

**ISTITUTO NAZIONALE DI
BIOSTRUTTURE E BIOSISTEMI**

E

**ISTITUTO SUPERIORE
PER LA PREVENZIONE E LA SICUREZZA DEL LAVORO**

WORKSHOP

***“BIOSENSORI
PER L’AMBIENTE E LA SALUTE”***

ABSTRACT

9-10 OTTOBRE 2007

ROMA

Segreteria Organizzativa:

I.N.B.B.

Viale delle Medaglie d'Oro, 305

00136 Roma

Tel. 0635340153

Fax. 0635451637

E-mail: inbbamm@inbb.it

www.inbb.it

Programma

MARTEDI' 9 OTTOBRE

h. 15.00 **Registrazione dei partecipanti**

h. 15.30 **Apertura dei Lavori e Saluti**

PROF. DAMIANO GUSTAVO MITA

Presidente INBB

PROF. ANTONIO MOCCALDI

Presidente ISPESL

Relazione Introduttiva

PROF. MARCO MASCINI (*UdR INBB Università di Firenze*)

“Aptameri, nuovi elementi di riconoscimento molecolare”

Coffee Break

BIOSENSORI PER L'AMBIENTE

h. 16.30 PROF ADELIO RIGO (*UdR INBB - Univ. Padova*)
“Possibilità di monitoraggio in continuo mediante biosensori dell'aldeide formica nell'atmosfera in ambienti di lavoro”

DOTT. CARLO CREMISINI (*ENEA Roma*)

“Biosensori in campo ambientale: situazione attuale e reali esigenze”

DOTT. ROMEO BERNINI (*CNR Napoli*)

“Biosensori optofluidici”

DOTT.SSA MARIA TERESA GIARDI (*CNR Montelibretti*)

“Approcci computazionali e biotecnologici nella costruzione di biosensori ambientali efficaci per l'analisi di erbicidi”

DOTT.SSA ELENA STURCHIO (*ISPESL*)

"Analisi di mutagenesi vegetale come test di conferma per biosensori a DNA"

DOTT. UBALDO MASTROMATTEO (*ST Microelectronics SpA*)

“Lab On Chip per l'analisi rapida del DNA”

h. 19.00 **Chiusura lavori della giornata**

MERCOLEDI' 10 OTTOBRE

h. 9,30 ***Apertura Lavori della Giornata***

BIOSENSORI PER LA SALUTE

DOTT. STEFANO SIGNORINI/DOTT. CARLO CRANDI (*ISPESL*)

“Biosensori: i progetti ISPESL-Ministero della Salute”

DOTT. FRANCESCO BALDINI (*CNR IFAC Firenze*)

“Ottica e Biosensori: nuove prospettive nell’ambito clinico”

PROF. SSA DANILA MOSCONE (*UdR INBB - Univ. Tor Vergata - Roma*)

“Applicazione di nuovi biosensori elettrochimici per la salvaguardia della salute”

PROF. ALDO RODA (*UdR INBB - Univ. Bologna*)

“Biosensori cellulari luminescenti in formato multiplex: applicazioni per monitoraggio ecotossicologico e per diagnostica medica”

DOTT. LUCA DE STEFANO (*CNR Napoli*)

“Biosensori ottici integrati in silicio poroso”

Coffee Break

PROF.SSA MARIANNA PORTACCIO (*UdR INBB - II Univ. Napoli*) “Determinazione amperometrica del glucosio mediante glucosio-ossidasi immobilizzata in un film di acetato di cellulosa”

DOTT. D. DAVOLOS / DOTT.SSA B. PIETRANGELI(*ISPESL*)

“Indagini molecolari su batteri con capacità biodegradative e realizzazione di DNA microarrays”

DOTT. ROBERTO RELLA (*CNR-IMM Lecce*)

“Biosensori ottici a risonanza plasmonica mediante immagini”

PROF. GIUSEPPE SPOTO (*Univ. Catania*)

"Ruolo della microfluidica e della spettrometria di massa nello sviluppo di biosensori basati su Surface plasmon resonance imaging"

h. 13.30 ***Chiusura del Workshop***

INDICE

	PAG.
<i>INTRODUZIONE AL WORKSHOP</i>	7
<i>RELAZIONE INTRODUTTIVA</i>	9
<i>BIOSENSORI PER L'AMBIENTE</i>	11
<i>BIOSENSORI PER LA SALUTE</i>	23
<i>POSTER</i>	39

INTRODUZIONE AL WORKSHOP

È con gran soddisfazione che mi accingo, anche a nome del Presidente ISPEL Prof. Moccaldi, ad introdurre la pubblicazione di questi atti del workshop congiunto INBB-ISPEL su “Biosensori per l’ambiente e la salute”.

Già da tempo l’INBB e l’ISPEL collaborano su tematiche di ricerca di interesse congiunto comune, nel quadro della convenzione in essere tra i due enti, e quella dei biosensori è una delle più prolifiche. In particolare l’interesse verso i biosensori per l’INBB è stato tale che si è voluto costituire, al suo interno, uno specifico gruppo di interesse formato da più unità accademiche a livello nazionale, insieme a quelli costituiti per altre filiere di ricerca come per gli interferenti endocrini e per le cellule staminali.

Questo workshop è nato come esposizione dei risultati scientifici conseguiti nell’ambito di due progetti finanziati dal Ministero della Salute con capofila ISPEL sui biosensori, ma vuole anche essere una ricognizione su alcune competenze integrative a quelle già in possesso di INBB ed ISPEL ed una panoramica di aggiornamento su alcuni aspetti innovativi del settore.

Abbiamo allargato la partecipazione a colleghi di altre Istituzioni e siamo felici per la loro convinta adesione, sicuri che l’interazione fra più soggetti, sia pubblici che privati, possa solo far bene alla comunità scientifica e, di conseguenza, al Paese.

Nella convinzione di poter continuare ad elaborare e svolgere attività di ricerca integrata, mi fa piacere porgere a tutti i partecipanti i più calorosi auguri di buon lavoro

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

Roma, 9 ottobre 2007

RELAZIONE INTRODUTTIVA

Marco Mascini

Dipartimento di Chimica, Università di Firenze, marco.mascini@unifi.it, www.unifi/dclabi

Negli ultimi anni la ricerca sui Biosensori si è allargata alla determinazione di specie di interesse per il controllo e la sicurezza dei luoghi di lavoro e in questa attività l'ISPESL e l'INBB sono stati in prima linea e nel Convegno sono esposte diversi risultati di questa ricerca.

Determinazioni di sostanze in fase gassosa come la formaldeide ed il benzene, valutazioni di neurotossicità e genotossicità di composti specifici sono esempi di queste ricerche recenti e i risultati saranno riportati in queste giornate.

Il Convegno serve anche a dare una panoramica di altre interessanti realizzazioni nel campo dei Biosensori con specifico riferimento alla salute e alle misure di interesse ambientale.

Un cenno al futuro ci permette di guardare con interesse alle nuove categorie di elementi biologici capaci di un selettivo riconoscimento molecolare e in questo senso vorrei ricordare le recenti ricerche sugli "Aptasensori" che rappresentano il prossimo futuro delle ricerche nel campo dei sensori e che daranno la possibilità di realizzare nuovi dispositivi robusti e molto selettivi per la determinazione di specie complesse come piccole molecole o grandi come proteine e anche batteri.

Un aptasensore consiste nell'immobilizzazione sulla superficie del trasduttore di specifici acidi nucleici, selezionati da pool di sequenze oligonucleotidiche casuali, denominati aptameri. Gli aptameri non si legano a sequenze di acidi nucleici complementari bensì a molecole bersaglio di piccole dimensioni o a proteine. Lo sviluppo delle tecniche di selezione in vitro e delle tecniche di amplificazione ha permesso l'identificazione di specifici aptameri che si legano a molecole target con grande affinità. Si possono selezionare aptameri contro apteni bersaglio come cellule batteriche e proteine prodotte da essi. Gli aptameri selezionati si legano con un'alta affinità ai loro targets e possono discriminare tra composti particolarmente simili. Questo è dovuto al riconoscimento adattativo: gli aptameri, non strutturati in origine, formano attraverso l'associazione con i loro ligandi architetture molecolari in cui il ligando diviene una parte intrinseca della struttura dell'acido nucleico.

“BIOSENSORI PER L’AMBIENTE”

BIOSENSORI OPTOFLUIDICI

R. Bernini, F.Brescia, M.R. Scarfi
IREA-CNR, Via Diocleziano 328, 80124 Napoli, Italy

E. De Nuccio, L. Zeni
DII, Seconda Università di Napoli, Via Roma 29, 81031 Aversa, Italy

R.Palumbo
IBB-CNR, via Mezzocannone 16, 80134, Napoli, Italy

P. M. Sarro
ECTM-DIMES, TUDelft. NL-2600 GB Delft, The Netherlands

L'optofluidica è nuovo settore emergente nato dalla fusione dell'ottica e della microfluidica, che sfrutta le proprietà dei liquidi per realizzare dispositivi ottici. Questo consente di realizzare nuovi dispositivi con proprietà uniche. Ad esempio, è possibile cambiare proprietà ottiche di un dispositivo semplicemente cambiando il liquido al suo interno o è possibile realizzare delle guide ottiche liquide le cui dimensioni possono essere cambiate semplicemente variando la velocità dei liquidi che la compongono. L'optofluidica quindi può rappresentare un potente strumento per realizzare una nuova generazione di sensori.

In questo lavoro viene mostrato l'utilizzo di guide ottiche cave integrate in Silicio basate su confinamento antirisonante (ARROW) per la realizzazione di biosensori optofluidici. In queste guide la luce non è confinata nel core per mezzo del fenomeno della riflessione totale, ma da strati dielettrici che fungono da specchi Fabry-Perot ad elevata riflettività. Questo meccanismo di confinamento permette la realizzazione di guide optofluidiche il cui core può essere un liquido. In questo modo è possibile confinare nel core sia il liquido contenente il materiale da analizzare sia la radiazione luminosa necessaria ad analizzarlo (Fluorescenza, Assorbimento).

In particolare, utilizzando queste guide sono stati realizzati e caratterizzati una micro cella a flusso per misure colorimetriche di concentrazione di proteine ed un micro citofluorimetro a flusso per l'analisi in fluorescenza di cellule.

BIOSENSORI IN CAMPO AMBIENTALE: SITUAZIONE ATTUALE E REALI ESIGENZE.

Carlo Cremisini

ENEA – Dipartimento Ambiente, Clima Globale e Sviluppo Sostenibile.

Centro Ricerche Casaccia – via Anguillarese 301 – 00123 S. Maria di Galeria, Roma.

A partire dalla fine degli anni 80 sono comparsi nella letteratura scientifica numerosi lavori sulle possibili applicazioni dei biosensori in campo ambientale. L'interesse generato dall'argomento era prevedibile, considerando le grandi potenzialità dell'accoppiamento di un componente biologicamente attivo (la scelta è praticamente infinita) con un trasduttore di segnale (e le opzioni sono molte) per la realizzazione di apparati analitici dotati di selettività e sensibilità. Oggi risulta evidente che, a fronte di un grande sforzo di ricerca che comunque ha prodotto interessanti risultati per la conoscenza di base, la scelta dei percorsi non è stata sufficientemente chiara e la dispersione della potenzialità investigativa non ha consentito il raggiungimento di risultati definitivi.

Le due strade principali, inizialmente quella dello sviluppo di sistemi analitici "in senso stretto" per la misura di singoli contaminanti, poi quella, forse più promettente ed attuale, dello sviluppo di sistemi per la misura della tossicità o ancor più specificamente della genotossicità, continuano ad essere percorse parallelamente senza una sufficiente preoccupazione di garantire una adeguata validazione dei "metodi" proposti. Se l'obiettivo è quello della penetrazione nel "mercato dei controlli analitici" occorre infatti che i metodi proposti siano opportunamente validati e riconosciuti come "metodi ufficiali" al punto di essere introdotti nella legislazione in campo ambientale (o, relativamente al settore industriale, di essere ritenuti adatti ai controlli delle materie prime, dei processi e dei prodotti).

