

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

WORKSHOP

***“Malattie neurodegenerative:  
dalla biologia alla clinica”***

ATTI

*10-11 NOVEMBRE 2009  
ROMA*

**Segreteria Organizzativa:**  
I.N.B.B.  
Viale delle Medaglie d'Oro, 305  
00136 Roma  
Tel. 0635340153  
Fax. 0635451637  
E-mail: [inbbamm@inbb.it](mailto:inbbamm@inbb.it)  
[www.inbb.it](http://www.inbb.it)

# PROGRAMMA

*MARTEDI 10 NOVEMBRE*

**h. 10.00**                    **Registrazione dei partecipanti**

**h. 11.00**                    **Apertura dei Lavori**

Saluti

**PROF. FERRUCCIO FAZIO**

Viceministro alla Salute

Relazione Introduttiva

**PROF. DAMIANO GUSTAVO MITA**

Presidente INBB

**h. 11.30**                    **Sessione “Amiloidosi”**

*Chairman:*                    **PROF. ENRICO RIZZARELLI**  
Università di Catania

**VITTORIO BELLOTTI** – Università di Pavia “*From the mechanism of amyloidogenesis to the discovery of effective drugs: lessons from the model of  $\beta$ 2-microglobulin*”

**GENNARO ESPOSITO** – Università di Udine “*Aggregation and Interaction of Amyloidogenic Proteins*”

**PIERO PUCCI** – Università di Napoli “Federico II” “*Molecular mechanisms of [1–93]-ApoA-I identification of protein partners by a functional proteomics approach*”

**FABRIZIO CHITI** – Università di Firenze “*Relazione tra Struttura e Tossicità di Oligomeri Proteici*”

**GAETANO IRACE** – II Università di Napoli “*Effetto dei glicosamminoglicani sull'aggregazione amiloide dell'apomioglobina W7FW14F*”

**h. 13.30**                    *Lunch*

**h. 15.00**                    **Sessione “Malattie rare”**

*Chairman:*                    **PROF. VITTORIO TOMASI**  
Università di Bologna

**DOMENICA TARUSCIO** – Istituto Superiore Sanità – Roma “*Strategie ed iniziative sulle malattie rare intraprese a livello europeo e a livello nazionale*”

**ANTONIO FEDERICO** – Università di Siena “*L'esperienza senese nelle Malattie Neurologiche Rare: un importante settore assistenziale per la Neurologia ed un modello naturale per la comprensione delle normali funzioni del sistema nervoso centrale, periferico e del muscolo*”

**RENATA LONIGRO** – Università di Udine “*Eventi precoci di disfunzione cellulare nella malattia di Huntington e biomarcatori nel sangue periferico di affetti*”

**ANGELO POLETTI** – Università di Milano “*Clearance of misfolded proteins in inherited motor neuron diseases*”

**h. 16.45**                      *Coffee Break*

**h. 17.00**                      ***Sessione “Alzheimer”***

*Chairman:*                      **PROF. DAMIANO GUSTAVO MITA**  
II Università di Napoli

**FABRIZIO TAGLIAVINI** – Istituto Carlo Besta - Milano “*Good Protein, Bad Protein: A New A $\beta$  Variant Can Be Both*”

**AGOSTINO PALMERI** – Università di Catania “*Role of Amyloid- $\beta$  peptide in Alzheimer’s disease: from synaptic dysfunction to therapy*”

**LUCA STEARDO** – Università Roma “La Sapienza” “*La neuroinfiammazione nel morbo di Alzheimer come target per nuove strategie terapeutiche*”

**ADRIANA MAGGI** – Università di Milano “*Estrogen signalling and neurodegeneration*”

**MARCO BRUCALE** – Università di Bologna “*Conformational equilibria of intrinsically disordered proteins probed by single molecule methodologies*”

**h. 19.00**                      ***Chiusura dei lavori della giornata***

### **MERCOLEDÌ 11 NOVEMBRE**

**h. 9.30**                      ***Sessione “Parkinson e Sclerosi Laterale Amiotrofica”***

*Chairman:*                      **PROF. GIOACCHINO TEDESCHI**  
II Università di Napoli

**SABATINO MAIONE** – II Università di Napoli “*Intra-brain microinjection of human mesenchymal stem cells decreases allodynia in neuropathic mice*”

**ANDREA URBANI** - Università Roma “Tor Vergata” “*Proteomics investigations of protein degradation blockage in cellular dopaminergic models*”

**ANTONIO MUSARÒ** - Università Roma “La Sapienza” “*Il contributo del muscolo scheletrico alla patogenesi della Sclerosi Laterale Amiotrofica*”

**FRANCESCO FORNAI** - Università di Pisa “*Meccanismi di morte neuronale nella malattia di Parkinson*”

**ROBERTO DEL BO** – Università di Milano “*Le basi genetiche della Sclerosi Laterale Amiotrofica: un “puzzle” ancora tutto da completare*”

**h. 11.30**                      *Coffee-Break*

**h. 11.45**                      ***Sessione “Terapie innovative”***

*Chairman:*                      ***PROF. CARLO VENTURA***  
Università di Bologna

**PAOLO RICCIO** – Università della Basilicata “*The molecular basis for complementary nutritional intervention in multiple sclerosis and in other chronic inflammatory diseases: is there a need to develop dietary-related drugs for their treatment?*”

**SABATA MARTINO** – Università di Perugia “*Terapia delle malattie neurodegenerative con cellule staminali: overview sullo stato attuale*”

**LAURA VERGANI** – Università di Genova “*Effetti neuroprotettivi ed antiossidanti delle cellule staminali mesenchimali nel modello animale di sclerosi multipla* ”

**LUCIANO CONTI** – Università di Milano “*Cellule staminali per il trattamento di malattie neurodegenerative: problemi e prospettive*”

**EMILIO MERLO PICH** - Glaxo-Smith-Kline “*Neurodegeneration of hypothalamic orexin-containing neurons resulting in sleep, motivation and eating disorders: rationale for possible therapeutic approaches*”

**h. 13.30**                      ***Chiusura del Convegno***



## INDICE

	PAG.
<i>INTRODUZIONE AL WORKSHOP (DEL PRESIDENTE INBB PROF.D.G.MITA)</i>	9
<i>ABSTRACT RELAZIONI SCIENTIFICHE</i>	13
<i>ABSTRACT BORSISTI</i>	73
<i>ELENCO PUBBLICAZIONI CON AFFILIAZIONE INBB(ULTIMO TRIENNIO)</i>	105



## INTRODUZIONE AL WORKSHOP

Al momento della mia prima nomina a Presidente dell'INBB presi l'impegno di organizzare ad anni alterni il Convegno Nazionale del Consorzio, dove gli aderenti avrebbero avuto la possibilità di esporre i loro migliori risultati, e nell'anno successivo un workshop monotematico su argomenti di attualità ed in espansione sui quali stimolare la crescita culturale e scientifica del Consorzio stesso. E' stato nell'attuazione di questa idea programmatica che sono stati organizzati in successione il workshop sulle Biotecnologie (Bressanone 6/8 settembre 2001), sulle Cellule Staminali (Bressanone 11/13 settembre 2003), sugli Interferenti Endocrini (Roma 27/28 ottobre 2005) e sui Biosensori (Roma 9/10 ottobre 2007). Seguendo questo percorso siamo giunti al workshop che ci vede oggi qui riuniti sul tema delle Malattie Neurodegenerative. Riflettendo sul percorso fatto si vede come, nel tempo, si è passati da problematiche di ricerca di base a problematiche di ricerca applicativa, soprattutto nel settore ambiente e salute. Scopo dei workshop passati, ed ancor di più di quello odierno, era la volontà di integrare le competenze all'interno del Consorzio, per lo più di base, con le competenze esterne più applicate. Questo ha permesso la creazione di gruppi di interesse che, con orgoglio, potrei definire "di eccellenza" in cui con competenze interne ed esterne è stata costituita una massa critica pronta a competere a livello nazionale ed internazionale. Per tutti basta ricordare il gruppo sugli Interferenti Endocrini in cui il Consorzio INBB può, a ragione, considerarsi un punto di riferimento per la qualità, il numero e la multidisciplinarietà delle Unità di ricerca che lo costituiscono.

Veniamo al workshop di oggi. Come per gli altri workshop anche per l'attuale lo scopo è quello di far incontrare in una stessa sede le unità INBB operanti nel settore, quelle esterne all'INBB ed il mondo operativo dell'industria farmaceutica. Obiettivo dichiarato: far crescere la cultura e le collaborazioni in questo importante settore, creare un network pronto a competere per finanziamenti dentro e fuori la nazione, far vedere all'industria farmaceutica che esiste un potenziale scientifico che non desidera altro che essere valorizzato. Devo confessare che per me l'organizzazione del workshop è stata un'impresa molto pesante perché la tematica era molto lontana dalla mia formazione, ma mi ha aiutato moltissimo l'interesse dimostrato verso l'iniziativa da parte di un numero inaspettato di aderenti al Consorzio INBB, interesse che è andato ben al di là di ogni mia più rosea aspettativa. Se saremo in grado di raggiungere l'obiettivo prefissato, questo lo potete decidere solo voi, trovando le occasioni per integrare le competenze tra più Unità di Ricerca e per elaborare progetti comuni, possibilmente interfacciandosi anche con il mondo industriale.

L'INBB sta fornendo un terreno su cui costruire e/o seminare e vi posso assicurare che la mia azione di Presidente non si limiterà solo a fornire il terreno, ma sarà sempre pronta ad agire con voi ed a darvi tutto il supporto tecnico ed amministrativo per iniziative future. La presenza di tanti giovani che hanno chiesto di partecipare, anche se la loro attività di ricerca talvolta esula dalla tematica del workshop, mi fa ben sperare e spero che giovani intelligenti possano cogliere l'innovatività delle esperienze di ricerca che emergerà dagli speaker invitati.

Ma adesso vorrei esporre alcune considerazioni sullo stato dell'Università e della Ricerca nel nostro Paese. Come detto in altre occasioni, se ripetessi tali e quali le considerazioni già espresse negli ultimi anni esse sarebbero ancora di attualità perché nulla è cambiato, nonostante la dichiarata volontà pre-elettorale di tutti i partiti, sia di destra che di sinistra, e dei successivi Governi, poi, di voler rafforzare il sistema Università e Ricerca. Quel che è peggio è che non solo quasi nulla è cambiato, ma certamente la situazione è peggiorata. Nessuno nega che i tagli alla spesa pubblica per riuscire a contenere il debito pubblico siano una necessità per il Paese, ma non siamo e non possiamo essere d'accordo con tagli indiscriminati a tutti i Ministeri, senza tener conto del ruolo che le istituzioni da essi controllate svolgono per lo sviluppo del paese. I tagli pesanti sul Fondo di Funzionamento al sistema universitario previsti per il prossimo anno stanno ancora lì senza ripensamenti, nonostante le forti critiche da parte di Istituzioni, dei rettori, dei ricercatori, degli studenti. Tutto è importante, soprattutto in Italia, ma non si può negare che Istruzione, Ricerca ed Innovazione sia un settore trainante per lo sviluppo economico del Paese. E' un miracolo che i nostri ricercatori riescano a produrre scientificamente quel che producono con il poco che hanno. Non neghiamo che anche nel nostro settore ci possano essere dei fannulloni, che molti aspetti non siano trasparenti (da questo punto di vista una trasparenza sui processi di valutazione dei progetti sarebbe fondamentale, come ad esempio nel settore della ricerca del Ministero alla Salute si è iniziato a fare) e che ci possano essere le corporazioni dei baroni, ma tutto ciò non può essere un alibi per non fare niente per migliorare il sistema. Quest'anno abbiamo visto qualche bando in più (es. quello per ricercatori under 40) ma corrono "strane voci" sulla relativa copertura finanziaria. Non si può razionare il vitto a chi è già denutrito: così si rischia di "uccidere" il sistema Università e Ricerca in Italia. Ma anche senza la mannaia dei tagli, un'altra mannaia si è già abbattuta sulla ricerca italiana: la perenzione amministrativa.

Dopo un periodo di tre anni i fondi già stanziati e deliberati, ma non assegnati e quindi non spesi, ossia i residui, sono eliminati dalle scritture contabili dei Ministeri e ritornano al Ministero del Tesoro che li incamera e li usa come vuole. Legge, questa voluta dal centro sinistra ed utilizzata senza "deroghe" dal Governo attuale. Con questo sistema, ad esempio, un bel po' di soldi destinati ai progetti FIRB non sono stati versati agli organismi che avevano vinto i bandi e che avevano anticipato i costi. Non crediamo che ciò sia avvenuto in mala fede, ma ci si doveva rendere conto, in partenza, che i progetti FIRB durano tre, quattro o cinque anni e che quindi gli stanziamenti a tre anni, con tutta la burocrazia per ottenerli, erano destinati ad andare perenti. Ma anche per i progetti triennali le cose sono simili: tra autorizzazioni, bandi e concorsi occorre aspettare almeno un anno prima di partire: come si fa a spendere in tre anni? Il risultato è che, scaduti i tre anni, i soldi tornano nelle casse statali e pare che i finanziamenti "perenti" destinati alla ricerca ammontino a circa 250.000 milioni di euro! Ora il problema è che i residui perenti sono eliminati dalle scritture contabili, ma la perenzione non comporta la prescrizione del debito, che resta quinquennale (Corte Costituzionale 50/81). Se il creditore chiede il pagamento del residuo perente, questo dopo alcuni passaggi burocratici viene reiscritto nel capitolo

di provenienza e viene coperto con somme prese dal Fondo Speciale per la rassegnazione dei residui perenti. Ed allora il problema è risolto? No! L'attuale fondo speciale pare completamente insufficiente o addirittura esaurito. Questo significa che alla mannaia dei tagli si è aggiunta quella della più subdola della perdita per perenzione del recupero dei fondi anticipati dalle singole Istituzioni e, per questo, Istituzioni piccole come il nostro Consorzio possono rischiare il collasso.

Ma non tutto per fortuna è negativo. Finalmente, dopo tentennamenti, è partita l'ANVUR, l'agenzia che deve valutare in base al merito le Università e gli Enti di Ricerca. Siamo contenti per questo; già da epoca non sospetta abbiamo detto di volere questa Agenzia e che volevamo essere giudicati non temendo un giudizio negativo. Per questo abbiamo invitato i nostri aderenti a pubblicare con l'affiliazione INBB e, come si può vedere dall'elenco dei lavori raccolti negli atti del workshop, gli aderenti hanno risposto con intelligenza. I lavori non sono pochi, ma sicuramente sono molti di più data una certa pigrizia con cui alcuni nostri aderenti rispondono alle nostre richieste.

Altra risposta positiva è stata quella di applicare a finanziamenti come INBB e con immensa soddisfazione devo dire che questo anno c'è stata una forte impennata di applicazioni a progetti nazionali (FIRB giovani e "under 35" del Ministero della Salute) e a progetti europei. Un grazie sentito a quanti hanno partecipato a queste iniziative ed un incoraggiamento a tutti a continuare a pubblicare anche come INBB ed a farsi parte attiva nelle richieste di finanziamenti. Ricordo a tutti che pubblicazioni con l'affiliazione INBB e progetti di ricerca gestiti attraverso l'INBB sono dei bonus qualificanti per vincere le borse di studio per giovani ricercatori bandite annualmente dal nostro Consorzio.

Un'ultima e veloce considerazione sulla riforma, recentemente presentata, dell'università. Speriamo che il dibattito parlamentare non la snaturi più del necessario e che gli obiettivi di meritocrazia vengano perseguiti fino in fondo. L'iter parlamentare ci permetterà di ritornare sulle questioni affrontate con gli approfondimenti necessari, ma fin d'ora crediamo di poter dire che i buoni propositi esplicitati nel progetto di riforma rischiano di frantumarsi di fronte alla programmata scarsità di risorse per il sistema universitario!

Chiudo augurando a tutti buon lavoro ed un arrivederci alle prossime iniziative.

*Prof. Damiano Gustavo Mita*

*Roma, 10 Novembre 2009*



**ABSTRACTS**  
**RELAZIONI SCIENTIFICHE**

**SESSIONE**  
**“AMILOIDOSI”**



## **FROM THE MECHANISM OF AMYLOIDOGENESIS TO THE DISCOVERY OF EFFECTIVE DRUGS: LESSONS FROM THE MODEL OF B2-MICROGLOBULIN**

Vittorio Bellotti

<sup>†</sup>*Department of Biochemistry, University of Pavia*

Discovery of new molecules able to inhibit protein fibrillogenesis represents a challenging demand for treatment of amyloid disease. Recent advances in the elucidation of the mechanism of amyloidogenesis of  $\beta$ 2-microglobulin ( $\beta$ 2-m) are offering the unique opportunity to discover new anti-amyloidogenic compounds. Small molecules like tetracyclines and high affinity antibodies anti  $\beta$ 2-m represent two prototypic classes of interactors for potential pharmaceutical exploitation. From a series of ten analogues of tetracyclines we have singled out the two best anti-amyloidogenic compounds, able to inhibit the fibrillogenesis of  $\beta$ 2-m and capable solubilising preformed fibrils. Both compounds abrogate the cytotoxicity of oligomeric  $\beta$ 2-m. Whereas the tetracyclines exert their activity through a low affinity interaction with the amyloidogenic conformers, the monovalent nanobodies displays an anti-amyloidogenic capacity through a nanomolar affinity against  $\beta$ 2-m. The contact of the nanobody with specific regions of  $\beta$ 2-m can switch off its amyloidogenic propensity. Comparative analyses of the effectiveness of these molecules in the inhibition or disorganization of amyloid fibrils are essential preliminary steps toward the identification of therapeutic strategies for patients affected by DRA.

