferation and invasion of DU145 prostate cancer cells.
J Cancer Res Clin Oncol. 2006; 132(6):408-16.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Gli obiettivi futuri dell'Unità saranno duplici: 1) proseguire gli studi precedenti, convalidando, mediante opportuni studi clinici vari effetti, tra i quali gli effetti benefici di tale trattamento nei sintomi del basso tratto urinario associati a BPH. Dal punto di vista sperimentale valuteremo gli effetti degli analoghi della vitamina D sulla contrattilità dell'uretra; 2) valutare, in un modello animale di sindrome metabolica (associata a ipogonadismo e quindi a disfunzione erettile), gli effetti di ligandi selettivi del recettore FXR.

Collaborazioni internazionali in atto

Convenzione di Ricerca con Industria Farmaceutica Bayer HealthCare AG, Wuppertal, Germany (Dr. Peter Sandner)

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Attrezzatura completa per colture cellulari (cappa a flusso laminare, microscopio invertito, incubatori umidificati con controllo automatico di O₂ e CO₂, centrifuga refrigerata, contenitori per la crio conservazione di cellule e tessuti in azoto liquido, congelatore a -80°C)

Attrezzature per metodiche di biologia molecolare (estrazione di RNA e DNA, ABI PRISM® Sequence Detection System RT-PCR, Western blotting, Victor Perkin Elmer-Multilabel counter).

Attrezzatura per la valutazione della reattività vascolare in preparati isolati (in vitro) e in animali anestetizzati (metodiche in vivo): bagnetti per organi isolati in vitro, pompe peristaltiche, oscilloscopio, trasduttori, registratore, stimolatore, elettrodi bipolari.

Immunoistochimica (microscopio a fluorescenza, microscopio a contrasto di fase, macchina fotografica Nikon).

Microscopio Confocale.

Biochimica (apparecchiature per radioisotopi, spettrofotometro, spettrofluorimetro).

Parole Chiave

Iperplasia prostatica benigna (BPH), analoghi vitamina D, elocalcitolio, vescica, sindrome metabolica.

UNITA' DI RICERCA INBB
Roma

Responsabile Scientifico

Maria Marino

Linea di Ricerca

Meccanismi alla base dell'azione degli interferenti endocrini

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Marino Maria	PA	m.marino@uniroma3.it
Ascenzi Paolo	PO	ascenzi@uniroma3.it

Non Aderenti INBB

Pallottini Valentina	RU	vpallott@uniroma3.it
Galluzzo Paola	DR	pgalluzzo@uniroma3.it
Bulzomi Pamela	DR	pbulzomi@uniroma3.it
Bolli Alessandro	BC	abolli@uniroma3.it

Sede Unità di Ricerca

Università Roma Tre, Dipartimento Biologia
Indirizzo Viale G. Marconi, 446
Telefono 06 57336345
Fax 06 57336321

Sezione INBB di appartenenza

Roma

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Identificazione dei meccanismi molecolari alla base dell'azione degli ormoni estrogeni.

Analisi del ruolo svolto dai flavonoidi di origine nutrizionale come interferenti dell'attività dei recettori per gli estrogeni.

Identificazione dei meccanismi molecolari degli effetti antiestrogenici dei flavonoidi di origine nutrizionale

Risultati ottenuti

Definizione di nuovi meccanismi di azione degli ormoni estrogeni importanti per la progressione del ciclo cellulare.

Definizione delle diverse vie di trasduzione di segnale attivate dalle due isoforme dei recettori per gli estrogeni e il ruolo svolto nel mediare gli effetti proliferativi ed anti-proliferativi .

Individuazione dei determinanti molecolari che consentono la presenza dei recettori per gli estrogeni sulla membrana plasmatica e la loro associazione con proteine strutturali (caveolina) o di segnale (c-src).

Definizione della capacità di sostanze di origine nutrizionale di agire come modulatori meccanismo specifici dell'attività dell'isoforma α del recettore per gli estrogeni.

Pubblicazioni più significative nel periodo 2006-2008

1. Marino M, Ascenzi P, Acconcia F (2006) S-Palmitoylation modulates estrogen receptor α localization and functions. *Steroids* 71:298-303.
2. Marino M, Galluzzo P, Leone S, Acconcia F, Ascenzi P (2006) Nitric oxide impairs the 17 β -estradiol-induced apoptosis in human colon adenocarcinoma cells. *Endocr-Relat Cancer* 13: 559-569.
3. Ascenzi P, Bocedi A, Marino M (2006) Structure-function relationship of estrogen receptor α and β : impact on human health. *Mol Aspect Med* 27: 299-402.
4. Marino M, Ascenzi P (2006) Steroid hormone rapid signaling: the pivotal role of S-palmitoylation. *IUBMB Life* 58: 1-4.
5. Galluzzo P, Marino M (2006) Nutritional flavonoid impact on nuclear and extranuclear estrogen receptor activities. *Gene & Nutrition* 1:161-176.
6. Galluzzo P, Caiazza F, Moreno S, Marino M (2007) Role of ER α palmitoylation in the inhibition of human colon cancer cell proliferation. *Endocr-Relat Cancer* 14: 153-157.
7. Caiazza F, Galluzzo P, Lorenzetti S, Marino M (2007) 17 β -Estradiol induces ER α up-regulation via p38/MAPK activation in colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 359: 102-107.

8. Pravettoni A, Mornati O, Martini PG, Marino M, Colciago A, Celotti F, Motta M, Negri-Cesi P (2007) Estrogen receptor beta (ER β) and inhibition of prostate cancer cell proliferation: Studies on the possible mechanism of action in DU145 cells. *Mol Cell Endocrinol* 263: 46-54.
9. Marino M, Galluzzo P (2008) Are flavonoids agonists or antagonists of the natural hormone 17 β -estradiol? *IUBMB Life* 60: 241-244.
10. Marino M, Ascenzi P. (2008) Membrane association of estrogen receptor α and β influences 17 β -estradiol-mediated cancer cell proliferation. *Steroids* 73: 853-858.
11. Galluzzo P, Ascenzi P, Bulzomi P, Marino M (2008) The nutritional flavanone naringenin triggers antiestrogenic effects by regulating estrogen receptor α palmitoylation. *Endocrinology* 149: 2567-2575.
12. Ricupito A, Del Pozzo G, Diano N, Grano V, Portaccio M, Marino M, Bolli A, Galluzzo P, Bontempo P, Mita L, Altucci L, Mita DG (2008) Effect of Bisphenol A with or without enzyme treatment on the proliferation and viability of MCF-7 cells. *Environ Int* In press

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Studio delle vie di trasduzione del segnale attivate dagli ormoni estrogeni in tessuti che coesprimono le due isoforme recettoriali.

Valutazione degli effetti esercitati da sostanze inquinanti somministrate durante il differenziamento sulla predisposizione a neoplasie e possibili fattori protettivi naturalmente presenti nella dieta.

Valutazione degli effetti esercitati da sostanze inquinanti sul mantenimento dell'omeostasi del colesterolo

Studio della possibile differenza di genere nella suscettibilità ad inquinanti ambientali.

Collaborazioni internazionali in atto

Dr. Stephen R. Hammes, M.D., Ph.D., University of Texas Southwestern Medical Center, 5323 Harry Hines Boulevard, Dallas, Texas 75390-8857.

Prof. Elias Castanas, Laboratory of Experimental Endocrinology, University of Crete, School of Medicine, Heraklion, 71003, Greece

Prof. Guy Leclercq, Institut Jules Bordet, Bruxelles, Belgique

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Microscopio elettronico

Citofluorimetro

Spettrofluorimetro

HPLC

Apparecchio per organo isolati

Ultracentrifuga

Parole Chiave

Estrogeni, Recettori per gli estrogeni, Flavonoidi, Interferenti endocrini, Traduzione del segnale.

UNITA' DI RICERCA INBB
Firenze

Responsabile Scientifico:

Marco Mascini

Linea di Ricerca: Sviluppo di sensori e biosensori

titolo: Biosensori per applicazioni analitiche ...

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Mascini Marco	PO	marco.mascini@unifi.it
---------------	----	------------------------

Non Aderenti INBB

Marrazza Giovanna.	PA	giovanna.marrazza@unifi.it
Palchetti Ilaria	RU	ilaria.palchetti@unifi.it
Minunni Maria	RU	minunni@unifi.it
Tombelli Sara	RU	sara.tombelli@unifi.it
Laschi Serena	BC	serena.laschi@unifi.it

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Chimica , Università di Firenze

Indirizzo Polo Scientifico Via della Lastruccia 3, 50019, Sesto Fiorentino, Firenze, Italia

Telefono +39 0554573283

Fax+39 0554573384

E-mail mascini@unifi.it

Sezione INBB di appartenenza:

Bologna

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

L'Unità di Ricerca di Firenze si occupa da tempo della realizzazione di sensori e biosensori per applicazione in campo analitico.

I biosensori sono dispositivi analitici innovativi costituiti da un elemento biologico responsabile del riconoscimento molecolare in intimo contatto con un trasduttore di segnale. Tali dispositivi sono da tempo impiegati come sistemi rapidi di analisi per le più diverse problematiche che spaziano dall'analisi ambientale alla diagnostica clinica. Presso il laboratorio si sviluppano biosensori utilizzando vari sistemi di trasduzione per la realizzazione di biosensori elettrochimici, piezoelettrici ed ottici. I dispositivi realizzati sono sia di tipo catalitico sia di affinità: nel primo caso, come elementi responsabili del bioriconoscimento molecolare, sono impiegati enzimi mentre nel secondo si utilizza un anticorpo, un recettore, un acido nucleico. Per la realizzazione di tali dispositivi il laboratorio ha sviluppato un'esperienza specifica nella messa a punto di metodi di immobilizzazione di biomolecole su supporti solidi.

Il gruppo di ricerca, inoltre, ha sviluppato una notevole esperienza nella realizzazione di sensori elettrochimici, impiegabili tali e quali o come trasduttori nella realizzazione di biosensori. Come esempio citiamo gli elettrodi a membrana ionoselettivi per misure potenziometriche, e le celle elettrochimiche stampate monouso. Per la realizzazione di queste ultime il gruppo ha negli ultimi anni sviluppato notevole competenza nelle procedure di stampa serigrafia. Con l'impiego di tale tecnologia è stato possibile realizzare dispositivi analitici monouso, portatili, che permettono l'analisi rapida di matrici di diversa provenienza, e soprattutto, consentono di monitorare direttamente *in situ* l'analita.

Risultati ottenuti

I risultati sono stati molteplici e sono illustrati nelle pubblicazioni citate di seguito.

In particolare sono state sviluppate metodiche analitiche basate su biosensori acidi nucleici per la determinazione di allergeni alimentari e di aptasensori per applicazioni in campo clinico.

Sono stati sviluppati protocolli con nuove metodologie elettrochimiche ed ottiche quali microscopio a scansione elettrochimica e SPR imaging. Numerose sono state anche le presentazioni dei risultati scientifici ottenuti a congressi nazionali ed internazionali.

Pubblicazioni più significative nel periodo 2006-2008

- 1) F. Farabullini, F. Lucarelli, I. Palchetti, G. Marrazza, M. Mascini. Disposable Electrochemical Genosensor for the Simultaneous Analysis of Different Bacterial Food Contaminants, *Biosensors & Bioelectronics*, 22, (2007) 1544-1549.
- 2) A. Bini, M. Minunni, S. Tombelli, S. Centi, M. Mascini. Improved analytical performances of aptamer-based sensing for thrombin detection, *Analytical Chemistry* 79 (2007) 3016-3019.
- 3) S. Centi, S. Tombelli, M. Minunni, M. Mascini. Aptamer-based detection of plasma proteins by an electrochemical assay coupled to magnetic beads, *Analytical Chemistry* 79 (2007) 1466-1473.
- 4) S. Tombelli, M. Minunni, M. Mascini. Aptamers-based assays for diagnostics, environmental and food analysis, *Biomolecular Engineering*, 24 (2007) 191-200 .
- 5) M. Ravera, G. Bagni, M. Mascini, J. C. Dabrowiak, D. Osella. The activation of platinum(II) antiproliferative drugs in carbonate medium evaluated by means of a DNA-biosensor. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2007 (in press)
- 6) Palchetti Ilaria; Laschi Serena; Marrazza Giovanna; Mascini Marco. Electrochemical Imaging of Localized Sandwich DNA Hybridization Using Scanning Electrochemical Microscopy. *Analytical Chemistry*, (2007) 79(18), 7206-7213
- 7) D. Dell'Atti, M. Zavaglia, S. Tombelli, G. Bertacca, A.O. Cavazzana, G. Bevilacqua, M. Minunni, M. Mascini. Development of combined DNA-based piezoelectric biosensors for the simultaneous detection and genotyping of high risk Human Papilloma Virus strains. *Clinica Chimica Acta* 383 (2007) 140-146.
- 8) F. Lucarelli; S. Tombelli; M. Minunni; G. Marrazza. Electrochemical and piezoelectric DNA biosensors for hybridisation detection. *Analitica Chimica Acta* (2008) 609, 139-159.
- 9) S. Centi, G. Messina, S. Tombelli, I. Palchetti, M. Mascini. Different approaches for the detection of thrombin by an electrochemical aptamer-based assay coupled to magnetic beads. *Biosensors & Bioelectronics* (In press).
- 10) A. Bini, S. Centi, S. Tombelli, M. Minunni, M. Mascini. Development of an optical RNA-based aptasensor for C-reactive protein. *Analytical Bioanalytical Chemistry* (2008) 383, 140-146.
- 11) S. Laschi, D. Ogończyk, I. Palchetti, M. Mascini. Evaluation of pesticide-induced acetylcholinesterase inhibition by means of disposable carbon-modified electrochemical biosensors, *Enzyme and Microbial Technology*, 40(2007) 485-489
- 12) F. Bettazzi, S. Laschi and Marco Mascini. One-shot screen-printed thylakoid membrane-based biosensor for the detection of photosynthetic inhibitors in discrete samples. *Analytica Chimica Acta*, (2007), 589, 14-21

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Il gruppo di ricerca si occuperà di sviluppare e testare in campioni reali i biosensori basati su acidi nucleici elettrochimici, ottici (SPR) e piezoelettrici. Per la trasduzione elettrochimica verranno impiegate celle elettrochimiche monouso prodotte tramite serigrafia. Verranno sviluppati ulteriori protocolli basati su microscopio a scansione elettrochimica e SPR imaging. Specifiche sequenze oligonucleotidiche, aptameriche e non, verranno immobilizzate sui diversi trasduttori.

Collaborazioni internazionali in atto

CARE-MAN-2004-2009 - EU (FP6) IP017333

HealthCARE by biosensor Measurements And Networking

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Potenziostrati/Galvanostati/Potenzimetri /Microscopio scansione elettrochimica

Nanobalance

Strumentazione SPR/ Biacore

Stampante serigrafica

Termociclatori PCR

Parole Chiave

Sensori, Biosensori, Molecole Biologiche, DNA, Aptameri

UNITA' DI RICERCA INBB
Napoli

Responsabile Scientifico

Damiano Gustavo Mita

Linea di Ricerca

Macromolecole Biologiche Immobilizzate: Aspetti Fondamentali Ed Applicativi

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Damiano Gustavo Mita	PO	mita@igb.cnr.it mita@unina2.it
Maria Lepore	PA	maria.lepore@unina2.it
Marianna Portaccio	Ricercatore Universitario	marianna.portaccio@unina2.it
Nadia Diano	Ricercatore Universitario	diano@igb.cnr.it
Valentina Grano	PhD	grano@igb.cnr.it

Non Aderenti INBB

Umberto Bencivenga	PT - CNR	benciven@igb.cnr.it
Sergio Rossi	PT - CNR	rossi@igb.cnr.it
Carla Nicolucci	BC	nicolucci@igb.cnr.it
Tiziana Grimaldi	BC	tizianagrimaldi@micso.net
Mariangela Bianco	BC	mariangelabianco@hotmail.com
Daniela Di Tuoro	BC	

Sede Unità di Ricerca

a)- Dipartimento di Medicina Sperimentale – Facoltà di Medicina e Chirurgia – Seconda Università di Napoli

Indirizzo: Via S. Maria di Costantinopoli 16, 80138 – Napoli

Tel 081/5665822

Fax 081/5665822

E-mail mita@unina2.it , mita@igb.cnr.it

b)- Istituto di Genetica e Biofisica “Adriano Buzzati Traverso” del CNR

Indirizzo: Via Pietro Castellino, 111 – 80131 - Napoli

Tel 081/6132608

Fax 081/6132608 – 5665822

E-mail mita@unina2.it , mita@igb.cnr.it

Sezione INBB di appartenenza

Napoli

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

L'attività di ricerca svolta negli ultimi tre anni ha riguardato prevalentemente:

- 1) la progettazione, la costruzione e l'impiego di bioreattori (planari, a fibre cave o a letto impaccato) in processi biotecnologici di interesse ecologico, agroalimentare e clinico;
- 2) la progettazione, la costruzione e l'impiego di nuovi biosensori;
- 3) l'impiego di reattori non isotermi per la produzione di acqua superpura per uso clinico: dialisi renale o peritoneale;
- 4) studio dell'interazione tra campi elettromagnetici ed enzimi immobilizzati;
- 5) spettroscopia Raman e FT-IR.

Risultati ottenuti

1) Progettazione, costruzione ed impiego di bioreattori (planari, a fibre cave o a letto impaccato) in processi biotecnologici di interesse ecologico, agroalimentare e clinico.

1.1) Bioreattori planari

Membrane planari di natura idrofobica (Nylon, Teflon, Polipropilene) sono state trattate chimicamente o mediante reattori plasmico-chimici allo scopo di attivarle con opportuni gruppi reattivi. Su questi supporti sono stati successivamente immobilizzati gli enzimi di interesse, in presenza o in assenza di opportuni spaziatori. Una volta immobilizzati gli enzimi, le membrane, caratterizzate dal punto di vista biochimico (dipendenza dal pH, dalla

temperatura e dalla concentrazione del substrato), dal punto di vista biofisico (permeabilità idraulica e termoosmotica), sono state impiegate in bioreattori operanti in condizioni isoterme o non isoterme in processi di interesse nel:

1.1.a) Settore ecologico:

1.1.a.1) Trattamento di acque reflue inquinate: con laccasi immobilizzata.