L'intervento si propone, attraverso una analisi di sintesi della letteratura, limitata per brevità al caso dei pesticidi come esempio di contaminanti ambientali, di individuare i più significativi punti di debolezza dei biosensori fin qui sviluppati relativamente alla possibilità di una larga utilizzazione nel settore dei controlli ambientali. Tra le cause, e certo non ultime tra esse, sia la mancanza di un "sufficiente interesse" alla trasformazione di un sistema analitico di laboratorio (specializzato) in uno "strumento commercializzabile", sia la consapevolezza di tutte le esigenze del possibile utilizzatore. In tal senso vengono riassunte le azioni prioritarie per la soddisfazione delle reali esigenze. Vengono anche presi in considerazione alcuni recenti sviluppi scientifico-tecnologici nel settore della ricerca sui biosensori e analizzato l'eventuale contributo che questi potrebbero dare nella realizzazione di sistemi analitici più conformi alle esigenze dei possibili utilizzatori. In questo ambito vengono sinteticamente presentate le attuali linee di ricerca del gruppo ENEA coordinato dal dott. Pilloton.

COMPUTATIONAL AND BIOTECHNOLOGICAL APPROACHES FOR THE CONSTRUCTION OF ENVIRONMENTAL BIOSENSORS FOR HERBICIDE ANALYSES

MT Giardi*, M Lambreva*, G Rea*, A Antonacci*, A Serafini*, T Lavecchia**, G Pezzotti**

**National Research Council-IC- Dept. of Food and Agriculture, Research Area of Rome 1, Via Salaria Km.29,300 - 00016 Monterotondo Scalo (Rome).*

***Biosensor S.r.l., Viale Tivoli Km.18,642 – 00018, Palombara Sabina (Rome).*

Biosensors are analytical devices composed of a recognition element of biological origin and a physico-chemical transducer where the interaction between the analyte and the recognition element produces a physicochemical change. This change is detected and measured by the transducer converting the signals into analytical information.

Traditionally, photosynthesis is regarded as the light-dependent production of oxygen and biomass from water and carbon dioxide. With an increasing knowledge of photosynthetic reaction mechanisms and structural details of reaction centers, culminating recently with 3-D structures of Photosystem II (PSII), new technological applications become visible which utilise isolated photosynthetic reaction center proteins for the construction of biosensors (Giardi and Pace, 2005). These proteins are natural nanostructured complexes which behave as sophisticated molecular devices.

The advantage of using PSII-based devices is given by the fact that this enzyme complex specifically recognizes certain analytes, some of which are widely used commercially as herbicides. Chemicals such as triazines, phenylurea, diazines and phenolic compounds, used for crop control, are able to bind specifically and reversibly to the D1 subunit of PSII within its QB-binding pocket, also called herbicide binding niche. Upon binding, these compounds alter or inhibit electron transfer by displacing QB, thus blocking electron flow, oxygen evolution and changing the fluorescence properties of PSII. These changes can be easily detected by electrochemical or optical systems. Most frequently used biosensing systems for monitoring herbicides utilise intact cells or PSII particles isolated from plants, algae or cyanobacteria to measure either changes in fluorescence either in photocurrent due to the inhibition of electron transport by means of artificial mediators (Touloupakis et al. 2005, Esposito et al. 2005).

Recent advances in PSII molecular biology have produced a number of site-directed mutants characterized by alterations in the amino acid composition of the reaction center protein D1 (Johanningmeier et al. 2006). Notably, modifications in only one amino acid within the Q_B-binding

pocket can change photosynthetic activity and herbicide binding considerably. The herbicide binding site consists of about 65 amino acids. Depending on position and type of amino acid substitution, chemically different inhibitors show differential affinity for their binding niche. It has been shown that a mutation which causes resistance towards one inhibitor class can lead to hypersensitivity towards other classes of inhibitors. Apparently, within the large space of the herbicide binding niche chemically different inhibitors only in part overlap with amino acids lining the pocket cavity.

Three different photosynthetic activities can be monitored to detect the chemical/physical interactions: electron transport, oxygen evolution and fluorescence emission. Two detection mechanisms have been implemented for monitoring water pollution: optical and electrochemical (figure 1). In the first system, a Photosystem II biomediator is excited by a blue LED and the re-emitted light by fluorescence is measured by a photodiode. Its photogenerated current is amplified and converted into a voltage signal. A timer controls the fluorescence process by turning the LED on at fixed intervals. In the second system the PSII biomediator is attached to a screen-printed electrode which measures the amount of current inhibited by the pollutant interaction.

Both the systems are completely modular for easy maintenance and replacement and equipped with electronic control boards, while each cell hosting the biological material allows a flow of liquid (e.g. pollutant water) with the employment of pumps and valves.

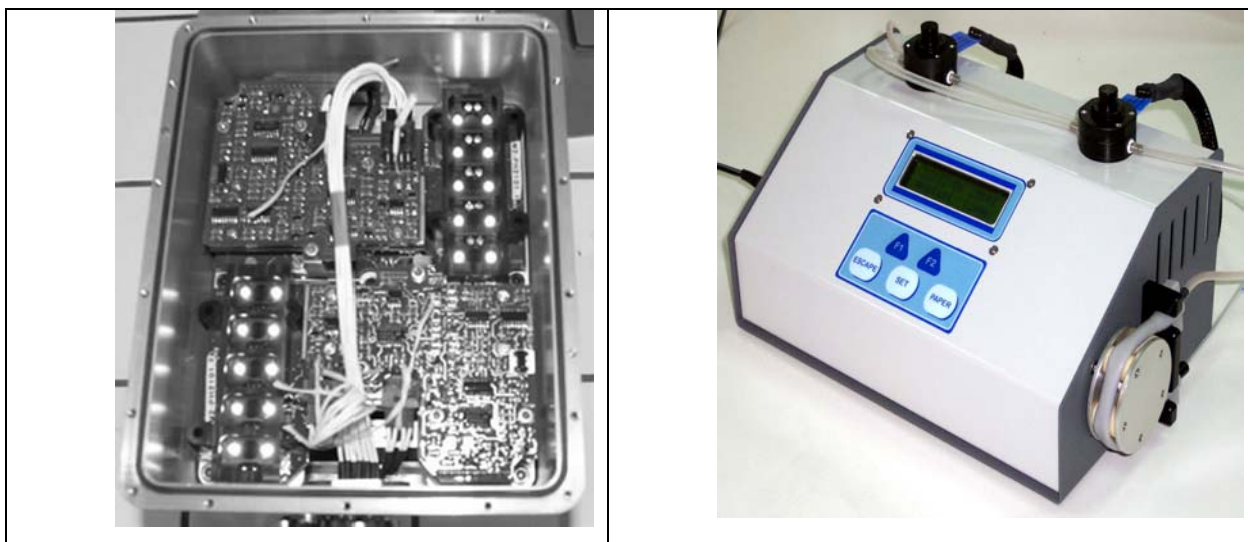


Figure 1: Picture of the optical biosensor instruments at the end of fabrication, showing the electronic control and measure boards and the optical modules with the LEDs on (left side). The biological containers arrays to be settled over the optical modules are still unmounted. On the right side the fabricated amperometric biosensor is shown in a photograph with two flow cells for biomediators in series.

In this study the D1 protein-herbicide interactions have been investigated by the combination of homology based protein modelling, virtual mutagenesis and engineering techniques in algal PSII. Ideally, the D1 protein modified for sensing applications should show a higher herbicide binding affinity, maintain its electron transport capacity and exhibit enhanced stability compared to the wild-type protein. For this purposes the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* has been selected because its D1-encoding *psbA* gene can be manipulated very easily using PCR fragments and a tailor-made deletion mutant.

Since a major drawback of using photosynthetic material is its short life-time, various immobilization techniques have been developed to improve its stability. A largely tested method is the immobilization of photosynthetic material in an albumin-glutaraldehyde crosslinked matrix. Other systems comprise physical immobilization on organic matrix followed by lyophilization. We tested a particular new promising technique which utilize light emitting polymers (LEP) with the double function of cross linkers and exciting source instead of LEDs.

The new biosensors has the unique feature of utilizing algae mutants proposed by a computer model and implemented by site-directed mutagenesis. The sensors are able to distinguish subclasses of photosynthetic herbicides as reported by Giardi et al. (2006). These setups resulted in reusable, portable biosensors for the detection of herbicide subclasses with a life-time of about 60 ± 6 hours for isolated PSII and of days for intact cells; detection limits between $4.44E-08$ and $9.21E-10$ depending on the transducer and the tested herbicide.

References

- U Johannngmeir. In: Biotechnological Applications of Photosynthetic Proteins: Biochips, Biosensors and Biodevices. MT Giardi and E Piletska Editors. Landes. Bioscience. Springer (2006)
- MT Giardi, L Guzzella, P Euzet, R Rouillon, D Esposito (2005). Detection of herbicide subclasses by an optical multibiosensor based on an array of Photosystem II mutants. Environ. Sci. Technol. 39, 5378-5384
- P Euzet, MT Giardi, R Rouillon (2005). A crosslinked matrix of thylakoids coupled to the fluorescence transducer in order to detect herbicides. Analytica Chimica Acta, 539, 263-269
- MT Giardi and E Pace (2005). Photosynthetic proteins for technological applications. Trends in Biotechnology, 25, 253-267
- E Touloupakis, L Giannoudi, SA Piletsky, L Guzzella, F Pozzoni, MT Giardi (2005) A multi-biomediator based on immobilized Photosystem II on screen-printed electrodes for the detection. Biosensors and Bioelectronics, 20 (10), 1984-1992
- MT Giardi, D Esposito, C Leonardi, A Mattoo, A Margonelli, G Angeli. Biosensor for herbicide monitoring (2006). EU patent 01830148.1-2204.

LAB ON CHIP PER L'ANALISI RAPIDA DEL DNA

Ubaldo Mastromatteo

ST Microelectronics SpA

La STMicroelectronics ha sfruttato la sua lunga esperienza nella integrazione di componenti miniaturizzati anche nel settore della microfluidica per affrontare la crescente domanda di microsistemi per l'analisi rapida del DNA. Il risultato di questa attività si è concretizzato in un prodotto denominato *In-Check* che racchiude in un unico componente le funzioni che in laboratorio sono svolte da più strumenti. La piattaforma di ST impiega un chip di silicio dove sono integrate le funzioni necessarie ad identificare sequenze di nucleotidi in un dato campione, che permettono la gestione microfluidica, l'esecuzione della PCR in un microreattore e la detection su un microarray specifico (definito col cliente/partner). Il chip è montato su una piastrina di PCB in grado di fare da supporto meccanico e di garantire le connessioni di tipo termico, elettrico e fluidico del chip stesso. Il PCB di supporto è fatto in modo tale da adattarsi ad una strumentazione dedicata in grado di permettere ad un operatore addestrato di seguire il funzionamento del chip durante la PCR e di esaminare quindi l'esito diagnostico tramite PC dotato di interfaccia software anch'essa disegnata da ST.

Data la rapidità della risposta e la miniaturizzazione del sistema che consente la portabilità del protocollo, la piattaforma *In-Check* è particolarmente adatta per applicazioni diagnostiche dove è utile esplorare un consistente numero di sequenze geniche.

Una versione semplificata del chip, attualmente in fase di sviluppo, è stata progettata per applicazioni di Real Time PCR, dove la quantità di amplificato è misurata dopo ogni ciclo: metodologia molto sensibile al fine di determinare quantitativamente il DNA specifico presente in un campione.

Il vantaggio di questo tipo di applicazione è dovuto alla raccolta dei dati di fluorescenza durante la fase iniziale dell'amplificazione (esponenziale), molto ben correlata alla concentrazione delle sequenze di nucleotidi da diagnosticare. Inoltre non risulta necessario alcun processo biochimico successivo alla PCR, diversamente dal caso di detection con microarray.

POSSIBILITÀ DI MONITORAGGIO IN CONTINUO MEDIANTE BIOSENSORI DELL'ALDEIDE FORMICA IN AMBIENTI DI LAVORO

Adelio Rigo, Raffaella Boscolo-Chio, Stefano Signorini^a and Fabio Vinello

Department of Biological Chemistry, University of Padua, Padua, Italy.