## AGGREGATION AND INTERACTION OF AMYLOIDOGENIC PROTEINS

Pagano K., Corazza A., Fogolari F., Mimmi M.C., Viglino P. and Esposito G.

*Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche, Università di Udine, P.le Kolbe, 4 - 33100 Udine - Italy*

The deposition of  $\beta$ 2-microglobulin ( $\beta$ 2-m), in fibrillar form, is associated to Dialysis Related Amyloidosis, DRA, a pathology arising in patients with renal failure following long-term haemodialysis treatment. Reducing the concentration of the amyloidogenic species by stabilizing the natively-folded protein is one of the strategies that can be pursued for a therapy of the disease. The characterization of the aggregation states and the interactions of  $\beta$ 2-m by NMR spectroscopy provides extremely useful information at the molecular level that help understanding the mechanisms and the properties of the systems under investigation. Examples will be illustrated concerning the effect of two different  $\beta$ 2-m ligands, namely a camelid antibody derivative and a small tetracycline antibiotic.

**MOLECULAR MECHANISMS OF [1–93]-APOA-I IDENTIFICATION  
OF PROTEIN PARTNERS BY A FUNCTIONAL PROTEOMICS  
APPROACH**

Maria Monti<sup>1,2</sup>, Viviana Pisa<sup>1</sup>, Angela Arciello<sup>3</sup>, Daria M. Monti<sup>3</sup>, Fulvio Guglielmi<sup>3</sup>, Renata Piccoli<sup>3</sup> and Piero Pucci<sup>1,2</sup>.

<sup>1,2</sup>*CEINGE Biotechnologie Avanzate and Dipartimento di Chimica Organica e Biochimica,*  
<sup>3</sup>*Dipartimento di Biologia Strutturale e Funzionale, Università di Napoli Federico II.*

Functional proteomics approaches are addressing two major topics, the elucidation of biological function of unknown proteins and the definition of cellular mechanisms at the molecular level. In the cells, many proteins display their biological functions through the rapid and transient association within large protein complexes. Understanding protein functions as well as unraveling molecular mechanism within the cell is then depending on the identification of the interacting protein partners. The association of an unknown protein with partners belonging to a specific protein complex involved in a particular process would in fact be strongly suggestive of its biological function. Furthermore, a detailed description of the cellular signaling pathways might greatly benefit from the elucidation of protein-protein interactions in the cell.

A key contribution to the identification of interacting proteins in stable complexes in cellular systems is provided by affinity-based approaches. The basic idea is to express the protein of interest with a suitable tag to be used as a bait to fish its specific partners out from a cellular extract. Isolation of the entire multi-protein complex can then be accomplished by taking advantage of the availability of several anti-tag systems, immobilized on agarose-sepharose supports, and showing high binding efficiency.

Apolipoprotein A-I (ApoA-I) is the major protein component of high density lipoprotein particles and plays a key role in the binding of high density lipoproteins to cell surfaces, and the promotion of cholesterol efflux from cells. A variety of familiar amyloidosis are associated with mutations in ApoA-I, for which the process of fibril formation has not yet been clarified, and a paucity of information exists in comparison to the detailed knowledge surrounding other disease-associated proteins. Analysis of natural amyloid fibrils has shown that fibrils consist of ApoA-I N-terminal fragments, 90–100 residues long. Mutations are sometimes present within the N-terminal portion of the protein that is eventually found in fibrils (“internal mutations”), but can also occur in positions located outside this region of the polypeptide sequence (“external mutations”).

In some familiar amyloidosis, ApoA-I fibrils have been shown to accumulate in the cardiac tissue, where amyloid deposits were found to be mainly constituted by the 93-residue N-terminal polypeptide, named [1–93]ApoA-I. A functional proteomics approach was then designed to investigate whether membrane proteins might be involved in the process of ApoA-I fibril formation. [1–93]ApoA-I was fused to GST and immobilised onto glutathione-sepharose beads to be used in a GST pull down assay with a membrane protein extract from a cardiomyoblasts rat cell line. GST sepharose beads were employed as control. Proteins specifically bound by the bait were eluted and fractionated by SDS-PAGE; protein bands were *in situ* digested with trypsin and analyzed by nano-chromatography tandem mass spectrometry (nanoLC-MS/MS). Raw data from mass spectral analyses were employed to search for a non-redundant protein database using the MASCOT software.

GST-[1–93]ApoA-I protein interactors were listed in different classes according to their functions as reported in literature. Some membrane receptors were identified, but most of the putative interacting proteins were involved in vesicle protein trafficking, in particular associated to the lipid droplet- membrane traffic. Some proteins involved in fatty acid metabolism and protein degradation were also identified. These results suggest that following interaction with the plasma membrane, [1–93]ApoA-I might be internalized by one or more vesicle pathways.

In line with these observations, fluorescence microscopy experiments on cardiomyoblasts incubated with FITC-labelled ApoA-I or its N-terminal polypeptide demonstrated that both proteins interact with the plasma membrane and are internalized by the cells.

## RELAZIONE TRA STRUTTURA E TOSSICITÀ DI OLIGOMERI PROTEICI

Fabrizio Chiti

*Dip. Scienze Biochimiche, Università di Firenze, Viale Morgagni 50, 50134 Firenze, Italia*

Un crescente numero di evidenze sperimentali indica che gli oligomeri che precedono la formazione di fibrille ben definite svolgono un ruolo critico nella patogenesi delle malattie da deposizione proteica. Tuttavia, la caratterizzazione strutturale di tali specie è di difficile soluzione, soprattutto a causa della loro natura dinamica, eterogeneità strutturale e instabilità. Per superare questo problema abbiamo sfruttato l'elevata propensione ad aggregare del dominio N-terminale di HypF da *E.coli* (HypF-N), capace di formare, in determinate condizioni, oligomeri stabili. Gli oligomeri di HypF-N sono stati preparati usando due protocolli distinti, cioè la condizione A e la condizione B. Gli aggregati ottenuti risultano oligomeri sferici e morfologicamente indistinguibili se osservati con la microscopia a forza atomica. Quando i due tipi di aggregati sono aggiunti al medium extracellulare di cellule di neuroblastoma umano SH-SY5Y e di cellule murine endoteliali Hend in coltura, solo quelli formati in condizione A si sono rivelati in grado di compromettere la vitalità cellulare, come mostrato dal test di riduzione dell'MTT e dalla colorazione di Hoechst.

La disponibilità di oligomeri proteici formati dalla stessa proteina, ma dotati di capacità così diverse nel causare disfunzione cellulare, fornisce una grande opportunità per studiare l'origine strutturale della disfunzione cellulare provocata dagli oligomeri. Per studiare le differenze strutturali dei due tipi di aggregati ottenuti nelle due condizioni è stata usata una sonda fluorescente in grado di formare eccimeri, la N-(1-pirene)maleimide. Gli eccimeri si formano, e sono manifesti nello spettro di fluorescenza, quando due molecole di pirene si trovano ad essere impilate l'una sull'altra entro una distanza di 4-10 Å. Perciò, coniugando una sola molecola di questo colorante ad una catena polipeptidica si possono ottenere informazioni sulle interazioni inter-catena negli oligomeri. 20 mutanti di HypF-N aventi un singolo residuo di cisteina situato in posizioni differenti della catena polipeptidica sono stati marcati selettivamente con la sonda ed ognuno di essi è stato incubato per quattro ore a 25 °C nelle due condizioni A e B per formare gli oligomeri. Sono stati poi acquisiti spettri di fluorescenza per ogni mutante marcato ed aggregato in entrambe le condizioni.

L'analisi condotta sugli oligomeri non tossici ottenuti in condizione B mostra un segnale significativo di eccimero per le tre regioni della sequenza aminoacidica maggiormente idrofobiche comprendenti approssivamente i residui 22-34, 55-59 e 75-87. Questo indica che tali regioni contribuiscono alla struttura degli aggregati e formano interazioni inter-catena negli oligomeri. Per confronto, l'analisi condotta sugli oligomeri tossici formati in condizione A rivela che le stesse

regioni sono solo marginalmente strutturate e formano deboli, ove esistenti, interazioni intermolecolari. Sono state trovate anche differenze nei valori del rapporto  $I_I/I_{III}$  negli spettri di fluorescenza del pirene, con gli oligomeri tossici formati in condizione A aventi valori più bassi in corrispondenza delle suddette tre regioni idrofobiche. Questo indica che gli oligomeri tossici formati in condizione A hanno (i) un minor grado di impacchettamento dei residui idrofobici e (ii) una maggior esposizione al solvente di tali residui.

Ulteriori esperimenti indicano che entrambi gli oligomeri sono in grado di interagire con la membrana cellulare ma solo le specie tossiche formate in condizione A sono in grado di attraversare la membrana, penetrare all'interno delle cellule e causare l'entrata di calcio extracellulare all'interno del citosol. La tossicità può essere soppressa se gli oligomeri tossici sono pre-incubati con chaperoni molecolari, come  $\alpha$ B-cristallina, clusterina, Hsp70, prima di essere aggiunti alle colture cellulari. I chaperoni sembrano sopprimere la tossicità legandosi agli oligomeri e schermando le loro regioni idrofobiche, piuttosto che dissolvendo gli oligomeri o rimodellarne la struttura. Complessivamente i dati forniscono informazioni strutturali sui due tipi di oligomeri pre-fibrillari formati dalla stessa proteina, suggeriscono l'origine strutturale del danno cellulare mediato dagli oligomeri pre-fibrillari e forniscono indizi su nuovi meccanismi di azione attraverso i quali i chaperoni molecolari mantengono l'omeostasi proteica.

## EFFETTO DEI GLICOSAMMINOGLICANI SULL'AGGREGAZIONE AMILOIDE DELL'APOMIOGLOBINA W7FW14F.

Irace G., Vilasi S., Sirangelo I.

*Dipartimento di Biochimica e Biofisica, Seconda Università di Napoli.*

I processi di aggregazione di proteine e peptidi sono stati, negli ultimi venti anni, oggetto di intensi studi in diversi campi della ricerca scientifica e tecnologica. In particolare, è stato riconosciuto che l'incapacità di una proteina ad adottare la sua conformazione nativa, processo riferito come "protein misfolding", è alla base di numerose malattie che affliggono l'uomo specialmente quelle degenerative. E' ormai provato che più di 40 patologie umane sono associate alla formazione di aggregati fibrillari extracellulari di natura proteica, noti come fibrille amiloidi, o ad analoghi depositi intracellulari. L'arrangiamento supra-molecolare delle fibre amiloidi è caratterizzato da una struttura cross-beta, un motivo strutturale particolarmente stabile, che è adottato da tutte le forme amiloidi, indipendentemente dalla struttura secondaria della proteina nativa. Anche proteine non coinvolte in alcuna patologia sono capaci di formare fibrille amiloidi morfologicamente e strutturalmente indistinguibili da quelle patologiche. Pertanto, la capacità di formare strutture amiloidi sembra essere una proprietà generica delle proteine, strettamente correlata alle proprietà dello scheletro polipeptidico.

Recentemente, notevole attenzione è stata rivolta all'influenza che molecole biologiche, come collagene, acidi nucleici e glicosamminoglicani (GAGs) esercitano sul processo di aggregazione amiloide *in vivo*. Nella maggior parte delle amiloidosi, per esempio, i GAGs sono spesso associati ai depositi amiloidi e ci sono evidenze per un loro ruolo nel favorire la formazione delle fibrille e la loro stabilizzazione. Il proposito di questo studio è stato quello di studiare le basi molecolari dell'interazione GAGs-proteina per meglio chiarire il loro effetto sul processo di aggregazione amiloide e sulla correlata citotossicità. In particolare, abbiamo analizzato l'effetto dell'eparina e altri GAGs sul processo di fibrillogenesi e citotossicità del mutante di apomioglobina W7FW14F che, sebbene non direttamente coinvolto in alcuna patologia, è capace di formare fibrille amiloidi identiche a quelle naturali in condizioni di pH e temperatura fisiologiche. Gli stessi effetti sono stati analizzati anche sulla proteina wild type e sullo stato intermedio parzialmente strutturato presente nel processo di *fold*ing. Le informazioni strutturali sono state ottenute mediante dicroismo circolare e FTIR, il processo di fibrillogenesi è stato seguito mediante fluorescenza della TioflavinaT, l'analisi morfologica attraverso AFM e la citotossicità degli aggregati mediante valutazione della vitalità cellulare con saggio MTT. I risultati ottenuti indicano che tra i vari GAGs,

l'eparina induce fortemente il processo di fibrillogenesi dell'apomioglobina amiloidogena riducendo in maniera dose-dipendente la durata della fase lag durante la quale si ha la formazione delle specie oligomeriche responsabili della tossicità. Infatti, in presenza delle maggiori concentrazioni testate gli aggregati amiloidi mostravano già nelle primissime fasi del processo di aggregazione le caratteristiche strutturali e morfologiche delle fibrille amiloidi e, inoltre non inducevano tossicità quando incubate con cellule in coltura. I composti neutri o carichi positivamente, come destrano e polilisina non ebbero nessun effetto sulla velocità di aggregazione e gli aggregati inducevano tossicità. Così, la presenza di cariche negative sembra essere essenziale per indurre la proteina a raggiungere la conformazione non tossica della fibra matura. Sorprendentemente, l'eparina ha mostrato lo stesso effetto anche sulla proteina wild type inducendo in essa aggregazione amiloide. Questo effetto sembra dovuto alla specificità dell'interazione eparina-proteina; infatti è possibile evidenziare nelle regioni "loop" della proteina particolari sequenze amminoacidiche "consensus", caratterizzate dalla successione di residui basici alternati a residui neutri. Questo risultato suggerisce che l'interazione eparina-proteina favorisca un cammino di aggregazione alternativo rispetto a quello a cui va incontro la proteina amiloidogena in condizioni fisiologiche ed in assenza di glicosamminoglicani. Infine, l'accelerazione in misura dose-dipendente del processo di formazione di fibrille scarsamente citotossiche apre interessanti scenari sul ruolo svolto da queste sostanze quali possibili agenti terapeutici.

**SESSIONE**  
**“MALATTIE RARE”**



## **STRATEGIE ED INIZIATIVE SULLE MALATTIE RARE INTRAPRESE A LIVELLO EUROPEO E A LIVELLO NAZIONALE**

Domenica Taruscio,

*Direttore del Centro Nazionale Malattie Rare, Istituto Superiore di Sanità – Roma*

*domenica.taruscio@iss.it - www.iss.it/cnmr*

Le malattie rare sono un eterogeneo gruppo di patologie definite dalla bassa prevalenza nella popolazione. In Europa si definisce rara una malattia che colpisce 5 cittadini su 10.000 abitanti nella popolazione comunitaria, negli USA questa misura di prevalenza è 7.5 e in Giappone è 4:10.000. Nel loro insieme queste patologie sono molto numerose, secondo l'OMS sono circa 7-8.000 e colpiscono il 3% della popolazione; possono colpire tutte le età, organi e sistemi. Nell'insieme, oltre che essere numerose ed eterogenee, spesso sono croniche ed invalidanti, causano effetti disabilitanti e difficoltà di cura, complessità nella gestione clinica e forte impatto emotivo su pazienti e familiari. Generalmente scarse risorse sono destinate allo studio di malattie rare, vi è pertanto la necessità di incrementare tutta la ricerca scientifica (dall'eziologia, alla patogenesi alla terapia agli studi socio-sanitari).

### **Iniziative europee**

A livello europeo le malattie rare sono diventate una priorità dal 1999 a oggi.

Brevemente, si ricordano le principali azioni:

- Programma d'azione comunitario (1999-2003) e successivi aggiornamenti ad oggi
- Regolamento 141/2000 del Parlamento europeo e del Consiglio (16 dicembre 1999) sui prodotti medicinali orfani
- Istituzione del Comitato per i prodotti medicinali orfani (COMP) all'EMEA (2001)
- Istituzione della Task Force for Rare Diseases (presso la DG-SANCO)
- Adozione della Comunicazione sulle malattie rare della Commissione (11 novembre 2008)
- Raccomandazione del Consiglio d'Europa (9 giugno 2009)

### **Iniziative a livello nazionale**

In Italia i Piani Sanitari Nazionali (PSN) 1998-2000, 2003-2005 e 2006-2008 hanno indicato fra le priorità la tutela dei soggetti affetti da malattie rare.

In particolare il PSN 1998-2000 individuava tra gli interventi prioritari "l'identificazione di centri nazionali di riferimento per patologie e la costituzione di una rete di presidi ospedalieri, ad essi collegati, per la diagnosi e il trattamento di patologie rare (singole o gruppi)".