Differenti tipi di membrane catalitiche sono state costruite immobilizzando laccasi da *Rhus Vernicifera* da utilizzare in processi di biorisanamento e disinquinamento di acque inquinate da composti fenolici. Come substrati modello al momento sono stati utilizzati idrochinone e catecolo. Anche con questo tipo di membrane è stato dimostrato che quando sono utilizzate in bioreattori non isoterme, l'efficacia del processo di disinquinamento cresce in maniera proporzionale all'entità del gradiente di temperatura applicato.

1.1.a.2) Biorisanamento di acque inquinate da interferenti endocrini

Come modello di interferenti endocrini abbiamo studiato il Bisfenolo A e la sua biodegradazione da parte dell'enzima laccasi da *Trametes versicolor* in bioreattori isoterme e non isoterme. In condizioni non isoterme la degradazione del BPA da parte della laccasi è risultata un centinaio di volte maggiore rispetto a quella ottenuta in condizioni isoterme, soprattutto a basse concentrazioni di BPA, ossia a concentrazioni plausibili nelle acque superficiali. L'attività di ricerca è continuata con la realizzazione e caratterizzazione biochimica e biofisica di 'trappole biotecnologiche' capaci di diminuire o rimuovere dalle acque inquinate la concentrazione di altre sostanze classificate come IE quali nonilfenolo e/o octilfenolo, appartenenti al gruppo degli alchilfenoli, e dimetilftalato, appartenente al gruppo dei ftalati. Sono stati utilizzati diversi tipi di enzima a secondo dell'interferente endocrino studiato. Laccasi e tirosinasi per gli alchilfenoli, lipasi per il dimetilftalato.

La verifica dell'avvenuto biorisanamento è stato accertato oltre che con le usuali tecniche analitiche (HPLC), con tecniche di biologia cellulare che permettono di valutare gli effetti biologici degli IE su opportune linee cellulari (ad esempio MCF-7) e di verificare l'avvenuto biorisanamento enzimatico.

1.1.b) Settore clinico.

Durante la circolazione extracorporea, ed in particolare durante l'emodialisi e/o le operazioni di bypass cardiopolmonare, vengono rilasciate delle proteasi in seguito alla degranolazione dei granulociti polimorfonucleati. Le proteasi in circolo producono danni infiammatori e/o gravi disfunzioni renali e/o polmonari. Sfruttando le interazioni proteasi/antiproteasi abbiamo immobilizzato su membrane planari l'inibitore di proteasi α_1 -antitripsina che, legando elastasi e/o catepsina, ha ridotto la concentrazione di queste proteasi nella soluzione in circolo, ponendo le basi per la riduzione del danno proteolitico da esse indotto. Quando impiegate con il plasma di pazienti sottoposti a bypass cardiopolmonare o a emodialisi queste trappole per proteasi hanno dimostrato una notevole capacità di abbattimento delle concentrazioni delle proteasi di interesse, anche in presenza di una miscela complessa come il plasma sanguigno. Questa attività di ricerca è stata svolta nell'ambito di un PRIN che ha visto il coordinamento da parte di questa unità operativa rispetto ad altre unità operanti a Genova (unità di Biochimica), Bologna (Unità di Bioinformatica) e nella Seconda Università di Napoli (Unità di Cardiocirurgia e di Nefrologia).

1.2) Bioreattori a letto impaccato.

Produzione di succhi di frutta limpidi.

Questa attività di ricerca si è sviluppata nell'ambito di un progetto PON che ha visto la collaborazione dell'INBB con la CIRIO Ricerche, prima, e successivamente con la EURECO, una società consortile che ha prelevato la CIRIO Ricerche. Nell'ambito di questa ricerca sono stati prodotti succhi di frutta limpidi di mele annurca utilizzando pectinasi fungine singole ed in miscele, sia in fase libera che immobilizzate su beads di Poliacrilonitrile (PAN) preparate e funzionalizzate ad hoc dall'Università di Burgas (Bulgaria), pellets di Nylon e microsfele di vetro. Tali supporti, una volta caratterizzati dal punto di vista biochimico e biofisico, sono stati impiegati in bioreattori a letto impaccato e fluidizzato, ottimizzando le rispettive condizioni operative.

2) Progettazione, costruzione ed impiego di nuovi biosensori.

2.1) Biosensori amperometrici

E' stato costruito un biosensore per la determinazione del glucosio in differenti range di concentrazione. I differenti range lineari sono stati ottenuti usando membrane di Nylon con pori di tre differenti diametri e sulle quali erano stati copolimerizzati due differenti monomeri, glicidil metacrilato e butil metacrilato.

Nell'ambito del nostro interesse per il risanamento di acque inquinate da interferenti endocrini abbiamo progettato e costruito biosensori, immobilizzando su opportuni supporti gli enzimi laccasi o tirosinasi. I processi ossidoriduttivi alla base della reazione enzimatica con l'interferente endocrino di interesse (BPA) danno origine ad un segnale elettrico proporzionale alla concentrazione dell'inquinante. Sono state impiegate diverse tipologie di carrier per l'immobilizzazione dell'enzima di interesse, in particolare sono stati costruiti biosensori a pasta di carbonio. La performance degli elettrodi è stata studiata in funzione del tipo di enzima utilizzato, del tipo di carbonio usato (polvere, nanotubi a singola parete, nanotubi a multi strato), dell'olio usato nel preparare la pasta, ed infine della presenza o meno di opportuni mediatori, che come noto, aumentano la velocità catalitica.

Questi biosensori hanno dato risultati soddisfacenti con sensibilità ed estensione del range di risposta lineare di interesse applicativo. C'è da segnalare che non esistono in letteratura esempi di costruzione di biosensori per il BPA. Queste tipi di biosensori sono stati prodotti nell'ambito di una attività di ricerca finanziata dall'ISPESL e dalla Regione Campania, assessorato per l'Ambiente.

2.2) Biosensori ottici

Si stanno progettando e realizzando biosensori di tipo ottico che utilizzino segnali di fluorescenza stazionari e risolti temporalmente per applicazioni in ambito clinico ed ambientale. In particolare si stanno studiando le varie fasi di immobilizzazione in sol-gel degli enzimi al fine di ottimizzare le condizioni di lavoro su fibra ottica.

3) Impiego di reattori non isotermi per la produzione di acqua superpura per uso clinico: dialisi renale o peritoneale.

Si è prodotta, mediante un unico processo, acqua da dialisi a partire da acqua di rubinetto. Questo obiettivo è stato perseguito mediante la realizzazione e la validazione di prototipi di reattori operanti in condizioni non isoterme che, utilizzando il processo della termodialisi, da noi brevettato, siano in grado di produrre acqua pura a partire da acqua di rete. Questi studi hanno evidenziato che l'acqua prodotta è priva di contaminanti chimici e biologici tale da renderla utilizzabile per le sedute di dialisi.

La purezza chimica dell'acqua prodotta è stata monitorata misurando le concentrazioni ioniche mediante un HPLC ionico. Per verificare la sterilità microbiologica ed endotossinica, si è fatto ricorso alla conta delle Unità Formanti Colonia ed al LAL test. Inoltre, si è pubblicato in merito alla possibilità di utilizzare questa nuova tecnologia per estrarre acqua pura dal liquido di scarto proveniente dalla dialisi peritoneale.

4) Studio dell'interazione tra campi elettromagnetici ed enzimi immobilizzati.

Sono stati condotti studi relativi all'interferenza di campi elettromagnetici di bassa frequenza (60 Hz) sull'attività di enzimi (glucosio ossidasi) allo stato solubile ed allo stato immobilizzato. Nel caso dell'immobilizzazione l'enzima è stato o intrappolato in un gel di agarosio o legato covalentemente ad una membrana di Nylon. Le due immobilizzazioni volevano simulare lo stato di immobilizzazione degli enzimi in vivo: intrappolamento nel citoplasma o legati nel doppio strato lipidico. Si è trovato che mentre il campo elettromagnetico accelera la disattivazione degli enzimi liberi, non presenta alcun effetto sugli enzimi immobilizzati.

Si è studiato inoltre l'effetto dei campi elettromagnetici sull'attività dell'enzima calpaina sia in fase libera che in globuli rossi di ratti normotesi ed ipertesi. Si è trovato che l'effetto del campo elettromagnetico era quello di mascherare l'effetto della concentrazione di ione calcio, attivatore e promotore dell'attività enzimatica.

5) Spettroscopia Raman e FT-IR.

Mediante la spettroscopia Raman sono stati studiati su campioni di tessuti biologici del cavo orale e campioni di siero e sangue liofilizzati al fine di mettere a punto tecniche diagnostiche di tipo non invasivo con particolare interesse per tecniche di analisi dei dati che consentano di estrarre informazioni di tipo quantitativo.

Inoltre, la spettroscopia Raman è stata anche applicata con successo a problematiche di interesse agro-alimentare (analisi composizione succhi di frutta).

Su campioni di interesse biotecnologico (resine e supporti per immobilizzazione) sono state condotte misure di microspettroscopia FT-IR. Mediante tale tecnica si sono effettuati studi per la caratterizzazione della struttura secondaria di proteine ed enzimi. In particolare si è posta l'attenzione sullo spettro dell'AMIDE I della mioglobina e si sono studiate le variazioni dello spettro durante la formazione di placche amiloidi

Finanziamenti ottenuti presso l'INBB nel periodo 2003-2007

ISPESL; Regione Campania; MIUR

Pubblicazioni più significative nel periodo 2006-2008

- 1) F. Salamino, R. Minafra, V. Grano, N. Diano, D.G. Mita, S. Pontremoli and E. Melloni. Effect of extremely low frequency magnetic fields on calpain activation. *Bioelectromagnetics*. 2006 Jan;27(1):43-50.
- 2) Grano V, Salamino F, Melloni E, Minafra R, Regola E, Diano N, Nicolucci C, Attanasio A, Nappi G, Cotrufo M, Maresca L, De Santo NG, Mita DG. Biotechnological traps for the reduction of inflammation due to cardiopulmonary bypass operations. *Biomaterials*. 27 (2006) 3855-3862
- 3) M.Portaccio, S. Di Martino, P. Maiuri, D. Durante, P. De Luca, M. Lepore, U. Bencivenga, S. Rossi, A. De Maio, D.G. Mita Biosensors for phenolic compounds: the catecol as a substrate model. *J. Mol. Catalysis B: Enzymatic* 41 (2006) 97-102.
- 4) N. Diano, V. Grano, L. Fraconte, P. Caputo, A. Ricupito, A. Attanasio, M. Bianco, U. Bencivenga, S. Rossi, I. Manco, L. Mita, G. Del Pozzo, D.G. Mita Nonisothermal bioreactors in enzymatic remediation of waters polluted by endocrine disruptors: the BPA as model of pollutant. *Applied Catalysis B: Environmental*. 69 (2007) 252-261
- 5) Diano N, Ettari G, Grano V, Gaeta FS, Rossi S, Bencivenga U, D'Alterio C, Ruocco G, Mita L, De Santo NG, Canciglia P, Mita DG. Nonisothermal reactors for the production of pure water from peritoneal dialysis waste waters. *Int J Artif Organs*. 2007 Jan;30(1):53-63.

- 6) Bartoli L, Calabrese R, Fariselli P, Mita DG, Casadio R. A computational approach for detecting peptidases and their specific inhibitors at the menoma level. BMC Bioinformatics 2007 Mar 8;8 Suppl 1:S3
- 7) M.Portaccio, D. Durante, A. Viggiano, S. Di Martino, P. Maiuri, P. De Luca, D. Di Tuoro, U. Bencivenga, S. Rossi, A. P. Canciglia, B. De Luca, D.G. Mita. Amperometric glucose determination by means of glucose oxidase immobilized on cellulose acetate film: dependence on the immobilization procedures Electroanalysis 19, 2007, N° 17, 1787-1793
- 8) Mita DG, Attanasio A, Arduini F, Diano N, Grano V, Bencivenga U, Rossi S, Amine A, Moscone D. Enzymatic determination of BPA by means of tyrosinase immobilized on different carbon carriers. Biosens Bioelectron. 2007 Aug 30;23(1):60-65. Epub 2007 Mar 25.
- 9) Camerlingo C, Zenone F, Delfino I, Diano N, Mita DG, Lepore M. Investigation on clarified fruit juice composition by using visible light micro-Raman spectroscopy. Sensors 2007, 7, 2049-2061.
- 10) S. Georgieva , T. Godjevargova, M. Portaccio , M. Lepore , D.G. Mita , Advantages in using non-isothermal bioreactors in bioremediation of water polluted by phenol by means of immobilized laccase from *Rhus vernicifera*, Journal of Macromolecular Catalysis: Enzymatic, 55 (2008) 177–184
- 11) Ricupito A., Del Pozzo G., Diano N., Grano V., Portaccio M., Marino M., Bolli A., Galluzzo P., Bontempo P., Mita L., Altucci L., Mita D. G. Effect of Bisphenol A and enzyme-treated Bisphenol A on the proliferation and vitality indexes of human breast MCF-7 cancer cells. Submitted on Environmental International.
- 12) Mita D.G., Diano N., Grano V., Portaccio M., Rossi S., Bencivenga U., Manco I., Nicolucci C., Bianco M., Grimaldi T., Mita L., Georgieva S., Godjevargova T. The process of thermodialysis in bioremediation of waters polluted by endocrine disruptors. 2008, Submitted on J. Mol. Catalysis B Enz.
- 13) Diano N., Grimaldi T., Bianco M., Rossi S., Gabrovska K., Yordanova G., Tzonka Godjevargova T., Grano V., Nicolucci C., Mita L., Bencivenga U., Canciglia P., Mita D. G. Pectin hydrolysis in apple juice by means of a mixture of pectolytic enzymes immobilized on PAN beads in fluidized or packed bed columns. 2008, Submitted on Journal Agr. Food Chem.
- 14) K. Gabrovska, I. Marinov, T. Godjevargova, M. Portaccio, M. Lepore, V. Grano , N. Diano, D. G. Mita, The influence of the support nature on the kinetics parameters, inhibition constants and reactivation of immobilized Achetylcholinesterase, International Journal of Biological Macromolecules (accepted), in press.
- 15) S. Georgieva , T. Godjevargova , N. Diano, V. Grano, D.G. Mita, Advantages in using non-isothermal bioreactors in enzymatic remediation of waste waters polluted by substituted phenol derivatives by means of immobilized laccase from *Trametes versicolor* , Process Biochemistry, 2008 (submitted).

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Le prospettive, ed i conseguenti obiettivi, per i prossimi anni, riguardano: 1) lo scale-up dei bioreattori attualmente in uso, bioreattori di dimensioni da laboratorio, a prototipi di tipo industriale; 2) la preparazione di membrane catalitiche sempre più efficienti e realizzate mediante la tecnica del grafting o con apparecchiatura plasmochimica; 3) la costruzione di supporti biocompatibili, caricati con inibitori di proteasi, da utilizzare durante la circolazione extracorporea per ridurre i danni da proteolisi indotti dalle proteasi in circolo; 4) la progettazione e costruzione di biosensori da utilizzare nella diagnostica clinica e/o on line in impianti di tipo industriale.

Collaborazioni internazionali in atto

4. Dr. Mohamed Mohy Eldin: Department of Polymers and Pigments – National Research Council – Dokki – Cairo - Egitto
5. Prof. J. Tramper: Food and Bioprocess Engineering Group – Agricultural University – Wageningen – The Netherlands
6. Prof. Nevenka Manolova – Institute of Polymer – Bulgarian Academy of Sciences – Sofia – Bulgaria
7. Prof. Tzonka Gojegargova – Chair of Biotechnologies – Faculty of Sciences – Burgas - Bulgaria

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

FT-IR – Apparecchiature generatrice di plasma – Gamma cell; Spettrofotometri; Assorbimento atomico; Gascromatografo – HPLC ionico - HPLC

Parole Chiave

Enzimi immobilizzati; Biotecnologie; Bioreattori; Biosensori; β -Galattosidasi; Ureasi; Laccasi; Tirosinasi; Pectinasi; Glucosio Ossidasi; Trappole per proteasi; Campi elettromagnetici; Interferenti endocrini; BPA; acqua ultra-pura.

UNITA' DI RICERCA INBB
Milano

Responsabile Scientifico

Paola Negri-Cesi

Linea di Ricerca

Interferenti endocrini e sistema riproduttivo

titolo

Interferenti endocrini, sviluppo neuronale e differenziazione sessuale del cervello: studi in vivo e in vitro

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Negri-Cesi Paola	PA	paola.negricesi@unimi.it
Celotti Fabio	PO	fabio.celotti@unimi.it
Colciago Alessandra	RU	alessandra.colciago@unimi.it

Non Aderenti INBB

Casati Lavinia	DR	lavinia.casati@unimi.it
Mornati Ornella	PT	ornella.mornati@unimi.it

Sede Unità di Ricerca

Istituto di Endocrinologia, Università degli Studi di Milano

Indirizzo via Balzaretti 9, 20133 Milano

Telefono +39 02 503 18243

Fax +39 02 503 18204

E-mail endomi@unimi.it

Sezione INBB di appartenenza

Milano

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi e risultati

E' noto che numerosi inquinanti ambientali, fra cui i bifenili policlorurati (PCB), interferiscono con la sintesi, il metabolismo e l'azione degli ormoni sessuali e che tali ormoni sono cruciali sia per la differenziazione dei caratteri sessuali primari e lo sviluppo dimorfico del sistema neuroendocrino durante l'epoca neonatale e puberale, sia nell'acquisizione e nel mantenimento delle caratteristiche sessuali nell'adulto. Poichè i PCB si accumulano nel tessuto adiposo e nel latte, la prole esposta durante il periodo gestazionale e l'allattamento può subire pesanti effetti avversi sul normale sviluppo e funzionamento dell'intero asse riproduttivo.