^a *ISPESL, Dipartimento di Medicina del Lavoro, Rome, Italy.*

Atmospheric formaldehyde was detected under continuous flow conditions by an on-line system at concentration below threshold limit value (TLV) of 0.3 ppm. The on-line system comprises a wet scrubber for a continuous transfer of the pollutant to an aqueous solution, a micro-reactor containing immobilized formaldehyde dehydrogenase and a conductometric transducer to monitor the increase of the conductivity due to the oxidation of formaldehyde to formic acid. By this system atmospheric formaldehyde concentrations in the range 0.05 – 2 ppm were detected with a sensitivity of 20 $\mu\text{S/ppm}$. In this concentration range the immobilized enzyme oxidized all the sampled formaldehyde molecules to formic acid, avoiding cumbersome calibration procedures. The operational stability of the biosensor was at least 10^4 hours.

ANALISI DI MUTAGENESI VEGETALE COME TEST DI CONFERMA PER BIOSENSORI A DNA

Elena Sturchio, Priscilla Boccia, Barbara Ficociello

Dipartimento Inseguimenti Produttivi ed Interazione con l'ambiente - ISPESL

Da studi pregressi, si è dimostrato che le piante permettono di rivelare la presenza di inquinanti ambientali genotossici, consentendo, accanto alle più collaudate metodiche di tipo chimico-fisico e biologico, il controllo e lo screening *in situ*. Inoltre negli ultimi anni c'è stato un incremento nell'applicazione degli acidi nucleici come strumento per il riconoscimento e il monitoraggio di composti di interesse analitico.

Il biosensore a DNA sfrutta le capacità di riconoscimento molecolare degli acidi nucleici nei confronti di sostanze a basso peso molecolare, come molti degli inquinanti ambientali. L'interazione con queste sostanze origina nel DNA (immobilizzato sulla superficie di un elettrodo) delle modificazioni chimico-fisiche, e quindi delle variazioni delle proprietà elettrochimiche del DNA stesso, che possono essere utilizzate per verificare l'avvenuta reazione. Il biosensore viene proposto come sistema analitico rapido per l'analisi qualitativa di screening di sostanze tossiche ad alta affinità per il DNA (e quindi potenziali carcinogeni e mutageni). Il metodo si basa su una misura elettrochimica dell'interazione DNA-sostanza. Quello che più comunemente si osserva è una riduzione della disponibilità all'ossidazione della base azotata guanina. Il parametro scelto quale indice di genotossicità di un campione è quindi la riduzione percentuale (R%) dell'area del picco di ossidazione della guanina rispetto ad un bianco, in una misura voltammetrica ed in particolare di voltammetria ad onda quadra. Il biosensore a DNA viene preparato impiegando trasduttori elettrochimici miniaturizzati, a base di grafite, su cui sono immobilizzati doppi filamenti di DNA genomico. I trasduttori elettrochimici sono preparati mediante stampa serigrafia.

Sono stati utilizzati due saggi a breve termine di citogenetica come test di conferma per le analisi effettuate con biosensore a DNA in grado di rilevare la presenza o meno di sostanze mutagene. Gli effetti di tipo genotossico sono stati valutati attraverso Test della Cometa e Test dei Micronuclei in cellule vegetali.

Il test dei micronuclei permette di evidenziare gli effetti mutageni di tipo clastogeno e mitoclastico di agenti mutageni chimici o fisici. La presenza di sostanze mutagene nel campione provoca nelle cellule degli apici radicali di *Vicia faba* danni al DNA cromosomico, determinando il non corretto svolgimento del processo mitotico, evidenziato dalla presenza di figure anelofasiche irregolari o dalla presenza di frammenti di DNA extranucleari delle dimensioni non superiori ad 1/3 di quelle del nucleo principale detti micronuclei.

Il “comet assay” è utilizzato per la valutazione del danno genetico in singole cellule e permette di studiare le possibili rotture alla molecola di DNA (ssDNA, dsDNA e siti alcalo-labili) indotte da agenti potenzialmente mutageni. Il test della cometa alcalino, data la sua semplicità, sensibilità e la necessità di poche cellule è ideale come test di genotossicità a breve termine.

Sono stati valutati gli effetti di tipo genotossico sui campioni di suolo e di acqua fluviale prelevati all'interno di tre Siti di Interesse Nazionale. Inoltre è stata effettuata una simulazione di rilascio, in ambiente confinato, di sostanze tossiche ampiamente utilizzate nelle produzioni industriali, allestita presso la sezione sperimentale del ISNP/CRA di Tor Mancina.

I risultati evidenziano come sia possibile ottenere da queste analisi, valide indicazioni sul livello di contaminazione di un sito esposto a sostanze tossiche, e i dati di comparazione hanno dimostrato che i test di genotossicità confermano i risultati ottenuti col biosensore a DNA.

“BIOSENSORI PER LA SALUTE”

OTTICA E BIOSENSORI: NUOVE PROSPETTIVE NELL'AMBITO CLINICO

Francesco Baldini

CNR-IFAC, Firenze

Negli ultimi anni si è assistito ad un aumento delle applicazioni fotoniche per lo sviluppo di biosensori nel settore biomedicale, nel monitoraggio ambientale, nel controllo dei processi industriali e nell'analisi della qualità di alimenti. Questo dato è confermato dal crescente numero di pubblicazioni su riviste internazionali di lavori concernenti lo studio, la progettazione e la realizzazione di biosensori di tipo ottico. Nonostante ciò e nonostante l'elevato numero di prototipi a livello di laboratorio, solo pochi sensori hanno raggiunto il mercato internazionale, soprattutto perché il biosensore è un oggetto altamente interdisciplinare, la realizzazione del quale richiede un lavoro di equipe da parte di esperti in differenti discipline, dalla fisica alla chimica, alla biochimica, all'elettronica e alla biomedicina, e tale caratteristica non si riscontra facilmente nei gruppi di ricerca.

In ogni caso, la diagnostica medica è sicuramente il settore che sembra avere le migliori prospettive di sviluppo, non solo per applicazioni di tipo invasivo (l'elevato grado di miniaturizzazione dei sensori a fibra ottica, la loro maneggevolezza e la versatilità geometrica rende possibile un monitoraggio continuo di numerosi parametri, così rendendo possibili prestazioni spesso uniche), ma anche tenendo conto dello sviluppo di biochip ottici per l'analisi multipla di parametri. Tali dispositivi possono fornire una valida alternativa, se non migliori prestazioni, rispetto ai tradizionali dispositivi di analisi da laboratorio. Fra i recenti sviluppi proposti di biosensori ottici, le microcavità risonanti sembrano essere estremamente promettenti per quanto riguarda il limite di rivelazione che può essere raggiunto mentre gli "array" di microcantilever si presentano come possibili sistemi per la rivelazione simultanea di più analiti.

INDAGINI MOLECOLARI SU BATTERI CON CAPACITÀ BIODEGRADATIVE E REALIZZAZIONE DI DNA MICROARRAYS.

Domenico Davolos, Biancamaria Pietrangeli

Dipartimento Installazioni di Produzione e Insediamenti Antropici (DIPIA), Istituto Superiore per la Prevenzione e la Sicurezza del Lavoro (ISPESL), Via Urbana, 167 - 00184 Roma.

Tel. 064414260; Fax: 064744017; Email: domenico.davolos@ispesl.it

Nel presente lavoro vengono illustrati i risultati di analisi molecolari effettuate su taxa batterici appartenenti ai Proteobacteria, alcuni con attività denitrificante ed altri con capacità di degradare composti aromatici. In particolare, vengono esposti i dati ottenuti da indagini di filogenesi molecolare condotte sui geni codificanti proteine direttamente coinvolte in specifiche vie biodegradative: 1) in taxa dei beta-Proteobacteria, la pathway di denitrificazione che consiste di riduzioni sequenziali di NO_3^- a N_2 catalizzate da quattro differenti metalloenzimi: nitrato-, nitrito-, NO- e N_2O - riduttasi; 2) in *Acinetobacter* sp. MO (gamma-Proteobacteria), isolato da effluenti di una industria galvanica, il complesso della fenolo idrossilasi del catabolismo del fenolo via catecolo. Tali studi sono basilari per la realizzazione di moderne tecnologie basate sul DNA (e.g. DNA microarrays) atte a monitorare le attività biodegradative (analisi simultanea dell'espressione di molti geni) di determinati batteri durante il trattamento di reflui industriali e civili ed in processi di bioremediation di ambienti inquinati da effluenti industriali.

BIOSENSORI: I PROGETTI ISPESL – MINISTERO DELLA SALUTE

Signorini S., Grandi C. - ISPESL

L'Istituto Superiore per la Prevenzione e la Sicurezza del Lavoro (ISPESL) ha abbracciato ormai da alcuni anni le tematiche di ricerca relative ai biosensori, in riferimento alla necessità di disporre di metodologie innovative per il monitoraggio degli inquinanti sia in ambito lavorativo sia in comparti ambientali (acque). L'ISPESL è stato capofila di un progetto di ricerca dal titolo: *“L'impiego dei biosensori nella valutazione dell'esposizione occupazionale a inquinanti chimici e biologici”*, ammesso al finanziamento del Ministero della Salute nell'anno 2001 nell'ambito dei “Programmi speciali”. Il progetto ha avuto come finalità la messa a punto e la validazione di metodologie analitiche basate sull'impiego dei biosensori per la valutazione dell'esposizione ad agenti chimici e biologici in ambito occupazionale.

Tra i risultati di rilievo raggiunti alla conclusione del progetto si segnala l'allestimento di un prototipo di biosensore per la rilevazione della formaldeide nell'aria ambiente, che è stato oggetto di brevettazione (brevetto ISPESL n. RM2004A000558). Interessanti sono stati inoltre i risultati aventi per oggetto la rilevazione di attività genotossica in matrici acquose.

Per consolidare i risultati raggiunti e focalizzare gli sforzi nei settori della biosensoristica per il monitoraggio ambientale che si sono rivelati più promettenti, l'ISPESL ha proposto un progetto di ricerca finalizzata dal titolo: *“Monitoraggio di agenti chimici aerodispersi (formaldeide) e di genotossicità in matrici ambientali mediante biosensori”* (progetto PMS/33/04), che è stato ammesso nell'anno 2004 al finanziamento da parte del Ministero della Salute. Il progetto ha un duplice obiettivo:

1. allestire e validare sul campo una versione per la produzione commerciale di biosensore già disponibile per la misura della concentrazione di formaldeide in aria,
2. mettere a punto e validare sul campo, ai fini della produzione e commercializzazione, un biosensore per la misura della genotossicità in matrici acquose.

Alla realizzazione del progetto partecipano 9 Unità Operative, delle quali 3 afferiscono all'ISPESL (Unità interne) e 6 al mondo accademico e all'impresa (Unità esterne). Il progetto è in corso e si è conclusa in modo soddisfacente la prima parte delle attività. Dati i ritardi nell'avvio effettivo di queste ultime, dovuti a cause di forza maggiore, e la complessità del lavoro di ricerca che si sta svolgendo l'originale data di conclusione del progetto medesimo (novembre 2007) è stata prorogata all'anno successivo.

APPLICAZIONE DI NUOVI BIOSENSORI ELETTROCHIMICI PER LA SALVAGUARDIA DELLA SALUTE

Danila Moscone

Università di Roma Tor Vergata, Via della Ricerca Scientifica, 00133 Roma

E-mail: moscone@uniroma2.it

La salvaguardia ed il mantenimento della salute umana passa anche attraverso la sicurezza degli alimenti. Nei soli paesi industrializzati, il 30 per cento della popolazione è soggetto ogni anno ad una tossinfezione alimentare; in particolare, nei soli Stati Uniti, circa 76 milioni di persone si ammalano ogni anno in seguito a questa patologia, con ospedalizzazione di 325 mila persone e la morte di 5200. E' quindi evidente come nell'attuale fase storica gli alimenti svolgano un ruolo di interesse primario, sia per gli enormi costi che il Sistema Sanitario Nazionale deve sostenere per la cura delle patologie riconducibili ad essi, sia per il crescente interesse dei consumatori verso la salubrità degli alimenti. L'Europa si sta attrezzando per rispondere alle esigenze dei consumatori mettendo in campo una serie di strutture e di metodologie che garantiscano la sicurezza degli alimenti 'dalla fattoria alla tavola'.

È quindi importante, oltre all'applicazione di nuovi quadri giuridici del settore alimentare capaci di coprire l'intera catena alimentare, anche la necessità di disporre di metodi d'analisi semplici, rapidi ed affidabili, per l'esecuzione di appropriati controlli e per poter attuare rapide ed efficaci misure di salvaguardia di fronte ad emergenze sanitarie che si manifestino in qualsiasi punto della catena alimentare.