Nel 2001 è stato emanato il Decreto del Ministero della Sanità n. 279/2001 “Regolamento di istituzione della rete nazionale delle malattie rare e di esenzione dalla partecipazione al costo delle relative prestazioni sanitarie, ai sensi dell'articolo 5, comma 1, lettera b), del decreto legislativo 29 aprile 1998, n. 124.

Questo Regolamento prevede la realizzazione di una rete clinico-epidemiologica costituita da presidi accreditati, appositamente individuati dalle Regioni e che nell'ambito di tali presidi siano individuati i centri interregionali, con Decreto del Ministero della Sanità, su proposta della Regione interessata, d'intesa con la Conferenza permanente per i rapporti tra lo Stato, le Regioni e le Province Autonome di Trento e Bolzano.

Attualmente tutte le regioni hanno emanato Deliberazioni in attuazione al D.M. 279/01 individuando Presidi per malattie rare o gruppi di queste, mentre non sono stati individuati Centri Interregionali.

L'ambito sovraregionale in tutte le sue funzioni è svolto da un gruppo tecnico interregionale permanente, definito nell'ambito della Conferenza Stato-Regioni.

L'obiettivo di questo gruppo interregionale, al quale partecipano il Ministero della Salute e l'Istituto Superiore di Sanità (ISS) e i rappresentanti delle singole Regioni, è rappresentato dall'ottimizzazione del funzionamento delle reti regionali e dalla salvaguardia del principio di equità dell'assistenza per tutti i cittadini.

In particolare da parte di questo gruppo sono scaturite alcune priorità, tra cui garantire il coordinamento e l'operatività in rete dei presidi regionali per il trattamento delle malattie rare, l'assistenza ai malati sulla base di principi di equità (Accordo fra Stato e Regioni dell'11 Luglio 2002) e sviluppare l'attività epidemiologica sia a livello regionale che nazionale (Accordo fra Stato e Regioni del 10 Maggio 2007).

Il D.M. 279/2001 istituisce presso l'ISS il Registro Nazionale Malattie Rare (RNMR) al fine di consentire la programmazione nazionale e regionale degli interventi per i soggetti affetti da malattie rare e al fine di effettuare la sorveglianza delle stesse.

Il Registro mira ad ottenere informazioni epidemiologiche (in primo luogo il numero di casi di una determinata malattia rara e relativa distribuzione sul territorio nazionale) utili a definire le dimensioni del problema.

Il Registro ha lo scopo, quindi, di definire la prevalenza/incidenza delle malattie rare, identificare i possibili fattori di rischio, supportare la ricerca clinica e promuovere il confronto tra operatori sanitari per la definizione di criteri diagnostici.

Al fine di aumentare la copertura e l'efficienza della raccolta dei dati epidemiologici, il RNMR, a partire dall'inizio del 2006, ha messo in atto una nuova modalità di raccolta dati che include un

nuovo software; tale strumento può essere utilizzato dai Responsabili dei Centri di Coordinamento Regionale che coordinano le attività e fanno da tramite tra l'ISS e i singoli presidi/centri.

L'ISS mette a disposizione il software gratuitamente sia delle Regioni che non hanno ancora attivato un proprio Registro Regionale, sia di quelle che ne sono già in possesso.

Il Ministero della Salute ha dedicato azioni e finanziamenti specifici finalizzati a:

- a) potenziare la rete assistenziale regionale (30.000.000 € nel 2007)
- b) sviluppare e potenziare attività di ricerca e di sanità pubblica in vari settori; attraverso la collaborazione con l'ISS, il Ministero della Salute ha lanciato, sin dal 2006, bandi di ricerca specifici attraverso gli accordi bilaterale fra l'Italia e i National Institutes of Healths, Office for Rare Diseases (USA) tesi ad implementare l'utilizzo di tecnologie avanzate al fine di identificare nuovi potenziali marcatori utili alla diagnosi precoce di malattie rare.

Nell'ambito della ricerca è importante ricordare le iniziative intraprese dall'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA) attraverso il Bando per la Ricerca indipendente.

La promozione della ricerca indipendente rappresenta uno dei compiti dell'AIFA, al fine di promuovere la produzione di conoscenze che siano capaci di contribuire a trovare risposte rilevanti per la salute pubblica. In particolare l'AIFA interviene su quelle aree che soffrono di una carenza cronica di interesse di mercato dovuta alla "rarità" delle popolazioni coinvolte e perché i farmaci non sono più coperti da brevetto.

La ricerca indipendente è quindi importante per studiare quesiti di ricerca poco esplorati dalla ricerca commerciale e dei pazienti che generalmente occupano un limitato interesse di mercato.

Il Centro Nazionale Malattie Rare (CNMR)

La missione del Centro Nazionale Malattie Rare, istituito all'interno dell'Istituto Superiore di Sanità, è: ricerca, consulenza e documentazione sulle malattie rare e farmaci orfani finalizzata a prevenzione, trattamento e sorveglianza. Le principali attività del Centro sono consultabili sul sito web dedicato alle malattie rare: [www.iss.it/cnmr](http://www.iss.it/cnmr)

In particolare tra le attività del Centro Nazionale Malattie Rare, oltre al Registro Malattie Rare, possiamo citare:

Ricerca sperimentale

Il Centro svolge ricerca sperimentale su selezionate patologie rare, inclusi alcuni tumori, anche in collaborazione con centri di eccellenza nazionali e internazionali. Inoltre realizza attività di ricerca epidemiologia e socio-sanitaria. Dal 2006 si è consolidata la collaborazione con i National Institutes of Health (NIH-USA), nell'ambito del Programma "Malattie Rare, Accordi Italia-USA"

Test genetici

Considerato lo sviluppo e l'uso crescente di test e' di cruciale importanza fornire criteri e parametri per assicurarne un elevato standard di qualità e affidabilità. In questo senso, dal 2001 il CNMR svolge attività di controllo esterno di qualità di test genetici eseguiti da laboratori pubblici, distribuiti su tutto il territorio nazionale; scopo di tale attività è di assicurare la validità, l'accuratezza, la precisione, la riproducibilità dei test genetici a scopo diagnostico. Ad oggi partecipano ottanta laboratori pubblici

#### Promozione dell'Acido Folico

La possibilità di ridurre significativamente l'incidenza di difetti congeniti e principalmente dei difetti del tubo neurale, mediante una adeguata assunzione periconcezionale di acido folico, rappresenta a tutt'oggi uno dei principali esempi di prevenzione primaria nel campo delle malattie rare.

Nel 2004 è stato istituito il "Network italiano promozione acido folico per la prevenzione primaria di difetti congeniti". Il Network è coordinato dal CNMR, svolge attività di prevenzione e si riunisce annualmente in un Convegno organizzato presso l'Istituto Superiore di Sanità.

#### Collaborazione con le Associazioni

Le numerose Associazioni di persone con malattie rare sono un importante punto di riferimento per il confronto e lo scambio di esperienze, svolgendo un ruolo determinante per i pazienti e per le loro famiglie. Il CNMR ha instaurato con le Associazioni numerose e proficue collaborazioni su vari progetti. In particolare, ha realizzato diversi studi per valutare l'accessibilità ai servizi sociosanitari, la qualità dell'assistenza e della vita nelle persone con malattia rara e nei loro familiari. La Consulta delle Malattie Rare, costituita dai 34 rappresentanti eletti dalle associazioni di pazienti, realizza le proprie attività presso l'Istituto Superiore di Sanità e collabora attivamente con il Centro Nazionale Malattie Rare (che fornisce supporto tecnico-scientifico alle diverse attività) e con altre istituzioni coinvolte nella gestione sanitaria delle Malattie Rare e dei farmaci orfani.

#### Telefono Verde Malattie Rare

Un servizio di counselling telefonico per cittadini e operatori socio-sanitari, gratuito sul territorio nazionale (Lunedì al Venerdì, dalle ore 9.00 alle 13.00) per dare informazioni corrette e aggiornate sulle malattie rare e farmaci orfani.

#### Collaborazioni Europee ed Internazionali

Il CNMR è membro della Task Force europea sulle Malattie Rare (Rare Diseases Task Force – RDTF).

La Task force è istituita dalla Commissione europea nel gennaio del 2004 con gli obiettivi di consigliare e assistere la Commissione Europea nella promozione di strategie per garantire prevenzione, diagnosi e trattamento delle Malattie Rare in Europa.

La Dott.ssa Domenica Taruscio, ha rappresentato dal 2000 al 2009 l'Italia nel Comitato per i prodotti medicinali orfani (COMP), istituito in seno all'Agenzia Europea di Valutazione dei Medicinali (EMA). Il COMP ha fra i suoi scopi esaminare le domande di assegnazione della qualifica di medicinale orfano ed assistenza.

Attualmente il CNMR coordina il progetto europeo "European Project for Rare Diseases National Plans Development (EUROPLAN; <http://www.europlanproject.eu>) e partecipa come partner ad altri importanti progetti europei quali ERA-Net for research programmes on Rare diseases (E-RARE) e Task force in Europe for Drug Development for the Young (TEDDY);

## **L'ESPERIENZA SENESE NELLE MALATTIE NEUROLOGICHE RARE: UN IMPORTANTE SETTORE ASSISTENZIALE PER LA NEUROLOGIA ED UN MODELLO NATURALE PER LA COMPrensIONE DELLE NORMALI FUNZIONI DEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE, PERIFERICO E DEL MUSCOLO**

Antonio Federico

*Dipartimento di Scienze Neurologiche, Neurochirurgiche e del Comportamento, Università di Siena [federico@unisi.it](mailto:federico@unisi.it)*

Le malattie neurologiche rare sono disordini che si presentano con una frequenza bassa nella popolazione generale (in Europa, meno di 5/10000). Recentemente sono state definite anche orfane, per i limitati supporti assistenziali, i pochi ricercatori dedicati allo studio della loro patogenesi, le poche industrie per la creazione di farmaci specifici (che non hanno un mercato sufficiente per ripagare gli ingenti investimenti necessari).

Alcune di queste malattie sono ereditarie, altre no; alcune sono presenti fin dalla nascita, altre appaiono solo in età adulta, alcune sono trasmissibili, alcune di esse sono oggi curabili, alcune sono rare in alcuni paesi ed endemiche nei paesi in via di sviluppo.

I dati più recenti indicano in almeno cinquemila le malattie rare. In Italia sono state riconosciute a livello assistenziale oltre 350 malattie, per le quali è possibile avere una esenzione del pagamento dei ticket assistenziali. Di queste la grande maggioranza sono causate da una anomalia genetica e colpiscono per la maggior parte il sistema nervoso insieme ad un interessamento di altri organi; una quota superiore del 50%, infatti, presenta una sintomatologia che richiede l'intervento di uno specialista in neurologia, per l'interessamento del sistema nervoso centrale, periferico, del muscolo, indicando in tale specialità una di quelle maggiormente coinvolte nei problemi derivanti dalla corretta e tempestiva diagnosi e dal corretto approccio alla gestione di tali pazienti

Su questa linea i neurologi italiani si sono impegnati attivamente nelle linee programmatiche scaturite dal piano sanitario nazionale 1998-2000 rappresentate da:

- identificazione dei centri nazionali di riferimento e costituzione di una rete di presidi ospedalieri per la diagnosi ed il trattamento di tali malattie, con il coordinamento dell'Istituto Superiore di Sanità;
- avvio di un programma nazionale di ricerca per il miglioramento delle modalità di prevenzione, diagnosi, assistenza e terapia;
- sviluppo di interventi diretti al miglioramento della qualità di vita dei pazienti;

- programma di informazione ai pazienti ed alle loro famiglie;
- acquisizione di farmaci specifici, al fine di migliorare le prospettive terapeutiche di tali malattie.

Malgrado questo, l'atteggiamento generale delle famiglie, dei pazienti stessi e delle strutture sanitarie in genere (medici di famiglia, medici specialistici, medici ospedalieri) è quasi sempre quello di una inoperosa rassegnazione, dal momento che è opinione comune che una corretta diagnosi rimane un inutile esercizio accademico, poiché gli attuali supporti terapeutici sono incapaci di risolvere le cause che portano alla neurodegenerazione.

Tuttavia, sempre più numerose sono le malattie curabili, se diagnosticate precocemente; per molte (soprattutto quelle genetiche) è possibile una diagnosi molecolare ed una diagnosi prenatale; tutte rappresentano interessanti modelli per comprendere le normali funzioni del sistema nervoso e del muscolo.

Riportiamo la nostra esperienza, come centro di Riferimento per tali malattie, e la nostra attività di diagnosi e terapia in tale settore. Discuteremo inoltre la nostra esperienza nella organizzazione dell'attività didattica nell'ambito della Facoltà di medicina e della Scuola di dottorato di ricerca, rivolta alla qualificazione di ricercatori su tali argomenti.

Dal momento che le malattie rare sono un interessante modello per lo studio e la comprensione degli intimi meccanismi patogenetici delle più comuni disfunzioni del sistema nervoso centrale, periferico e del muscolo, riporteremo alcuni risultati dell'attività di ricerca da noi svolta nell'ambito delle malattie lisosomiali, mitocondriali e perossisomiali e di alcune malattie neurodegenerative, con riferimento anche a prospettive terapeutiche.

Infine riporteremo i dati relativi ad un Centro di Informazione per le Malattie Neurologiche Rare, che è attivo nella nostra struttura da oltre 15 anni e fornisce informazioni ai pazienti ed alle loro famiglie ed ai medici.

## **EVENTI PRECOCI DI DISFUNZIONE CELLULARE NELLA MALATTIA DI HUNTINGTON E BIOMARCATORI NEL SANGUE PERIFERICO DI AFFETTI**

Incoronata, Renata Lonigro

*Sezione di Genetica – Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche, Università di Udine*

*Istituto di Genetica dell'A.O.U. di Udine*

Progetto "Huntington" finanziato dalla SNO su Lascito Gobessi (coordinatore Dr. B. Lucci)

### ***Introduzione***

La malattia di Huntington (HD) è una patologia ereditaria neurodegenerativa a trasmissione autosomica dominante che inevitabilmente conduce alla morte gli individui affetti. Gli aspetti clinici della forma classica di questa patologia consistono in: progressiva disfunzione motoria, disturbi psichiatrici e graduale demenza. La progressione clinica della malattia di Huntington si accompagna alla degenerazione selettiva di specifici neuroni, inizialmente nel caudato e nello striato, in stadi più avanzati della malattia anche nella corteccia cerebrale.

Il gene responsabile della malattia è localizzato sul braccio corto del cromosoma 4 (locus 4q16.3) e codifica per una proteina di 350 kD, detta huntingtina e ad espressione ubiquitaria. La mutazione responsabile è stata identificata nell'amplificazione di una ripetizione CAG nel primo esone codificante la proteina che si traduce nell'amplificazione di un tratto di glutamine (Q). Nella popolazione non affetta questo dominio CAG/Q è polimorfico e varia da 6 a 39 ripetizioni, mentre un numero di CAG/Q superiore a 39 invariabilmente porta il soggetto a sviluppare la malattia. In generale il numero di ripetizioni CAG/Q è inversamente proporzionale all'età di insorgenza dei sintomi.

### ***Meccanismi di disfunzione cellulare nella malattia di Huntington***

L'intensa ricerca degli ultimi dieci anni ha dimostrato che l'huntingtina mutata (mhtt) acquisisce funzione tossica e può indurre difetti in un vasto numero di processi cellulari vitali come: endocitosi, trasporto intraneurale, segnalazione postsinaptica, espressione genica, metabolismo energetico e funzione mitocondriale, omeostasi del calcio e morte cellulare.<sup>1,2</sup> Studi condotti adoperando modelli animali della malattia suggeriscono che cambiamenti dei profili di espressione genica e delle vie bioenergetiche della cellula, possono essere tra i primi eventi indotti dall'mhtt e, quindi, meccanismi di innesco della citotossicità neuronale.

D'altro canto, studi di espressione genica condotti con la tecnica dei microarray, sia su modelli murini HD sia su cervelli post mortem di pazienti HD, sostengono variazioni nei livelli di espressione di molte proteine appartenenti alle vie di segnale del calcio. Gli ioni Ca<sup>2+</sup> rivestono un ruolo fondamentale nella normale funzione del sistema nervoso, essendo coinvolti in molti processi

cellulari quali il rilascio di neurotrasmettitori, la conduzione del potenziale d'azione e l'espressione genica. Una fine regolazione della concentrazione intracitoplasmatica degli ioni  $\text{Ca}^{2+}$  quindi è essenziale per il corretto funzionamento di diverse vie metaboliche e per la sopravvivenza stessa della cellula. A sostegno di ciò, un gran numero di distretti cellulari controlla la concentrazione di calcio intracellulare ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ ). Tra questi, la membrana plasmatica, il reticolo endoplasmatico, il nucleo, le vescicole secretorie e i mitocondri.