Questa Unità di ricerca studia da molti anni il meccanismo d'azione degli ormoni sessuali nel SNC, in particolare durante le sue fasi di sviluppo. Studi condotti sull'ipotalamo di ratto hanno dimostrato che il profilo di espressione degli enzimi aromatasi e 5alfa-riduttasi che convertono il testosterone nei suoi mediatori attivi (estradiolo e DHT) è dimorfico (Colciago et al. 2005). La stessa Unità ha inoltre dimostrato che il recettore degli arilidrocarburi (AhR), attivato dagli PCB coplanari diossino-simili è presente nell'ipotalamo in via di sviluppo e che la sua espressione viene stimolata dagli stessi PCB (Pravettoni et al. 2005). Gli studi si sono quindi focalizzati inizialmente sulla valutazione dell'impatto di aroclor 1254 su tali parametri, evidenziando che l'esposizione prenatale causa, già nell'animale neonato, modificazioni sesso-specifiche perlomeno di uno degli enzimi studiati. Parallelamente, studi in vitro condotti su neuroni ipotalamici hanno dimostrato che aroclor 1254 è un inibitore dell'attività di aromatasi (Colciago et al 2006). Successivamente, gli stessi ed altri parametri sono stati valutati in diverse fasi dello sviluppo (dalla nascita all'età adulta) in animali esposti dalla gestazione alla fine dell'allattamento ad una miscela ricostituita contenente i principali PCB ritrovati nel latte materno. Tali studi hanno evidenziato modificazioni importanti e sesso-specifiche dei parametri analizzati, che permangono anche nell'animale adulto; l'esposizione in alcuni casi ha abolito e in altri amplificato il normale profilo dimorfico. Da questi studi è inoltre emerso che l'esposizione può interferire con i meccanismi centrali che regolano la pubertà anticipandola nelle femmine e ritardandola nei maschi. (Negri-Cesi, submitted).

Pubblicazioni recenti sull'argomento:

- Colciago, F. Celotti, A. Pravettoni, O. Mornati, L. Martini, P. Negri-Cesi. *Develop. Brain Res* 155:107-116, 2005
- A. Pravettoni, A. Colciago, P. Negri-Cesi, S. Villa, F. Celotti. *Reprod Toxicol* 20: 521-530, 2005
- A. Colciago, P. Negri-Cesi, A. Pravettoni, O. Mornati, L. Casati, F. Celotti. *Reprod Toxicol* 22: 738-745, 2006
- P. Negri-Cesi, A. Colciago, F. Celotti. In "The Endocrine disruptors" (M. Marino e DG Mita Eds), Research Signpost/Transworld Research Network, Trivandrum, Kerala, India, pp. 67-93, 2007

- P. Negri-Cesia, A. Colciago, A. Pravettoni, L. Casati, L. Conti, F. Celotti. *J Steroid Biochem & Mol Biol* 109: 294–299, 2008

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

- 1- Approfondire i meccanismi neuroendocrini che innescano la pubertà, analizzando in vitro (neuroni GnRH-secernenti) e in vivo, se i PCB siano in grado di influenzare il sistema di kisspeptin.
- 2- Valutare gli effetti avversi dei PCB **a)** sulla differenziazione di cellule staminali neurali pluripotenti (cellule NSC murine) in neuroni e glia (immunopositività per specifici marker neuronali [beta-III tubulina] e gliali [GFAP]; microarray/real-time PCR); **b)** sul processo di mielinizzazione (valutazione dopo trattamento perinatale della proteina mielinica BMP e delle proteine ad essa associate [MAG, MAL e CXN32], analisi al microscopio dell'integrità delle guaine, valutazioni di parametri funzionali modificati da demielinizzazione).
- 3- Valutare la capacità dell'esposizione ai PCB di alterare la sopravvivenza neuronale (studio dell'attivazione dei processi di morte cellulare per apoptosi).
- 4- Valutare gli effetti epigenetici/transgenerazionali dell'esposizione prenatale, cioè la capacità di riprogrammare il pattern epigenetico della linea germinale durante la fertilizzazione o la gametogenesi modificando il grado di metilazione del DNA (variazioni della DNA-metiltransferasi), l'acetilazione di istoni (variazioni della istone-deacetilasi) e l'espressione di microRNA (collaborazione con il laboratorio del Dr. Esteller).

Obiettivo globale è quello di approfondire e ampliare le conoscenze sugli effetti pleiotropici dei PCB nel SNC in via di differenziazione.

Pubblicazioni più significative nel periodo 2006-2008

- F. Celotti, A. Colciago, P. Negri-Cesi, A. Pravettoni, R. Zaninetti, C. Sacchi: Effect of platelet-rich plasma on migration and proliferation of SaOS-2 osteoblasts: role of PGDF and TGF-beta. *Wound Repair and Regeneration* 14: 196-203, 2006
- A. Colciago, P. Negri-Cesi, A. Pravettoni, O. Mornati, L. Casati, F. Celotti. Prenatal aroclor 1254 exposure and brain sexual differentiation: effects on the expression of testosterone metabolizing enzymes and androgen receptors in the hypothalamus of male and female rats. *Reprod Toxicol* 22: 738-745, 2006
- A. Pravettoni, O. Mornati, P.G.V. Martini, M. Marino, A. Colciago, F. Celotti, M. Motta, P. Negri-Cesi. Estrogen receptor beta (ERbeta) and inhibition of prostate cancer cell proliferation: studies on the possible mechanism of action in DU145 cells. *Mol Cell Endocrinol* 263:46-54, 2007
- P. Negri-Cesi, A. Colciago, A. Pravettoni, L. Casati, L. Conti, F. Celotti: Sexual differentiation of the rodent hypothalamus: Hormonal and environmental influences. *J Steroid Biochem Mol Biol* 109: 294–299, 2008

Collaborazioni internazionali in atto

- Effetti epigenetici in vivo e in vitro dei PCB: Dr. Manel Esteller, Institut Català d'Oncologia, Direttore del Programma PEBC, Hospital Duran i Reynals, Barcellona, Spagna.

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Presso l'Istituto di Endocrinologia, di cui fa parte l'UR, sono disponibili:

- 1) attrezzature per studi di biologia cellulare, biologia molecolare e biochimica
 - apparecchiature per RT-PCR, Real-time PCR, sequenziamento DNA, elettroforesi mono e bi-dimensionale, fornetti per ibridazione, transilluminatori UV;
 - liofilizzatore, spettrofotometro, centrifughe e ultracentrifughe;
 - apparecchiature per cromatografia (HPLC, strato sottile, gas-massa per analisi di proteomica, sistema HPLC-chip);
 - luminometro Microbeta e fluorimetro Victor;
- 2) attrezzature per studi su colture cellulari:
 - cappe sterili, incubatori
 - microscopi a luce normale e in fluorescenza, analizzatore di immagini computerizzato, strumentazione per analisi time-lapse in microscopia (microscopio invertito a fluorescenza, telecamera CCD, software per acquisizione delle immagini in fluorescenza).

L'Unità dispone inoltre di stabulari e dei permessi per detenere piccoli animali di laboratorio

Parole Chiave

Esposizione perinatale a PCB; Ormoni sessuali; Sviluppo cerebrale; Pubertà; Epigenetica

UNITA' DI RICERCA INBB
Siena

Responsabile Scientifico:

Neri Niccolai

Linea di Ricerca Biostrumentazione e Bioelettronica

Titolo: Costruzione di modelli molecolari di proteineda dati spettroscopici NMR e calcoli teorici come base per la realizzazione di farmaci e diagnostici.

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Niccolai Neri	PO	niccolai@unisi.it
---------------	----	-------------------

Non Aderenti INBB

Spiga Ottavia	RU	spiga@unisi.it
Bernini Andrea	PT	Andrea.bernini@unisi.it

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Biologia Molecolare dell'Università di Siena.

Indirizzo via Fiorentina 1, 53100 Siena

Telefono 0577 234910.

Fax 0577 234903

E-mail niccolai@unisi.it

Sezione INBB di appartenenza:

Bologna

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi: Studio della struttura di proteine e della loro accessibilità superficiale allo scopo di disegnare mutanti ad attività modulata.

Risultati ottenuti: Vedi pubblicazioni elencate

Pubblicazioni più significative nel periodo 2006-2008

1. Staple DW, Venditti V, Niccolai N, Elson-Schwab L, Tor Y, Butcher SE. Guanidinoneomycin B recognition of an HIV-1 RNA helix. *Chembiochem*. 2008 Jan 4;9(1):93-102.
2. Venditti V, Niccolai N, Butcher SE. Measuring the dynamic surface accessibility of RNA with the small paramagnetic molecule TEMPOL. *Nucleic Acids Res*. 2008 Mar;36(4):e20.
3. Summa D, Spiga O, Bernini A, Venditti V, Priora R, Frosali S, Margaritis A, Di Giuseppe D, Niccolai N, Di Simplicio P. Protein-thiol substitution or protein dethiolation by thiol/disulfide exchange reactions: the albumin model. *Proteins*. 2007 Nov 1;69(2):369-78.
4. Falciani C, Lozzi L, Pini A, Corti F, Fabbrini M, Bernini A, Lelli B, Niccolai N, Bracci L. Molecular basis of branched peptides resistance to enzyme proteolysis. *Chem Biol Drug Des*. 2007 Mar;69(3):216-21.
5. Venditti V, Bernini A, De Simone A, Spiga O, Prischi F, Niccolai N. MD and NMR studies of alpha-bungarotoxin surface accessibility. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Apr 27;356(1):114-7. Epub 2007 Feb 27.
6. Spiga O, Padula MG, Scarselli M, Ciutti A, Bernini A, Venditti V, Prischi F, Falciani C, Lozzi L, Bracci L, Valensin PE, Caudai C, Niccolai N. Structurally driven selection of human hepatitis C virus mimotopes. *Antivir Ther*. 2006;11(7):917-22.
7. Bernini A, Spiga O, Venditti V, Prischi F, Bracci L, Tong AP, Wong WT, Niccolai N. NMR studies of lysozyme surface accessibility by using different paramagnetic relaxation probes. *J Am Chem Soc*. 2006 Jul 26;128(29):9290-1.
8. Bernini A, Spiga O, Ciutti A, Venditti V, Prischi F, Governatori M, Bracci L, Lelli B, Pileri S, Botta M, Barge A, Laschi F, Niccolai N. NMR studies of BPTI aggregation by using paramagnetic relaxation reagents. *Biochim Biophys Acta*. 2006 May;1764(5):856-62. Epub 2006 Apr 3.
9. Bernini A, Spiga O, Venditti V, Prischi F, Bracci L, Huang J, Tanner JA, Niccolai N. Tertiary structure prediction of SARS coronavirus helicase. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 May 19;343(4):1101-4. Epub 2006 Mar 23.
10. Pini A, Runci Y, Falciani C, Lelli B, Brunetti J, Pileri S, Fabbrini M, Lozzi L, Ricci C, Bernini A, Tonello F, Dal Molin F, Neri P, Niccolai N, Bracci L. Stable peptide inhibitors prevent binding of lethal and oedema factors to protective antigen and neutralize anthrax toxin in vivo. *Biochem J*. 2006 Apr 1;395(1):157-63.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Le ottime premesse per gli obiettivi citati delle ricerche di questa Unità Operativa ne fanno prevedere la continuazione almeno per i prossimi tre anni.

Collaborazioni internazionali in atto

Dr Arthur M Lesk, PennState University, Department of Biochemistry and Molecular Biology

Dr. Annalisa Pastore, MRC-NIMR London

Dr. Franca Fraternali, Randall Division of Cell & Molecular Biophysics, King's College, London

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Spettrometri NMR Bruker 400, 500 e 600 MHz

Parole Chiave

Struttura proteine, accessibilità di superfici molecolari, ingegnerizzazione di biomolecole

UNITA' DI RICERCA INBB
Parma

Responsabile Scientifico:

Ida Ortalli

Linea di Ricerca

Biofisica e fisica medica di sistemi complessi

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Bettati Stefano	PO	stefano.bettati@unipr.it
Croci Simonetta	RU	simonetta.croci@unipr.it
Ortalli Ida	PO	ida.ortalli@unipr.it
Pedrazzi Giuseppe	PA	giuseppe.pedrazzi@unipr.it
	BC	kaneluca.77@hotmail.com
Bruni Luca		
Vaccari Silvia	PT	silvia.vaccari@unipr.it

Sede Unità di Ricerca

Sezione di Fisica, Dipartimento di Sanità Pubblica, Università degli Studi di Parma

Telefono: 0521-033710 (Responsabile Scientifico); 0521-033711 (Segreteria)

Fax: 0521-033712

E-mail: ida.ortalli@unipr.it

Sezione INBB di appartenenza:

Milano

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

- 1) Studio delle proprietà dinamiche e funzionali di proteine in soluzione, in gel di silice e nel cristallo:
 - a) Meccanismi di regolazione allosterica di enzimi dipendenti dalla vitamina B6 come cofattore: triptofano sintasi e *O*-acetilserina sulfidrilasi.
 - b) Processo di folding-unfolding, dinamiche e pathways di protonazione della green fluorescent protein sia in soluzione che in gel di silice, con risoluzione a livello di singola molecola.
 - c) Caratterizzazione strutturale e funzionale di proteine trasportatrici di ossigeno in soluzione, in cristallo e incapsulate in gel di silice, anche in funzione della progettazione e sviluppo di "blood substitutes".
 - d) Attività di supporto all'Unità di Chirurgia Toracica dell'Università di Parma/Azienda Ospedaliera per la programmazione di studi statistici ed analisi dei dati.
- 2) Analisi dell'azione antiproliferativa dell'ascorbato e del ribosato di potassio su linee cellulari tumorali canine
- 3) Studio degli stati conformazionali e dei sottostati di emoproteine
- 4) Dosimetria in e con spettroscopia Moessbauer.

Risultati ottenuti

- 1) Sono stati rispettati gli obiettivi sopra riportati: tutte le linee di ricerca elencate hanno portato a risultati pubblicati su riviste internazionali (vedi pubblicazioni).
- 2) La ricerca sull'ascorbato di potassio ha mostrato, nei risultati preliminari, un effetto antiproliferativo sulla linea cellule canina A72.
- 3) Lo studio sugli stati conformazionali ha evidenziato il valore delle barriere entalliche che caratterizzano diversi sottostati dell'emoglobina mostrando come al disopra di una temperatura critica la proteina sia flessibile e possa "esplorare" diversi sottostati.
- 4) Sono state valutate la modellistica e il calcolo della dose in dosimetria con spettroscopia Moessbauer.

Pubblicazioni più significative nel periodo 2006-2008

- Thoracoscopic Parietal Pleural Argon Beam Coagulation Versus Pleural Abrasion in the Treatment of Primary Spontaneous Pneumothorax. - Bobbio, A., Ampollini, L., Internullo, E., Caporale, D., Cattalani, L., Bettati, S., Carbognani, P. and Rusca, M European Journal of Cardio-thoracic Surgery 29, 6-8 (2006).

- Circular Dichroism Spectroscopy of Tertiary and Quaternary Conformations of Human Hemoglobin Entrapped in Wet Silica Gels. - Ronda, L., Bruno, S., Viappiani, C., Abbruzzetti, S., Mozzarelli, A., Lowe, K. C. and Bettati, S. *Protein Science* 15, 1961-1967 (2006).
- Exploring the Pyridoxal 5'-phosphate-dependent Enzymes. - Mozzarelli, A. and Bettati, S. *The Chemical Record* 6, 275-287 (2006).
- Evidence of Discrete Substates and Unfolding Pathways in Green Fluorescent Protein. Baldini, G., Cannone, F., Chirico, G., Collini, M., Campanini, B., Bettati, S. and Mozzarelli, A. *Biophysical Journal* 92,
- Pyridoxal 5'-phosphate Enzymes as Targets for Therapeutic Agents. - Amadasi, A., Bertoldi, M., Contestabile, R., Bettati, S., Cellini, B., Di Salvo, M. L., Borri-Voltattorni, C., Bossa F. and Mozzarelli, A. *Current Medicinal Chemistry* 14, 1291-1324 (2007).
- Structure, Mechanism, and Conformational Dynamics of O-Acetylserine Sulfhydrylase from *Salmonella typhimurium*: Comparison of A and B Isozymes. - Chattopadhyay, A., Meier, M., Ivaninskii, S., Burkhard, P., Speroni, F., Campanini, B., Bettati, S., Mozzarelli, A., Rabeh, W. M., Li, L. and Cook, P. F. *Biochemistry* 46, 8315-8330 (2007).
- Evolution of Allosteric Models for Hemoglobin. - Eaton, W. A., Henry, E. R., Hofrichter, J., Bettati, S., Viappiani, C. and Mozzarelli, A. *IUBMB Life* 59, 586-599 (2007).
- Protonation and Conformational Dynamics of GFP Mutants by Two-photon Excitation Fluorescence Correlation Spectroscopy. - Bosisio, C., Quercioli, V., Collini, M., D'Alfonso, L., Baldini, G., Bettati, S., Campanini, B., Raboni, S. and Chirico, G. *Journal of Physical Chemistry. B.* 112, 8806-8814 (2008).
- Protein Dynamics on Different Timescales. - Parak, F. G., Achterhold, K., Schmidt, M., Prusakov, V. and Croci, S. *Journal of Non-Crystalline Solids* 352, 4371-4378 (2006) *A Physical Picture of Protein Dynamics and Conformational Changes.*
- Parak, F. G., Achterhold, K., Croci, S. and Schmidt, M. *Journal of Biological Physics* - (Accepted for publication)
- Conformational Changes in Hemoglobin Triggered by Changing the Iron Charge. - Croci, S., Achterhold, K., Ortalli, I. and Parak, F. G. *Hyperfine Interactions* - (Accepted for publication)
- Radiation Exposure in Mössbauer Spectroscopy. - Pedrazzi, G., Vaccari, S. and Capotti, E. *Health Physics* 91, 161 (2006)

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

- L'incapsulazione in gel nanoporosi di silice riveste un notevole interesse per studi biofisici su proteine, con potenziali ricadute applicative. E' facile prevedere un uso sempre maggiore di questa tecnica nello sviluppo di biosensori e bioreattori anche su scala nanometrica, un ambito nel quale i membri dell'Unità intendono sfruttare le competenze acquisite sia nel campo dell'immobilizzazione di proteine, sia nello studio delle proprietà strutturali, dinamiche e funzionali. Un'ulteriore applicazione si basa sul fatto che il confinamento in gel mima molti effetti del crowding molecolare.
- Si continuerà lo studio dell'azione dell'ascorbato e ribosato di potassio sulla crescita di linee cellulari tumorali umane, primarie e metastatiche.
- Lo studio degli stati conformazionali dell'emoglobina prosegue con il confronto con la mioglobina in modo da correlare la presenza di sottostati con i cambiamenti conformazionali quaternari e terziari dell'emoglobina stessa.