La presentazione illustrerà nuovi sensori, biosensori ed immunosensori elettrochimici recentemente sviluppati nel nostro laboratorio per applicazioni in quest'area di grande interesse. I metodi elettrochimici hanno mostrato, infatti, qualità specifiche come velocità di analisi, buona selettività, buona applicabilità all'analisi di campioni reali. Tecniche voltammetriche di stripping ed elettrodi stampati monouso (SPEs), opportunamente modificati, sono stati utilizzati, ad esempio, per la determinazione del Piombo nel latte.

Gli stessi elettrodi, insieme con anticorpi specifici, sono stati utilizzati per lo sviluppo di nuovi sistemi immunoelettrochimici di screening capaci di rivelare la presenza/assenza di microrganismi patogeni quali *Salmonella spp* e *Listeria monocytogenes*; utilizzando particelle magnetiche come supporto per la catena immunologica, ed una rivelazione finale tramite SPEs. L'efficacia del sistema sviluppato per la ricerca della salmonella è stata verificata analizzando campioni di carne sperimentalmente contaminati con 1-10 cellule di differenti sierotipi di salmonella, ed i risultati

confermati analizzando gli stessi campioni sia con il metodo colturale classico che con la PCR Real Time SYBR Green I accoppiata all'analisi della temperatura di melting.

Sono stati realizzati inoltre immunosensori capaci di determinare micotossine spesso presenti su cereali e prodotti a base di cereali destinati all'uso umano ed animale, quali i tricoteceni appartenenti al gruppo A (T₂ ed HT₂) e B (DON), o l'Aflatossina B1.

Le Aflatossine B1 e B2 sono state anche determinate tramite un nuovo approccio, basato sull'inibizione dell'enzima Acetilcolinesterasi, ed applicato alla misura di campioni reali di orzo ed olio, lo stesso tipo di approccio utilizzato per la determinazione di pesticidi organofosforici e carbammici nelle acque.

Si ringrazia il progetto CEE CT 2005-006988 Biocop ed il progetto Nazionale PRIN 2005 per il supporto finanziario.

AMPEROMETRIC GLUCOSE DETERMINATION BY MEANS OF GLUCOSE OXIDASE IMMOBILIZED ON A CELLULOSE ACETATE FILM: DEPENDENCE ON THE IMMOBILIZATION PROCEDURES.

Marianna Portaccio^{a,b}, Daniela Durante^a, Andrea Viggiano^{a,b}, Daniela Di Tuoro^b, Umberto Bencivenga^c, Sergio Rossi^c and Damiano Gustavo Mita^{a,b,c}.

^a*Department of Experimental Medicine, Faculty of Medicine and Surgery, Second University of Naples, Via S. M. di Costantinopoli, 16 – 80136 Naples, Italy.*

^b*National Institute of Biostructures and Biosystems “INBB” – Viale Medaglie d’oro, 305- 00136 Rome, Italy*

^c*Institute of Genetics and Biophysics of CNR, Via Pietro Castellino, 111-80131 Naples, Italy*

Glucose microelectrodes were prepared by immobilizing glucose oxidase onto a cellulose acetate film coating a platinum wire. Hexamethylenediamine (HMDA) and Glutaraldehyde (GA) were employed as spacer and coupling agent, respectively. Sensitivities and linear response ranges were studied as a function of the relative amounts of HMDA and GA. The best sensitivity was found when HMDA and GA were 5% and 2.5% in aqueous solutions, respectively. Taking as a reference the functioning of this biosensor, the roles of HMDA and GA percentages appear to be opposed when the extension of the linear response range is considered. Indeed, an increase of one unit in HMDA percentage (from 5 to 6 %) induces an increase in the extension of the linear response range equal to that obtained with a decrease of one unit of GA percentage (from 2.5 to 1.5%).

The functioning of the biosensor displaying the highest sensitivity was tested with pineapple juice and rat serum, giving results comparable to those obtained by means of the glu-cinet test. Moreover, the “in vivo” glucose measurement during induced glycaemia in *Sprague Dawley* rats by intra-peritoneal glucose injections resulted similar to that obtained by using a commercial glucometer.

BIOSENSORI OTTICI A RISONANZA PLASMONICA MEDIANTE IMMAGINI

Roberto Rella

IMM-CNR, Sezione di Lecce, via Arnesano, 73100 Lecce (Italy)

roberto.rella@le.imm.cnr.it

Lo sviluppo di sistemi sensoriali capaci di monitorare in modo specifico interazioni DNA/DNA complementare, antigene/anticorpo, proteina/anticorpo ecc., di una data specie rappresentano un apporto importante alla biologia molecolare. Tali tipi di sistemi vengono chiamati biosensori, dispositivi analitici costituiti da un elemento biologico (sistema di riconoscimento molecolare che interagisce con l'analita) e un trasduttore di segnale. In genere l'elemento biologico è rappresentato da un oligonucleotide specifico (sonda), immobilizzato sulla superficie del sensore, in grado di interagire e legarsi specificatamente con una sequenza complementare (analita) presente in soluzione. Tra i sistemi di trasduzione maggiormente usati (acustico, elettrochimico, piezoelettrico ecc.) quelli di tipo ottico sono ben collocati all'interno di questa tematica poiché permettono di misurare direttamente la variazione locale dell'indice di rifrazione indotta dalla reazione biomolecolare e di studiare in parallelo la risposta cinetica delle interazioni biologiche misurate, senza dover ricorrere a dei marcatori.

Allo scopo di rilevare per via ottica un processo chimico o biologico che avviene sulla superficie di un sensore, una scelta molto comune consiste nell'utilizzo di tecniche basate sulle onde evanescenti. Tali tecniche, infatti, permettono di monitorare variazioni dell'indice di rifrazione che avvengono entro un centinaio di nanometri dalla superficie del sensore e sono il risultato del legame della molecola biologica studiata con il recettore immobilizzato sulla superficie del sensore (o della successiva dissociazione di tale complesso).

La tecnica della risonanza plasmonica di superficie (SPR) sfrutta il principio secondo cui un campo evanescente viene generato quando la luce subisce una riflessione totale all'interfaccia tra mezzi con differenti costanti ottiche come il vetro e l'aria. Anche se la luce viene riflessa all'interfaccia, il campo elettromagnetico penetra nel secondo mezzo decadendo in maniera esponenziale e perpendicolarmente al bordo e si propaga parallelamente ad esso. L'onda che si propaga lungo l'interfaccia è proprio l'onda evanescente. Essa è utilizzata per eccitare i cosiddetti plasmoni di superficie in un sottile film metallico posto in corrispondenza dell'interfaccia vetro/aria, facendo registrare un minimo nell'intensità della luce riflessa in conseguenza di tale eccitazione. Un fascio parallelo di luce monocromatica colpisce ad un determinato angolo di incidenza un film di oro opportunamente funzionalizzato chimicamente, dopo aver attraversato un prisma di vetro nella

configurazione Kretschmann. L'intensità della luce riflessa fornisce una valida rappresentazione della distribuzione dell'indice di rifrazione sulla superficie dello strato attivo. L'adsorbimento di molecole, come ad esempio di acidi nucleici, su tale superficie influenza il suo indice di rifrazione, causando così una variazione di riflettività della luce incidente che può essere monitorata con una CCD per fornire una mappa della distribuzione dell'indice di rifrazione. Alcuni tipici esempi di utilizzo della tecnica verranno evidenziati partendo dalla progettazione e preparazione dei supporti per eccitare i plasmoni di superficie illustrando alcune recenti applicazioni relative ai settori agroalimentare e biomedicale.

BIOSENSORI OTTICI INTEGRATI IN SILICIO POROSO

I. Rendina e L. De Stefano

Istituto per la Microelettronica e Microsistemi – Consiglio Nazionale delle Ricerche – Unità di Napoli - Via P. Castellino 111, 80131 Napoli, email: ivo.rendina@na.imm.cnr.it; luca.destefano@na.imm.cnr.it

I biochip ed i lab-on-chip sono dei microsistemi complessi che rappresentano l'evoluzione tecnologica più spinta del laboratorio analitico tradizionale, coniugando tutte le funzioni generalmente svolte da strumentazione da banco in un unico dispositivo fabbricato su di un chip monolitico, tipicamente di silicio cristallino, ed assemblato con altri materiali compatibili, come il silicio poroso, il vetro e i polimeri, aventi ciascuno una propria specifica funzionalità [1]. Tipicamente un biochip si differenzia da un sensore tradizionale perché impiega del materiale biologico come sonda per riconoscere gli analiti target in una matrice complessa: in tal modo si sfrutta l'alta specificità del riconoscimento molecolare. Gli altri componenti del biochip sono i dispositivi di microfluidica per il trasporto delle soluzioni da analizzare; il materiale di supporto adatto alla trasduzione dell'evento molecolare ed il sistema di rivelazione dello stesso. Lo sviluppo e l'integrazione di questi singoli elementi determinano le prestazioni ed il successo di un biochip nelle applicazioni per le quali c'è maggiore richiesta: nella diagnostica clinica, nell'analisi di inquinanti ambientali, in biomedicina, in agricoltura, nel rilevamento dell'inquinamento industriale, nel controllo delle fermentazioni. Ultimamente anche i settori difesa e sicurezza necessitano di dispositivi per il monitoraggio rapido e su vasta scala di agenti pericolosi, sia biologici che chimici. Tra i materiali precedentemente citati, risulta essere particolarmente innovativo il silicio poroso, recentemente proposto in diverse applicazioni biomediche soprattutto per la sua biocompatibilità. Grazie alla sua struttura simile ad una spugna, il silicio poroso è un materiale pressoché ideale come trasduttore di segnali: la sua superficie interna ha un'area specifica molto elevata dell'ordine di 200-500 m²-cm⁻³, così che l'interazione con le sostanze adsorbite, sia liquide che gassose, è estremamente efficace. In più, il silicio poroso è un materiale di basso costo, completamente compatibile con i processi standard per la fabbricazione dei circuiti integrati. Il silicio poroso è prodotto tramite attacco elettrochimico di un wafer di silicio in una soluzione di acido fluoridrico. Questo è il motivo per il quale tutta la superficie del silicio poroso è fortemente idrogenata, cioè ricoperta da legami Si-H. Dal punto di vista della chimica di superficie, la presenza dei legami Si-H fa sì che il silicio poroso sia fortemente idrofobico e molto reattivo [2].

I sensori ottici basati sul silicio poroso sfruttano le variazioni delle proprietà dielettriche di questo materiale quando è esposto all'analita che penetra nei suoi pori sostituendosi all'aria in essi presente. Ovviamente questo tipo di rivelazione dipende fondamentalmente dall'indice di rifrazione dell'analita e dalle sue proprietà chimico-fisiche, così che un sensore ottico in silicio poroso è in grado di riconoscere le sostanze pure. Diverso è il discorso per gli analiti presenti in miscele o in matrici complesse: il meccanismo di rivelazione non è selettivo e non riesce a distinguere le diverse componenti. Proprio per implementare la selettività del silicio poroso, sono stati proposti alcuni metodi chimici per modificare chimicamente la sua superficie ed attaccare covalentemente alcune sonde molecolari in grado di riconoscere le sostanze complementari con alta specificità.

In questa comunicazione presentiamo i più recenti risultati acquisiti dall'IMM-CNR, Unità di Napoli, nello sviluppo di biosensori ottici integrabili per applicazioni genomiche e proteomiche ottenuti in collaborazione con università ed altri istituti del CNR.

[1] F. S. Ligler and C. A. Rowe Taitt (Eds.), *Optical Biosensors: Present and Future* (2004), Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.

[2] L. Canham Ed., *Properties of porous silicon* (1997), IEE Inspec, London, United Kingdom.