Nella malattia di Huntington, la destabilizzazione del sistema di segnalazione neuronale mediata dal  $\text{Ca}^{2+}$  è una delle funzioni tossiche esercitata dall'mhtt e si propone quindi come ipotesi primaria di patogenesi nell'HD. I canali VGCC e NR2B, presenti nella membrana plasmatica, risultano interagire direttamente con l'mhtt nelle cellule striatali e promuovono un eccessivo influsso di  $\text{Ca}^{2+}$  nel citoplasma. I recettori per la dopamina delle classi D1R e D2R, molto abbondanti nello striato, promuovono rispettivamente l'attivazione della protein chinasi A (PKA) e la sintesi di inositolo trifosfato ( $\text{InsP}_3$ ).  $\text{InsP}_3$  viene sintetizzato anche a seguito dell'attivazione dei recettori per il glutammato (mGluR5). La produzione di  $\text{InsP}_3$  e l'attivazione della PKA agiscono sinergicamente per attivare il recettore specifico ( $\text{InsP}_3\text{R1}$ ) presente a livello delle membrane del reticolo endoplasmatico. Questa interazione, ancor più esasperata in presenza di mhtt, induce rilascio del  $\text{Ca}^{2+}$  dalle cisterne del reticolo, nelle quali lo ione è normalmente immagazzinato, con ulteriore aumento della  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ . Lo ione in eccesso viene in parte captato dai mitocondri attraverso l'unipoter con conseguente apertura del poro di permeabilità mitocondriale ed apoptosi cellulare. L'apoptosi viene indotta anche dall'attivazione delle calpaine conseguente all'incremento generale della  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ . Possibili interventi terapeutici farmacologici, validati o ancora in studio, mirano ai recettori sopra menzionati e riguardano farmaci come: Tetrabenazina (TBZ), riluzolo, memantina (MMT). La TBZ è il primo tra i farmaci menzionati ad essere stato approvato dall'US FDA nel 2008; è un potente inibitore del traffico vescicolare delle monoammine causando deplezione del contenuto di dopamina dalle vescicole presinaptiche. La TBZ riduce significativamente i sintomi coreici nei pazienti HD anche se, in alcuni, può causare severa depressione<sup>3</sup>. Il Riluzolo è un agente antiglutammato (Glu) approvato dall'US FDA per il trattamento della SLA (Sclerosi Laterale Amiotrofica) ma che in un trial clinico triennale sull'HD si è dimostrato inefficace.<sup>4</sup> La Memantina è un antagonista dei recettori NMDA (N-methyl D-aspartate), ha una azione neuroprotettiva in esperimenti in vitro e sembra avere efficacia, se pur limitata, su pazienti HD<sup>5</sup>.

### ***Obiettivi della ricerca in atto***

Da quanto sopra esposto, emerge chiaramente la necessità di ricercare nuovi targets molecolari e diversi e più efficaci farmaci di intervento precoce nella terapia dell'HD.

La ricerca intrapresa nell'Istituto di Genetica di Udine si pone l'obiettivo di indagare, in primis, un eventuale contributo dato dalle pompe del  $\text{Ca}^{2+}$  PMCA, SERCA2 e SERCA3 all'alterazione dell'omeostasi di questo ione nella malattia di Huntington. Si tratta di pompe di membrana che promuovono un trasporto attivo del  $\text{Ca}^{2+}$  (ATP dipendente) rispettivamente, dall'interno verso l'esterno della cellula la pompa PMCA e dal citoplasma alle cisterne di immagazzinamento del reticolo endoplasmatico le pompe SERCA2 e SERCA3. Per questi tre trasportatori del  $\text{Ca}^{2+}$  non esistono ancora dati di espressione, strutturali o funzionali nella malattia di Huntington. Questa ricerca si pone inoltre l'obiettivo di individuare eventi primari di disfunzione cellulare nell'HD in modo da poter disegnare, in futuro, interventi terapeutici precoci se non addirittura preventivi dell'insorgenza dei sintomi in affetti e presintomatici HD.

A tale scopo si sta costituendo una banca di RNA estratto dai linfociti del sangue periferico di sintomatici e presintomatici HD. L'RNA servirà per lo studio dei livelli di espressione genica delle pompe menzionate rispetto ad una coorte di soggetti normali, appartenenti alla popolazione generale, adeguata per sesso ed età. L'identificazione di marcatori di malattia nel sangue periferico di soggetti HD costituirà in primo luogo uno strumento di stadiazione e progressione sia di sintomatici che di presintomatici. Contemporaneamente, si sta procedendo allo studio dei livelli di espressione delle pompe PMCA, SERCA2 e SERCA3 in modelli cellulari striatali di ratto, inducibili per l'espressione di Huntingtina wilde-type o mutante. Questi modelli cellulari sono stati gentilmente forniti dalla Prof. Elena Cattaneo dell'Università degli Studi di Milano e offrono la possibilità di identificare eventi molecolari precoci di disfunzione cellulare nell'HD in quanto l'espressione dell'htt transgenica (wilde-type o mutante) non è costitutiva ma viene indotta dall'esposizione delle cellule alla doxiciclina.

### ***Risultati raggiunti dalla ricerca in atto***

I risultati preliminari della ricerca riguardano i livelli di espressione della pompa del  $\text{Ca}^{2+}$  SERCA2, deputata all'immagazzinamento dello ione nelle cisterne del reticolo endoplasmatico.

I livelli di RNA di SERCA2 risultano ridotti significativamente negli affetti HD rispetto ai controlli, in tutte le fasce di età indagate. Gli esperimenti condotti sulle linee cellulari striatali di ratto si avvalgono di due cloni distinti, l'HD19 che esprime in maniera inducibile una htt wild-type con 26 glutamine e l'HD43 che esprime in maniera inducibile una mhtt con 105 glutamine. Sia le HD19 che le HD43 possono crescere in coltura non differenziate oppure indotte a differenziare. I risultati ottenuti riguardo alle modifiche di espressione della pompa SERCA2, nelle diverse condizioni sperimentali adottate, dimostrano che:

- a) i livelli di RNA di SERCA2 aumentano con il differenziamento cellulare in entrambi i cloni anche in presenza di mhtt;

- b) i livelli di proteina SERCA2 aumentano con l'aumentare dell'RNA nelle cellule HD19 differenziate; al contrario diminuiscono nelle cellule HD43 differenziate e non, in presenza di mhht;

I risultati complessivi di questa ricerca depongono per un ruolo della pompa SERCA2 nella deregolazione dell'omeostasi del  $\text{Ca}^{2+}$  nella malattia di HD e suggeriscono che la riduzione di espressione di SERCA2 sia un evento precoce nella patogenesi di questa malattia.

1. Bezprozvanny I. Trends Mol Med, 2009; 15 (3), 89-100
2. Browne S.E. Ann. N.Y. Acad. Sci. 2008; 1147, 358-382
3. Savani A.A. and Login I.S. Neurology, 2007; 68, 797
4. Landwehrmeyer G.B. et al. Ann Neurol, 2007 ; 62, 262-272
5. Ondo W.G. et al. Parkinsonism Relat. Disord. 2007; 13, 453-454

## **CLEARANCE OF MISFOLDED PROTEINS IN INHERITED MOTOR NEURON DISEASES**

Crippa V, Rusmini P, Sau D, Onesto E, Bolzoni E, Poletti A

*Dpt. of Endocrinology, Pathophysiology and Applied Biology; Center of Excellence on Neurodegenerative Diseases, University of Milan and InterUniversity Center on Neurodegenerative Diseases (Universities of Milan, Rome "Tor Vergata", Genoa and Florence).*

*e-mail: [angelo.poletti@unimi.it](mailto:angelo.poletti@unimi.it)*

Motor neuron diseases comprise several types of neurodegenerative diseases involving cortical and/or bulbo-spinal motor neurons. Among these, SpinoBulbar Muscular Atrophy (SBMA or Kennedy's disease) and some Familial forms of Amyotrophic Lateral Sclerosis (fALS), have been linked to neurotoxic properties acquired by mutant proteins. The neurotoxicity seems to be a consequence of aberrant conformations (misfolding), generated by the mutations, which might trigger and perturb a wide variety of downstream processes affecting motor neuronal functions.

SBMA is linked to an androgen receptor (AR) containing an elongated polyglutamine tract (ARpolyQ). fALS in 20% of cases is linked to point mutations in Superoxide Dismutase 1 (SOD1) (i.e. G93A and A4V). AR and SOD1 are totally unrelated, do not share structural or functional domains, but are thought to alter similar intracellular pathways. We have produced motor neuronal cell models to study SBMA and fALS, based on an immortalized motor neuronal cell line (NSC34) expressing wt and mutant AR or SODs (G93A). Both mutant proteins showed alteration in their solubility and clearance, accumulating into ubiquitinated aggregates, and impaired the proteasome functions. All these events may be linked to aberrant processing of misfolded proteins. In the case of the ARpolyQ, the neurotoxicity depends upon ligand (testosterone) activation of the mutant receptor, and this provides a very useful tool to modulate ARpolyQ aberrant behavior for experimental and/or potential therapeutic approaches. We then tested the potential beneficial effects of the modulation of chaperone molecules on the biochemical properties of the ARpolyQ and of the mutant SOD1 as well as on the consequent effects of increased mutant proteins turnover in the motor neurons. The results have demonstrated that by assisting the processing of the two misfolded proteins, with selected intracellular chaperones, it is possible to affect mutant protein clearance and to decrease protein aggregation without impairing the functions of the major intracellular degradative systems.

*Telethon - Italy (GGP06063 and GGP07063); Italian Ministry of University and Research; Italian Ministry of Labour, Health and Social Affairs (2007-36 and 2008-15) Convenzione Fondazione Mondino/UNIMI); Universita' degli Studi di Milano; Fondazione CARIPLO (2008-2307).*

**SESSIONE  
“ALZHEIMER”**



## GOOD PROTEIN, BAD PROTEIN: A NEW AB VARIANT CAN BE BOTH

Tagliavini F.<sup>1</sup>, Catania M.<sup>1</sup>, Morbin M.<sup>1</sup>, Gobbi M.<sup>2</sup>, Colombo L.<sup>2</sup>, Bastone A.<sup>2</sup>, Cantù L.<sup>3</sup>, Salvalaglio M.<sup>4</sup>, Salmona M.<sup>2</sup>, Di Fede G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Fondazione IRCCS Istituto Neurologico "Carlo Besta", Milano; <sup>2</sup>Istituto di Ricerche Farmacologiche "Mario Negri", Milano; <sup>3</sup>Università di Milano; <sup>4</sup>Politecnico di Milano

### **Background**

Mutations in the amyloid  $\beta$  (A $\beta$ ) precursor protein gene (APP) cause familial Alzheimer's disease with virtually complete penetrance. We found an APP mutation (A673V, corresponding to position 2 of A $\beta$ ) that causes disease only in the homozygous state, whereas heterozygous carriers are not affected, consistent with a recessive Mendelian trait of inheritance.

### **Objective**

To investigate the mechanisms by which the A673V APP mutation causes disease only in the homozygous state.

### **Methods**

We analyzed APP processing in fibroblasts from an A673V homozygous patient and controls, and in CHO and COS7 cells transfected with wild-type or mutated APP cDNA. Moreover, we assessed the physicochemical and biological properties of A2V-mutated and wild-type A $\beta$ 1-40 and A $\beta$ 1-42 peptides by laser light scattering, electron and atomic force microscopy, surface plasmon resonance, urea denaturation studies, and neurotoxicity assays.

### **Results**

The study showed that the A673V mutation has two pathogenic effects: it (*i*) shifts APP processing toward the amyloidogenic pathway resulting in enhanced sAPP $\beta$ :sAPP $\alpha$  and C99:C83 ratios and A $\beta$  production, and (*ii*) increases the aggregation and fibrillogenic properties of A $\beta$ . However, co-incubation of mutated and wild-type peptides confers instability on A $\beta$  aggregates and inhibits amyloid formation and neurotoxicity. The finding that the A2V A $\beta$  variant has a dominant-negative effect on amyloidogenesis is consistent with the observation that the heterozygous carriers do not develop the disease and offers ground for the development of a therapeutic strategy. As a first step for designing an inhibitor of A $\beta$  aggregation based on the mutated A $\beta$  sequence, we synthesized a peptide homologous to residues 1-6 of A $\beta$  with the A2V substitution and tested its ability to bind to wild-type A $\beta$  and inhibit amyloidogenesis. The study showed that the mutated hexapeptide retains the anti-amyloidogenic properties of the parent full-length A $\beta$ . Molecular dynamics simulations suggest that this property may be related to the structural flexibility of the

peptide that adopts dynamically “closed” and “open” configurations, at variance with the wild-type sequence which is characterized by a “closed” structure.

***Conclusion***

The present data have important implications for genetic screening and the potential treatment of Alzheimer’s disease based on A2V-modified A $\beta$  peptides or peptido-mimetic compounds.

## ROLE OF AMYLOID-B PEPTIDE IN ALZHEIMER'S DISEASE: FROM SYNAPTIC DYSFUNCTION TO THERAPY

Daniela Puzzo<sup>1</sup>, Maria Bellomo<sup>2</sup>, Salvatore Sapienza<sup>1</sup>, Agostino Palmeri<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Dept. of Physiological Sciences, University of Catania, Catania, Italy*

<sup>2</sup>*University "Kore", Enna, Italy*

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disease characterized by loss of memory and cognitive functions leading to dementia. The advanced stages of the pathology are characterized by the presence of senile plaques at the cerebral level, made up principally of amyloid-beta peptide (A $\beta$ ), and neurofibrillary tangles formed by Tau protein [Selkoe, *Ann Rev Neurosci*, 1994]. A $\beta$  is a 40-42-aminoacid peptide that originates from the amyloid precursor protein (APP), through a proteolytic process [Mattson, *Phys Rev*, 1997]. Several studies have focused on APP, not only because A $\beta$  is obtained from its cleavage, but also because rare cases of familial AD have been correlated to mutations of both APP and gamma-secretase (presenilins, PS) genes. Indeed, several AD animal models are based on the over-expression of APP and PS genes.

A $\beta$  has been found to play a fundamental role in the pathogenesis of AD. Various studies have been carried out to look at the chemical characteristics and morphology of the peptide, and various forms of A $\beta$  have been identified, each having particular properties and functions. Oligomers are believed to be the assembly states of A $\beta$  with the most potent neurotoxicity [Klein *et al*, *Trends Neurosci*, 2001] producing synaptic dysfunction before synaptic loss. In fact, the earliest amnesic symptoms, taking place in the absence of any other clinical sign of brain injury, are likely to be due to a more subtle defect, probably occurring at the level of the synapse and produced, at least in part, by oligomeric A $\beta$  [Cullen *et al*, *Neuroreport*, 1997; Itoh *et al*, *Eur J Pharmacol*, 1999; Vitolo *et al*, *PNAS USA*, 2002; Puzzo *et al*, *J Neurosci*]. The importance of synaptic alterations, highly correlated with the severity of clinical dementia [Masliah, *Histol Histopathol*, 1995; Selkoe, *Science*, 2002], has been confirmed by studies on long-term potentiation (LTP), a widely studied phenomenon of synaptic plasticity thought to be the cellular model of learning and memory [Bliss and Collingridge, *Nature*, 1993]. LTP and memory are impaired following exogenous application of amyloid-beta peptide (A $\beta$ ) [Cullen *et al*, *Neuroreport*, 1997; Itoh *et al*, *Eur J Pharmacol*, 1999; Vitolo *et al*, *PNAS USA*, 2002; Puzzo *et al*, *J Neurosci*, 2005] as well as in transgenic (Tg) mouse models of AD [Sant'Angelo *et al*, *PNAS USA*, 2003; Trinchese *et al*, *Ann Neur*, 2004].

Several studies have tried to clarify the second messenger pathway(s) by which A $\beta$  affects synaptic plasticity and memory. Given that it has been shown the involvement of the second messenger

systems cAMP/protein kinase A (PKA) and NO/cGMP/protein kinase G (PKG) in A $\beta$ -induced LTP and memory impairment, drugs aiming to increase these pathways have been studied as possible therapy for AD. Rolipram and forskolin, increasing cAMP levels, reversed the inhibition of PKA activity and the phosphorylation of the transcription factor and memory molecule cAMP responsive element binding protein (CREB) [Vitolo *et al*, *PNAS USA*, 2002]. We have previously demonstrated that A $\beta$  downregulates the NO pathway leading to a reduction of cGMP levels and CREB phosphorylation [Puzzo *et al*, *J Neurosci*, 2005]. Other recent studies have shown that NO-mimetic molecules may reverse cognitive impairment in AD [Thatcher *et al*, *Curr Alzh Res*, 2002, 2004]. Thus, enhancers of the cAMP/PKA or NO/cGMP/PKG pathways might represent novel classes of compounds that might effectively counteract the disease progression by acting at the downstream level of A $\beta$  production. An additional strategy based on these findings includes the inhibition of phosphodiesterases (PDEs), enzymes that physiologically hydrolyze the second messengers cAMP and cGMP. Indeed, treatment with the PDE4 inhibitor Rolipram re-established LTP and contextual learning in animal models of AD [Gong *et al*, *J Clin Invest*, 2004]. However, the use of PDE4 in humans has been difficult because of undesirable side effects [Souness *et al*, *Immunopharmacology*, 2000]. For this reason, inhibiting PDE5 might be a better strategy to improve memory in AD patients. Indeed, some studies have shown the potential use of PDE5 inhibitors as memory enhancers [Prickaerts *et al*, *Neuroscience*, 2002; Rutten *et al*, *Behav Brain Res*, 2005].