Collaborazioni internazionali in atto

- Dr. William A. Eaton, Laboratory of Chemical Physics, Building 5, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892-0520 USA.
- Prof. Enrico Gratton, Laboratory of Fluorescence Dynamics, University of California, Irvine, CA 92697-2715, USA.
- Prof. Fritz G. Parak, Biophysik Department E17 - Fakultät für Physik Technische Universität München -Deutschland

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

- a) tre spettroscopi Mossbauer dotati di criostati capaci di lavorare fra 1000 K e 2 K, con la possibilità di raffreddare una sorgente fino a LNT
- b) spettrometro EPR in banda X (9.5 GHz) e in banda Q (35 GHz), con cavità a temperature variabile da RT a LHeT
- c) spettrofluorimetro a modulazione e correlazione di fase per misure di spettri di emissione steady-state, di polarizzazione della luminescenza, di tempi di vita di luminescenza e di decadimenti di anisotropia
- d) microscopio ottico invertito
- e) cabina per irraggiamenti X

Parole Chiave

Proteine, Patologie degenerative, Spettroscopia, Fluorescenza, Mössbauer.

UNITA' DI RICERCA INBB
Bari

Responsabile Scientifico

Palmieri Ferdinando

Linea di Ricerca

Proteine Di Trasporto Della Membrana Dei Mitocondri: Biochimica, Biologia Molecolare E Malattie

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Iacobazzi Vito PA viacob@farmbiol.uniba.it

Non Aderenti INBB

Stipani Italo Romano PO stipani@farmbiol.uniba.it

Prezioso Girolamo PO gprezioso@farmbiol.uniba.it

De Palma Annalisa RU a.depalma@farmbiol.uniba.it

Palmieri Luigi PO Lpalm@farmbiol.uniba.it

Fiermonte Giuseppe PA Gfierm@farmbiol.uniba.it

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento Farmaco-Biologico Università degli Studi di Bari

Indirizzo: Via Orabona 4, 70125 Bari

Telefono: 080/5443374

Fax: 080/5442770

E-mail: fpalm@farmbiol.uniba.it

Sezione INBB di appartenenza

Bari

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Identificazione del carrier umano dei nucleotidi pirimidinici (PNC1). Abbiamo trovato che la proteina umana, la cui espressione dipende dal recettore di membrana dell'insulina (IGF-IR) è il trasportatore dei nucleotidi pirimidinici ed in particolare di UTP nei mitocondri. Questo trasportatore ora chiamato PNC1 è importante per la proliferazione cellulare.

Identificazione di tre isoforme del carrier mitocondriale degli acidi dicarbossilici in *Arabidopsis thaliana*. Abbiamo trovato che i 3 geni di *Arabidopsis* At2g22500, At4g24570 e At5g09470 codificano proteine che trasportano acidi dicarbossilici e che ora sono chiamati DIC1, DIC2 e DIC3. Queste proteine presentano tutte le caratteristiche del carrier degli acidi dicarbossilici da noi già identificato nell'uomo. Esse si differenziano per la loro distribuzione tissutale e per i loro parametri cinetici.

Ruolo strutturale e funzionale dei residui amminoacidici dei segmenti transmembrana I, III e V del carrier mitocondriale del chetoglutarato (OGC). Ogni residuo dei segmenti transmembrana I, III, V dell'OGC è stato sostituito individualmente con una cisteina. Di ciascun mutante, dopo ricostituzione nei liposomi, è stata misurata l'attività di trasporto, in presenza e in assenza di reagenti sulfidrilici. La maggior parte dei residui essenziali è localizzata alla base della cavità idrofila e precisamente nei motivi di sequenza P-X-[DE]-X-X-[KR] che sono ripetuti tre volte. Un altro gruppo di residui essenziali è localizzato in prossimità del probabile sito di legame del substrato. Infine, altri residui sono essenziali perché coinvolti nelle interazioni tra i segmenti transmembrana.

Accessibilità delle cisteine 58, 136 e 155 del carrier mitocondriale della carnitina (CAC) a reagenti impermeabili dei gruppi sulfidrilici in funzione dello stato conformazionale della proteina. Abbiamo dimostrato che la regione del CAC, che contiene le cisteine 236 e 155 e che collega le eliche transmembrana 3 e 4, subisce una modificazione conformazionale durante il ciclo catalitico del carrier che la rende più accessibile ai reagenti sulfidrilici aggiunti all'esterno dei proteoliposomi. I dati sono consistenti con la supposta transizione reversibile tra la conformazione-c e la conformazione-m dei carrier mitocondriali.

I residui del motivo RX2PANAAXF del carrier della carnitina (CAC) sono importanti per la sua funzione di trasporto. Usando due approcci sperimentali abbiamo trovato che gli amminoacidi conservati sono essenziali per la funzione del trasportatore e in particolare i residui R275, N280 e F285 sono coinvolti, in varia misura, nel legame del substrato.

Identificazione di una nuova mutazione del gene SLC25A13 in pazienti affetti da citrullinemia di tipo 2. In un paziente affetto da "Citrullinemia di tipo 2", abbiamo identificato una nuova mutazione missenso allo stato omozigote, c.1763G>A (AF118838.1) nel gene SLC25A13. Questa mutazione, che introduce nell'AGC2 una glutammina in posizione 588 al posto di una arginina, causa una diminuzione del 90% dell'attività di trasporto di aspartato e glutammato, mentre non ha alcun effetto sui livelli di espressione.

Pubblicazioni più significative nel periodo 2006-2008

- 1) S. Todisco, G. Agrimi, A. Castegna and F. Palmieri (2006). Identification of the mitochondrial NAD⁺ transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 281, 1524-1531
- 2) F. Palmieri, G. Agrimi, E. Blanco, A. Castegna, M.A. Di Noia, V. Iacobazzi, F.M. Lasorsa, C.M.T. Marobbio, L. Palmieri, P. Scarcia, S. Todisco, A. Voza and J. Walker (2006). Identification of mitochondrial carriers in *Saccharomyces cerevisiae* by transport assay of reconstituted recombinant proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1757, 1249-1262
- 3) A.R. Cappello, R. Curcio, D.V. Miniero, I. Stipani, A.J. Robinson, E. R. S. Kunji and F. Palmieri (2006). Functional and structural role of amino acid residues in the even-numbered transmembrane α -helices of the bovine mitochondrial oxoglutarate carrier. *Journal of Molecular Biology* 363, 51-62
- 4) L. Palmieri, R. Arrigoni, E. Blanco, F. Carrari, M.I. Zanor, C. Studart-Guimareas, A. R. Fernie and F. Palmieri (2006). Molecular identification of an *Arabidopsis thaliana* S-adenosylmethionine transporter: analysis of organ distribution, bacterial expression, reconstitution into liposomes and functional characterization. *Plant Physiology* 142, 855-865
- 5) M.J. Lindhurst, G. Fiermonte, S. Song, E. Struys, F. De Leonardis, P. L. Schwartzberg, A. Chen, A. Castegna, N. Verhoeven, C. K. Mathews, F. Palmieri and L.G. Biesecker (2006). Knockout of *Slc25a19* causes mitochondrial thiamine pyrophosphate depletion, embryonic lethality, CNS malformations, and anemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*, 103, 15927-15932
- 6) V. Zara, V. Dolce, L. Capobianco, A. Ferramosca, P. Papatheodorou, J. Rassow and F. Palmieri (2007). Biogenesis of eel liver citrate carrier (CIC): negative charges can substitute for positive charges in the presequence. *Journal of Molecular Biology*, 365, 958-967
- 7) V. Infantino, V. Iacobazzi, F. De Santis, M. Mastrapasqua and F. Palmieri (2007). Transcription of the mitochondrial citrate carrier gene: role of SREBP-1, upregulation by insulin and downregulation by PUFA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 356, 249-254
- 8) A.R. Cappello, D.V. Miniero, R. Curcio, A. Ludovico, L. Daddabbo, I. Stipani, A.J. Robinson, E.R.S. Kunji and F. Palmieri (2007). Functional and structural role of amino acid residues in the odd-numbered transmembrane α -helices of the bovine mitochondrial oxoglutarate carrier. *Journal of Molecular Biology* 369, 400-412
- 9) V. Zara, A. Ferramosca, L. Capobianco, K. M. Baltz, O. Randel, J. Rassow, F. Palmieri and P. Papatheodorou (2007). Biogenesis of yeast dicarboxylate carrier: the carrier signature facilitates translocation across the mitochondrial outer membrane. *Journal of Cell Science*, 120, 4099-4106
- 10) F. Palmieri (2008). Diseases caused by defects of mitochondrial carrier: a review. *Biochimica et Biophysica Acta*. Published on-line on March 25, 2008; doi: 10.1016/j.bbabo.2008.03.008
- 11) F.M. Lasorsa, P. Pinton, L. Palmieri, P. Scarcia, H. Rottensteiner, R. Rizzuto and F. Palmieri (2008). Peroxisomes as novel players in cell calcium homeostasis. *Journal of Biological Chemistry*. Published on-line on March 25, 2008; doi:10.1074/jbc.M800648200
- 12) G. Fiermonte, D. Soon, A. Chaudhuri, E. Paradies, P.J. Lee, S. Krywawych, F. Palmieri and R.H. Lachmann (2008). An adult with type II citrullinemia presenting in Europe. *The New England Journal of Medicine* 358, 1408-1409

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

La presente ricerca si propone i seguenti obiettivi:

1. Identificazione della funzione di trasporto di nuovi carrier mitocondriali, dopo espressione dei rispettivi cDNA in *E. coli* e/o *S. cerevisiae*, purificazione dei prodotti genici e loro incorporazione in vescicole lipidiche (liposomi);
2. Identificazione di amminoacidi importanti per la struttura e la funzione delle proteine di trasporto dei mitocondri;
3. Analisi di mutazioni in pazienti affetti da malattie causate da deficienza di un carrier mitocondriale;
4. Modeling per omologia di carrier mitocondriali;
5. Analisi funzionale del promotore dei geni dei trasportatori mitocondriali.

Collaborazioni internazionali in atto

1) Dr. A. Fernie, Department Willmitzer, Max Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie, Potsdam-Golm, Germany 2) Dr. E. Kunji, Molecular Research Council, Cambridge, England 3) Dr. M. Hodges, Institut de Biotechnologie des Plantes Université de Paris Sud, Orsay, Cedex, France

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

- 1) Beckman L8-55 Ultracentrifuga (centrifugazione ad alta velocità)
- 2) 3100 Avant genetic Analyzer (sequenziamento del DNA)
- 3) Apparecchio per real-time PCR ABI Prism 7000 - Applied Biosystems
- 4) Coulter Epics Elite Citofluorimetro (identificazione di diversi tipi cellulari, determinazione di ROS e misura del potenziale di membrana)
- 5) Quattro Premier Micromass (identificazione e quantificazione di metaboliti cellulari)

Parole Chiave

Trasporto, Biomembrane, Clonaggio, Geni, Espressione di proteine, Malattie mitocondriali

UNITA' DI RICERCA INBB
Napoli

Responsabile Scientifico

Renata Piccoli

Linea di Ricerca

Proteine amiloidogeniche

titolo

Attività citotossica e analisi del meccanismo d'azione del dominio fibrillogenico della Apolipoproteina A-I e di Atassina-3.

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Piccoli Renata	PO	piccoli@unina.it
----------------	----	------------------

Non Aderenti INBB

Arciello Angela	RU	anarciel@unina.it
Monti Daria Maria	RU	mdmonti@unina.it

Sede Unità di Ricerca

Dip di Biologia Strutturale e Funzionale, Università di Napoli Federico II
Indirizzo Complesso Universitario di Monte S. Angelo, via Cinthia, 80126 Napoli
Telefono 081 679156
Fax 081 679233
E-mail piccoli@unina.it

Sezione INBB di appartenenza

Napoli

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

I nostri studi sono stati diretti alla produzione in forma ricombinante del dominio fibrillogenico di ApoA-I, un polipeptide di 93 residui, alla sua caratterizzazione strutturale e funzionale volti alla comprensione del meccanismo molecolare della patogenicità di tale polipeptide.

La proteina fibrillogenica Atassina-3 e il suo dominio N-terminale, Josephine, sono stati oggetto di studio in collaborazione con il gruppo della Dott.ssa Annalisa Pastore. Studi preliminari sono stati volti all'analisi del potenziale citotossico di tali proteine.

Risultati ottenuti

1. Produzione del dominio fibrillogenico di ApoA-I in forma ricombinante. E' stato messo a punto un efficiente sistema di espressione per produrre una versione ricombinante di [1-93]ApoA-I, seguendo una strategia volta a mascherare l'instabilità del polipeptide fibrillogenico durante la produzione intracellulare. La proteina ricombinante è stata isolata in forma omogenea. L'analisi conformazionale di [1-93]ApoA-I ha indicato che [1-93]ApoA-I è intrinsecamente fibrillogenico con caratteristiche molto simili a quelle descritte per la sua controparte naturale. E' quindi disponibile un sistema sperimentale in vitro funzionalmente analogo a quello in vivo.
2. Produzione delle varianti di [1-93]ApoA-I associate a patologie amiloidi. Sono state espresse in forma ricombinante le 13 varianti di [1-93]ApoA-I descritte in pazienti affetti da amiloidosi da ApoA-I. Tale sistema sperimentale risulta quindi estremamente utile per uno studio sui determinanti molecolari dell'aggregazione proteica e sulla propensione che polipeptidi omologhi hanno nel generare depositi amiloidi.
3. Sono stati analizzati gli effetti di [1-93]ApoA-I sulla crescita di cellule eucariotiche in coltura, che hanno evidenziato che [1-93]ApoA-I ha attività inibitoria della vitalità cellulare. E' in atto uno studio approfondito sul potenziale citotossico del dominio fibrillogenico di ApoA-I e sulla interazione del polipeptide con la membrana cellulare di cellule in coltura.

Pubblicazioni più significative nel periodo 2006-2008

Di Gaetano S, Guglielmi F, Arciello A, Mangione P, Monti M, Pagnozzi D, Raimondi S, Giorgetti S, Orrù S, Canale C, Pucci P, Dobson CM, Bellotti V, Piccoli R. Recombinant amyloidogenic domain of ApoA-I: analysis of its fibrillogenic potential. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 351: 223-8.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre

- Analisi del meccanismo molecolare della citotossicità di [1-93]ApoA-I
- Analisi del legame di [1-93]ApoA-I a membrane di cellule eucariotiche
- Definizione della propensione all'aggregazione di tutti i mutanti di [1-93]ApoA-I associati alla patologia
- Analisi dell'effetto di Atassina-3 e del dominio Josephine sulla vitalità cellulare

Collaborazioni internazionali in atto

- National Institute for Medical Research, London NW7 1AA, UK, Dott.ssa Annalisa Pastore

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

- Fermentatore New Brunswick da 7 lt
- Sistema cromatografico Acta purifier (Pharmacia)
- Spettrofotometro Cary50 BIO UV-visibile (Varian)
- Phosphoimager (Biorad)
- Spettrofluorimetro LS 55 (PerkinElmer)

Parole Chiave

Fibrillogenesi; Proteine amiloidogeniche; Aggregazione proteica; Citotossicità

UNITA' DI RICERCA INBB
Napoli

Responsabile Scientifico

Riccardo Pierantoni

Linea di Ricerca

Biologia della Riproduzione

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Fasano Silvia	Prof. Straordinario	silvia.fasano@unina2.it
Cobellis Gilda	RU	gilda.cobellis@unina2.it
Meccariello Rosaria	RU	rosaria.meccariello@uniparthenope.it

Non Aderenti INBB

Chianese Rosanna	DR	rosanna.chianese@unina2.it
Cacciola Giovanna	DR	giovanna.caciola@unina2.it
Chioccarelli Teresa	DR	teresa.chioccarelli@unina2.it

Sede Unità di Ricerca

Seconda Università di Napoli

Indirizzo Dipartimento di Medicina Sperimentale, Via Costantinopoli 16, 80138 Napoli

Telefono 081 5667617

Fax 081 566750./7536./7617

E-mail riccardo.pierantoni@unina2.it

Sezione INBB di appartenenza

Napoli

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Ruolo degli estrogeni nella regolazione della spermatogenesi e della steroidogenesi testicolare

Ruolo del sistema degli endocannabinoidi nella regolazione della fertilità maschile

Ruolo degli chaperons (proteine DNA-J) nella regolazione della spermio istogenesi

Risultati ottenuti

Gli estrogeni sono coinvolti nella regolazione delle mitosi spermatogoniali e nel trasporto degli spermatozoi nei dotti eiaculatori

Gli endocannabinoidi inibiscono il rilascio di GnRH e la motilità degli spermatozoi

MSJ-1 è presente negli spermatozoi umani

Pubblicazioni più significative nel periodo 2006-2008

1) Meccariello R., Chianese R., Cacciola G., Cobellis G., Pierantoni R. and Fasano S. (2006). Type-1 cannabinoid receptor (CB1) expression in the frog, *Rana esculenta*, tissues: a possible involvement in the regulation of testicular activity. *Mol. Reprod. Dev.* 73: 551-558

2) Cobellis G., Cacciola G., Scarpa D., Meccariello R., Chianese R., Franzoni M.F., Mackie K., Pierantoni R. and Fasano S. (2006). Endocannabinoid system in frog and rodent testis: type-1 cannabinoid receptor and fatty acid amide hydrolase activity in male germ cells. *Biol Reprod.* 75: 82-89

3) Meccariello R., Chianese R., Scarpa D., Berruti G., Cobellis G., Pierantoni R., Fasano S (2007). UBPY/MSJ-1 System during male germ cell progression in the frog, *Rana esculenta*. *Gen.Comp.Endocrinol.* 153: 275-279

4) Ricci G., Cacciola G., Altucci L., Meccariello R., Pierantoni R., Fasano S. and Cobellis G. (2007) Endocannabinoid control of sperm motility: the role of epididymus. *Gen. Comp. Endocrinol.* 153: 320-322

5) Meccariello R., Chianese R., Cobellis G., Pierantoni R. and Fasano S. (2007) Cloning of type-1 cannabinoid receptor in *Rana esculenta* reveals differences between genomic sequence and cDNA. *FEBS J.* 274: 2909-2920

- 6) Cobellis G., Cacciola G., Chioccarelli T., Izzo G., Meccariello R., Pierantoni R. and Fasano S. (2008). Estrogen regulation of the male reproductive tract in the frog, *Rana esculenta*: a role in Fra-1 activation in peritubular myoid cells and in sperm release. *Gen. Comp. Endocrinol.* 155: 838-846
- 7) Meccariello R., Berruti G., Chianese R., De Santis R., Di Cunto F., Scarpa D., Cobellis G., Zucchetti I., Pierantoni R., Altruda F. and Fasano S. (2008). Structure of msj-1 gene in mice and humans: a possibile role in male reproduction. *Gen. Comp. Endocrinol.* 156: 91-103
- 8) Meccariello R., Franzoni M.F., Chianese R., Cottone E., Scarpa D., Donna D., Cobellis G., Guastalla A., Pierantoni R. and Fasano S. (2008). Interplay between the endocannabinoid system and GnRH-I in the forebrain of the anuran amphibian *Rana esculenta*. *Endocrinology*, in press
- 9) Cacciola G., Chioccarelli T., Ricci G., Meccariello R., Fasano S., Pierantoni R. and Cobellis G. (2008). The endocannabinoid system in vertebrate male reproduction: a comparative overview. *Mol. Cell. Endocrinol.*, in press
- 10) Chianese R., Cobellis G., Pierantoni R., Fasano S., and Meccariello R. (2008). Non mammalian vertebrate models and endocannabinoid system: relationship with gonadotropin-releasing hormone. *Mol. Cell. Endocrinol.*, in press

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Chiarire il ruolo degli endocannabinoidi nella fisiologia della riproduzione maschile

Collaborazioni internazionali in atto

Ken Mackie, Università dell'Indiana USA

Sheena Lewis, Università di Belfast UK

Tibor Harkany Università di Aberdeen UK

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Per tecniche immunostochimiche, per tecniche routinarie di Biologia Molecolare

Parole Chiave

Comunicazioni cellulari, riproduzione, asse ipotalamo ipofisario, testicolo, spermatogenesi

UNITA' DI RICERCA INBB
Napoli

Responsabile Scientifico

Marina Porcelli

Linea di Ricerca

-Enzimi del metabolismo dei nucleosidi solforati in *Archaea*: enzimi modello per lo studio delle relazioni struttura-funzione-stabilità di proteine ipertermofile.