BIOSENSORI CELLULARI LUMINESCENTI IN FORMATO MULTIPLEX: APPLICAZIONI PER MONITORAGGIO ECO-TOSSICOLOGICO E PER DIAGNOSTICA MEDICA

Aldo Roda, Elisa Michelini

Department of Pharmaceutical Sciences, University of Bologna, Via Belmeloro 6, 40126, Bologna, Italy

L'adozione di sistemi di riconoscimento molecolare come recettori o proteine biospecifiche inseriti in sistemi complessi e vitali come le cellule ha permesso di espandere il campo di applicazione dei biosensori in quanto consente, a differenza delle tecniche analitiche convenzionali, di valutare non solo la concentrazione ma la biodisponibilità e gli effetti biologici di analiti o sostanze tossiche di interesse ambientale e clinico. Questi sistemi sono ottenuti mediante l'inserimento all'interno della cellula di uno o più geni "reporter", che codificano per proteine rivelabili mediante tecniche di bioluminescenza, sotto il controllo di una specifica sequenza che ne induce l'espressione solo in presenza dell'analita.

Recentemente i biosensori cellulari che usano geni reporter bioluminescenti (ad esempio geni che codificano per luciferasi di lucciola, batterica o di *Renilla*, equorina...) hanno trovato largo impiego soprattutto nel monitoraggio ambientale, nel campo agro-alimentare e nella diagnostica medica.

Ad esempio sono stati sviluppati biosensori cellulari per il monitoraggio di composti ad attività androgenica/estrogenica costituiti da cellule di *Saccharomyces cerevisiae* modificate geneticamente in modo da esprimere il recettore umano per gli androgeni/estrogeni e come gene reporter la luciferasi di *Photinus pyralis*. Tali biosensori hanno trovato una prima applicazione nel monitoraggio di acque prima e dopo trattamento di depurazione in impianti municipali per fornire una valutazione integrata dell'efficacia dell'impianto nel rimuovere composti con attività pseudo-ormonale.^{1,2}

Biosensori cellulari bioluminescenti che utilizzano come gene reporter la luciferasi batterica o di lucciola sono stati inoltre sviluppati e applicati al il monitoraggio ambientale di metalli pesanti (ad es. mercurio, cadmio, arsenico) e diossine nelle acque e nei sedimenti.^{3,4}

Un'evoluzione di questi strumenti analitici è stata ottenuta tramite l'immobilizzazione delle cellule su superfici funzionalizzate con materiali idonei per mantenerne una ottimale vitalità ed allo stesso tempo per permettere una misura analitica affidabile e rapida. L'immobilizzazione delle cellule consente infatti l'utilizzo di nuovi formati analitici multianalita (piastre "multititer" e sistemi

"microarray", idonei per eseguire l'analisi simultanea di numerosi analiti) e lo sviluppo di sistemi portatili per analisi in situ.

Inoltre la disponibilità di nuovi geni reporter ottenuti da nuovi organismi o tramite mutagenesi sito-diretta e random ha ulteriormente espanso le potenzialità dei biosensori cellulari luminescenti ponendo le basi per lo sviluppo di "High Content Analysis". È possibile infatti ingegnerizzare una cellula con più geni reporter bioluminescenti (che emettono a diverse lunghezze d'onda o utilizzano diversi substrati) la cui espressione è regolata dalla presenza di diversi analiti e, misurando i singoli segnali, ottenere più informazioni analitiche.

Utilizzando queste strategie sono stati sviluppati numerosi biosensori cellulari che utilizzano cellule di lievito o linee cellulari umane per monitorare la presenza di composti ad attività pseudo-ormonale (distruttori endocrini), metalli pesanti, analiti di interesse diagnostico, in matrici ambientali, alimentari e in campioni clinici.⁵

1. Roda A, Mirasoli M, Michelini E, Magliulo M, Simoni P, Guardigli M, Curini R, Sergi M, Marino A. Analytical approach for monitoring endocrine-disrupting compounds in urban waste water treatment plants. *Anal Bioanal Chem.* 2006;385(4):742-52.
2. Michelini E, Leskinen P, Virta M, Karp M, Roda A. A new recombinant cell-based bioluminescent assay for sensitive androgen-like compound detection. *Biosens. Bioelectron.* 2005; 20:2261-7
3. Michelini E, Guardigli M, Magliulo M, Mirasoli M, Roda A, Simoni P, Baraldini M. Bioluminescent Biosensors Based on Genetically Engineered Living Cells in Environmental and Food Analysis. *Anal. Lett.* 2006; 39:1503-1515
4. Roda A, Pasini P, Mirasoli M, Guardigli M, Russo C, Musiani M, Baraldini M. Sensitive determination of urinary mercury(ii) by a bioluminescent transgenic bacteria-based biosensor. *Anal.Lett.* 2001;34(1), 29–41

Michelini E, Magliulo M, Leskinen P, Virta M, Karp M, Roda A. Recombinant cell-based bioluminescence assay for androgen bioactivity determination in clinical samples. *Clin Chem.* 2005;51(10)

RUOLO DELLA MICROFLUIDICA E DELLA SPETTROMETRIA DI MASSA NELLO SVILUPPO DI BIOSENSORI BASATI SU SURFACE PLASMON RESONANCE IMAGING

Giuseppe Spoto

Dipartimento di Scienze Chimiche, Università di Catania, Viale Andrea Doria 6, Catania.

La Surface Plasmon Resonance (SPR) è una tecnica ottica, in grado di sondare in modo rapido, in tempo reale e senza far ricorso a marcatori, interazioni che si instaurano tra sistemi biomolecolari all'interfaccia con una superficie metallica, affermatasi come tecnica di rilievo per lo sviluppo di nuovi biosensori. La possibilità di ricavare immagini SPR (SPR Imaging) espande le potenzialità applicative dell'SPR, in quanto rende possibile lo sviluppo di approcci analitici che consentano di operare in parallelo nell'investigazione di un elevato numero di interazioni biomolecolari. La reale utilizzazione dell'SPRI come biosensore operante secondo un formato multiplex passa, però, dal corretto controllo dei parametri sperimentali che influiscono sulla rivelazione dell'interazione recettore-analita, oltre che sulla adeguata funzionalizzazione della superficie metallica del sensore SPRI. In tale contesto di grande utilità risulta l'uso di dispositivi microfluidici in grado sia di controllare il patterning della superficie metallica, che di rendere più efficiente il processo di interazione.

Un fondamentale contributo allo sviluppo di biosensori basati sull'uso di superfici metalliche funzionalizzate con sistemi biomolecolari viene anche fornito dall'accoppiamento delle informazioni riguardanti il processo di interazione, ottenibili dall'SPR, con dati più tipicamente analitici ricavabili da studi di spettrometria di massa. Anche in quest'ultimo caso è necessario individuare le corrette procedure per lo studio spazialmente controllato dei sistemi immobilizzati.

Sulla base di quanto sopra verranno presentati esempi applicativi riguardanti l'uso di dispositivi microfluidici nella realizzazione di esperimenti di SPRI e l'uso dell'Electrospray Mass Spectrometry e Atmospheric Pressure MALDI- Mass Spectrometry per lo studio di sistemi proteici immobilizzati su superfici metalliche.

ABSTRACT POSTER

IL METODO MICRO BIOLOGICAL SURVEY

G. Antonini, A.Mari, M.T. Massucci

Dipartimento di Biologia e Laboratorio Interdipartimentale di Microscopia Elettronica, Universita' Roma Tre e MBS s.r.l, Tecnopolo Tiburtino, Roma

Il metodo Micro Biological Survey (MBS) è un sistema colorimetrico rapido che utilizza fiale monouso per la rilevazione e la conta selettiva di microrganismi in prodotti agroalimentari e in acque superficiali e per uso umano, le cui caratteristiche principali sono:

- Misurare l'attività catalitica di enzimi ossidoreduttasici del metabolismo primario, permettendo quindi di stabilire una corrispondenza inequivoca tra attività enzimatica misurata e carica microbica presente nel campione.
- Effettuare analisi microbiologiche da 3 a 10 volte più rapide rispetto ai metodi tradizionali basati sulla replicazione microbica.
- Permettere una rilevazione differenziale selettiva di: Carica batterica totale, coliformi, *E.coli*, *Stafilococco* spp, *Stafilococco aureo* e, in via di sperimentazione: *Pseudomonas* spp, *Salmonella* spp, *Listeria* spp., Funghi e muffe
- Avere una sensibilità tale da rilevare i differenti microrganismi, fino al limite teorico di 1 CFU/ml.
- Essere economico, con il costo globale di una singola analisi inferiore a quello delle pur economiche analisi tradizionali.
- Determinare quantitativamente la carica microbica anche su campioni solidi senza ricorrere alla omogeneizzazione e/o alla determinazione dell'MPN (*Most Probable Number*).
- Essere di facile esecuzione e permettere di effettuare analisi microbiologiche rapide, accurate, riproducibili e di grande sensibilità anche senza disporre della attrezzatura presente in un laboratorio di analisi microbiologiche (cappa a flusso laminare, autoclave, incubatore termostatico, ecc.).

Il metodo MBS è stato brevettato dall'Università Roma Tre e, nell'ambito dell'iniziativa Business Lab della FILAS SpA è nato un progetto che ha permesso ai ricercatori dell'Università Roma Tre di dimostrare la trasferibilità industriale dell'invenzione. Nel Marzo 2007 è stata quindi costituita la MBS srl, con sede presso il Tecnopolo Tiburtino, uno dei pochissimi spin-off universitari del Lazio. MBS completerà la ricerca e lo sviluppo industriale grazie ad agevolazioni concesse dal Ministero dell'Università e Ricerca (DM 593/00 Art. 11) e dalla FILAS SpA (DOCUP 2000-2006 Misura IV.2.2 Capitale di rischio).

UNA NUOVA TECNOLOGIA PER L'ESTRAZIONE DI ACQUA ULTRA-PURA DALLE SACCHE DI DRENAGGIO DELLA DIALISI PERITONEALE

Bianco M.^{1,2}, **Diano N.**^{1,2}, **Grano V.**^{1,3}, **Rossi S.**³, **Grimaldi T.**¹, **Prisco M.**³, **Battiniello P.**³, **Canciglia P.**⁴, **Mita D.G.**^{1,2,3}

¹ *Ist. Nazionale di Biostrutture e Biosistemi (INBB) – Viale Medaglie d'Oro, 305, 00136 Roma.*

² *Dipartimento di Medicina Sperimentale – Seconda Università di Napoli – Via S. M. di Costantinopoli, 16, 80138 Napoli.*

³ *Istituto di Genetica e Biofisica "ABT" – Via P. Castellino 111, 80131 Napoli.*

⁴ *Dipartimento di Farmacologia, Università di Messina, Via SS Annunziata, 90168, Messina – Italia.*

Il poter estrarre acqua pura dalle sacche di drenaggio della dialisi peritoneale (PD) consente di superare un gran numero di limitazioni di tale metodica, sia relative alla sua realizzazione clinica sia alle sue caratteristiche depurative. Infatti tale metodologia di dialisi rappresenta un trattamento meno diffuso della dialisi extracorporea a causa ad esempio dei volumi utilizzati (4,5 -20 litri nelle 24 ore) che possono provocare problemi di magazzino sia per l'ospedale sia per chi è inserito in un programma domiciliare.

In questo lavoro viene valutato l'impiego di un reattore operante in condizioni non isoterme (processo di termodialisi) per produrre acqua ultra pura a partire dal liquido di drenaggio della PD. Si pensa, infatti, che il recupero del solvente contenuto nelle confezioni di liquido per dialisi possa portare un contributo decisivo in termini di semplificazione della metodica, della sua diffusione ed, infine, di risparmio economico.

Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando 24 sacche di drenaggio provenienti da 8 pazienti sottoposti alla PD. I risultati hanno dimostrato che utilizzando il processo di termodialisi in un reattore a fascio tubiero operante in condizioni non isoterme si ottiene un' acqua pura corrispondente agli standards di riferimento diffusi dall' AAMI (Association for the Advancement of Medical Instrumentation) e dalla Farmacopea Europea (Eph). Inoltre i risultati hanno dimostrato che la resa del processo di termodialisi, in termini di volumi di acqua prodotta, dipende dalla differenza di temperatura applicata attraverso la membrana idrofobia. In particolare la produzione di acqua pura per metro quadro di superficie di membrana e per ora è risultata pari a 0.55, 1.2 e 2.0 L con differenze di temperatura pari a 11°C, 21°C e 28°C, rispettivamente.

I risultati incoraggiano l'impiego del processo di termodialisi per la produzione di acqua pura per uso farmaceutico.