Here we studied the effect of the PDE5 inhibitor sildenafil in synaptic transmission and cognition of animal models of AD. These mice, expressing both the human amyloid precursor protein (APP) mutation (K670M:N671L) and the human presenilin-1 (PS1) mutation (M146L), termed APP/PS1 mice, are characterized by a early impairment of LTP and memory and plaques deposition [Trinchese *et al*, *Ann Neurol*, 2004]. We performed electrophysiological recordings to assess synaptic function (basal synaptic transmission and long-term potentiation), behavioural studies (radial arm water maze, Morris water maze and fear conditioning), immunocytochemistry for phospho-CREB and A $\beta$  levels measurements. We assessed both the short- and long-term effects of sildenafil. We showed that sildenafil is beneficial against the AD phenotype in APP/PS1 mice. Sildenafil rescued synaptic and memory deficits. It re-established the increase in CREB phosphorylation and caused a reduction in A $\beta_{40}$  and A $\beta_{42}$  levels. Most importantly, the inhibitor exerted its effect not only immediately, but also for a prolonged period beyond the drug administration. In conclusion, PDE5 might have potential for the treatment of AD and other diseases associated with elevated A $\beta$  levels.

## LA NEUROINFIAMMAZIONE NEL MORBO DI ALZHEIMER COME TARGET PER NUOVE STRATEGIE TERAPEUTICHE

Luca Steardo

*Università di Roma "La Sapienza"*

Il morbo di Alzheimer (AD) è una malattia neurodegenerativa correlata all'età, a tarda insorgenza e lenta progressione, clinicamente caratterizzata da deficit cognitivi e alterazioni comportamentali.

La sua peculiarità istopatologica è la deposizione di anomali aggregati proteici, dovuti all'accumulo di beta amiloide (Abeta) (placche senili) o di proteine tau iperfosforilate (tangle neurofibrillari), anche se il preciso ruolo patogenetico di tali aggregati non è ancora completamente chiarito. Tuttavia sono stati proposti molteplici meccanismi biochimici come possibili responsabili della neurotossicità da Abeta, quali la produzione di radicali liberi dell'ossigeno, le alterazioni dell'omeostasi del calcio, la distruzione del pathway Wnt, la disfunzione mitocondriale, l'eccitotossicità, l'attivazione della cascata apoptotica, la degenerazione neuronale con perdita sinaptica e i deficit di neurotrasmissione. Sebbene le placche senili ed i tangle neurofibrillari siano tratti patognomonici, sarebbe un errore ritenerle le uniche alterazioni riscontrabili nei cervelli affetti da AD dal momento che osservazioni neuropatologiche nell'animale e nell'uomo confermano la presenza di un chiaro processo neuroinfiammatorio. Difatti la deposizione di Abeta è responsabile della sintesi di numerosi mediatori pro-infiammatori quali ossido nitrico, prostaglandine, citochine, interleuchine e molecole di specifica origine gliale come la proteina S100B. Una volta rilasciati, tali mediatori agiscono in modo autocrino per perpetrare la gliosi reattiva, ed in modo paracrino danneggiando i neuroni, amplificando così la gravità del quadro neuropatologico. Una volta innescato, il processo neuroinfiammatorio contribuisce indipendentemente alla disfunzione neuronale, alimentando un circolo vizioso positivo al quale partecipa in larga misura la proteina S100B, capace di incrementare direttamente i livelli di espressione della proteina precursore dell'amiloide (APP) la quale, a sua volta, attiva gli astrociti e incrementa i livelli stessi di S100B. Il nostro gruppo ha recentemente dimostrato che S100B promuove la iperfosforilazione di tau, il che supporta l'idea che la gliosi reattiva innesca sia l'amiloidogenesi sia la taupatia tramite differenti meccanismi neurodegenerativi, tra i quali l'induzione dello stress ossidativo e la distruzione del pathway Wnt sono di maggior rilievo. Lo stress ossidativo e la perossidazione lipidica mediano la risposta agli stimoli extracellulari tramite le protein chinasi attivate dallo stress (SAPKs), sovra-regolando i livelli dell'enzima che taglia il sito beta dell'APP (BACE-1). Tra le numerose chinasi la cui azione è innescata dallo stress ossidativo, la glicogeno sintasi chinasi 3 beta (GSK3beta),

membro chiave del pathway Wnt, è la più coinvolta nella neuropatia. Una volta attivato, il pathway Wnt inibisce l'attività di GSK3beta riducendo così l'iperfosforilazione di tau. Nell'AD, sia Aβ che S100B innescano la distruzione del pathway Wnt, la fosforilazione di tau e la conseguente perdita neuronale. Le citochine infiammatorie e lo stress ossidativo modulano inoltre la trascrizione del recettore per gli attivatori della proliferazione dei perossisomi (PPAR), il cui coinvolgimento modula la neurotossicità da Aβ.

Se da principio la neuroinfiammazione era stata considerata nella patogenesi dell'AD un fenomeno secondario, provocato dal danno neuronale che attivava una risposta gliale, le evidenze sopra riportate indicano un suo ruolo preminente nell'avvio e nella progressione della malattia. Pertanto risulta chiaro che la soppressione del rilascio di molecole pro-infiammatorie ad attività neurotossica, prodotte da elementi gliali attivati, si traduca in una netta attività neuroprotettiva, suggerendo che interventi tesi a ridurre la neuroinfiammazione possano rappresentare una nuova e promettente strategia di trattamento di tale patologia neurodegenerativa.

Molecole correlate al sistema endocannabinoide offrono l'opportunità di agire ad un tempo sia sulla neurodegenerazione sia sulla neuroinfiammazione, giacché i cannabinoidi esogeni ed endogeni sono neuroprotettive in modelli in vitro ed in vivo di danno neuronale. In questo contesto, il cannabidiolo (CBD) e la palmitoiletanolammide (PEA) sono tra i più versatili.

Il CBD è il principale costituente non psicotropo della Cannabis Sativa, con proprietà antiossidanti che forniscono protezione contro la tossicità da glutammato. In colture neuronali stimulate con Aβ, il CBD riduce l'espressione della iNOS ed il conseguente rilascio di nitriti, l'attivazione di p38 e di NfKB, il che consolida il ruolo del CBD nell'attenuare i segnali infiammatori associati alla stimolazione con Aβ. Il CBD inibisce inoltre la morte neuronale indotta da Aβ funzionando da scavenger per le ROS e riducendo la perossidazione lipidica e l'aumento dei livelli di calcio intracellulare indotto da Aβ. Queste proprietà antiossidanti prescindono dalla attivazione del recettore CB1. Il CBD inibisce inoltre la fosforilazione di tau agendo su GSK3beta. Poiché GSK3beta favorisce anche il clivaggio di APP che porta all'accumulo di Aβ, la sua inibizione mediata dal CBD consente anche di smorzare la amiloidogenesi. La potenzialità terapeutica del CBD nell'AD deriva quindi dalla inibizione di stress ossidativo, iperfosforilazione di tau, neuroinfiammazione ed apoptosi: questa idea è rafforzata da recenti risultati in vivo che dimostrano la capacità del CBD di attenuare la gliosi reattiva ed il rilascio di mediatori infiammatori. E' inoltre di grande interesse l'osservazione che il CBD influenza l'attività del sistema PPAR, considerando che interazioni a questi siti recettoriali possano ridurre la patologia associata ad Aβ.

La PEA è una molecola endocannabinoide-simile coinvolta in numerosi processi patofisiologici quali il dolore, le convulsioni, la neurotossicità e l'infiammazione, anche se il suo ruolo nel sistema

nervoso centrale è poco chiaro se confrontato con gli endocannabinoidi convenzionali (2 arachidonoilglicerolo ed anandamide). Se la PEA è significativamente presente nel cervello dei roditori (200-500 pmol/g tessuto), stimoli patofisiologici possono selettivamente incrementarne i livelli. E' stato inoltre dimostrato che gli astrociti in coltura, a differenza dei neuroni, producono PEA in misura 2-3 volte superiore all'anandamide e che la PEA incrementa la motilità microgliale. Nostri dati preliminari in vitro indicano che, come il CBD, anche la PEA controlla la sopravvivenza neuronale e gliale e modula l'espressione di molecole proinfiammatorie in modelli di neurotossicità indotta da Abeta. Il meccanismo che sottende questi effetti potrebbe anche in questo caso coinvolgere i PPAR.

In conclusione, sulla base dei dati prodotti sino ad oggi è possibile sostenere che un appropriato ed efficace controllo della funzione gliale, compromessa dalla persistenza degli eventi infiammatori, è fondamentale per assicurare un ambiente in grado di garantire la funzionalità e la sopravvivenza neuronale.

## ESTROGEN SIGNALLING AND NEURODEGENERATION

Adriana Maggi and Elisabetta Vegeto

*Center of Excellence on Neurodegenerative Diseases (CEND), University of Milan, via Balzaretti, 9 20133-Milan, Italy.*

Several lines of evidence demonstrated that estrogens have beneficial effects on Alzheimer's Disease (AD) onset and progression; however, the mechanism underlying this effect is still poorly elucidated. It has been shown that estrogens prevent neuron loss induced by diverse insults by activating specific metabolic and signalling neural pathways. A relevant inflammatory reaction has been observed in AD brains and several lines of evidence suggest that a chronic activation of the inflammatory response may be detrimental for neurons.

The observation of a beneficial effect in several pathologies characterized by a strong inflammatory component and proposed that the anti-inflammatory action of sex hormones may explain, at least in part, their neuroprotective action. To demonstrate the validity of our theory we first assessed whether hormone modulates the inflammatory response of the brain in wild-type animals, by inducing acute brain inflammation with intracerebroventricular (i.c.v.) injections of lipopolysaccharide (LPS). We showed that E2, via interaction with ERalpha and not ERbeta, strongly inhibits LPS-induced microglia activation in several regions of the brain, including cortex, hippocampus and non cortical areas, that hormone administration results in a significant reduction of the expression of inflammatory markers, such as TNF- $\alpha$ , MCP-1 and MIP-2, and also that it prevents monocyte infiltration. Next, we studied the effect of estrogens on APP23 transgenic mice, a genetic model of AD (expressing the Swedish mutated form of amyloid precursor protein associated with the early AD onset). Ovariectomy was associated to an increased inflammatory response while hormone replacement clearly limited the inflammatory reaction in the regions where the amyloid plaques were manifest. However, the administration of estrogens did not have a clear effect in delaying the progression of the symptoms associated with the disease. We concluded that most likely the model system utilized for our studies was not suitable for the evaluation of the subtle effects that a hormonal therapy may provide.

We are now studying the effects of estrogen deprivation and estrogen replacement in a more physiological system: i.e. during the natural aging of the animal. Using the ERE-Luc reporter mouse we are currently demonstrating that aging is associated with an increase in the production of

inflammatory cytokines at the level of the mouse CNS and evaluating in this model the state of activation of estrogen receptors in relation to neuroinflammation.

Our results provide the rationale for future studies on the molecular and cellular targets of hormone action on AD-associated neuroinflammation

# CONFORMATIONAL EQUILIBRIA OF INTRINSICALLY DISORDERED PROTEINS PROBED BY SINGLE MOLECULE METHODOLOGIES

Marco Brucale and Bruno Samori

*Department of Biochemistry, University of Bologna, Italy*

The structural disorder of the intrinsically-unstructured-proteins is the outcome of a complex ensemble of conformers driven by a rugged energy landscape. Many of these proteins are involved, through their aggregation into amyloid fibrils, in neuro-degenerative pathologies like Parkinson's, Alzheimer's and prion diseases. Significant progress has been made recently in characterizing these fibrils at the molecular level. However, the process of aggregation is still poorly understood because traditional bulk methods can only provide ensemble-averaged information for monomers and oligomers alike. Single-molecule methodologies can circumvent these limitations.

We applied the AFM-based Single Molecule Force Spectroscopy (AFM-SMFS) methodology to human alpha-synuclein (1,2). This methodology proved very effective in characterizing the conformational diversity of wild type (WT) alpha-synuclein and we observed that in several unrelated conditions linked to the pathogenicity of Parkinson's disease the conformational equilibrium of this protein shifts toward beta-sheet-containing structures (1). The direct relationship of these beta-structures to alpha-synuclein toxicity was confirmed by our single-molecule study of the conformational heterogeneity of its pathologic mutants A30P, A53T and E46K. We found that those mutated sequences have a strongly higher propensity to acquire a monomeric beta-structure with respect to the WT one, and we identified significant differences in their conformational equilibria. These differences were related to the marked differences in the WT and mutant aggregation behaviors, with regard to both fibrillization and oligomerization. (2)

The capability of single-molecule approaches to resolve the properties of individual protein molecules and quantify their sub-populations is most likely going to play a crucial role in studies of the conformational equilibria of intrinsically disordered proteins involved in neurodegenerative diseases.

(1) M. Sandal, F. Valle, I. Tessari, S. Mammi, E. Bergantino, F. Musiani, M. Brucale, L. Bubacco, B. Samori, Conformational Equilibria in Monomeric alpha-Synuclein at the Single Molecule Level  
*Plos Biology* 2008, 6, 99

(2) Marco Brucale, Massimo Sandal, Selena Di Maio, Aldo Rampioni, Isabella Tessari, Laura Tosatto, Marco Bisaglia, Luigi Bubacco, and Bruno Samori  
Pathogenic mutations shift the equilibria of alpha-synuclein single molecules towards structured conformers,  
*ChemBioChem* 2009, 1, 176-183

**SESSIONE**  
**“PARKINSON E**  
**SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA”**



## **INTRA-BRAIN MICROINJECTION OF HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS DECREASES ALLODYNIA IN NEUROPATHIC MICE**

Dario Siniscalco, Vito de Novellis, Francesco Rossi, Sabatino Maione

*Department of Experimental Medicine, Section of Pharmacology “L. Donatelli” Second University of Naples*

Neuropathic pain is a very complex disease, involving several molecular pathways. Current available drugs are usually not acting on the several mechanisms underlying the generation and propagation of pain.

We used spared nerve injury model of neuropathic pain to assess the possible use of human mesenchymal stem cells (hMSCs) as anti-neuropathic tool.

Human MSCs were transplanted in the mouse lateral cerebral ventricle. Stem cells injection was performed 4 days after sciatic nerve surgery. Neuropathic mice were monitored 7, 10, 14, 17, and 21 days after surgery. hMSCs were able to reduce pain like behaviours, such as mechanical allodynia and thermal hyperalgesia, once transplanted in cerebral ventricle. Anti-nociceptive effect was detectable from day 10 after surgery (6 days post cell injection). Human MSCs reduced the mRNA levels of the pro-inflammatory interleukin IL-1 $\beta$  mouse gene. Transplanted hMSCs were able to reduce astrocytic and microglial cell activation.

## PROTEOMICS INVESTIGATIONS OF PROTEIN DEGRADATION BLOCKAGE IN CELLULAR DOPAMINERGIC MODELS

A. D'Alessandro<sup>1,2</sup>, S. D'Aguanno<sup>1,2</sup>, M. T. Cencioni<sup>2</sup>, A. Diamantini<sup>2</sup>, L. Battistini<sup>2</sup>, G. Federici<sup>1,2</sup>  
and A. Urbani<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *University of Rome "Tor Vergata", Department of Internal Medicine, Rome, Italy;* <sup>2</sup> *Santa Lucia Foundation-IRCCS, Rome, Italy;*

Late-onset neurodegenerative diseases are often associated with the formation of toxic intracellular aggregates which should be substrates of cell degradation pathway such as the ubiquitin-proteasome system. In fact, aggregates of ubiquitinated proteins have been observed in the CNS of patients affected by Alzheimer's, Parkinson's and Huntington's disease. These aggregates might be suggestive that dysfunctions in the ubiquitin-proteasome system might contribute to the pathology of various neurodegenerative disorders. The UPS (ubiquitin-proteasome system) and the ALP (autophagy-lysosome pathways) are key mechanisms for cellular homeostasis sustenance and protein clearance. A wide number of NDs (Neurodegenerative Diseases) are tied with UPS impairment and have been also described as proteinopathies caused by aggregate-prone proteins, not efficiently removed by proteasome. Despite the large knowledge on proteasome biological role, molecular mechanisms associated with its impairment are still blur. We have pursued a comprehensive proteomics investigation to evaluate the phenotypic rearrangements in protein repertoires associated with a UPS blockage.

Different functional proteomic approaches have been employed to tackle UPS impairment impact on human NB (neuroblastoma) cell lines responsive to proteasome inhibition by Epoxomicin. 2-Dimensional Electrophoresis separation combined with Mass Spectrometry and shotgun proteomics experiments have been employed to collect a thorough picture of protein profile. Proteomics data have been then revised by bioinformatics tools.