-Purine nucleoside fosforilasi e nucleoside idrolasi termostabili e termoattive da *Archaea*: enzimi con interessanti potenzialità applicative

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Cacciapuoti Giovanna PO Giovanna.cacciapuoti@unina2.it

Non Aderenti INBB

Manna Caterina PA Caterina.manna@unina2.it
Peluso Iolanda DR Iolanda.peluso@unina2.it
Napoli Daniela DR Daniela.napoli@unina2.it
De Santis Antonio PT Antonio.desantis@unina2.it

Sede Unità di Ricerca

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

Indirizzo Via Costantinopoli 16, Napoli

Telefono Tel: 081-5667545.

Fax Fax: 081-5667519.

E-mai marina.porcelli@unina2.it

Sezione INBB di appartenenza

Napoli

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Lo studio delle relazioni tra struttura, funzione e stabilità delle proteine rappresenta uno degli argomenti di maggior interesse della biochimica moderna. La comprensione dei meccanismi che sono alla base del funzionamento e della stabilità delle proteine è attraente, da un punto di vista scientifico, e, importante, da un punto di vista applicativo, perché l'instabilità degli enzimi rappresenta un serio ostacolo per l'impiego di tali macromolecole in vari settori della tecnologia chimica, medica e biologica. Di qui l'interesse per la definizione delle strategie molecolari che la natura ha messo in atto per ottenere proteine stabili quali quelle degli organismi estremofili, e in particolare termofili e ipertermofili.

Gran parte degli estremofili sono stati di recente classificati come membri della nuova linea evolutiva degli *Archaea*. La lunga segregazione evolutiva di cui sono stati oggetto gli *Archaea* è alla base delle notevoli diversità biochimiche che, a molti livelli, distinguono questi microrganismi dalle altre forme di vita. Lo stato attuale delle conoscenze indica che le peculiari caratteristiche di stabilità del patrimonio enzimatico di questi microrganismi sono alla base della loro capacità di sopravvivenza in condizioni ambientali estreme.

In generale il patrimonio enzimatico degli estremofili, in particolare dei termofili, è caratterizzato non solo da una elevata stabilità alle alte temperature, ma anche ai comuni agenti denaturanti delle proteine, come forza ionica, solventi organici e tensioattivi. Sotto il profilo biotecnologico gli *Archaea* sono dunque di estremo interesse non solo per la eccezionale stabilità dei loro enzimi, ma anche perché in essi si trovano attività enzimatiche con caratteristiche di specificità completamente nuove.

Il programma dell'unità di ricerca si inquadra in un progetto finalizzato allo studio delle nucleoside idrolisi e della 5'-metiltioadenosina fosforilasi da *Archaea* ipertermofili quali *Sulfolobus solfataricus* e *Pyrococcus furiosus* attraverso una caratterizzazione strutturale e funzionale che permetta di ottenere informazioni sui rapporti struttura-funzione-stabilità e consenta di esplorare il potenziale applicativo di tali enzimi.

Risultati ottenuti

Il progetto di ricerca ha riguardato la caratterizzazione strutturale e funzionale di purine nucleoside fosforilasi (PNP) da *Archaea* ipertermofili, quali la metiltioadenosina fosforilasi II da *Sulfolobus solfataricus* (SsMTAP II) e la purina nucleoside fosforilasi da *Pyrococcus furiosus* (PFPNP) e della nucleoside idrolisi (NH) da *S. solfataricus* (SsCU-NH). Tali enzimi, per la loro distanza evolutiva e per le caratteristiche chimico fisiche del tutto peculiari, sono interessanti strumenti per l'ottenimento di informazioni sulla stabilità, sul meccanismo d'azione e sulla specificità di substrato di tali

enzimi. I risultati di questa linea di ricerca hanno consentito da un lato di acquisire nuove conoscenze sulle strategie molecolari alla base della estrema stabilità delle proteine ipertermofile e dall'altro di esplorare il potenziale applicativo delle PNP e delle NH.

Pubblicazioni più significative nel periodo 2006-2008

- 1) M. Porcelli, L. Concilio, I. Peluso, A. Marabutti, A. Facchiano and G. Cacciapuoti
Pyrimidine-specific ribonucleoside hydrolase from the archaeon *Sulfolobus solfataricus* - biochemical characterization and homology modeling.
FEBS J., 275 1900-1914, 2008.
- 2) G. Cacciapuoti, C. Manna, D. Napoli, V. Zappia and M. Porcelli
Homocysteine-induced endothelial cell adhesion is related to adenosine lowering and is not mediated by S-adenosylhomocysteine.
FEBS LETTERS, 581, 4567-4570, 2007.
- 3) G. Cacciapuoti, M. Porcelli, M.A. Moretti, F. Sorrentino, L. Concilio, V. Zappia, Z.J. Liu. W. Tempel, F. Schubot, J.P. Rose, B.C. Wang, P.S. Brereton, F.E. Jenney, M.W. Adams
The first agmatine/cadaverine aminopropyl transferase: biochemical and structural characterization of an enzyme involved in polyamine biosynthesis in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*
J. Bacteriol., 189, 6057-6067, 2007
- 4) G. Cacciapuoti, S. Gorassini, M.F. Mazzeo, R.A. Siciliano, V. Carbone, V. Zappia, and M. Porcelli
Biochemical and structural characterization of mammalian-like purine nucleoside phosphorylase from the Archaeon *Pyrococcus furiosus*.
FEBS J., 274, 2482-2495, 2007.
- 5) Y. Zhang, M. Porcelli., G. Cacciapuoti and S.E Ealick
The crystal structure of 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine phosphorylase II from *Sulfolobus solfataricus*, a thermophilic enzyme stabilized by intramolecular disulfide bonds.
Journal of Molecular Biology, 357, 252-262, 2006

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Le PNP e le NH giocano un ruolo chiave nella via di riciclaggio dei nucleosidi catalizzando, con un meccanismo rispettivamente fosforolitico e idrolitico, il rilascio delle basi azotate dai corrispondenti nucleosidi. Tale processo ha un importante significato biochimico in quanto consente alle cellule, quando sono disponibili appropriati precursori, di aggirare la via di biosintesi de novo dei nucleotidi, dispendiosa dal punto di vista energetico. In aggiunta al loro ruolo biochimico le due classi di enzimi sono anche estremamente interessanti dal punto di vista biomedico. La PNP umana è considerato un importante bersaglio per interventi farmacologici poiché la deficienza di PNP è associata ad una immunodeficienza dei linfociti T. Inoltre, le PNP di varie fonti, soprattutto batteriche, sono state impiegate per la sintesi enzimatica di nucleosidi con potenziali attività antivirali e antineoplastiche. Anche le NH sono interessanti dal punto di vista applicativo. Tali enzimi infatti, sono coinvolti nella via di riciclaggio dei nucleosidi in protozoi parassiti e possono pertanto rappresentare il razionale bersaglio terapeutico per il trattamento farmacologico delle parassitosi.

Il progetto di ricerca si propone di individuare nuove PNP e nuove NH da *Archaea* ipertermofili da utilizzare sia per la sintesi di inibitori di interesse farmacologico che per l'attivazione di profarmaci i cui prodotti siano caratterizzati da elevata selettività e bassa tossicità. Tali enzimi, infatti per la loro distanza evolutiva e per le caratteristiche chimico fisiche del tutto peculiari, sono interessanti strumenti per l'ottenimento di informazioni sulla struttura, sul ruolo e sul meccanismo catalitico.

Collaborazioni internazionali in atto

Section of Biochemistry, Molecular and Cell Biology, Cornell University, New York
Department of Biochemistry and Molecular Biology dell'Università della Georgia

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Scintillatori; Spettrofluorimetri; Spettrofotometri; HPLC; RT-PCR

Parole Chiave

Nucleoside idrolasi; S-adenosilomocisteina idrolasi; 5'-metiltioadenosina fosforilasi; Proteine ipertermofile; Purine nucleoside fosforilasi

UNITA' DI RICERCA INBB
Parma

Responsabile Scientifico

Alberto Spisni

Linea di Ricerca

Uso integrato della spettrometria NMR multidimensionale e multinucleare, della spettroscopia di dicroismo circolare (CD) e di fluorescenza, con calcoli di modellismo molecolare per lo studio della struttura e dinamica in soluzione di peptidi biologicamente attivi e di proteine.

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Franzoni Lorella	PA	lfranz@unipr.it
Sartor Giorgio	PA	giorgio.sartor@unibo.it

Non Aderenti INBB

Casali Emanuela	RU	emanuela.casali@unipr.it
Ferrari Elena	RU	elena.ferrari@unipr.it
De Aguiar Pertinhez Thelma	A	thelma@unipr.it

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università di Parma.

Indirizzo: Via Volturmo, 39

Telefono: 0521 033801/7

Fax: 0521 0033802

E-mail: alberto.spisni@unipr.it

Sezione INBB di appartenenza

Milano

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Determinare la struttura tridimensionale in soluzione di peptidi e proteine e correlazione alla loro funzione. Nel caso dei recettori accoppiati alla proteina G (GPCR), studiare le proprietà conformazionali e funzionali di loro segmenti per risalire alla descrizione del meccanismo molecolare della proteina intera. I sistemi attualmente allo studio sono il GPCR α B-adrenergico, peptidi caratterizzati di attività antimicrobica, proteine appartenenti alla super-famiglia delle lipocaline quali una proteina appartenente alla famiglia delle Major Urinary Proteins (MUP), la cellular Retinol Binding Protein (cRBP) e la Sm14, entrambe appartenenti alla famiglia delle FABP. Sono oggetto di studio tossine come la crotamina, presente nel veleno di serpente (crotalo) e altre tossine attive sul canale del K e presenti nel veleno di scorpione. Infine si studiano le strutture di proteine di funzione ancora sconosciuta derivate dal genoma di parassiti delle arance. Le tecniche utilizzate sono la spettrometria NMR multinucleare e multidimensionale, il CD e la fluorescenza. I peptidi sono sintetici, le proteine di MW superiore ai 5Kd sono ricombinanti e sono clonate ed espresse nel nostro laboratorio in forma nativa e modificate sito-specificamente. Per proteine di MW inferiore ai 5Kd si usano proteine native. Estrazione e purificazione è condotta in laboratorio. Infine si usano metodiche di calcolo di simulazione di dinamica molecolare per rappresentare la struttura 3D di questi polipeptidi e per descriverne le caratteristiche di flessibilità molecolare.

Risultati ottenuti

Sono state risolte le strutture di vari peptidi ad attività antimicrobica. Sono state risolte le strutture di tre proteine derivate dal genoma di parassiti delle arance. Inoltre stata risolta la struttura di una FABP dell'elminta Schistosoma Mansoni e di una tossina prodotta da un fungo che risulta tossico per fragole e pomodori. Tutto ciò è stato realizzato usando la spettrometria NMR multinucleare e multidimensionale e la spettroscopia CD.

Publicazioni più significative nel periodo 2006-

- 1) R.M. Martins, M.L. Sforça, R. Amino, M.A. Juliano, S. Oyama Jr., L. Juliano, T.A. Pertinhez, A. Spisni and S. Schenkman
"Lytic Activity and Structural Differences of Amphipathic Peptides Derived from *Triatoma infestans* Trypsin"
Biochemistry (2006) 45, 1765-74 (IF 2005: 3.848)
- 2) Casallanovo F., de Oliveira F.J.F., de Souza F.C., Ros U., Martínez Y., Pentón D., Tejuca M., Martínez D., Pazos F., Pertinhez T.A., Spisni A., Cilli E.M., Lanio M.E., Alvarez C., Schreier S.
"Model peptides mimic the structure and function of the N-terminus of the pore-forming toxin Sticholysin II"
Biopolymers (Peptide Science) (2006) 84, 269-280 (IF 2005: 2.545)
- 3) Pazzagli L., Pantera B., Carresi L., Pertinhez T.A., Spisni A., Tegli S., del Sorbo G., Scala A., and Cappugi G.
"Cerato-platanin, the First Member of a New Funfal Family: Clonino, Expression and Characterization"
Cell Biochemistry and Biophysics (2006), 44, 512-521 (IF 2005: 2.138)
- 4) Vanini M.M.T., Benedetti C.E., Spisni A. and Pertinhez T.A.
"NMR Assignment of the Outer Membrane Lipoprotein (OmlA) from *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*"
J. Biomol. NMR (2006), 36, 34 (IF 2005: 2.180)
- 5) Fraceto, F.L., Oyama S. Jr., Nakaie R.C., Spisni A., de Paula E. and Pertinhez A. T.
"Interaction of Local Anesthetics with a Peptide Encompassing the IV/S4-S5 Linker of the Na⁺ Channel"
Biophysical Chemistry (2006), 123, 29-39 (IF 2005: 1.925)
- 6) Oliveira AL, Pazzagli L, Pantera B, Cappugi G, Benedetti CE, Spisni A, Pertinhez TA
"1H, 15N and 13C Resonance Assignments of Cerato-platanin, a Phytotoxic Protein from *Ceratocystis fimbriata*"
J. Biomol. NMR (2006), 36 50 (IF 2005: 2.180)
- 7) Carresi L., Pantera B., Zoppi C., Cappugi G., Oliveira L.A., Pertinhez T.A. Spisni A., Scala A. and Pazzagli L.
"Cerato-platanin, a phytotoxic protein from *Ceratocystis fimbriata*: expression in *Pichia pastoris*, purification and characterization"
Protein Express. Purif. (2006), 49, 159-167 (IF 2005: 1.553)
- 8) Cicero D.L., Contessa G.M., Pertinhez T.A., Gallo M., Katsuyama A.M., Paci M., Farah C.S. and Spisni A.
"Solution Structure of ApaG from *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* Reveals a Fibronectin-3 Fold"
Proteins: Structure, function and bioinformatics (2007), 67, 490-500 (IF 2005: 4.684)
- 9) Machado A., Sforça M.L., Miranda A., Daffre S., Pertinhez T.A., Spisni A. and Miranda M.T.M.
"Truncation of Amidated Fragment 33-61 of Bovine α -Hemoglobin: Effects on the Structure and Anticandidal Activity"
Peptide Science (2007), 88, 413-426 (IF 2005: 2.545)
- 10) M.M.T. Vanini, T.A. Pertinhez, M.L. Sforça, A. Spisni, C.E. Benedetti
"The solution structure of the outer membrane lipoprotein OmlA from *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* reveals a protein fold implicated in protein-protein interaction"
Proteins, (2007) in press (IF 2005: 4.684)
- 11) Guedes Stehling E., Dias da Silveira W., Campos Tatiana A., Brocchi M., Aguiar Pertinhez T., Spisni A.
"Development of a bacterial cloning vector for expression of scorpion toxins for biotechnological studies"
Protein Express. Purif. (2008), 57, 88-94 (IF 2005: 1.553)
- 12) Sirlei Daffre, Philippe Bulet, Alberto Spisni, Laurence Ehret-Sabatier, Elaine G. Rodrigues and Luiz R. Travassos
"Bioactive natural peptides"
In Studies In Natural Products Chemistry, vol 35
Ed. Atta-ur- Rahman, Elsevier, 2008

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Completare la descrizione delle porzioni citoplasmatiche del recettore α -adrenenrgico. Continuare gli studi sul meccanismo di entrata ed uscita del retinolo nella cRBP, studiare alcuni aspetti del processo di unfolding e refolding della rMUP, proseguire lo studio delle tossine di veleno di scorpione attive sui canali del K, della crotamina e di alcune tossine presenti in funghi. Proseguire lo studio di peptidi ad attività antimicrobica. Clonare ed esprimere mutanti sito specifici della MUP per modularne la funzione biologica, in particolare l'azione allergenica.