MICROCANTILEVER ARRAY PLATFORM FOR THE DETERMINATION OF MELTING TEMPERATURES OF NUCLEIC ACIDS

Marina Dipasquale, Suman Cherian, Roberto Reiteri

Department of Biological and Electronic Engineering (DIBE) - Via all'Opera Pia 11a 16145

Genova - email: marina.dipasquale@unige.it

Microcantilever based sensors are a new class of extremely sensitive sensor devices currently developed for chemical and biological detection. Microcantilevers transducer recognition events on their receptor-coated surfaces into mechanical deflections. We report the use of a new optical reader set-up capable of monitoring the deflection of 16 cantilevers in parallel (VeriScan-3000TM) to determine the melting temperatures, T_m , of immobilized oligonucleotide duplex. We report for the first time the observation of duplex melting from deflection changes upon ramping of temperature of the flow cell cartridge. The T_m of an 25 nt long oligo was determined to be 40.7_C and for a 11 nt long oligo was determined to be 34.3_C.

ATTIVITÀ ANTI-PROLIFERATIVA E DIFFERENZIANTE INDOTTA DAL FRUTTO DI PSIDIUM GUAJAVA IN CELLULE LEUCEMICHE UMANE.

Doto A¹, Mita L², Nebbioso A¹, Miceli M¹, Abbagnano M¹, Rigano D³, Cioffi M¹, Altucci L¹, Sica V^{1,2,4}, Molinari A.M. ^{1,2,4} Bontempo P¹

¹Patologia Clinica - Dipartimento di Patologia Generale, ²Dottorato in Diagnostica di laboratorio: sviluppo di tecniche cellulari e molecolari e di bioingegneria e informatica, ³Dipartimento di Biologia vegetale - Federico II, ⁴Scuola di Specializzazione in Patologia Clinica.

Oli essenziali estratti dalle radici e dalle foglie di *Psidium Guajava* (Guava) presentano attività antiproliferativa in linee cellulari epiteliali e leucemiche. Abbiamo precedentemente dimostrato che il frutto di Guava possiede una spiccata attività anti-neoplastica e ciò ci ha indotto ad identificare quali parti del frutto ne sono principalmente responsabili ed a caratterizzarne il potenziale effetto antineoplastico.

L'efficacia biologica degli estratti totali di polpa, buccia e semi di Guava, è stata testata sulle linee cellulari mieloidi NB4 e U937 e blasti ottenuti da pazienti leucemici. Per ottenere la soluzione d'uso, il residuo secco è stato risospeso con poche gocce di DMSO e PBS, tamponato a pH 7.5 e filtrato. L'analisi del ciclo cellulare è stata effettuata mediante citofluorimetria a flusso FACScalibur e l'analisi delle caspasi eseguita con il programma "Cell Quest". La comparsa di specifici markers di differenziamento è stata evidenziata al citofluorimetro (FACScan, BD) mentre l'analisi dell'espressione proteica è stata analizzata mediante Western blotting.

Dai risultati ottenuti si evince che l'estratto ottenuto dalla sola polpa induce prevalentemente blocco della proliferazione ed arresto del ciclo prevalentemente in fase G1 e presenta una scarsa attività differenziante. E' stata riscontrata una forte induzione degli inibitori del ciclo cellulare p16 e p21 ed un attivazione del programma apoptotico evidenziata dall'aumento dell'espressione delle caspasi 3/7 coinvolte nella fase effettrice dell'apoptosi, e della caspasi 8 che rappresenta la caspasi iniziatrix del programma di morte cellulare. L'estratto ottenuto dalla buccia presenta, invece, un forte effetto differenziante evidenziato dalla comparsa di CD11c, marker di differenziamento verso la via granulocitica, e minore attività apoptotico. L'estratto ottenuto dai semi non mostra alcuna attività .

I nostri risultati hanno confermato l'attività antiproliferativa e differenziante dell'estratto totale del frutto di Guava. La capacità di indurre arresto proliferativo, differenziamento cellulare ed apoptosi dell'estratto del frutto potrebbe costituire un grosso potenziale terapeutico. Ciò suggerisce di

caratterizzare l'attività antineoplastica di Guava e di identificare i principi attivi responsabili di tale attività. Questo potrebbe rappresentare un'importante punto di partenza per la ricerca di trattamenti innovativi considerando l'alta percentuale degli effetti collaterali delle chemioterapie e il fallimento di diversi trattamenti medici o chirurgici applicati alla cura del cancro.

LA PREDIZIONE DEI FATTORI DI TRASCRIZIONE NEI GENI UMANI

Giulietti M, Piva F, Principato G.

Istituto di Biologia e Genetica, Università Politecnica delle Marche, Via Brecce Bianche, Monte D'Ago – 60131 Ancona. Tel: +39-0712204641, fax: +39-0712204609, email: f.piva@univpm.it

In questo lavoro abbiamo cercato di comprendere il meccanismo di regolazione di alcuni gruppi di geni che partecipano alla stessa funzione o allo stesso processo metabolico, attraverso risorse di biologia computazionale presenti in rete. Numerosi lavori riportano che i geni coinvolti in una stessa funzione sono spesso coregolati e ciò è spiegabile dal fatto che i promotori di tali geni legano fattori di trascrizione comuni. La comprensione della logica di attivazione dei geni permetterebbe di ottenere un modello in grado di prevedere le risposte cellulari agli stimoli. Sperimentalmente, la metodica della Chromatin Immuno-Precipitation (ChIP) è la più adatta a fornire informazioni su larga scala riguardo al tipo e alla posizione dei fattori di trascrizione presenti sui promotori dei geni. Poiché tale metodica presenta ancora costi elevati e si sta affermando recentemente, è importante poter usufruire di predizioni che indichino quali fattori di trascrizione sono più probabilmente presenti sul promotore. Mediante questo studio abbiamo confrontato i programmi di predizione più citati presenti in rete, al fine di conoscere i fattori di trascrizione comuni e specifici di alcuni gruppi di geni, quindi responsabili della loro simultanea attivazione. Confrontando le informazioni ottenute, abbiamo evidenziato importanti incongruenze tra i vari programmi di predizione. Realizzato che le differenze erano in parte dovute all'utilizzo di vari nomi sinonimi per indicare lo stesso fattore di trascrizione, abbiamo ridotto la complessità delle predizioni, costruendo una tabella di conversione per i nomi dei fattori di trascrizione sinonimi. Poiché la ripulitura non ha eliminato del tutto le incongruenze tra le predizioni dei diversi programmi ed esistono ancora pochi dati sperimentali, non è possibile stabilire quale strumento di predizione sia più attendibile. Pur scegliendo di utilizzare il programma che utilizza il database più recente, non emergono chiare indicazioni riguardo alla logica di coattivazione dei diversi gruppi di geni.

BIOREMEDIATION TOOLS BASED ON SILICA GEL- ENCAPSULATED DIOXYGENASES

Chiara Micaella¹, Raffaella Caglio², Francesca Valetti², Carlo Giunta², Stefano Bruno¹, Stefano Bettati¹ and Andrea Mozzarelli¹

¹ *Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Parma, Parma, Italy, and* ² *Department of Human and Animal Biology, University of Torino, Torino, Italy. E-mail: chiara.micaella@nemo.unipr.it*

Dioxygenases play an important role in the aerobic catabolism of many toxic aromatic hydrocarbons released in the environment as pesticides, herbicides, fire retardants and solvents. As a consequence, they might be of interest in the development of bioremediation strategies.

Catechol 1,2-dioxygenases (C1,2O) IsoB from *Acinetobacter radioresistens* S13 is a mononuclear Fe(III) homodimeric enzyme that catalyzes an intradiol cleavage of catechol to yield *cis,cis* muconic acid. In order to create bioreactors for bioremediation, C1,2O was encapsulated in silica gels and its catalytic properties were compared to those in solution. Protein encapsulation in silica gel was obtained by a sol-gel process, consisting of an acid catalyzed hydrolysis of silica alkoxides (such as TMOS and TEOS) and a subsequent polycondensation at alkaline pH. A mixture of TMOS and DMDMS (an organically modified silicate) was also used to encapsulate C1,2O. The organically modified silicate was chosen in order to increase the hydrophobicity of the gel, given that C1,2O is specific for hydrophobic substrates and has an hydrophobic tunnel binding two phospholipids, possibly involved in modulating the activity of the enzyme.

Enzymatic assays carried out on wild type C1,2O indicate that encapsulation in either an organically modified silicate or a TMOS-derived silica gel does not enhance the activity of the enzyme. A number of mutants were designed in order to achieve a higher specificity toward cholocatechols, which are well known pollutants. One of the most promising mutants, L69A, proved to be stabilized in TMOS-derived silica gel but particularly in TMOS/DMDMS-derived gels. This is probably due to the larger and more hydrophobic ligand binding pocket with respect to the wild type enzyme. Further studies are currently ongoing on other mutants and matrices, in order to optimize this strategy for the development of bioremediation tools.

ATTIVITA' ANTITUMORALE DEL FLAVONE NATURALE PURIFICATO DA *FEIJOA SELLOWIANA* IN CELLULE DI LEUCEMIA MIELOIDE ACUTA

Mita L^{1,2}, Doto A², Altucci L¹, Bontempo P², Nebbioso A¹, Miceli M¹, Abbagnano M¹, Basile A³, Rigano D³, Vietri M.T¹ Sica V^{1,2}, Molinari A.M^{1,2}

¹Dottorato di ricerca "Diagnostica di laboratorio: sviluppo di tecniche cellulari e molecolari e di bioingegneria e informatica, ²Dipartimento di Patologia Generale cattedra di Patologia Clinica, Dipartimento di Biologia Vegetale Federico II³

Le proprietà curative di alcune piante come *Feijoa sellowiana* (Berg) sono state spesso descritte in letteratura ma i meccanismi molecolari restano pressochè sconosciuti. L'attività antineoplastica, già descritta, dell'estratto del frutto di *Feijoa sellowiana* potrebbe costituire un grosso potenziale terapeutico. Ciò ci ha indotto a studiare i meccanismi molecolari responsabili di tale attività e ad identificare i composti biologicamente attivi contenuti nel frutto.

L'estratto totale acetonic del frutto di *Feijoa sellowiana*, dissolto in CH₃OH, è stato frazionato su colonna cromatografia in gel di silice mediante eluizione con *n*-hexane/EtOAc. L'analisi del ciclo cellulare è stata effettuata mediante citofluorimetria a flusso (FACScalibur) e l'analisi delle caspasi è stata eseguita con il programma "Cell Quest". La comparsa di specifici markers di differenziamento è stata evidenziata al citofluorimetro (FACScan, BD) mentre mediante Western blotting è stata analizzata la variazione dell'espressione proteica e l'acetilazione.

Il frazionamento dell'estratto acetonic di *Feijoa sellowiana* e la sua successiva purificazione hanno identificato nel flavone il composto principalmente responsabile dell'attività apoptotica. In linee cellulari leucemiche ed in colture *ex vivo* di blasti di pazienti affetti da leucemia mieloide acuta (AML), il flavone induce arresto proliferativi ed apoptosi già dopo 24h di trattamento alle concentrazioni di 85 e 170 M come evidenziato dall'aumento dell'espressione delle caspasi 3/7 e della caspasi 8 e dalla forte induzione degli inibitori del ciclo cellulare p16 e p21^{WAF1}. Tale effetto non si riscontra nei precursori normali CD34⁺.

L'attività apoptotica dell'estratto totale e del flavone si accompagna ad un aumento dell'acetilazione di target istonici (dell'istone H3) e target non istonici come l'--tubulina e ad inibizione delle istone deacetilasi (HCDC). Il flavone, contrariamente all'estratto totale, presenta una minima attività differenziante il che suggerisce che altri composti presenti nell'estratto potrebbero essere responsabili di tale effetto.

I nostri dati aprono nuove prospettive circa il trattamento di patologie umane ed indicano che alcuni componenti delle piante come il flavone possono esercitare un'attività anti-cancro mediante modulazione epigenetica (come l'inibizione delle HDAC). L'assenza di tossicità e l'idea di ricercare composti naturali che presentino un'attività anti-neoplastica potenzialmente sfruttabile in terapia, rappresenta il punto di forza del lavoro proposto.