Our results have highlighted 116 distinct proteins involved in the survival pathway to UPS impairment. Unsupervised metanalysis have revealed that all identified proteins relate each other in a functional network centred on  $\beta$ -estradiol. These findings have confirmed on a NB cell line model in which we have observed the reduction of p53 expression and apoptotic bodies, the resumption of cell cycle, the strong reduction of the ubiquitinated inclusions and the increase of autophagy associated with  $\beta$ -estradiol treatment. Our data may provide the molecular basis of the observed  $\beta$ -estradiol protective role in neurodegenerative disorders possibly shading a new light in its therapeutic use.

## **IL CONTRIBUTO DEL MUSCOLO SCHELETRICO ALLA PATOGENESI DELLA SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA**

Antonio Musarò

*Dipartimento di Istologia ed Embriologia Medica; Sapienza Università di Roma*

La SLA è una malattia progressiva dell'adulto che colpisce i motoneuroni. I pazienti manifestano alterazioni motorie, difficoltà di movimento, difficoltà a reggere gli oggetti a causa dell'indebolimento dei muscoli delle mani. Con il progredire della malattia si giunge alla paralisi completa degli arti con una difficoltà sempre maggiore a parlare, masticare e deglutire.

Esistono due forme principali di SLA, quella definita sporadica e quella ereditaria. La maggior parte dei casi di SLA non ha una componente genetica e viene definita sporadica. Le cause di questa non sono state ancora completamente chiarite e il decorso clinico è altamente variabile, suggerendo che diversi fattori possono essere coinvolti nel determinare la malattia.

Una percentuale oscillante dal 5 al 10% è di origine ereditaria e si parla di SLA familiare.

Il 20% dei casi di SLA familiare è causato dalla mutazione del gene che codifica per l'enzima Superossido dismutasi-1 (SOD-1), una proteina deputata a detossificare le cellule dall'accumulo di radicali liberi. E' stato osservato che la tossicità della SOD-1 mutata è mediata dall'acquisizione di proprietà tossiche della proteina mutata, piuttosto che da una perdita di funzione dell'enzima stesso.

Un notevole contributo alla caratterizzazione della patogenesi della SLA è stato dato dallo sviluppo di topi transgenici che esprimono la SOD-1 umana mutata. Sono state descritte più di 100 diverse mutazioni a carico del gene SOD-1 ed una delle più frequenti mutazioni Gly93 -->Ala (G93A), è stata ampiamente studiata in questi modelli animali.

In particolare ad oggi, l'ipotesi più accreditata stabilisce che la mutazione nel gene SOD-1 causa degenerazione del motoneurone con conseguente paralisi e atrofia muscolare.

Tuttavia recenti evidenze sperimentali suggeriscono che i motoneuroni potrebbero non essere i soli bersagli primari della mutazione SOD-1, suggerendo che gli scarsi risultati ottenuti con la terapia convenzionale siano proprio dovuti ad una incompleta conoscenza delle basi molecolari e cellulari della malattia stessa.

In questo contesto il muscolo scheletrico rappresentava una componente inesplorata nell'ambito degli effetti neurodegenerativi della mutazione SOD-1.

A tale scopo abbiamo recentemente generato un nuovo modello sperimentale in cui il gene mutato SOD1G93A è stato selettivamente espresso nel muscolo scheletrico, sotto il controllo trascrizionale del promotore della catena leggera della miosina.

Abbiamo dimostrato che l'espressione localizzata del gene mutato SOD1 induce atrofia muscolare associata con una significativa riduzione della forza muscolare, alterazione dell'organizzazione sarcomerica e danno mitocondriale, senza una apparente degenerazione dei motoneuroni. Ciononostante, abbiamo anche osservato che l'espressione muscolo specifica della SOD1 mutata è sufficiente ad indurre i segni pre-sintomatici della SLA a livello del midollo spinale, quali attivazione della microglia e di citochine infiammatorie, che normalmente precedono la degenerazione dei motoneuroni.

L'analisi dei meccanismi molecolari attivati dalla mutazione SOD1 e responsabili dell'atrofia muscolare ha rivelato poi l'attivazione di due vie degradative principali: la via dell'ubiquitina-proteasoma e quella dell'autofagia.

Abbiamo quindi dimostrato che a prescindere dalla degenerazione dei motoneuroni, il muscolo scheletrico può essere danneggiato dall'effetto tossico della proteina mutata SOD1, attivando nelle cellule bersaglio vie di trasduzione del segnale che portano alla degenerazione cellulare o come nel caso del muscolo all'atrofia muscolare, alla riduzione della forza e all'alterazione dell'organizzazione ultrastrutturale del muscolo.

L'insieme di questi esperimenti ci aiutano a rifocalizzare le strategie terapeutiche per malattie neurodegenerative, come la SLA, la quale sta emergendo come una malattia "multisistemica" in cui l'alterazione nei parametri strutturali, fisiologici e metabolici di diversi tipi cellulari, come muscolo, neurone e glia, potrebbe agire sinergicamente per aggravare la progressione della malattia stessa.

## MECCANISMI DI MORTE NEURONALE NELLA MALATTIA DI PARKINSON

Francesco Fornai

*Dipartimento di Morfologia Umana e Biologia Applicata – Università di Pisa*

*Laboratorio di Neurobiologia dei Disordini del Movimento Dipartimento di Neurologia*

*I.N.M. I.R.C.C.S. Neuromed; Pozzilli (IS), Italia*

Alterazioni a carico della conformazione proteica possono determinare la formazione di aggregati (1) sia con se stesse che con altre proteine. Questo fenomeno avviene costantemente ma assume un significato fondamentale in alcune patologie che vengono dette proprio “proteino-patie”, caratterizzate da aggregati proteici sia in specifiche aree del SNC che in periferia (1). Tali cambiamenti conformazionali possono essere il risultato di mutazioni geniche, dei sistemi di controllo del ripiegamento della catena polipeptidica, di insulti tossici, che possono alterare la fase post-trasduzionale. L’impiego di animali transgenici, ha dimostrato che le alterazioni conformazionali possono determinare una perdita di funzione, parziale o totale, della proteina ma anche produrre un aumento di attività fisiologica della proteina fino alla comparsa di nuove proprietà le quali vanno sotto il nome di “guadagno di funzione” e risultano altrettanto tossiche per la cellula (2).

Due sistemi fondamentali: ubiquitina-proteasoma (UP) e autofagia, hanno il ruolo fisiologico di rimuovere le proteine danneggiate e/o malfunzionanti, impedendo così il loro accumulo in forma di aggregati potenzialmente tossici.

Tra le varie proteino-patie, in neurologia un ruolo importante viene svolto dalle cosiddette sinucleino-patie di cui il prototipo è la Malattia di Parkinson (MdP). Infatti la MdP si caratterizza, oltre che per la degenerazione dei neuroni dopaminergici nigrostriatali, anche per la presenza di aggregati di alfa sinucleina (3) nei corpi di Lewy (4): inclusioni neuronali (5). Sebbene la causa della morte selettiva dei neuroni dopaminergici nigrali e dell’accumulo di alfa-sinucleina nell’encefalo dei pazienti parkinsoniani non sia nota, si ritiene che lo stress ossidativo e la compromissione dei principali sistemi proteolitici possano svolgere un ruolo decisivo nella patogenesi di tale malattia .

I legami che corrono tra le alterazioni dei sistemi di “controllo qualità” proteica e dei maggiori sistemi degradativi (UP ed autofagia), il turnover fisiologico di alcune proteine, la funzione dei mitocondri e la neurodegenerazione sono argomento di questa relazione, in cui viene messo in rilievo la sinergia tra questi sistemi.

## Referenze

1. Taylor JP, Hardy J, Fischbeck KH. Toxic proteins in neurodegenerative disease. *Science*. 2002; 296: 1991-1995.
2. Rubinsztein DC. The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature*. 2006; 443: 780-786.
3. Jellinger KA. Neuropathological spectrum of synucleinopathies. *Mov Disord*. 2003;18 Suppl 6: S2-S12.
4. Forno LS. Neuropathology of Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1996; 55: 259-272.
5. Shults CW. Lewy bodies *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103: 1661-1668.

## **LE BASI GENETICHE DELLA SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA: UN “PUZZLE” ANCORA TUTTO DA COMPLETARE**

Roberto Del Bo, Nereo Bresolin, Giacomo P. Comi

*Centro Dino Ferrari, Dipartimento di Scienze Neurologiche, Università degli Studi di Milano;  
IRCCS Fondazione Ospedale Maggiore Policlinico-Mangiagalli-Regina Elena, Milano.*

La Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) è una malattia neurodegenerativa progressiva, caratterizzata da morte selettiva dei motoneuroni che controllano l'esecuzione delle azioni volontarie muscolari come respirare e camminare. La patologia ha esordio in età adulta e porta ad un'inesorabile paralisi solitamente fatale in pochi anni per insufficienza respiratoria. Attualmente non esiste alcuna terapia efficace per tale patologia. L'incidenza della malattia è di 1-2 casi per 100,000persone/anno e la prevalenza è di 4-13 casi per 100,000. Sebbene la maggior parte dei casi siano sporadici (s-SLA), circa il 10% dei casi di SLA sono familiari (f-SLA). Le cause alla base della degenerazione sporadica non sono ancora state chiarite, tuttavia si pensa che i fattori genetici giochino un ruolo chiave nella predisposizione alla degenerazione motoneuronale. A tutt'oggi, i geni già identificati come causativi ammontano solo al 5% dei casi di SLA e una comprensione dei meccanismi genetici è pertanto necessaria per definire come la malattia abbia origine e si sviluppi. Il 15-20% dei pazienti con SLA familiare autosomica dominante presenta mutazioni nel gene della rame-zinco superossido dismutasi SOD1, mentre molto più rare sono le mutazioni a carico di altri geni quali SETX, ALS2, VAPB e ANG.

La demenza frontotemporale (FTD) è una malattia che si osserva in un ampio sottogruppo di paziente affetti da SLA. E' stato identificato un locus sul cromosoma 9, ma il gene candidato non è noto. Sia la SLA che la FTD sono state recentemente associate a simili inclusioni neuronali positive per la TAR DNA-binding protein (TDP-43). TDP-43 è una proteina nucleare ubiquitariamente espressa, individuata come una proteina di accumulo in diverse patologie neurodegenerative oggi identificate/classificate con il termine di "proteinopatie da TDP-43". Recentemente, plurime evidenze sperimentali suggeriscono che la proteina TDP-43 possa avere un ruolo diretto nei processi degenerativi della SLA non solo familiare ma, più significativamente, nella forma sporadica. TDP-43 è una proteina di 414 aminoacidi altamente conservata nella scala evolutiva e contiene due motivi di riconoscimento del RNA e una regione carbossi-terminale ricca di residui di glicina. Da un punto di vista funzionale la proteina è coinvolta nella regolazione della trascrizione, nello skipping esonico e come elemento strutturale per corpi nucleari attraverso l'interazione con la proteina SMN (Buratti et al. 2008). Tuttavia le inclusioni neuronali TDP-43 positive non sono state

riportate in soggetti affetti da SLA con mutazioni a carico del gene SOD1, facendo ipotizzare l'esistenza di differenti meccanismi patologici nei pazienti sporadici e in quelli associati a mutazioni SOD1. TDP-43 è codificata dal gene TARDBP, localizzato sul cromosoma 1p36.22; a tutt'oggi, sono state descritte differenti mutazioni a carico di TARDBP in soggetti affetti da SLA familiare e sporadica provenienti da coorti diverse di pazienti, supportando di fatto un ruolo centrale di TDP-43 nella neurodegenerazione motoneuronale (Daoud et al. 2008, Kabashi et al. 2008, Rutherford et al. 2008, Sreedharan et al. 2008); in accordo con quanto riportato in letteratura, il nostro gruppo ha recentemente identificato 5 pazienti SLA con mutazioni a carico di TARDBP; il dato estende lo spettro delle mutazioni TARDBP e conferma le mutazioni TARDBP come causa rilevante nelle forme di SLA familiare e nelle forme sporadiche (Del Bo et al, 2009).

Molto più recentemente, è stato identificato un nuovo gene malattia associato a forme di SLA sia familiari che sporadiche: mutazioni a carico del gene FUS/TLS sono state osservate in circa 5% delle forme f-SLA, di fatto espandendo l'elenco dei geni noti associati a SLA (Kwiatkowski et al., 2009; Corrado et al., 2009). Analogamente a quanto osservato per TDP-43, FUS/TLS è una molecola multifunzionale implicata nella regolazione della trascrizione, dello splicing e della stabilità del mRNA. Va sottolineato come il recentissimo coinvolgimento di TDP-43 e FUS/TLS nei processi neurodegenerativi rappresenti una nuova area di ricerca biomedica che potrebbe permettere di i) contribuire alla comprensione di una malattia caratterizzata da un'ampia eterogeneità fenotipica; ii) definire nuovi target terapeutici e diagnostici, contribuendo allo sviluppo di efficaci strategie terapeutiche.

Tra le forme sporadiche, di particolare importanza è l'associazione tra alcune varianti polimorfiche localizzate all'interno del promotore del gene VEGF e un aumentato rischio di sviluppare la malattia (Lambrechts et al., 2003). Il dato non è stato comunque successivamente confermato da altri studi condotti su coorti di pazienti aventi origini etniche differenti (Del Bo et al., 2008). Oltre alle analisi di linkage che hanno permesso ad esempio di identificare SOD1 come gene causativo principale nelle forme di f-SLA, sono stati recentemente utilizzati altri tipi di approcci biologico/molecolare al fine di identificare nuovi geni coinvolti nella malattia. Tali metodi includono studi di associazione di geni candidati e studi associativi condotti sull'intero genoma (i cosiddetti studi WGA) (Cronin et al., 2009). Per esempio, mediante tali tipi di indagini, Van Es e collaboratori hanno per primi individuato una comune variante intronica del gene DDP6 quale importante fattore di suscettibilità genetica della SLA sporadica, dato confermato successivamente anche da altri gruppi (Del Bo et al., 2008). Sebbene non sia ancora stata evidenziata un'alterazione genetica specifica responsabile delle forme di SLA sporadica, una serie di loci "modifier" e geni associati sono stati recentemente descritti, anche se con risultati contraddittori (Garber et al., 2008;

Schymick et al., 2007; Landers et al., 2009). L'assenza di replicazione in studi differenti e/o la presenza di effetti relativamente ridotti a carico di alleli associati alla malattia rappresentano degli ovvi problemi nella comprensione dei meccanismi patogenetici alla base di una malattia complessa e geneticamente eterogenea quale la SLA sporadica (Del Bo et al., 2008).

Infine, plurime evidenze sperimentali hanno inoltre dimostrato un ruolo centrale della progranulina nella patogenesi dei disordini neurodegenerativi. La progranulina è un fattore di crescita coinvolto nella regolazione di processi multipli che includono la genesi di tumori, riparazione di ferite, processi di sviluppo e infiammazione. Varie evidenze clinico-patologiche suggeriscono che i fenotipi SLA e demenza lobo-frontotemporale con corpi ubiquitina-positivi (FTLD-U) rappresentano "un continuum" dal punto di vista clinico. La scoperta di TDP-43 come substrato comune per i corpi inclusi ubiquitina-positivi osservati sia nelle forme di SLA che di FTLD-U ulteriormente rafforza l'associazione tra i due disordini degenerativi (Liscic et al., 2008). Inoltre, la progranulina, stimolando l'espressione di VEGF, rappresenta un fattore di potenziale rilevanza per la patogenesi delle malattie del motoneurone. Perciò un'interazione complessa tra diversi fattori di crescita può giocare un ruolo centrale nella patogenesi della SLA così come delle forme FTLD-U, come proposto. E' stata recentemente evidenziata un'aumentata espressione di progranulina a livello delle aree di neurodegenerazione attiva nella SLA mediante tecniche immunohistochimiche (Irwin et al., 2009). Infine, sono state identificate alcune varianti nucleotidiche "missenso" a carico del gene PGRN in pazienti con SLA sporadica, sebbene la patogenicità di queste varianti sia ancora da dimostrare (Schymick et al., 2007; Del Bo et al., 2009). Specifici polimorfismi e assetti alplotipici del gene PGRN sono stati significativamente associati ad un'età di insorgenza anticipata della malattia e a sopravvivenza ridotta nella popolazione belga e olandese.



**SESSIONE**  
**“TERAPIE INNOVATIVE”**



**THE MOLECULAR BASIS FOR COMPLEMENTARY NUTRITIONAL INTERVENTION  
IN MULTIPLE SCLEROSIS AND IN OTHER CHRONIC INFLAMMATORY DISEASES:  
IS THERE A NEED TO DEVELOP DIETARY-RELATED DRUGS FOR THEIR  
TREATMENT?**

Paolo Riccio

*Dept. Biology D.B.A.F., University of Basilicata, Potenza, & INBB, Rome, Italy*

MS is a chronic inflammatory and multi-factorial disease with an unusual geographical distribution. If the genetic background is not the discriminating element, susceptibility to MS is determined by environmental factors, including nutritional components rather than microbial infections. High-fat/high-carbohydrate and hyper-caloric “Western” diets may in fact contribute to the uneven geographical distribution of MS and the influence of migration on the course of disease.