Collaborazioni internazionali in atto

- Prof. Gian Luigi Rossi, Istituto di Scienze Biochimiche, Università di Parma, Parma;
- Porf. Eliane Candiani Arantes Braga, Facoltà di Farmacia, Universidade de São Paulo a Ribeirão Preto

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

- Spettrofotometro per dicroismo circolare Jasco J715
- NMR Varian Inova 600
- Sistema per purificazione di proteine Akta Purifier
- Worstation Silicon Graphics O2 e Octane
- Spettrometro di Massa MALDI-TOF Micromas

Parole Chiave

NMR, CD, proteine, struttura, dinamica molecolare.

UNITA' DI RICERCA INBB
Sassari

Responsabile Scientifico

Quirico Migheli

Linea di Ricerca

Sviluppo Di Marcatori Biomolecolari Per La Caratterizzazione Di Funghi Filamentosi Di Interesse Fitopatologico

Titolo: Diagnosi molecolare di funghi antagonisti, fitopatogeni e tossigeni

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Quirico Migheli	PA	qmigheli@uniss.it
-----------------	----	-------------------

Non Aderenti INBB

Virgilio Balmas	RU	balmas@uniss.it
Barbara Scherm	BC	scherm@uniss.it
Marcella Orrù	BC	orrum@uniss.it
Loredana Cubaiu	DR	lcubaiu@uniss.it
Stefano Fiori	DR	stenof@hotmail.it
Angela Fadda	Ricercatore CNR	Angela.Fadda@imfpp.ss.cnr.it
Angela Marcello	PT	amarcell@uniss.it

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Protezione delle Piante, Università di Sassari

Via Enrico de Nicola 9, 07100 Sassari

Telefono: ++ 39 079 229295

Telefax: ++ 39 079 229316

E-mail: qmigheli@uniss.it

Sezione INBB di appartenenza

Genova

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni (2006-2008)

Obiettivi della linea di ricerca sono: 1) sviluppo di nuovi metodi diagnostici per l'identificazione funghi filamentosi fitopatogeni e tossigeni e per lo studio delle basi molecolari della patogenicità nei confronti di piante agrarie; 2) sviluppo di nuovi antagonisti microbici per la difesa biologica delle piante; 3) sviluppo di strategie innovative per la protezione delle piante e delle derrate. Quali modelli di studio sono stati scelti funghi appartenenti al genere *Fusarium*, *Phoma tracheiphila*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma* spp.

I *risultati ottenuti* dal responsabile scientifico dell'unità e dai suoi collaboratori hanno riguardato la messa a punto di sonde e primer idonei all'identificazione non equivoca di isolati di *F. oxysporum* appartenenti a razze o a *formae speciales* dotate di diversa patogenicità nei confronti della pianta ospite. In collaborazione con altri gruppi di ricerca è in atto una serie di studi volti a mettere a punto un sistema di marcatura genica mediante trasposoni in *F. culmorum*, con lo scopo di identificare le basi molecolari della patogenicità e della produzione di micotossine in questo fungo. Inoltre, attraverso lo sviluppo di vettori di silenziamento genico, è stato possibile modulare l'espressione del gene *tri6*, implicato nella biosintesi dei tricoteceni, con una conseguente riduzione della patogenicità su frumento duro. Le ricerche svolte su *P. tracheiphila* hanno riguardato l'analisi molecolare di popolazioni italiane del patogeno mediante diversi marcatori (RAPD, microsatelliti, ITS1-2). Sulla base di tali sequenze, sono stati disegnati dei primer ad elevato valore diagnostico per l'identificazione del patogeno basata sulla Real Time PCR. Le ricerche intraprese su *Aspergillus* spp. hanno permesso di individuare alcuni geni la cui espressione appare essenziale nel processo biosintetico dell'aflatossina, consentendo quindi l'applicazione di tecniche RT-PCR e microarray per la rapida identificazione degli isolati tossigeni. In collaborazione con l'U.R. Mascini (Università di Firenze) sono in atto esperimenti volti alla messa a punto ed alla validazione di un biosensore a DNA per l'identificazione di *Aspergillus* spp. tossigeni. Le ricerche riguardanti il genere *Trichoderma* hanno previsto la caratterizzazione di oltre 500 isolati da diversi terreni non coltivati della Sardegna e l'analisi dell'espressione di geni coinvolti nell'attività antagonistica in *T. harzianum*. Infine, una serie di studi sono stati consacrati alla valutazione di nuovi formulati fungicidi (attraverso l'inclusione in β -ciclodestrina) contro la fusariosi dei cereali, nonché alla combinazione di trattamenti fungicidi e di termoterapia per la lotta contro agenti di marciume in post-raccolta della frutta (*Penicillium* spp., *Botrytis cinerea*, *Monilia* spp.) su agrumi, drupacee e pomacee.

Pubblicazioni più significative nel periodo 2006-2008

1. Balmas V., Delogu G., Sposito S., Rau D., Migheli Q. (2006) Use of a complexation of tebuconazole with α -cyclodextrin for controlling foot and crown rot of durum wheat incited by *Fusarium culmorum*. *The Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 480-484.
2. Abd-elsalam K.A., Schnieder F., Migheli Q., Verreet J.-a. (2006) Molecular detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* in cotton roots by PCR and real-time PCR assay. *Journal of Plant Diseases and Protection* 113: 14-19.
3. Seidl V., Schmoll M., Scherm B., Balmas V., Seiboth B., Migheli Q., Kubicek C.P. (2006) Antagonism of *Pythium* blight of zucchini by *Hypocrea jecorina* does not require cellulase gene expression but is improved by carbon catabolite derepression. *FEMS Microbiology Letters*, 257: 145-151.
4. D'aquino S., Schirra M., Palma A., Angioni A., Cabras P., Migheli Q. (2006) Residue levels and effectiveness of pyrimethanil versus imazalil when using heated postharvest dip treatments for control of *Penicillium* decay on citrus fruit. *The Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 4721-4726.
5. Schirra M., D'aquino S., Palma A., Angioni A., Cabras P., Migheli Q. (2006) Residues of the Quinone Outside Inhibitor (QoI) fungicide trifloxystrobin after postharvest dip treatments to control *Penicillium* spp. on *Citrus* fruit. *Journal of Food Protection* 69: 1646-1652.
6. Demontis M.A., Ortu S., Cocco A., Lentini A., Migheli Q. (2007) Diagnostic markers for *Planococcus ficus* (Signoret) and *P. citri* (Risso) by random amplification of polymorphic DNA-polymerase chain reaction and species-specific mitochondrial DNA primers. *Journal of Applied Entomology* 131: 59-64.
7. Giobbe S., Marceddu S., Scherm B., Zara G., Mazzarello V., Budroni M., Migheli Q. (2007) The strange case of a biofilm-forming strain of *Pichia fermentans*, which controls *Monilinia* brown rot on apple but is pathogenic on peach fruit. *FEMS Yeast Research* 7: 1389-1398.
8. Demontis M.A., Cacciola S.O., Balmas V., Chessa V., Orrù M., Maserti B.E., Mascia L., Raudino F., Magnano Di San Lio G., Migheli Q. (2008) Development of real-time PCR systems based on SYBR[®] Green I and TaqMan[®] technologies for specific quantitative detection of *Phoma tracheiphila* in infected *Citrus*. *European Journal of Plant Pathology* 120: 339-351.
9. Schirra M., D'aquino S., Mulas M., Melis R.A.M., Giobbe S., Migheli Q., Garau A., Angioni A., Cabras P. (200-) Efficacy of heat treatments with water and fludioxonil for postharvest control of blue and gray molds on inoculated pears and fludioxonil residues in fruit. *Journal of Food Protection* (in stampa).
10. Migheli q., Balmas V., Komoń-Zelazowska M., Scherm B., Caria R., Kopchinskiy A.G., Kubicek C.P., Druzhinina I. (200-) Soils of a Mediterranean hotspot of biodiversity and endemism (Sardinia, Tyrrhenian Islands) are inhabited by pan-European and likely invasive species of *Hypocrea/Trichoderma*. *Environmental Microbiology* (submitted).
11. Scherm B., Schmoll M., Ghignone S., Kubicek C.P., Migheli Q. (200-) Identification of potential marker genes for *Trichoderma harzianum* strains with improved antagonism against *Rhizoctonia solani* by a rapid subtraction hybridisation (RaSH) approach. *Fungal Genetics & Biology* (submitted).
12. Maserti B.E., Centeno D., Hirtz C., Sommerer N., Della Croce C.M., Podda A., Migheli Q., Luro F., Morillon R., Froelicher Y., Ollitrault P., Talon P.M., Gambale F., Rossignol M. (200-) A first insight on *Citrus clementina* whole leaf proteome. *Proteomics* (submitted).

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Si intende proseguire le ricerche relative alla caratterizzazione molecolare di *Fusarium* spp. nell'ambito di un progetto (MIUR-COFIN2005) mirante alla identificazione, attraverso l'applicazione di tecniche di mutagenesi inserzionale mediata da trasposoni eterologhi, di geni coinvolti nel rapporto patogenetico e tossigenico di *F. culmorum*, un importante patogeno dei cereali. Tale ricerca verrà attuata in collaborazione con il gruppo di ricerca diretto dalla dottoressa M. J. Daboussi, operante presso l'Institut de Génétique et Microbiologie, l'Université Paris Sud di Orsay, Francia. Parallelamente, si intende proseguire la ricerca di sistemi di diagnosi per *Aspergillus* spp. aflatossigeni e ocratossigeni mediante biosensori (in collaborazione con l'U.R. del Prof. Mascini, Università di Firenze) e DNA chip. Accanto alle attività di ricerca, in collaborazione con l'I.N.B.B. sono stati organizzati due Workshop tematici che si terranno congiuntamente ad Alghero (Sassari) dal 30 agosto al 2 settembre 2008. Sulla base dei precedenti incontri, si prevede che prenderanno parte all'evento circa 250 ricercatori attivi nello studio dei *Fusarium* spp. in diversi settori (agrario, medico, alimentare, ambientale). Al fine di favorire lo scambio di informazioni, i due Workshop si articoleranno in sessioni congiunte nell'arco di 4 giorni. Le sessioni previste sono le seguenti (<http://www.ars.usda.gov/Main/docs.htm?docid=9850>): Systematics and phylogenetics; Genomics; Pathogenicity and disease epidemiology; Ecology and biogeography; Biological control; Disease management; Diagnostics; Host-fungal interactions; Metabolism.

Collaborazioni internazionali in atto

Dr. M.J. Daboussi, Institut de Génétique et Microbiologie, Université Paris Sud, Orsay, Francia.

Dr. Nancy Keller, University of Madison, Wisconsin, USA.

Professor Christian Kubicek, Technical University, Vienna, Austria.

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Cappe a flusso laminare, microscopi completi di attrezzatura fotografica, microscopio elettronico a trasmissione, microcentrifughe, centrifughe e ultracentrifughe, sistema di amplificazione automatizzata degli acidi nucleici (PCR e Real-Time PCR), spettrofotometro, fornetto per ibridizzazione, agitatori, armadi termostatati, celle climatizzate e serre presso il Centro per la Conservazione e la Valorizzazione della Biodiversità Vegetale, Surigheddu (Sassari).

Parole Chiave

Funghi fitopatogeni, micotossine, trasposon tagging, microarray, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Phoma*, *Penicillium*.

UNITA' DI RICERCA INBB
Venezia

Responsabile Scientifico

Roberto Stevanato

Linea di Ricerca

1 – Antiossidanti nell'agroalimentare.

2 - Studio delle interazioni di molecole di interesse biologico e farmacologico con sistemi biologici complessi – enzimi e membrane biologiche – e delle possibili conseguenze nelle loro proprietà.

3 – Applicazioni biotecnologiche di enzimi.

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Stevanato Roberto	PO	roberto.stevanato@unive.it
-------------------	----	----------------------------

Non Aderenti INBB

Fabris Sabrina	PT	sabri@unive.it
Bertelle Mariangela	PT	bertelle@unive.it
Zanin Achille	PT	azanin@unive.it
Gregoris Elena	DR	gregoris@unive.it

Sede Unità di Ricerca

Indirizzo Università Ca' Foscari di Venezia, Dip. di Chimica Fisica, Dorsoduro 2137 – 30123 Venezia

Telefono 041.2348600

Fax 041.2348594

E-mail roberto.stevanato@unive.it

Sezione INBB di appartenenza

Padova

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

- Interazioni di molecole su membrane modello;
- Indagine sulle proprietà antiossidanti di prodotti dell'agroalimentare;
- Studio di nuove metodiche per la immobilizzazione di enzimi.

Risultati ottenuti

Si è trovato che l'isopropiltioxantone (ITX), molecola estranea trovata in tracce nelle confezioni di latte, interagisce con la membrana plasmatica destabilizzandone l'ordinata organizzazione della struttura lipidica probabilmente a causa della struttura rigida dei tre anelli condensati che impedisce alla molecola di interagire intimamente con le catene aciliche nello stato gel.

Dallo studio delle attività antiossidanti del trans-resveratrolo e del trans-piceide, presenti nell'uva e nel vino, è stato trovato che i due stilbeni hanno simile capacità antiossidante, caratterizzata da una lenta ma prolungata azione protettiva contro la perossidazione lipidica. Si è dimostrato che il gruppo ossidrilico suscettibile di questi composti è situato nel bilayer lipidico vicino ai doppi legami degli acidi grassi poliinsaturi, prevenendone efficacemente la perossidazione. Questi composti appaiono quindi utilizzabili nelle formulazioni atte a prevenire l'invecchiamento cellulare.

Mediante il metodo enzimatico recentemente messo a punto, è stato dimostrato che la concentrazione di polifenoli totali in mosti di uve rosse e bianche in fermentazione presenta andamento sostanzialmente parallelo all'incremento del contenuto alcolico ed una lenta diminuzione a partire dal dodicesimo giorno, dovuta all'azione delle fenoloossidasi naturali.

La mela, nelle differenti varietà, evidenzia un contenuto di polifenoli totali molto superiori a quelli di altra frutta di uso comune, seguita dagli agrumi e dai frutti di bosco, mentre i succhi di verdure presentano un contenuto di polifenoli totali inferiore mediamente di un fattore tre a quello della frutta.

Il polimero polichetonico di struttura $[-CO-CH_2-CH_2-]_n-$ dimostra eccezionali capacità di immobilizzazione degli enzimi ammino ossidasi e per ossidasi, sicuramente per la formazione di legami idrogeno fra i gruppi chetonici del polimero ed i gruppi ammidici della proteina, grazie alla corrispondenza delle distanze fra i citati gruppi funzionali del polimero e della proteina.

È stato redatto il capitolo "Biotechnological aspects of amine oxidases" del volume "Copper amine oxidases: structures, catalytic mechanisms and role in pathophysiology" in stampa a cura della CRC Press. Il capitolo riporta in forma

organica e comparata tutte le applicazioni biotecnologiche delle ammino ossidasi ed, in particolare, quelle chimico analitiche per la determinazione delle ammine biogeniche.

Pubblicazioni più significative nel periodo 2006-2008

Momo F., Fabris S., Stevanato R.

Interaction of isopropylthioxanthone with phospholipid liposomes.
Biophysical Chemistry, 127, 36-40 (2007)

Agostinelli E., Belli F., Tempera G., Mura A., Floris G., Toniolo L., Vavasori A., Fabris S., Momo F., Stevanato R.
Polyketone polymer: a new support for direct enzyme immobilization.
Journal of Biotechnology 127/4, 670-678 (2007).

Fabris S., Momo F., Ravagnan, G., Stevanato R.

Antioxidant properties of resveratrol and piceid on lipid peroxidation in micelles and monolamellar liposomes.
Biophysical Chemistry 135, 76-83 (2008)

Stevanato R., Fabris S., Bertelle M., Momo F.,

Phenolic content and antioxidant properties of fermenting musts and fruit and vegetable fresh juices.
In press on Acta Alimentaria (DOI: 10.1556/AAlim.2008.0031).

Stevanato R.

Biotechnological aspects of CuAOs

In press in "Copper amine oxidases: structures, catalytic mechanisms and role in pathophysiology", G. Floris and B. Mondovi Eds., CRC Press/Taylor and Francis Books Publishers. Boca Raton, 2008.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

- Studio delle proprietà antiossidanti e delle possibili interazioni con membrane biologiche di molecole naturali presenti negli alimenti di maggiore consumo;
- Sviluppo delle applicazioni del polimero polichetonico (immobilizzazione di ulteriori enzimi; frazionamento di proteine e di ammine piogene, ecc.)
- Studio del rapporto struttura/funzione di nuove ammino ossidasi.

Collaborazioni internazionali in atto

Anna Wisniewska, Jagiellonian University – Cracovia (Polonia)

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

- Spettrometro ESR Bruker
- Gascromatografo GC17A con rivelatore a selezione di massa QP 5000 Shimadzu
- Calorimetro differenziale a scansione Setaram DSC92
- Microcalorimetro LKB 2107
- Spettrofotometro DU 640 Beckman
- Autoclave e attrezzatura per la sintesi di NO-derivati

Parole Chiave

Struttura e funzione di enzimi – Enzimi immobilizzati - Membrane biologiche – Polifenoli ed antiossidanti.

UNITA' DI RICERCA INBB
Bologna

Responsabile Scientifico:

Vittorio Tomasi

Linea di ricerca:

Vedi singole linee di ricerca

Titolo:

Vedi singole linee di ricerca

Composizione del gruppo:

Aderenti INBB

Vittorio Tomasi

PO

vittorio.tomasi@unibo.it

Enzo Spisni

RU

enzo.spisni@unibo.it

Non aderenti INBB

Cristiana Griffoni

RU

cristiana.griffoni@unibo.it

Antonio Strillacci

BO

antonio.strillacci@unibo.it

Mattia Toni

A

mattia.toni@unibo.it

Sede unità di ricerca

Dipartimento di Biologia Evoluzionistica Sperimentale

Via Selmi 3, Bologna, Italia

Telefono: 0512094147

Mail: vittorio.tomasi@unibo.it

Sezione INBB di appartenenza:

Bologna

Riassunto attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivo N° 1

Caratterizzazione dei componenti della trasduzione del segnale in micro domini di membrana.