NUOVI SUPPORTI CATALITICI PER IL MIGLIORAMENTO DELL'AROMA DEI VINI MEDIANTE GLICOSIDASI IMMOBILIZZATE

Nicolucci C.¹, Grano V.^{1,3}, Diano N.^{1,3}, Ricupito A.¹, Falco A.³, Bencivenga U.³, Mita D.G.^{1,2,3}

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

² *Dipartimento di Medicina Sperimentale, Biotecnologie e Sezione di Biologia Molecolare, Facoltà di Medicina Chirurgia - Seconda Università di Napoli - Via S.M. di Costantinopoli 16, 80136 Napoli, Italia.*

³ *Istituto di Genetica e Biofisica "A. Buzzati Traverso" del CNR - Via P. Castellino 111, 80131 Napoli, Italia.*

Le proprietà sensoriali del vino sono dovute alla presenza di glucosidi, molecole complesse costituite da molecole aromatiche dette agliconi, associati a zuccheri. I glucosidi, presentando bassa reattività e volatilità, fanno sì che le molecole aromatiche del vino, ossia gli agliconi, non possano essere avvertite dai sensi umani. Gli enzimi glicosidici liberano la porzione agliconica dai glucosidi, rendendola volatile e portando un miglioramento alla qualità del vino.

Obiettivo della ricerca è stato la realizzazione di nuovi supporti catalitici per incrementare l'aroma dei vini. A questo scopo è stata utilizzata β -glucosidasi immobilizzata con legame covalente su spugne di poliuretano, ottenute dalla polimerizzazione di Hypol 2000 con Brij-52 [di(etilen glicole)monoacetil etere] come emulsionante, e il CoCl_2 come iniziatore della reazione di polimerizzazione. L'attività dell'enzima è stata saggiata utilizzando substrati sintetici, come il *p*-NPG (*p*-nitrofenilglucopiranoside) idrolizzato a *p*-nitrofenolo (*p*-NP).

La stabilità dei supporti catalitici risulta ottima in quanto si riscontra una ritenzione dell'attività enzimatica del 93,86 % per la β -glucosidasi dopo due mesi di operatività. Sono stati effettuati, inoltre, esperimenti per la determinazione della temperatura e del pH ottimali sia dell'enzima libero che di quello immobilizzato. La dipendenza dell'attività catalitica per l'enzima libero nei confronti della temperatura è molto più marcata rispetto a quella dell'enzima immobilizzato che, tra l'altro, mostra uno shift della temperatura ottimale di circa 10 °C. Il pH ottimale della β -glucosidasi immobilizzata è a pH 4.2, quello dell'enzima libero è a pH 5.0.

In conclusione si può affermare di aver trovato una metodica di immobilizzazione la cui applicazione in enologia risulterebbe utile per almeno tre motivi: i) grande stabilizzazione dell'attività enzimatica nel tempo; ii) la forma immobilizzata dell'enzima risente in minor misura degli effetti dovuti ad una variazione della temperatura, e questo è importante per far funzionare l'enzima alle basse temperature delle cantine; iii) l'enzima immobilizzato presenta un optimum di pH a valori più acidi, e questo gli permette una migliore attività al pH acido del mosto e del vino.

Esperimenti sono in corso per verificare il comportamento della β -glucosidasi sui suoi substrati naturali, su soluzioni aventi caratteristiche più simili a quelle del vino e, per finire, sullo stesso vino.

DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DI GLUCOSIO MEDIANTE FLUORESCENZA UV UTILIZZANDO GLUCOSIO OSSIDASI SOLUBILE E INSOLUBILE

M. Portaccio^{1,2}, P. De Luca¹, P. Caputo², I. Manco¹, M. Lepore^{1,2}, D.G. Mita^{1,2}

¹*Dipartimento di Medicina Sperimentale, Seconda Università di Napoli*

²*Consorzio Interuniversitario Biostrutture e Biosistemi, "INBB" Roma*

Negli ultimi anni, sono state effettuate numerose ricerche sull'enzima glucosio ossidasi (GOD) al fine di realizzare sensori ottici da utilizzare in campo clinico e industriale.

Per questo lavoro abbiamo studiato due diversi metodi per la determinazione del glucosio utilizzando GOD sia libero che immobilizzato mediante intrappolamento in membrane di gelatina.

In un caso, abbiamo analizzato le variazioni di emissione di fluorescenza stazionaria nell'UV dell'enzima in funzione della concentrazione di glucosio. I campioni venivano eccitati ad una lunghezza d'onda di 295 nm e gli spettri di emissione venivano registrati tra 310 e 400 nm. Questo approccio permetteva di utilizzare la fluorescenza intrinseca della proteina e in particolare di alcuni suoi residui amminoacidici, come tirosine e triptofani.

Le variazioni di fluorescenza venivano caratterizzate quantitativamente mediante l'utilizzo di parametri ottico-cinetici e i loro valori venivano paragonati a quelli ottenuti precedentemente con la fluorescenza del FAD.

In seguito abbiamo utilizzato un metodo alternativo per determinare la concentrazione di glucosio, riguardante la variazione temporale di fluorescenza. La fluorescenza del GOD sia libero che immobilizzato, veniva inizialmente misurata a 340 nm, quindi dopo l'aggiunta di glucosio a diverse concentrazioni, veniva monitorata la variazione temporale di fluorescenza dell'enzima. Questo secondo approccio permetteva di sfruttare la differente emissione di fluorescenza del FAD ridotto e ossidato legato alla proteina enzimatica. Anche in questo caso venivano condotte delle analisi quantitative. Questo metodo offre il vantaggio di monitorare un segnale alto ma non specifico, quale è quello ottenuto con la fluorescenza UV, per caratterizzare la fluorescenza del complesso FAD-glucosio che è più bassa ma altamente specifica.

I risultati ottenuti sia per la fluorescenza in fase stazionaria che per l'evoluzione temporale della fluorescenza, hanno evidenziato che, con il GOD immobilizzato, è possibile ottenere range lineari di calibrazione più ampi rispetto a quelli ottenuti utilizzando la fluorescenza nel visibile. Per quanto riguarda la "sensibilità" del metodo di misura utilizzato è chiaro che per la fluorescenza stazionaria, la sensibilità diminuisce quando il GOD è immobilizzato, ma la percentuale di decremento non è

alta come quella ottenuta per l'emissione di fluorescenza nel visibile. Risultati migliori si ottengono quando viene misurata la variazione di fluorescenza nel tempo. In questo caso, infatti la sensibilità per l'enzima immobilizzato è maggiore di quella ottenuta per l'enzima libero. Questi ultimi risultati sono molto incoraggianti soprattutto in vista di un utilizzo di questo metodo per la realizzazione di sensori per la determinazione di glucosio nei fluidi biologici, per i quali la fluorescenza stazionaria nell'UV darebbe risultati poco specifici a causa della presenza di numerose proteine.

Infine, l'utilizzo dell'evoluzione temporale della fluorescenza sempre con l'enzima immobilizzato ci ha permesso di raggiungere sensibilità maggiore di quelle ottenute da altri ricercatori che avevano utilizzato la fluorescenza esogena del GOD marcato con probe fluorescenti.

REALIZZAZIONE DI UN BIOSENSORE AMPEROMETRICO MULTIENZIMATICO PER LA DETERMINAZIONE DEL LATTOSIO.

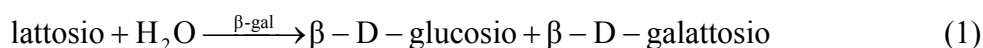
Portaccio M.^{1,2}, Di Martino S.¹, **Di Tuoro D.**², Manco I.¹, Mita D.G.^{1,2}

¹ *Dipartimento di Medicina Sperimentale - Facoltà di Medicina e Chirurgia - II Università degli studi di Napoli.*

² *Consorzio Interuniversitario "Istituto Nazionale Biostrutture e Biosistemi" - INBB Roma.*

E' stato realizzato un biosensore amperometrico a tre elettrodi per la rivelazione di lattosio in soluzioni acquose. L'elettrodo di lavoro, su cui sono stati coimmobilizzati gli enzimi glucosio ossidasi (God) e β -galattosidasi (β -gal), è di grafite; l'elettrodo di riferimento è un elettrodo Ag/AgCl, quello contatore è di platino. L'elettrodo di lavoro è mantenuto ad un potenziale costante e positivo (+700mV) rispetto all'elettrodo di riferimento mediante un potenziostato che permette anche l'acquisizione del segnale di corrente. Il biosensore viene utilizzato con architettura FIA (Flow Injection Analysis): una elettrovalvola, la cui apertura è regolata da un timer, permette l'immissione nel circuito del *carrier* o della soluzione contenente l'analita da determinare. Il *carrier* è una soluzione tampone, necessaria per la pulizia e la conservazione a riposo del biosensore. Un volume di 800 μ l di soluzione contenente lattosio viene immesso nel circuito di alimentazione.

Il lattosio raggiunge l'elettrodo di lavoro ed interagisce con gli enzimi presenti secondo il seguente schema:



Il perossido di idrogeno prodotto nella reazione (2), a sua volta, è ossidato sull'anodo generando in tal modo una corrente proporzionale alla concentrazione di lattosio:



L'immobilizzazione degli enzimi sull'elettrodo di grafite è stata effettuata mediante legame covalente. La grafite viene trattata con acido nitrico per generare sulla sua superficie dei gruppi

carbossilici (COOH) che, attivati con carbodiimide, legano l'esametildiammina a cui, successivamente, si lega covalentemente il complesso glutaraldeide-enzima.

Si è studiata la risposta del biosensore in funzione della concentrazione relativa dei due enzimi immobilizzati.

I biosensori così ottenuti sono stati caratterizzati studiando l'andamento della corrente di picco (I_{picco}) in funzione della concentrazione dell'analita e misurando la sensibilità (S) ed il range lineare (RL) di risposta. Tutti gli esperimenti sono stati condotti a $T=25^{\circ}\text{C}$ usando il lattosio alla concentrazione opportuna in tampone fosfato a pH 6.5.

Tutti i biosensori si sono rivelati in grado di determinare il lattosio in soluzioni acquose. I risultati ottenuti hanno dimostrato che il biosensore ottenuto immobilizzando God alla concentrazione di 2 mg/ml e β -gal alla concentrazione di 6 mg/ml presenta una maggiore sensibilità ed un più ristretto range di risposta lineare rispetto a tutti gli altri realizzati.

Infine è stata anche valutata la risposta del biosensore al variare del pH della soluzione da analizzare. Si è trovato che la corrente presenta un valore compreso tra il 95 e il 100% nel range di pH tra 5 e 7.

SVILUPPO DI BIOSENSORI BASATI SU TECNOLOGIA FRET PER LA RILEVAZIONE DI XENOESTROGENI E METALLI PESANTI

Roberta Ruotolo, Gessica Marchini, **Samanta Raboni**, Andrea Mozzarelli, Simone Ottonello
*Dipartimento di Biochimica e Biologia Molecolare, Università di Parma, via G.P. Usberti 23/A,
43100 Parma, Italia.*

Nell'ambito del Progetto SIQUAL finanziato dalla Regione Emilia Romagna per lo sviluppo di nuovi metodi per il controllo della sicurezza alimentare, sono stati realizzati i prototipi di due biosensori ricombinanti per xenoestrogeni e metalli pesanti basati sulla tecnologia FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*). Il biosensore è costituito da due proteine fluorescenti della famiglia della *Green Fluorescent Protein* (*Cerulean*, CFP, e *Citrine*, YFP), fuse, rispettivamente, all'N- e al C-terminale del dominio di legame dell'ormone del recettore degli estrogeni umano (hER α) o di una proteina con una elevata affinità di legame per i metalli pesanti, la metallotioneina MT2a di *Arabidopsis thaliana*. Il legame del ligando induce un cambiamento conformazionale nel dominio proteico inserito fra le due proteine fluorescenti, che modifica l'orientamento e la distanza fra CFP e YFP rilevabile come variazione del segnale FRET. Risultati positivi sono stati ottenuti con il biosensore per i metalli pesanti, mentre il biosensore per gli xenoestrogeni è ancora in corso di ottimizzazione. Queste proteine chimeriche potranno essere utilizzate per lo *screening* di ligandi e xenobiotici e per lo studio della interazione fra ligandi e proteine d'interesse.