However, to know how diet can exacerbate or ameliorate MS symptoms, it is necessary to identify both the dietary molecules and the molecular mechanisms involved in the control of disease.

In principle, the MS patients should avoid the intake of food containing molecules that are potentially harmful over time, and should prefer dietary molecules that can improve their wellness.

On the one hand, saturated fatty acids of animal origin have been considered most frequently for their deleterious influence on MS and other inflammatory diseases. They form large aggregates that can block small capillaries, activate the CD14/TLR4 receptor complex and the formation of TNF- $\alpha$ . Moreover, changes in gut microbiota composition induced by a high-fat/high carbohydrate, high n-6/n-3, diet can favor a systemic low grade inflammation and contribute to exacerbate MS symptoms, in particular through the increase of gut and plasma LPS.

On the other hand, specific bioactive dietary molecules are able to interfere with cell signaling and counteract inflammation, oxidative stress, and angiogenesis associated with MS. Among them, the most important “healthy” molecules are the polyphenols and the carotenoids from vegetables, the omega-3 (n-3) long-chain polyunsaturated fatty acids (PUFA) from fish, vitamin D, and elements as selenium and zinc.

Recent reports are showing that the dietary molecules indicated above have a pleiotropic nature and act on several and different targets in the cell. The most important targets are those involved in the normal control of metabolism and energy homeostasis. Cells possess specific sensors to adapt themselves to changes in their environment, and changes in content and type of food molecules are the most common over time. These sensors are ligand-dependent, multi-domain nuclear receptors that are activated upon binding of lipids, cholesterol derivatives and glucose. The most important

are the peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and the liver X receptors (LXRs). Both receptors exert a tight control on metabolism but also over the expression of metabolic and inflammatory genes and therefore represent an important link for the integration between metabolic and inflammatory signalling. Through their binding to PPARs - but also directly - dietary molecules such as polyphenols and n-3 PUFA inhibit transcription factors involved in inflammatory pathways - the activator protein (AP-1) and the nuclear transcription factor  $\kappa$  (NF- $\kappa$ B) - modulate the activity of Ser/Thr kinases as the mitogen-activated protein kinases (MAPK) and inhibit the enzymes of the n-6 arachidonic acid (AA) pathways. Moreover, they might influence the balance between regulatory and proinflammatory activities via the Arylhydrocarbon receptor (AHR). Furthermore, polyphenols can mimic and enhance the effects of caloric restriction and training by activating the AMP-activated protein kinase (AMPK).

In conclusion, it is now becoming clear that polyphenols act not only as antioxidants but can modulate multiple cell-signaling pathways which are crucial for most chronic inflammatory diseases and have a great potential therapeutic value. Furthermore, their molecular targets and mechanisms of action are often similar to those of pharmacological drugs. This means that we can expect that they can act in synergy. However, an important limitation with polyphenols is their low bioavailability, which is due to their hydrophobic nature and to chemical modifications. On these grounds, it is necessary to undertake studies aimed to enhance their bioavailability and to develop dietary-related drugs with higher ability to inhibit inflammatory processes at low doses.

Acknowledgements: Funding from the Italian Foundation for Multiple Sclerosis (FISM), Project 2007/R/15 and the experimental work of Rocco Rossano and Marilena Larocca, Potenza, and Grazia Maria Liuzzi and Tiziana Latronico, University of Bari, is gratefully acknowledged.

## **TERAPIE DELLE MALATTIE NEURODEGENERATIVE CON CELLULE STAMINALI: OVERVIEW SULLO STATO ATTUALE**

Sabata Martino & Aldo Orlacchio

*Dipartimento di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche, Sezione di Biochimica e Biologia Molecolare, Università di Perugia, Via del Giochetto, 06126 Perugia, Italy.*

La medicina rigenerativa basata sull'uso delle cellule staminali rappresenta a tutt'oggi la più promettente strategia terapeutica per malattie degenerative del sistema nervoso centrale e periferico. Dimostrazioni in tal senso arrivano da sperimentazioni cliniche su pazienti con malattia di Parkinson e Huntington oltre che su pazienti con lesioni di varia origine del midollo spinale.

L'uso di cellule staminali in terapia si basa sulla proprietà delle cellule staminali di sostituire in loco le cellule degenerate con nuove cellule al fine di ripristinare la funzione che in seguito al danno era stata danneggiata.

Le cellule staminali sono cellule indifferenziate caratterizzate dalle proprietà di automantenimento ("self-renewal") e di multipotenzialità (capacità di originare cellule differenziate anche di tipo diverso). Entrambe le proprietà, sono una conseguenza della particolare divisione cellulare (asimmetrica e simmetrica) che contraddistingue le cellule staminali all'interno della nicchia in cui risiedono. In particolare con la divisione asimmetrica le cellule staminali originano due cellule figlie di cui una identica alla madre che rimane dunque staminale e l'altra con le proprietà di progenitore che invece migra dalla nicchia per originare le cellule differenziate del tessuto di destinazione. Molti laboratori sono interessati allo studio dei meccanismi di base che governano l'attività delle cellule staminali. Così sono state identificate molte molecole (Wnt, Notch, citochine, proteine chinasi, microRNA) che disegnano un complesso crocevia di segnalazioni che mantengono bilanciate le attività di self-renewal e di differenziamento. Questo bilanciamento è alla base dell'omeostasi tissutale. Le cellule embrionali (ESCs) originano dalle blastocisti e sono caratterizzate dalla capacità di rigenerazione di tutte le altre staminali così come di tutti i tipi di progenitori e cellule differenziate presenti in un individuo. Le cellule staminali adulte (ASCs) originano durante l'ontogenesi e persistono per tutta la vita all'interno della nicchia di tessuti/organi. Sono capaci di automantenimento e multipotenzialità, sebbene presentino un potenziale differenziativo ristretto verso specifici lineages cellulari. Generalmente le ASCs sono coinvolte nella rigenerazione tissutale sia in condizioni fisiologiche che patologiche.

Recentemente sono state generate cellule staminali in vitro a partire da cellule somatiche differenziate ingegnerizzate con quattro geni solitamente espressi nelle ESCs (Oct3/4, Sox2, c-Myc, and Klf4). Sono designate con il termine di cellule staminali pluripotenti indotte (iPS) e presentano il vantaggio di avere proprietà simili a quelle delle ESCs. Esse infatti possono generare cellule differenziate di vario tipo e permettono di superare la barriera dell'espansione in vitro delle cellule staminali. Inoltre offrono il vantaggio di generare cellule staminali paziente-specifico permettendo così la creazione di modelli di studio privilegiati di una determinata patologia.

La terapia cellulare per il sistema nervoso è quindi basata sulla sostituzione di cellule degenerate con nuove cellule in grado di differenziare in neuroni o in altri tipi di cellule neurali. Quando impiantate nel sistema nervoso centrale o periferico le cellule staminali/progenitori sono in grado di interagire con il microambiente stimolando processi di differenziazione oltre che di neuroprotezione.

In realtà il sistema nervoso centrale è dotato di due regione neurodegenerative (la zona sub ventricolare e il giro dentato dell'ippocampo) per le cellule staminali neurali adulte (NSCs). Queste cellule provvedono al ripristino delle cellule degenerate durante la vita del tessuto.

La moderna medicina rigenerativa cerca di ricreare artificialmente quanto le NCSs fanno naturalmente. Pertanto sono state sviluppate diverse strategie terapeutiche basate sull'uso di cellule staminali di diverso tipo (staminali ematopoietiche, staminali mesenchimatiche di midollo osseo, staminali dal cordone ombelicale, staminali neurali).

A seconda del modello animale di patologia (Alzheimer, Parkinson, Huntington, con trauma al midollo spinale, atrofia muscolare spinale, sclerosi laterale amiotrofica etc) le cellule staminali sono state impiantate in specifici punti di inoculo ed hanno fornito incoraggianti risultati. La disponibilità di cellule staminali pluripotenti indotte paziente specifico offre nuove prospettive di ampliare lo sviluppo di strategie terapeutiche. Di non meno rilevanza è l'opportunità di utilizzare cellule staminali ingegnerizzate con la tecnica della terapia genica.

### **Ringraziamenti**

Finanziamenti ad A.O: Ministero della Salute (#. RF-UMB-2006-339457); MIUR-FIRB "Idea Progettuale" RBIP06FH7J\_002.

## **EFFETTI NEUROPROTETTIVI ED ANTIOSSIDANTI DELLE CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI NEL MODELLO ANIMALE DI SCLEROSI MULTIPLA**

**Vergani L<sup>1</sup>, Lanza C<sup>1</sup>, Voci A<sup>1</sup> Uccelli A<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>**Dipartimento di Biologia, Università di Genova, Genova, Italia**

<sup>2</sup>**Dipartimento di Neuroscienze, Oftalmologia e Genetica, Università di Genova, Genova, Italia**

La sclerosi multipla (SM) è una malattia infiammatoria autoimmune cronica che colpisce il sistema nervoso centrale (SNC). La caratteristica fondamentale della patologia consiste nella perdita di mielina, in aree cerebrali circoscritte, con lesioni multifocali nella sostanza bianca e nell'encefalo. Al microscopio si osserva rarefazione delle guaine e proliferazione reattive dell'astroglia. L'andamento clinico della malattia si caratterizza nella forma iniziale acuta, seguita da periodi di remissione (o quasi) spontanea. La malattia ha probabilmente un'eziologia multifattoriale in cui sono coinvolti sia fattori genetici che ambientali. L'attività immunitaria, sia umorale che cellulare, ha un ruolo predominante, ma non ancora chiaramente definito.

Sebbene i meccanismi patogenetici della SM non siano del tutto chiari, numerose evidenze sperimentali indicano un ruolo primario svolto dallo stress ossidativo nel danno mielinico e neuronale. Tra i meccanismi cellulari di difesa dallo stress ossidativo, grande importanza rivestono le metallothioneine (MT) insieme al glutatione (GSH) ed ai classici enzimi antiossidanti. Dal punto di vista farmacologico non esiste una terapia specifica, ma un ventaglio di trattamenti indirizzati a sopprimere o regolare le attività immunitarie. Negli ultimi anni, grande interesse è stato rivolto al potenziale terapeutico di cellule staminali somatiche autologhe per il trattamento di quelle malattie infiammatorie e degenerative del SNC in cui le terapie convenzionali mostrano scarso successo nel controllare l'evoluzione del quadro clinico. In particolare, l'utilizzo delle cellule staminali mesenchimali (MSC) potrebbe rappresentare nel prossimo futuro una plausibile strategia terapeutica alternativa per le malattie infiammatorie e degenerative del SNC, dato che si sono dimostrate in grado sia di inibire la proliferazione delle cellule T, che di promuovere la sostituzione di cellule neurali attraverso programmi di trans-differenziazione.

L'encefalomielite sperimentale autoimmune (EAS) rappresenta un collaudato modello animale di SM caratterizzato da segni clinici e lesioni al SNC molto simili a quelli osservati nella SM umana. Nei nostri studi è stato utilizzato un modello murino di SM a decorso cronicamente-progressivo in cui la EAS viene indotta nel topo adulto femmina ceppo *C57black6J* tramite immunizzazione con 'glicoproteina mielinica-oligodendrocitaria' (MOG-peptide 35-55). Recenti studi hanno infatti dimostrato l'efficacia clinica della somministrazione di MSC nel trattamento dell'EAS. Il nostro studio ha analizzato, durante la progressione della EAS murina, in concomitanza o meno del trattamento con MSC, l'espressione e l'attività di sistemi antiossidanti sia enzimatici (SOD, CAT e GST) che non enzimatici (metallotioneine) a livello del SNC (Lanza et al., "Neuroprotective Mesenchymal Stem Cells are endowed with a potent antioxidant effect in vivo" in press su *Journal of Neurochemistry*). Le metallotioneine giocano un ruolo di primaria importanza tra i meccanismi cellulari non enzimatici di difesa dallo stress ossidativo inattivando i radicali liberi grazie ai gruppi sulfidrilici. Nei mammiferi sono presenti diverse isoforme di MT. MT-1 e MT-2 sono principalmente presenti negli astrociti e nella microglia, ma assenti nei neuroni e negli oligodendrociti. MT-3 è invece l'isoforma principalmente espressa nel cervello soprattutto a livello dei neuroni dell'ippocampo ricchi di zinco, ma assente nelle cellule gliali.

I nostri risultati mostrano un'induzione dell'espressione di tutte e tre le metallotioneine cerebrali in topi EAS rispetto ai controlli sani. Mentre però l'espressione di MT-1 and MT-3 aumenta con la progressione della malattia, MT-2 risulta indotta all'esordio della malattia per poi ritornare a livelli basali nella fase cronica. Questo risultato sembra indicare MT-1 e MT-3 come possibili marker di danno cerebrale associato alla progressione della malattia, mentre MT-2 risulterebbe un marker del danno ossidativo associato al reclutamento di cellule immunitarie all'esordio della malattia. Il profilo trascrizionale e l'attività di tutti e tre gli enzimi antiossidanti (SOD, CAT e GST), così come l'espressione di PARP-1 e p53, mostrano cinetiche simili a quelle osservate per MT-1 e MT-3 in corso di EAS. La somministrazione per via i.v. di MSC riduce la stimolazione dell'espressione e dell'attività di queste proteine, indicando pertanto un'evidente azione antiossidante delle MSC che può, almeno in parte, spiegare l'attività neuro protettiva svolta da queste cellule staminali nel trattamento della EAS. I dati ottenuti con gli esperimenti *in vivo* trovano conferma in esperimenti *in vitro* condotti su linee di neuroblastoma sottoposte ad un insulto ossidativo (acqua ossigenata e staurosporina) in presenza o meno di MSC.

## CELLULE STAMINALI PER IL TRATTAMENTO DI MALATTIE NEURODEGENERATIVE: PROBLEMI E PROSPETTIVE

Luciano Conti

*Centro Interdipartimentale di Ricerca sulle Cellule Staminali - UNISTEM - e Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Universita' degli Studi di Milano, via Balzaretti 9, 20133 Milano – ITALIA. Tel. 0250325845, FAX 0250325845. E-mail: [luciano.conti@unimi.it](mailto:luciano.conti@unimi.it)*

Negli ultimi anni le strategie di trapianto cellulare e trasferimento genico per il trattamento delle malattie neurodegenerative o traumatiche del cervello hanno fornito le basi per lo sviluppo coerente di nuovi approcci terapeutici basati sulla sostituzione delle cellule degenerate con cellule nuove. Esperimenti condotti su modelli sperimentali nell'arco degli ultimi trent'anni hanno evidenziato l'adattabilità e la plasticità di cellule cerebrali fresche di origine fetale per scopi di trapianto intracerebrale, dimostrando anche la loro capacità nell'indurre un recupero funzionale dell'animale lesionato. Il trapianto cellulare per il trattamento delle malattie del cervello ha già da tempo mosso i primi passi, passando dalla sperimentazione su modelli animali alla sperimentazione clinica. Il Morbo di Parkinson e la Corea di Huntington hanno rappresentato i logici candidati per saggiare l'efficacia della terapia di trapianto cellulare, essenzialmente perché esistono ben caratterizzati modelli animali che ricapitolano le caratteristiche anatomico-funzionali della malattia e i trattamenti farmacologici convenzionali si sono rivelati poco utili.

Il trapianto di tessuto fetale, a parte le considerazioni di natura etica circa l'utilizzo di neuroni prelevati da aborti, presenta tuttavia problemi "pratici" difficilmente risolvibili e che ne limitano la diffusione. I ricercatori guardano quindi con sempre maggiore interesse all'utilizzo delle cellule staminali espresse *in vitro* come una nuova e inesauribile fonte di materiale da trapiantare. Tuttavia, nonostante la scoperta delle notevoli potenzialità delle cellule staminali derivanti dagli studi *in vitro*, le attuali conoscenze sui meccanismi e sulle interazioni che determinano il loro comportamento nel cervello sono ancora molto scarse.

Idealmente, le cellule trapiantate dovrebbero essere in grado di migrare verso precise destinazioni all'interno del cervello ospite, acquisire fenotipi specifici di tali regioni e integrarsi nei circuiti nervosi in modo da ricomporre l'anatomia e ripristinarne la funzione. Questi processi sono il risultato di complesse interazioni fra le proprietà intrinseche degli elementi trapiantati e specifici segnali espressi dal tessuto ricevente, sia esso embrionale, adulto o lesionato.

Nel complesso, i risultati finora ottenuti hanno evidenziato come nonostante sia possibile isolare cellule staminali cerebrali umane e di espanderle *in vitro*, le possibilità di trapiantarle in pazienti

affetti da malattie neurodegenerative restino, al momento, lontane dal garantirne risultati terapeutici. E' pertanto necessario acquisire nuove conoscenze per controllare la proliferazione delle cellule staminali cerebrali, dirigerne il differenziamento verso i fenotipi neuronali desiderati, favorirne la sopravvivenza e la funzionalità *in vivo*. Occorre inoltre stabilire quale sia il reale potenziale differenziativo di queste cellule e definire quali siano le condizioni ambientali necessarie per ottenere un'integrazione adattativa nel tessuto ospite.