I micro domini di membrana (rafts e caveole) costituiscono un insieme complesso di proteine di membrana organizzato dalla presenza di proteine scaffold come la caveolina, coinvolti nella trasduzione di segnali utilizzati per la regolazione dell'angiogenesi, dell'apoptosi e della differenziazione cellulare. Il loro funzionamento è legato alla ricezione di segnali extracellulari che comportano spesso il reclutamento di proteine citosoliche (spesso di proteine chinasi) capaci di trasdurre il segnale fino al nucleo, regolando l'espressione di geni. L'obiettivo delle ricerche degli ultimi anni è stato di definire la natura delle proteine legate alla caveolina-1 e coinvolte nell'angiogenesi utilizzando cellule endoteliali umane. Inoltre sono proseguiti studi volti a definire il meccanismo di azione di complessi chiamati mecano sensori coinvolti nell'adattamento cardiovascolare alle variazioni di gravità. In entrambi i casi l'obiettivo finale è stato di mettere appunto tecniche di proteomica (soprattutto DIGE) per proteine di membrana volte a definire e mappare la maggior parte di componenti di caveole e rafts.

Risultati

I principali risultati ottenuti sono stati la dimostrazione che la proteina prionica è una proteina caveolare legata allo scaffolding domain della caveolina-1, che è coinvolta nella traduzione di segnali a livello di caveole di neuroni dell'ipotalamo.

L'attivazione della proteina prionica mediante binding di anticorpi induce un processo di clustering con traslocazione probabilmente da zone extracaveolari a zone caveolari e conseguente reclutamento di proteine citosoliche come ERK 1 / 2 e FYN che trasducono segnali per la sopravvivenza e/o il differenziamento di precursori neuronali. (Toni et al. J. Biotech. Biomed 2006) Per quanto riguarda il problema del mecano sensori è stato confrontato l'assetto proteomico di cellule endoteliali (HUVEC) normali e sottoposte a micro gravità. L'analisi comparativa ha permesso di identificare almeno uno spot presente nelle seconde ma non nelle prime cellule che è stato sottoposto ad analisi mediante spettrometria di massa. Si tratta di una proteina coinvolta nella formazione di corpi chetonici la cui identificazione definitiva è ancora in corso.

Obiettivo N° 2

Silenziamento genico applicato alla regolazione di geni coinvolti nella metastatizzazione di tumori al colon.

Ricerche iniziate mediante l'utilizzo di oligonucleotidi antisense come silenziatori di geni super espressi nei tumori sono proseguite utilizzando small interfering RNA (siRNA) che hanno il vantaggio di essere più selettivi e con effetti più duraturi nel tempo. Negli ultimi anni abbiamo optato per ricerche volte a identificare nuovi microRNA coinvolti nel silenziamento di geni super espressi nel tumore al colon. L'obiettivo principale è stato di identificare nuovi vettori virali capaci di ospitare geni per microRNA da utilizzare per il silenziamento genico in vitro e in vivo. Particolare

attenzione è stato rivolto al gene cicloossigenasi-2 e al gene della metallo proteinasi-1 che come noto sembrano favorire la selezione di cellule tumorali del colon capaci di metastatizzare.

Risultati

Ricerche eseguite utilizzando un panel di siRNA elaborati mediante un approccio bioinformatico ci ha permesso di identificare una molecola che si comporta, quando applicata a linee cellulari di tumori al colon, come un potente inibitore del gene COX-2. Il silenziamento di tale gene comportava non tanto un blocco della proliferazione ma un blocco della capacità delle cellule di migrare e invadere, aspetti tipici del processo di metastatizzazione. (Strillacci et al. 2006). Queste ricerche sono proseguite cercando di verificare l'esistenza di un microRNA capace di regolare l'espressione del gene COX-2. Questo microRNA è stato di recente identificato (miR-101) e si è rivelato, quando inserito in un vettore virale, capace di bloccare in modo pressoché permanente l'espressione del gene COX-2. E' molto interessante e promettente l'osservazione che l'espressione di COX-2 e livelli di miR-101 sono inversamente correlati in cellule di tumore al colon. Inoltre utilizzando biopsie di tumore al colon è stato osservato che miR-101 è elevato in tessuti normali mentre è fortemente depresso nel tessuto tumorale dove COX-2 viene super espresso. Sono in corso esperimenti per verificare le modalità di regolazione della sintesi di questo microRNA. Uno dei fattori più significativi sembra essere legato alla genesi di mediatori dell'ipossia. (Strillacci et al. In preparazione)

Obiettivo N° 3

Ruolo del rame nel funzionamento della proteina prionica cellulare.

Sono proseguiti studi volti a chiarire il significato dei siti leganti rame presenti nella regione octarepeats della proteina prionica allo scopo di chiarire se tale proteina sia coinvolta nel trasporto di ioni rame oppure se il rame rappresenti un modo di stabilizzare la proteina e di renderla non disponibile verso una conversione a proteina prionica di tipo scrapie capace di trasmettere le tipiche malattie da prione.

Risultati

Utilizzando un modello cellulare basato su colture di cellule neuronali ipotalamiche (linea GN11) esposte a dosi fisiologiche (0-50 μ M) di rame extracellulare o a chelanti specifici del rame (cuprizone) abbiamo analizzato come i livelli di rame possono modificare l'espressione, la localizzazione subcellulare e le modificazioni post-traduzionali della proteina prionica cellulare. In particolare, abbiamo dimostrato che livelli crescenti di rame inducono una diminuzione significativa dei livelli di proteina prionica cellulare esposta sulla membrana plasmatica attraverso due differenti meccanismi: a) diminuzione dell'mRNA di PrPC; b) aumento del rilascio di proteina prionica cellulare attraverso un meccanismo di taglio dell'ancora GPI con cui la PrPC è ancorata alla membrana. Per quello che riguarda le modificazioni post-traduzionali indotte dal rame su PrPC, abbiamo osservato un aumento della glicosilazione di PrP. In particolare, mentre in assenza di rame le isoforme non glicosilate, monoglicosilate e diglicosilate sono espresse a livelli sostanzialmente uguali, già alla concentrazione di rame pari a 50 μ M la forma diglicosilata viene maggiormente espressa, ed alla concentrazione di rame di 100 μ M scompaiono la forma non glicosilata e la diglicosilata diventa l'isoforma dominante. Queste evidenze sperimentali confermano che, almeno nel nostro modello, la presenza di ioni rame ha un potenziale effetto protettivo nei confronti della conversione tra proteina prionica cellulare e proteina prionica patologica. Infatti, il rame extracellulare -a concentrazioni fisiologiche- riduce fortemente la quantità di PrPC espressa in membrana. Questa localizzazione è ritenuta quella maggiormente soggetta alla conversione a prione. Inoltre essi confermano il coinvolgimento della proteina prionica cellulare nel metabolismo degli ioni rame.

Obiettivo N° 4

Studi sulla tossicità del Vioxx

Il fatto che il Vioxx si sia rivelato un antinfiammatorio estremamente pericoloso in quanto capace di causare rilevanti danni cardiovascolari, danni molto più marcati rispetto a quelli esercitati da altri inibitori specifici della COX-2 come Celebrex, ci ha indotto a ipotizzare un effetto diretto del Vioxx sulla biosintesi della prostaciclina un potente vasodilatatore e protettore cardiovascolare.

Risultati

Negli ultimi anni è stato messo appunto un test per valutare gli effetti diretti di un antinfiammatorio specifico per la COX-2 basato sull'attività della prostaciclina sintasi e sulla sua localizzazione sub cellulare. Utilizzando tale test sono stati saggiati: Vioxx, Celebrex, e antinfiammatori non steroidei a largo spettro d'azione. I risultati sono stati molto chiari nel senso che solo Vioxx, anche a bassi livelli si è rivelato un potente inibitore della prostaciclina sintasi senza effetti sulla sua localizzazione sub cellulare. Da qui emerge la nostra ipotesi per spiegare l'elevata tossicità cardiovascolare del Vioxx rispetto ad altri inibitori COX-2. Mentre Celebrex inibisce la COX-2 lasciando inalterata l'attività COX-1 e prostaciclina sintasi il che consente una sintesi di prostaciclina sufficiente per esercitare effetti vaso dilatatori e protettivi per l'apparato cardiovascolare, il Vioxx inibendo oltre che la COX-2 anche la prostaciclina sintasi annulla completamente la sintesi di questo prostanoide creando le condizioni ottimali per l'instaurarsi di vasocostrizione, ipertensione e danni cardiovascolari. E' interessante notare che l'utilizzo da parte della MERCK di questo semplice test avrebbe evitato le conseguenze drammatiche del Vioxx. (Griffoni et al. 2006)

Pubblicazioni più significative nel periodo 2006-2008

- 1) Tavolari S, Bonafè M, Marini M, Ferreri C, Bartolini G, Brighenti E, Manara S, Tomasi V, Laufer S, Guarnieri T. Licofelone, a dual COX/5-LOX inhibitor, induces apoptosis in HCA-7 colon cancer cells through the mitochondrial pathway independently from its ability to affect the arachidonic acid cascade. *Carcinogenesis*. 2008 Feb;29(2):371-80. Epub 2007 Nov 21. IF=5,4
- 2) Toni M, Spisni E, Griffoni C, Santi S, Riccio M, Lenaz P, Tomasi V. Cellular prion protein and caveolin-1 interaction in a neuronal cell line precedes fyn/erk 1/2 signal transduction. *J Biomed Biotechnol*. 2006;2006(5):69469. IF=1,829
- 3) Griffoni C, Spisni E, Strillacci A, Toni M, Bachschmid MM, Tomasi V. Selective inhibition of prostacyclin synthase activity by rofecoxib. *J Cell Mol Med*. 2007 Mar-Apr;11(2):327-38. IF=6,555
- 4) Strillacci A, Griffoni C, Spisni E, Manara MC, Tomasi V. RNA interference as a key to knockdown overexpressed cyclooxygenase-2 gene in tumour cells. *Br J Cancer*. 2006 May 8;94(9):1300-10. IF=4,406
- 5) Spisni E, Toni M, Strillacci A, Galleri G, Santi S, Griffoni C, Tomasi V. Caveolae and caveolae constituents in mechanosensing: effect of modeled microgravity on cultured human endothelial cells. *Cell Biochem Biophys*. 2006;46(2):155-64. IF=2,5
- 6) Tavolari S, Bucci L, Tomasi V, Guarnieri T. Selected polychlorobiphenyls congeners bind to estrogen receptor alpha in human umbilical vascular endothelial (HUVE) cells modulating angiogenesis. *Toxicology*. 2006 Jan 20;218(1):67-74. Epub 2005 Nov 15. IF=3,2

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

In seguito al finanziamento con fondi dell'università di Bologna (finanziamento delle grandi attrezzature) e con fondi FIRB è stato realizzato un laboratorio di proteomica presso il Dipartimento di Biologia coordinato dal sottoscritto comprendente una serie di strumenti elencati sotto la voce "principali attrezzature" che consente l'esecuzione di un protocollo chiamato proteome discovery. Questo protocollo è mirato alla identificazione di nuove proteine coinvolte nella trasduzione del segnale in microdomini di membrana, nella identificazione di prodotti genici coinvolti nella metastatizzazione di tumori al colon, nel funzionamento della proteina prionica cellulare. Per il prossimo anno si prevede l'acquisto del Proteon (Biorad) strumento che permetterà di completare lo studio del proteoma monitorando i processi di interazione proteina-proteina (interattomica) e determinando le costanti di affinità dei rispettivi ligandi.

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

BIOPLEX (Biorad); Test ELISA multiplo
PF (Beckman); Elettroforesi bidimensionale con HPLC
EXQUEST (Biorad); Taglio di spot per analisi proteomica
FAROS (Biorad); Acquisizione analisi gel
ETTAN IPGphor3 (Ge healthcare); Focalizzazione proteina, prima dimensione.

Parole chiave

Angiogenesi, Silenziamento genico; Microdomini di membrana; Infiammazione.

UNITA' DI RICERCA INBB
Bologna

Responsabile Scientifico

Carlo Ventura

Linea di Ricerca

Differenziamento cardiaco ed endoteliale di cellule staminali mesenchimali da varie fonti

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Carlo Ventura	PO	cvent@libero.it
Cantoni Silvia	Assegnista	silcant@gmail.com
Bianchi Francesca	Assegnista	francibi@alice.it
Cavallini Claudia	Assegnista	clo.cavallini@gmail.com
Bonavita Francesca	BC	francesca.bonavita@unibo.it
Olivi Elena	BC	ele.na.82@libero.it
Frasconi Irene	BC	frascari.c@libero.it
Vaccari Valentina	BC	va81le@yahoo.it
Tassinari Riccardo	A	rikta@libero.it

Sede Unità di Ricerca

Istituto di Cardiologia, Osp. S. Orsola-Malpighi, Pad. 21 Piano 6, Lab. Cardiologia Sperimentale

Indirizzo Via Massarenti 9

Telefono 051-340339

Fax 051-340339

E-mail cvent@libero.it

Sezione INBB di appartenenza

Bologna

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

- Isolamento di cellule staminali mesenchimali umane (hMSCs) isolate da midollo osseo e da fonti alternative
- Sviluppo di molecole innovative di sintesi per la realizzazione di strategie idonee alla induzione dei differenziamenti oggetto di studio alternative al trasferimento genico mediante vettori virali.
- Studio di profili trascrizionali e di segnali molecolari responsabili dell'induzione dell'orientamento endoteliale e cardiogenico delle tipologie cellulari isolate.
- Sviluppo di approcci di validazione in vivo dell'efficacia delle molecole di sintesi realizzate.

Risultati ottenuti

- Coltura, propagazione in vitro e fenotipizzazione di cellule mesenchimali staminali umane isolate da midollo osseo e da fonti alternative quali la polpa dentaria, le membrane fetali di placenta a termine e tessuto adiposo (lipoaspirati).
- Sviluppo di esteri misti dell'acido ialuronico con acido butirrico ed acido retinoico (HBR); queste molecole agiscono come nuovi potenti agenti cardiogenetici nelle hMSCs
- L'HBR aumenta in maniera significativa la trascrizione dei geni GATA-4 e Nkx-2.5, che agiscono come promotori della cardiogenesi. Il trattamento con HBR porta al differenziamento delle hMSC in cellule esprimenti sia la catena pesante della miosina sarcomerica, sia l'alfa-actinina sarcomerica. L'HBR induce anche un aumento consistente dell'espressione del gene del KDR, codificante per un recettore del VEGF coinvolto nella vasculogenesi, e determina la formazione di cellule esprimenti vWF.
- Trasferimento in vivo, in modelli animali di scompenso cardiaco, di hMSC di membrane fetali pre-trattate ex vivo con HBR; questa popolazione è quella che in vitro ha mostrato i migliori risultati di differenziamento cardiaco ed endoteliale.
- Le cellule trapiantate si differenziano 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 sono 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 cardiogenesi in cellule staminali umane senza dover ricorrere ad approcci di trasferimento genico.

Pubblicazioni più significative nel periodo 2006-2008

- 1) Ventura C, Cavallini C, Bianchi F, and Cantoni S.: Stem cells and cardiovascular repair: a role for natural and synthetic molecules harboring differentiating and paracrine logics. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem.* 2008 Jan;6(1):60-8.
- 2) Alviano F, Fossati V, Marchionni C, Arpinati M, Bonsi L, Franchina M, Lanzoni G, Cantoni S, Cavallini C, Bianchi F, Tazzari PL, Pasquinelli G, Foroni L, Ventura C., Grossi A. and Bagnara G.P.: Term amniotic membrane is a high throughput source for multipotent mesenchymal stem cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro. *BMC Developmental Biology.* 2007, 7:11
- 3) Ventura C, Cantoni S, Bianchi F, Lionetti V, Cavallini C, Scarlata I, Foroni L, Maioli M, Bonsi L, Alviano F, Fossati V, Bagnara GP, Pasquinelli G, Recchia FA, Perbellini A; Hyaluronan mixed esters of butyric and retinoic Acid drive cardiac and endothelial fate in term placenta human mesenchymal stem cells and enhance cardiac repair in infarcted rat hearts. *J Biol Chem.* 2007 May 11;282(19):14243-52. Epub 2007 Mar 15.
- 4) Maioli M, Asara Y, Pintus A, Ninniri S, Bettuzzi S, Scaltriti M, Galimi F, Ventura C. Creating prodynorphin-expressing stem cells alerted for a high-throughput of cardiogenic commitment. *Regen Med.* 2007 Mar;2(2):193-202.
- 5) Ventura C, Cantoni S, Bianchi F, Cavallini C. Stem cells: a promise for cardiac repair. *Organs, tissues and cells* Vol. 9 (3) November 2006.
- 6) Ventura C, Branzi A. Autocrine and intracrine signaling for cardiogenesis in embryonic stem cells: a clue for the development of novel differentiating agents. *Handb Exp Pharmacol.* 2006;(174):123-46.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

- Sintesi di nuovi agenti differenzianti. Valutazione della loro azione cardiogenica ed endoteliale da comparare a quella di HBR
- Sviluppo di linee cellulari di hMSCs per una ottimizzazione dello studio del processo di differenziamento cardiaco in vitro.
- Studio della secrezione di citokine ad azione vasculogenetica, antiapoptotica ed antifibrotica da diverse tipologie di hMSCs.
- Identificazione di fattori di trascrizione responsabili della cardiogenesi in cellule staminali umane.
- Identificazione di fattori di crescita implicati nel processo di cardiogenesi
- Analisi dei meccanismi molecolari responsabili della crescita e del differenziamento di cellule endoteliali da hMSCs.