L'INDICE DI PROLIFERAZIONE CELLULARE COME MARKER DI INQUINAMENTO DA INTERFERENTI ENDOCRINI

Ricupito A.¹, Del Pozzo G.², Pisapia L.², Falco A.², Battiniello P.², Diano N.^{1,3}, Grano V.^{1,2}, Mita D.G.^{1,2,3}

¹ *Istituto Nazionale Biostrutture e Biosistemi, Roma.*

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

³ *Dipartimento di Medicina Sperimentale, Seconda Università di Napoli.*

Gli interferenti endocrini sono una categoria di contaminanti di origine sintetica o naturale che agiscono come modulatori del funzionamento del sistema endocrino ed esplicano i loro effetti dannosi quando si bioaccumulano negli organismi.

Come interferente endocrino modello abbiamo usato il Bisfenolo A (BPA), un monomero (228 Da) dalle caratteristiche estrogeniche, che viene ampiamente utilizzato per la produzione di plastiche policarboniche e di resine.

Come materiale biologico abbiamo utilizzato cellule della linea di carcinoma mammario umano MCF7 che incrementano la loro proliferazione in presenza di estrogeno.

La proliferazione cellulare è stata studiata analizzando l'incorporazione di timidina triziata nei nuovi filamenti di sintesi del DNA. La lettura tramite beta counter è indicativa della timidina che è stata incorporata nel processo di duplicazione delle cellule, ottenendo in tal modo una misura della proliferazione cellulare.

Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando campioni di concentrazioni note di BPA e/o utilizzando campioni delle stesse soluzioni di BPA trattati enzimaticamente con laccasi da *Trametes versicolor*. Il trattamento enzimatico del BPA porta ad un biorisanamento delle acque inquinate da questo composto. La diminuzione della concentrazione di BPA è stata eseguita mediante HPLC. Gli studi sono stati effettuati a diverse concentrazioni iniziali di BPA e a diversi tempi di trattamento enzimatico. Si è trovato che per tutte le concentrazioni iniziali studiate l'indice di proliferazione cellulare decresce in maniera esponenziale in funzione del tempo di trattamento enzimatico.

Possiamo quindi concludere che, almeno nel caso di cellule MCF7 e del BPA, l'indice di proliferazione può essere utilizzato come indicatore di inquinamento.

ENERGY-BASED PRINCIPLES TO PREDICT AMINO ACID-NUCLEOTIDE BASE SPECIFIC RECOGNITION IN PROTEIN-DNA COMPLEXES.

Francesca Spyraakis,^{1,2} Anna Marabotti,^{3,4} Angelo Facchiano,^{3,4} Andrea Mozzarelli,^{2,5} Glen E. Kellogg,⁶ Donald J. Abraham,⁶ and Pietro Cozzini.^{1,2}

¹Laboratory of Molecular Modelling, Department of General Chemistry University of Parma, Parma, Italy; ²Istituto Nazionale di Biostrutture e Biosistemi (INBB), Consorzio Interuniversitario, Rome, Italy; ³Laboratory for Bioinformatics and Computational Biology, Institute of Food Science, National Research Council, Avellino, Italy; ⁴Interdepartmental Research Center for Computational and Biotechnological Sciences (CRISCEB), Second University of Naples, Naples, Italy; ⁵Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Parma, Parma, Italy; ⁶Institute for Structural Biology and Drug Discovery, Virginia Commonwealth University, Richmond, Virginia, USA.

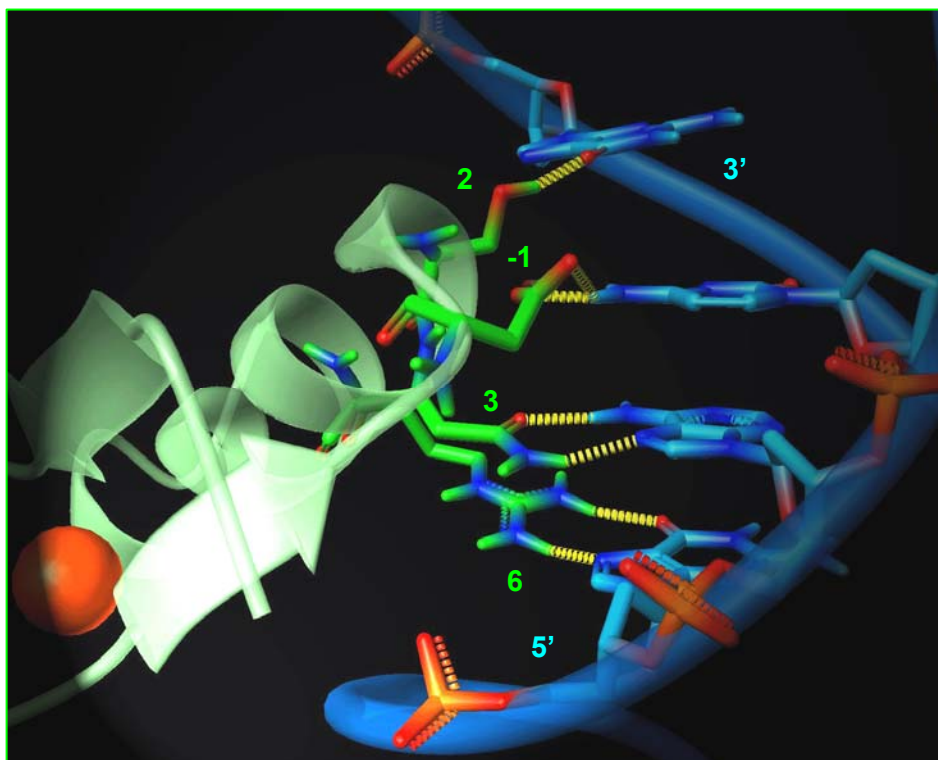
Even if many investigations have been carried out and many efforts have been done in order to investigate the interaction between protein and DNA, it is not yet clear if there are rules dictating the specific recognition between amino acids and nucleotide bases [1,2]. We addressed this problem by determining, for a 100 high-resolution protein-DNA complexes dataset, the frequency of occurring contacts, the energetics and sign of each interaction, and the contribution of bridging water molecules. The analyses were performed using HINT, a non-Newtonian empirical approach based on experimentally determined $\text{LogP}_{o/w}$ values, able to quantitatively evaluate both enthalpic and entropic contributions to the free energy of binding [3], and Rank, a geometry-based tool for evaluating hydrogen bond interactions [4]. Previous results obtained on a set of 39 crystallographic complexes testified the capability of the HINT force field to correctly evaluate the energetics of protein-DNA association, taking also into account the role of relevant water molecules [5].

The hydrophobic analysis identified that the contacts between some amino acids and bases (Arg-G, Lys-G, Glu-C, Asp-C, Asn-A, Gln-A, Ser-G, His-G) are highly specific and conserved and contribute about 80% of the total specificity free energy. Moreover, frequent and strong contacts usually involve G, C and A, but interestingly, not T. Not only favourable, but also unfavourable contacts were found to be conserved, with AA-T accounting for most of the negative HINT score. Careful inspection of interfacial crystallographic water molecules led to the identification of favoured amino acid/base water-mediated contacts: frequently A was in a water-mediated contact with positively charged or H-bond donor amino acids like Arg, Lys, Asn, Tyr, His and Ser, while C

was more often found in water-mediated contacts with Asp. In the first case, water alleviates electrostatic repulsion between H-bond donor groups, while in the second case water acts as an extension arm for shorter amino acid side chains.

The frequency, interaction energy, and water enhancement contribution associated with each amino-acid base pair were then applied to predict the base triplet recognized by the helix motif in 45 zinc fingers, identified by phage display selection and designed to bind 5'-ANN-3', 5'-CNN-3', 5'-GNN-3' sequences [6]. Our predictive tool managed to successfully describe 95/135 AA-B interactions based on a simple one-to-one amino acid-to-nucleotide base model, leading to a success rate of 70.4%. The prediction rate significantly increased to 89.7% when the energetic relevance of each AA-B pair was weighted with respect to the overall recognition energy, thus suggesting the importance to weight the relative energetic preferences of an amino acid for a given base with respect to the absolute energetic preference of an AA-B contact over the entire dataset. Only small improvements were achieved by introducing the frequency and water enhancement contribution weightings.

This work represents the first step towards the identification of energetically-based rules for the prediction of amino acid or base counterparts in known protein-DNA interaction motifs. Further investigation decoding context-dependent effects are necessary to better understand the association preferences and to further improve the reliability of our predictions.



Close-up of the crystallographic structure of the complex formed by the Zif268 protein DSNR variant and the GACC site located on the DNA double strand (PDB code 1A1F). The fundamental one-to-one interactions formed by residues -1, 2, 3 and 6, placed on the protein recognition helix, and four bases, located on the corresponding DNA major groove subsite, are highlighted.

References.

- [1] B.W. Matthews. Protein-DNA interaction. No code for recognition. *Nature*, 335: 294-295, 1998.
- [2] P.V. Benos, A.S. Lapedes, G.D. Stormo. Is there a code for protein-DNA recognition? Probab(istical)ly. *Bioessays*, 24: 466-475, 2002.
- [3] G.E. Kellogg, D.J. Abraham. Hydrophobicity: is $\text{LogP}_{o/w}$ more than the sum of its parts? *Eur. J. Med. Chem.*, 35: 651-661, 2000.
- [4] G.E. Kellogg, D.L. Chen. The importance of being exhaustive. Optimization of bridging structural water molecules and water networks in models of biological systems. *Chem. Biodivers.*, 1: 98-105, 2004.
- [5] F. Spyrakis, P. Cozzini, C. Bertoli, A. Marabotti, G.E. Kellogg, A. Mozzarelli. Energetics of the protein-DNA-water interaction. *BMC Struct. Biol.*, 7, 4, 2007.
- [6] I. Ghosh, C.I. Stains, A.T. Ooj, D.J. Segal. Direct detection of double-stranded DNA: molecular methods and applications for DNA diagnostics. *Mol. Biosyst.*, 2: 551-560, 2006.

LYSOSOMAL ASPARTIC PROTEASE CATHEPSIN D PROCESSING AS A NOVEL BIOMARKER FOR HEMATOPOIETIC STEM CELLS

¹Roberto Tiribuzi, ²Anna C. Berardi, ¹Sabata Martino and ¹Aldo Orlicchio

¹*Dipartimento di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche, Sezione Biochimica e Biologia Molecolare, Università degli Studi di Perugia, Via del Giochetto, 06126, Perugia*

²*IRCCS, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù; Roma*

A stem cell niche is a specialized microenvironment where resident cells orchestrate self-renewal and differentiation decisions through molecular signalling that may or may not depend on the type of adult tissue in which they are localized. Within a niche, stem cells are physically anchored through adhesion molecules that apparently mediate cross-talk to the niche itself, as well as the external milieu. Under physiological conditions, a stem cell niche functions to keep cell proliferation and differentiation under control, whereas transient proliferating signals are required to perform tissue regeneration duties. Within this context, a long-term goal of stem cell research is the elucidation of the molecular events involved with tissue homeostasis.

Lysosomal cathepsins play crucial roles in diverse biological processes, such as antigen-presentation, cancer, angiogenesis, cell proliferation, apoptosis, and metastatic progression. Known for their proteolytic activity toward certain adhesion molecules such as β -integrin and E-cadherin, these enzymes appear to be functionally linked to the biology of the stem cell niche. To elucidate their role, we investigated the expression of lysosomal Cathepsins D, S, B and L in stem cells derived from different embryonic origins: i) endodermal (hematopoietic stem cells, HSCs), ii) mesodermal (mesoangioblasts), and iii) ectodermal (neural stem cells).

Our results show that cysteine Cathepsins S, B and L are expressed as precursor forms in stem cells regardless of their embryonic origin, whereas Cathepsin D, an aspartic protease, appeared as a mature enzyme protein. However, there was a significant difference in Cathepsin D expression in HSCs isolated from bone marrow, a hematopoietic niche, *versus* circulating HSCs derived from either peripheral or cord blood. In the latter, only the precursor form of the enzyme was detected.

Based on these results we suggest cathepsin D as a specific biomarker to distinguish HSCs CD34⁺ from bone marrow rather than from circulating stem cells.

Acknowledgements: Supported by grant: FIRB IDEA PROGETTUALE RBIP06FH7J_002 (2007-2010)