Collaborazioni internazionali in atto

-Prof. James K. Gimzewski
PhD CPhys FIoN FInstP FWIF FREng
Distinguished Professor
Department of Chemistry and Biochemistry

- Prof. Edward G. Lakatta
Director of: Laboratory of Cardiovascular Science
Gerontology Research Center
National Institutes of Health (N.I.H.)- National Institute on Aging (N.I.A.)
5600 Nathan Shock Drive

-Dr. Sandro Carrara Ph.D. – Senior Research Scientist - Swiss Federal Institute of Technology – Lausanne EPFL IC ISIM LSII - INF 333 (Bâtiment INF) Station 14 CH-1015 Lausanne Campus Plan

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Cappe a flusso laminare
Microscopio ottico e a fluorescenza con fotocamera digitale
Incubatore
Termociclatore
Spettrofotometro

Parole Chiave

- cardiogenesi
- cellule staminali mesenchimali
- infarto cardiaco
- rigenerazione miocardica
- vasculogenesi

UNITA' DI RICERCA INBB
Udine

Responsabile Scientifico

Paolo Viglino

Linea di Ricerca

Studi mediante spettroscopia NMR e predizioni computazionali di proteine di interesse biologico

Composizione del Gruppo

Aderenti INBB

Viglino Paolo	PO	pviglino@mail.dstb.uniud.it
Esposito Gennaro	PA	gesposito@mail.dstb.uniud.it
Fogolari Federico	PA	ffogolari@mail.dstb.uniud.it
Corazza Alessandra	RU	acorazza@mail.dstb.uniud.it

Non Aderenti INBB

Pagano Katuscia	DR	kpagano@mail.dstb.uniud.it
Mimmi Maria Chiara	BC	cmimmi@mail.dstb.uniud.it
Codutti Luca	DR	lcodutti@mail.dstb.uniud.it
Renella Enrico	DR	erenella@mail.dstb.uniud.it
Gümral Devrim	DR	dgokkaya@mail.dstb.uniud.it

Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche

Indirizzo Piazzale Kolbe 4

Telefono 0432-494302

Fax 0432-494301

E-mail pviglino@mail.dstb.uniud.it

Sezione INBB di appartenenza

Padova

Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

Obiettivi

Studi di proteine amiloidogeniche

Un'intera classe di malattie legate a "misfolding" e aggregazione di proteine (amiloidosi) è associata alla presenza, in diversi tessuti, di depositi amiloidi di proteine/peptidi organizzati in fibre con una caratteristica struttura cross-beta. Sono note circa 25 diverse amiloidosi, ciascuna associata a una specifica proteina che, in varie condizioni, polimerizza in aggregati oligomericici che si organizzano in fibre amiloidi. Metà delle proteine che causano amiloidosi sistemica appartiene alla superfamiglia delle immunoglobuline. Tra di esse, una delle più rappresentative è la beta2-microglobulina (b2m), responsabile della amiloidosi da emodialisi (DRA).

Conseguentemente, molti sforzi sono stati volti a caratterizzare le basi biochimiche e molecolari dell'aggregazione proteica e le proprietà strutturali degli aggregati amiloidi; sono state ampiamente studiate anche le modificazioni strutturali che portano una proteina/peptide "unfolded" o con struttura compatta ad acquisire la struttura alternativa "cross-beta" che si propaga nell'architettura ripetitiva delle fibrille amiloidi.

Studi di fattori di trascrizione

L'importanza dei fattori di trascrizione nella corretto sviluppo nel corretto sviluppo embrionale e nella differenziazione dei tessuti è nota da lungo tempo. In particolare il nostro interesse si è rivolto nella superfamiglia di geni PAX a PAX-8, fattore di trascrizione coinvolto nello sviluppo della tiroide, rene e del sistema nervoso centrale, mentre nell'adulto promuove l'attivazione di enzimi coinvolti nel metabolismo dello iodio.

Risultati ottenuti

Proteine amiloidogeniche

Il nostro gruppo, utilizzando le tecniche di risonanza magnetica, ha studiato a fondo le proprietà strutturali della beta2-microglobulina (β 2-m) e dei loro derivati troncati o mutati individuando le zone della molecola maggiormente coinvolte nel processo di formazione della fibrilla e fornendo un possibile meccanismo di aggregazione di tipo. Oltre a studi prettamente strutturali sono in corso una ricerche che ci hanno permesso di ottenere informazione sulla dinamica della b2-m e di alcuni mutanti con differenti caratteristiche dal punto di vista della amiloidogenicità. Inoltre abbiamo anche realizzato lo studio degli intermedi di refolding con tecniche bidimensionale SOFAST che ci ha permesso di individuare un nuovo intermedio finora ignoto.

L' acilfosfatasi è una piccola proteina, costituita da un centinaio di residui, che ben si presta a studi sia biochimici sia strutturali per cercare di far luce sui meccanismi amiloidogenici. Specificamente a Udine abbiamo caratterizzato dal punto di vista strutturale mediante NMR le acilfosfatasi da *Sulfolobus solfataricus* e da *Eschaerichia Coli*. Più di recente uno studio NMR di scambio H/D dell'acilfosfatasi da *Sulfolobus solfataricus* ci ha permesso di individuare, in condizioni sperimentali che favoriscono la formazione di fibrille amiloidi, le regioni della proteina che pensiamo siano coinvolte nei primi istanti dell'aggregazione.

Fattori di trascrizione

Lo studio della struttura di Pax-8 nella forma non legata al DNA ha permesso di evidenziare che in soluzione i motivi strutturali elica-turn-elica sono già presenti contrariamente a quanto era emerso da precedenti studi biochimici. Dato il grado di omologia all'interno della famiglia Pax possiamo supporre che la strutturazione della proteina libera sia un aspetto generale di tutti i suoi componenti.

Publicazioni più significative nel periodo 2006-2008

1. Mimmi MC, Jorgensen TJ, Pettirossi F, Corazza A, Viglino P, Esposito G, De Lorenzi E, Giorgetti S, Pries M, Corlin DB, Nissen MH, Heegaard NH "Variants of beta-microglobulin cleaved at lysine-58 retain the main conformational features of the native protein but are more conformationally heterogeneous and unstable at physiological temperature." (2006) *FEBS J.* 273, 2461-74.
2. Relini A, Canale C, De Stefano S, Rolandi R, Giorgetti S, Stoppini M, Rossi A, Fogolari F, Corazza A, Esposito G, Gliozzi A, Bellotti V "Collagen plays an active role in the aggregation of beta2-microglobulin under physiopathological conditions of dialysis-related amyloidosis." (2006) *J. Biol. Chem.* 281, 16521-9.
3. Corazza A, Rosano C, Pagano K, Alverdi V, Esposito G, Capanni C, Bemporad F, Plakoutsi G, Stefani M, Chiti F, Zuccotti S, Bolognesi M, Viglino P "Structure, conformational stability, and enzymatic properties of acylphosphatase from the hyperthermophile *Sulfolobus solfataricus*." (2006) *Proteins* 62, 64-79.
4. Pagano K, Ramazzotti M, Viglino P, Esposito G, Degl'Innocenti D, Taddei N and Corazza A. "NMR solution structure of the Acylphosphatase from *Eschaerichia coli*" (2006) *J. Biomol. NMR* 36, 199-204.
5. Fogolari F, Corazza A, Viglino P, Zuccato P, Pieri L, Faccioli P, Bellotti V, Esposito G. "Molecular dynamics simulation suggests possible interaction patterns at early steps of beta2- microglobulin aggregation" (2007) *Biophys. J.* 92, 1673-81.
6. Fogolari F, Pieri L, Dovier A, Bortolussi L, Giugliarelli G, Corazza A, Esposito G, Viglino P "Scoring predictive models using a reduced representation of proteins: model and energy definition" (2007) *BMC Struct Biol* 7-15.
7. Pagano K, Fogolari F, Corazza A, Viglino P, Esposito G "Estimation of $^3J_{HN-H\alpha}$ and $^3J_{H\alpha-H\beta}$ coupling constants from heteronuclear TOCSY spectra" (2007) *J. Biomol NMR* 39, 213-222.
8. Gümral D, Nadalin L, Corazza A, Fogolari F, Damante G, Viglino P, Esposito G. "Helix mobility and recognition function of the rat thyroid transcription factor 1 homeodomain - hints from (15)N-NMR relaxation studies." (2008) *FEBS J.* 275, 435-48.
9. Esposito G, Ricagno S, Corazza A, Rennella E, Gümral D, Mimmi MC, Betto E, Pucillo CE, Fogolari F, Viglino P, Raimondi S, Giorgetti S, Bolognesi B, Merlini G, Stoppini M, Bolognesi M, Bellotti V. (2008) *J Mol Biol.* 378, 885-95.
10. Verdone G, Doliana R, Corazza A, Colebrooke SA, Spessotto P, Bot S, Bucciotti F, Capuano A, Silvestri A, Viglino P, Campbell ID, Colombatti A, Esposito G. "The solution structure of EMILIN1 globular C1q domain reveals a disordered insertion necessary for interaction with the alpha4beta1 integrin." (2008) *J Biol Chem.* 283, 18947-56.
11. Rennella E, Corazza A, Fogolari F, Viglino P, Giorgetti S, Stoppini M, Bellotti V and Esposito G. "Analysis of the equilibrium unfolding thermodynamics of b2-microglobulin through native-state H/D exchange" (2008) *Biophys. J.* in press.
12. Codutti L, van Ingen H, Vascotto C, Fogolari F, Corazza A, Tell G, Quadrifoglio F, Viglino P, Boelens R and Esposito G. "Solution Structure of Human Pax-8 Paired Box Domain: predefined HTH motifs in the unbound state" (2008) *J. Biol. Chem.* in press.

Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Proteine amiloidogeniche

Interazione della b2-m con altre molecole in grado di inibire la sua capacità amiloidogenica. In particolare verrà effettuato uno studio di binding con anticorpi di camelidi a singola catena e verranno studiate le modificazioni a livello strutturale e dinamico della b2-m legata all'anticorpo. In parallelo in collaborazione con il laboratorio del Prof. Bellotti di Pavia saranno effettuati test di amiloidogenicità dei complessi.

Lo studio sulle acilfosfatasi proseguirà nel tentativo di comprendere il core strutturale delle fibrille amiloidi.

Fattori di trascrizione

Verrà effettuato lo studio NMR del complesso Pax-8-DNA e studi di rilassamento ^{15}N sia della proteina nello stato libero e nello stato legato.

Collaborazioni internazionali in atto

Prof. Rolf Boelens
NMR Spectroscopy Research Group
Bijvoet Center for Biomolecular Research
Utrecht University
Bloembergen gebouw
Padualaan 8, 3584 CH Utrecht
The Netherlands

Dr. Bernhard Brutscher
Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, CNRS
Grenoble
France

Prof. Geoffrey Bodenhausen
Ecole Normale Supérieure
Département de Chimie
24 rue Lhomond
75231 Paris Cedex 05
France

Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca

Spettrometro NMR Bruker operante a 500 MHz sul ^1H dotato di probe con gradienti di campo.
Spettrometro di massa Applied Biosystem Q-star
Sistema per micro HPLC Agilent
3 stazioni grafiche Sgi per l'analisi dei dati NMR e per calcoli di meccanica e dinamica molecolare:
1) Octane, 2) O₂, 3) Indigo
rete di PC Linux con cluster a 6 processori

Parole Chiave

Amiloidosi, beta2-microglobulina, acilfosfatasi, NMR, struttura di proteine, folding proteico, misfolding proteico, fattori di trascrizione

UNITA' DI RICERCA INBB
Roma

Responsabile Scientifico:

Pietro Volpe

Linea di Ricerca

Molecular Biology and Biophysics of Nucleic Acids and Gene Expression

Composizione dell'Unità di Ricerca

Membri INBB

Volpe Pietro PO f.r. volpe@bio.uniroma2.it

Membri Non INBB

Eremenko tamilla ex Director of Research CNR, Rome volpe@bio.uniroma2.it
La teana anna PA (University of Ancona)

Cacciamani tiziana RU (University of Ancona)

Virgili samantha DR (University of Ancona)
Duranti tiziana A (University of Ancona)
Maraschio daniela A (University of Ancona)

Indirizzo dell'Unità di Ricerca

Department of Biology of the University of Rome "Tor Vergata"

Via della Ricerca Scientifica 1, 00133 Roma

Telephone: 06-72594244

E-mail: volpe@bio.uniroma2.it

Sezione INBB S

Roma

Research Report

Our background investigations showed that, although a slight extra-S phase asymmetric methylation occurs *de novo* on CpC/GpG, CpT/GpA and CpA/GpT dinucleotide pairs, a heavy methylation during S involves semiconservatively newly made chains to guarantee genetic *maintenance* of 5-methylcytosine (m^5C) in symmetrically dimethylated m^5CpG/m^5Gpm^5C dinucleotide pairs (*BBRC 57, 353-361, 1974; Mol Biol Rep 10, 177-182, 1985*). Probes of methylated DNA helped to discover, in the eukaryotic gene, the presence of methylated sequences that do not code for mRNAs (*FEBS-Lett 44, 121-126, 1974*) and an inverse correlation was detected between DNA methylation, in S, and RNA transcription, in G_1 and G_2 (*Horiz Biochem Biophys 2, 285-340, 1976*). This basic rule was confirmed by the fact that in lymphocytes (where the *hTGc* gene is inactive) its promoter shows two fully methylated CpG-rich domains at 5' and one fully unmethylated CpG-rich domain at 3' including the site +1 and a 5'-UTR (*Gene 297, 103-112, 2002*), whereas in *Huvec* cells (where the *hTGc* gene is active) in the first CpG-rich domain of its promoter four CpGs appear to lack $-CH_3$: a result stimulating hypotheses on the machinery of transcription^{1,2}.

Thus, while a number of data accounted for genome stability in *Friend erythroleukemia (FL)* cells vs. deprivation or enrichment of the geomagnetic field³⁻⁷, attention was paid to a basic aspect of molecular evolution⁸. In mammals, the pathways leading to synthesis and post-synthetic modification of DNA use methionine as common donor of atoms, since the carbon coming from the methyl group of this amino acid is necessary for replication and the entire methyl group is necessary to build m^5C on daughter strands^{1,2}. In bacteria, an enzyme system construct on DNA 6-methylaminopurine (m^6A) in addition to m^5C . The formation rate of m^6A – lost in mammals – gradually decreases during the bacterial culture growth cycle and that of m^5C reaches an optimum in its middle because the *dcm* and *dam* methyltransferase activities, as well as the activities of the methyltransferase moieties of the restriction-modification enzymes, are uncoupled^{8,9}. On the other hand, the Shine-Dalgarno hybrid found in *E. coli* during initiation of translation and elongation¹⁰ suggested that polygenic messenger RNA modulates the rate of its proper translation through conformational changes¹⁰, whilst in a Space-simulating magnetically shielded environment eukaryotic translation is slightly influenced by weak magnetic forces^{5,7}. Evaluated together, these facts contributed to shed some new light on the mechanisms regulating, in evolution, the response of biological targets of various orders of complexity to radiation^{11,12}.

Pubblicazioni

1. Volpe P.: The Language of Methylation in Genomics of Eukaryotes. *Biochemistry (Mosc)* 70, 584-595 (2005).
2. Volpe P.: Post-synthetic methylation of macromolecules in synchronized mammalian cells. In "Progress in DNA Methylation Research" (Neuman H. P., ed.), Nova Science Publishers, New York, Chapter 8, pp. 203-224 (2007).
3. Volpe P. and Eremenko T.: DNA replication and repair in a magnetically shielded room vs. a low-frequency/low-intensity magnetic irradiation. In "Biological Effects of EMFs" (Kostarakis P., ed.), University of Ioannina and NCSR Demokritos Publishers, Kos, Vol. 1, pp. 193-200 (2004).
4. Volpe P. and Eremenko T.: RNA transcription in a magnetically shielded room vs. a low-frequency/low-intensity magnetic field. In "Biological Effects of EMFs" (Kostarakis P., ed.), University of Ioannina and NCSR Demokritos Publishers, Kos, Vol. 2, pp. 1098-1104 (2004).
5. Volpe P. and Eremenko T.: Gene expression in a magnetically shielded room vs. a low-frequency/low-intensity magnetic irradiation. In "Biological Effects of EMFs" (Kostarakis P., ed.), University of Ioannina and NCSR Demokritos Publishers, Kos, Vol. 1, pp. 184-192 (2004).
6. Volpe P. and Eremenko T.: Genome Stability vs. Deprivation or Enrichment of the Geomagnetic Field. *Environmentalist* 25, 75-82 (2005).
7. Volpe P. and Eremenko T.: Gene Expression in a Space-simulating Magnetically Shielded Environment. *Environmentalist* 25, 83-92 (2005).
8. Duranti T., La Teana A., Cacciamani T. and Volpe P.: Evolution of the pathways leading to synthesis and modification of DNA. *J. Biol. Res.* 81, 47-50 (2006).
9. Duranti, T., La Teana, A., Cacciamani, T., and Volpe, P.: The prokaryotic origin of the pathways for synthesis and post-synthetic modification of DNA. *RNA Biol.* 3, 49-53 (2006).
10. Maraschio, D., La Teana, A., and Volpe, P.: The Shine-Dalgarno hybrid during initiation of translation and elongation. *Biopol. Cell* 23, 243-249 (2007).
11. Volpe P. and Eremenko T.: Biological complexity and magnetic-field sensitivity. In "Biological Effects of EMFs" (Kostarakis P., ed.), University of Ioannina and NCSR Demokritos Publishers, Crete, Vol. 1, pp. 582-593 (2006).
12. Volpe P. and Eremenko T.: Mechanisms of the target response to magnetic fields and their correlation with the biological complexity. *Environmentalist* 27, 387-393 (2007).

Prospettive

Further attention of this study will be paid, on the one hand, to mechanisms of gene silencing through promoter/intron methylation and, on the other, to variations of sensitivity to magnetic field (MF) as a function of biocomplexity. These variation might depend, presumably, upon the number of "biological windows" present in a given biostructure: when the number of windows would be very large, as in the case of tadpoles (*Intern J Rad Med* 1, 96-103, 2000) or FL cells (*Bioelectromagnetics* 18, 58-66, 1997), sensitivity to MF should be highly significant; when the number of windows would be very small or below a needed threshold, as in the case of single molecular reactions (*Photoch Photobiol Sci* 6, 637-648, 2003), sensitivity to MF should become stochastic or even absent.

Cooperazioni internazionali

A joint venture with the Center for Medicine of Radiations of the Ukrainian Medical Academy of Sciences – undertaken in Kiev in occasion of the pioneering Post-Chernobyl CNR enterprises (Volpe P. and Ravagnan G.: "Problems of Human Radiobiology", Pacini Editore, Pisa, pp. 1-94, 1993; Volpe P.: "Introduzione alla Biofisica delle Radiazioni", UNESCO Publishers, Venice, pp. 1-256, 1999, on line from 2004) – should continue.

Parole Chiave

Post-synthetic modification of macromolecules; evolution of the DNA methylation pathways; regulation of gene expression; biocomplexity and biological windows; mechanisms of interactions of the living matter with the magnetic field.