**NEURODEGENERATION OF HYPOTHALAMIC OREXIN-CONTAINING NEURONS  
RESULTING IN SLEEP, MOTIVATION AND EATING DISORDERS: RATIONALE FOR  
POSSIBLE THERAPEUTIC APPROACHES**

Emilio Merlo Pich, Mauro Corsi & Renzo Carletti

*Addiction and Sleep Disorder Discovery Performance Unit, Neuroscience CEDD, GlaxoSmithKline  
R&D, Via Fleming 4, 37100 Verona Tel. +39 045 8218212*

The hypothalamic orexin (hypocretin) system plays a crucial role in the regulation of sleep-wakefulness cycle and eating. Orexin is expressed together with dynorphin and glutamate in neurons of lateral hypothalamus. Neurodegeneration of orexin neurons is associated with the primary sleep disorder narcolepsy, and disrupted orexin signaling produced in preclinical models is supportive of a critical role of orexin A peptides. There is a growing interest in the role of orexin defects not only in the pathophysiology of other sleep disorders, but also in neurological diseases with associated sleep symptomatology (Yasui et al. 2006). Recent studies showed reduction of orexin in the CSF of subjects with Parkinson's Disease associated with excessive daytime sleepiness (Fronczek et al. 2008) and sleep attack, possibly modulated by dopamine D3 receptors (Asai et al. 2009). A possible role for immune mechanism in the orexin neuron neurodegeneration has been proposed. In our laboratories we analyze the respective role of the orexin receptor 1 and 2 as well as D3 receptors in the neurobiology of the orexin system. Implication of the modulation of these receptors and other targets of relevance with the therapeutic approach of disorders associated with orexin neuron degeneration will be presented.



**ABSTRACTS**  
**BORSISTI**



## **POTASSIO CON RIBOSIO - KRib - BLOCCO DELLA PROLIFERAZIONE DI LINEE CELLULARI TUMORALI UMANE**

L. Bruni<sup>1,2,3</sup>, I. Ortalli<sup>1,2,3</sup>, S. Croci<sup>1,2</sup>

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

*2- INBB –Milano 3- Fondazione Valsé Pantellini – Firenze.*

Lo scopo di questo lavoro è stato testare l'effetto della soluzione acquosa di Bicarbonato di Potassio e D(-) Ribosio (con un rapporto in peso di 2:1), su differenti linee cellulari umane: HTB-126 (carcinoma mammario), HTB-30 (metastasi pleuriche dello stesso carcinoma) ed HTB-125 (epitelio mammario non tumorale immortalizzato). Il D(-)-Ribosio è un componente essenziale di RNA, ATP ed di altre molecole, così come è una potenziale fonte di energia. Prima d'entrare nel metabolismo è fosforilato a D-Ribosio-5-fosfato precursore di nucleotidi, istidina e triptofano ed intermedio della via dei pentosi monofosfati <sup>(1)</sup>. Il Potassio è uno ione cardine della vita cellulare in quanto è coinvolto in importantissimi processi tra cui la regolazione dell'apoptosi <sup>(2,3)</sup> e il folding delle strutture telomeriche. In condizioni fisiologiche nelle cellule la sua concentrazione intracellulare di 150 mM mentre quella extracellulare è di 5 mM.

Le cellule sono state trattate per 30 giorni con una concentrazione di KRib di 5mM (riferita al Bicarbonato di Potassio) e seminate ad una concentrazione di 4000 cell/ml.

Si è valutato l'effetto del KRib sulla duplicazione cellulare e su eventuali cambiamenti morfologici. Per valutare la cinetica di proliferazione cellulare non è stato possibile utilizzare saggi di proliferazione quali MTT *assay*, in quanto il D(-)-Ribosio interagisce direttamente con il (3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) riducendolo spontaneamente <sup>(4)</sup>. La cinetica cellulare è stata quindi studiata valutando la Population Doubling (PD)<sup>(5)</sup> durante il periodo di trattamento. La linea HTB-126 (carcinoma mammario) trattata con KRib, mostra differenze significative rispetto al controllo <sup>(6)</sup>. Al 9° giorno di trattamento, è evidente una diminuzione della capacità proliferativa rispetto al controllo, apparentemente senza nessun cambiamento morfologico. Al 14° giorno si ha una perdita d'adesione e d'integrità della membrana cellulare, con la concomitante formazione di *blebs*. Era presente tuttavia una sottopopolazione cellulare che, pur cambiando morfologia e presentando un blocco della crescita, non perdeva adesione. Il mezzo con KRib è stato successivamente cambiato con mezzo senza KRib per la restante parte dell'esperimento senza nessun cambiamento significativo. Anche nel caso della linea HTB-30 si hanno differenze fra trattato e controllo. Al 8° giorno di trattamento le cellule sono decisamente più grandi rispetto al controllo senza perdita delle strutture cellulari ma con un iniziale rallentamento della crescita. Queste differenze sono mantenute durante tutto il trattamento, senza particolari cambiamenti. La sostituzione del mezzo di trattamento con mezzo di mantenimento comporta, dopo una settimana, il ripristino della morfologia iniziale e la ripresa della proliferazione cellulare.

La linea HTB-125 (epitelio mammario non tumorale immortalizzato) trattata non mostra differenze significative rispetto al controllo. Le cellule trattate mantengono una normale cinetica di duplicazione, sono perfettamente adese conservando la morfologia fibroblastica.

Questi risultati (preliminari) evidenziano che il trattamento con KRib, sia nel caso della linea HTB-126 che HTB-30, provoca un rallentamento della crescita e un cambiamento morfologico che nel caso del tumore primario porta anche alla perdita di adesione. Da questi risultati, sebbene da confermare, gli effetti del KRib sulla linea HTB-30 sono completamente differenti rispetto agli effetti sulle HTB-126. È evidente che la linea HTB-30 è più resistente al trattamento con KRib, con ipotetiche possibilità di ripristino del fenotipo metastatico una volta che il KRib venga tolto dal mezzo di coltura.

Di grande importanza, questi risultati mostrano che il trattamento sulla linea HTB-125, dopo un mese di trattamento con KRib, non ha alcun effetto sulla cinetica di duplicazione e sulla morfologia.

S'intende proseguire lo studio per confermare questi risultati impiegando la metodica *TIME LAPSE MICROSCOPY* e cercando di comprendere il meccanismo d'azione del bicarbonato di potassio con ribosio.

### **References**

1. Ida Lager, Marcus Fehr, Wolf B. Frommer, Sylvie Lalonde. FEBS Letters 553 : 85-89, 2003.
2. Carl D. Bortner, John A. Cidlowski . Archives of Biochemistry and Biophysics 462: 176-188, 2007.
3. Francis M. Hughes, Jr., Carl D. Bortner, Geoffrey D. Purdy, and John A. Cidlowski: The journal of Biological Chemistry. 272 (48): 30567-30576, 1997.
4. S. Croci, L. Bruni , S.Bussolati, M. Castaldo,I Ortalli : VIII Convegno Nazionale INBB 2008- Roma 23- 24 Ottobre.
5. J. F. Riou, L. Guittat, P. Mailliet, A. Laoui, E. Renou, O. Petitgenet, F. Me' gnin-Chanet, C. He' le'ne, and J. L. Mergny:. PNAS 99: 2672-2677, 2002.
6. S. Croci, L. Bruni , S.Bussolati, M. Castaldo,I Ortalli submitted to Anticancer Research, 2009

## EFFETTO DEGLI INTERFERENTI ENDOCRINI SULLA PROGRESSIONE DEL CICLO CELLULARE.

L. Caputo<sup>1</sup>, G. Del Pozzo<sup>2</sup>, P. Barba<sup>2</sup>, C. Nicolucci<sup>1,3</sup>, N. Diano<sup>1,3</sup>, D.G. Mita<sup>1,2,3</sup>.

<sup>1</sup> *Istituto Nazionale di Biostrutture e Biosistemi (INBB), Via le Medaglie d'Oro, 305, 00136 Roma, Italia*

<sup>2</sup> *Istituto di Genetica e Biofisica, CNR, Via Pietro Castellino, 111-80131, Napoli, Italia*

<sup>3</sup> *Dipartimento di Medicina Sperimentale, Seconda Università di Napoli, Via S. M. di Costantinopoli 16, 80138 Napoli, Italia*

Scopo di questa ricerca è stato valutare gli effetti di alcune sostanze note come Interferenti Endocrini (IE) sul ciclo cellulare. In particolare abbiamo investigato se il Bisfenolo A, Bisfenolo B, Bisfenolo F, Nonilfenolo e Octilfenolo, interferenti endocrini appartenenti al gruppo degli alchilfenoli, legandosi ai recettori per gli estrogeni, sono in grado di stimolare la progressione del ciclo cellulare. Come sistema biologico modello è stata scelta la linea cellulare tumorale MCF-7. L'effetto degli IE è stato studiato mediante l'analisi citofluorimetrica del ciclo cellulare su cellule sincronizzate. La sincronizzazione è stata ottenuta mediante deprivazione di siero per 24 ore. In questo modo le cellule vengono arrestate nella fase G0 e sincronizzate. I risultati ottenuti sono riportati nella tabella, come media di 8 esperimenti.

	G0-G1	S	G2-M
C-	81,275	13,025	5,65
E2 10 <sup>-6</sup>	50,5	33,35	16,15
E2 10 <sup>-7</sup>	61,1	28,8	14,3
E2 10 <sup>-8</sup>	61,97	28,43	9,43
E2 10 <sup>-9</sup>	73,1	20,3	6,5
E2 10 <sup>-10</sup>	76	18,8	5,2
BPA 10 <sup>-5</sup>	60,7	28,9	9,9
BPA 10 <sup>-6</sup>	65,2	27,5	7,2
BPA 10 <sup>-7</sup>	82,3	12,6	4,85
BPB 10 <sup>-5</sup>	71,2	21,4	7,4
BPB 10 <sup>-6</sup>	72,1	21	6,9
BPB 10 <sup>-7</sup>	74,2	17,6	8,2
BPF 10 <sup>-5</sup>	68,8	25,7	6,4
BPF 10 <sup>-6</sup>	66,1	21,7	4,4
BPF 10 <sup>-7</sup>	77,9	17,7	3,9
NP 10 <sup>-5</sup>	59,9	28,7	11,25
NP 10 <sup>-6</sup>	69,1	22,5	8,35
NP 10 <sup>-7</sup>	82,5	12,5	5
OP 10 <sup>-5</sup>	65,1	29,1	5,6
OP 10 <sup>-6</sup>	78,56	14,16	7,2
OP 10 <sup>-7</sup>	84,9	9,3	5,8

In condizioni di colture prive di estrogeni i dati mostrano che dopo sincronizzazione c'è un arresto nella fase G0-G1 del ciclo, con una quantità di cellule del controllo pari all'80%.

Aggiungendo alle colture 17-β-Estradiolo, o i singoli IE a differenti concentrazioni, il numero di cellule decresce nella fase G0-G1 ed aumenta nella fase S e G2-M in maniera dose dipendente.

Gli esperimenti hanno dunque dimostrato che i diversi IE determinano una progressione del ciclo cellulare con efficienza diversa a seconda dell'interferente endocrino studiato e a seconda delle concentrazioni. Questo significa che ciascun IE si lega al recettore con affinità diversa.

## DETECTION OF DIFFERENT CLUSTERIN mRNA ISOFORMS IN NORMAL, IMMORTALIZED AND CANCEROUS HUMAN CELL LINES

Mariangela Coletta, Federica Rizzi, Alessandro Silva, Saverio Bettuzzi

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

**Background:** Clusterin (CLU) is a secreted glycoprotein with a nearly ubiquitous tissue distribution, involved in many pathological states including neurodegeneration, ageing and cancer<sup>1,2,3</sup>. The CLU gene is unique in the genome and is well conserved during evolution. It maps on chromosome 8 and it is organized in 9 exons, of variable size, ranging from 126 bps to 412 bps, spanning a region of 17,877 bps<sup>4</sup>. A recent GenBank update has earmarked two transcriptional isoforms (RefSeq) of human CLU, named Isoform 1 and Isoform 2 (GenBank accession number NM\_001831.2 and NM\_203339.1 respectively), which are only produced in humans and chimpanzees. These two mRNA isoforms share nucleotide sequence from exon 2 to exon 9 and the terminal 3'-untranslated region but have a unique exon 1. Actually Isoform 1 is predicted to produce a protein of 501 aminoacids and a molecular weight of 57.8 kDa. This protein is supposed to have a prevalent cytoplasmic/nuclear localization according to a computational prediction of its sub-cellular localization by the PSORT program<sup>5</sup>, and might account for the existence of intracellular forms of CLU escaping the secretion pathway. Isoform 2, differently, has an alternative untranslated exon 1, and the first available AUG is located in exon 2, immediately upstream of a functional endoplasmic reticulum (ER) localization leader sequence. Using the largest open reading frame this m-RNA is predicted to produce a protein of 449 aminoacids destined to secretion. Moreover, an alternative transcript was found by Leskov et al. in MCF-7 cells<sup>6</sup>. In this messenger exon 1 of the isoform 1 is directly joined to exon 3, therefore lacking the AUG in exon 2 and the ER localization sequence. According to the Authors this alternative mRNA is constitutively expressed in MCF-7 breast cancer cell line, and codes for a protein precursor called pnCLU, a putative nuclear pro-death form.

**Objectives:** We decided to investigate the distribution of the two transcriptional isoforms of clusterin in different human cell lines. We also tried to check for the presence of the alternative messenger described by Leskov et al.

**Materials and methods:** Total RNA was extracted using Trireagent (Sigma) from normal embryonic lung fibroblasts (WI-38), from immortalized (BEAS-2B) and tumorigenic (A549) lung cell lines and from immortalized (PNT1a) and cancer (PC3, DU145) prostate epithelial cells. RNA has been retro-transcribed in presence of random hexamers. We used the cDNA obtained, to perform a PCR reaction using specific primers pair able to discriminate isoform 1 from 2. We placed the forward primer in the unique exon 1 of each transcript, while the reverse primer anneals on exon 4. We specifically amplified nucleotides from 67 to 537 of NM\_001831.2 and from 50 to 657 of NM\_203339.1. Amplicons molecular size determination allowed us to detect the presence (or absence) of exon 2 and consequently alternative splicing occurrence. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) has been used as housekeeper gene. RT-PCR products have been resolved on 1% agarose gel electrophoresis.

**Results:** We observed that CLU amplicons had the expected size and we did not find any evidence of shorter DNA fragments due to the 'skipping exon 2'. Moreover, we found that both CLU transcript variants are expressed at comparable levels in normal fibroblast cells WI38. This result agreed with data previously obtained in various adult normal tissues (lung, prostate, breast, heart, liver, colon, kidney, pancreas, stomach, ovary, brain)(data not published). Interestingly, we found

Isoform 1 both in immortalized and in tumorigenic cells, while Isoform 2 is almost undetectable in all the transformed cell lines tested.

**Conclusions:** Clusterin messenger generated by hypothetical alternative splicing and described by Leskov et al. is not present in cells and/or conditions checked. Moreover, since its discovery, its existence has never been confirmed later by other authors<sup>7,8,9</sup>, it should be seriously taken into consideration that this transcript is either very specific to MCF7 cells or an experimental artefact. CLU transcript variants have different expression pattern in cancer cells; Isoform 1 is constitutively expressed in all the cell lines tested so far. At difference Isoforms 2 is absent (or present at undetectable levels) both in immortalized and cancerous cell lines tested and appears more related with transformation events. Further experiments (currently ongoing in our laboratory), will be necessary in order to understand the role played by Isoform 2 in tumour development.

### **References:**

1. Rosenberg, M. E., Silkensen, J., 1995. Clusterin: physiologic and pathophysiologic considerations. *Int J Biochem Cell Biol.* 27, 633-45.
2. Shannan, B., et al., 2006. Challenge and promise: roles for clusterin in pathogenesis, progression and therapy of cancer. *Cell Death Differ.* 13, 12-9.
3. Trougakos, I. P., Gonos, E. S., 2002. Clusterin/apolipoprotein J in human aging and cancer. *Int J Biochem Cell Biol.* 34, 1430-48
4. Wong, P., et al., 1994. Molecular characterization of human TRPM-2/clusterin, a gene associated with sperm maturation, apoptosis and neurodegeneration. *Eur J Biochem.* 221, 917-25.
5. Horton, P., et al., 2007. WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Res.* 35, W585-7.
6. Leskov, K. S., et al., 2003. Synthesis and functional analyses of nuclear clusterin, a cell death protein. *J Biol Chem.* 278, 11590-600.
7. Andersen, C. L., et al., 2007. Clusterin expression in normal mucosa and colorectal cancer. *Mol Cell Proteomics.* 6, 1039-48.
8. Cochrane, D. R., et al., 2007. Differential regulation of clusterin and its isoforms by androgens in prostate cells. *J Biol Chem.* 282, 2278-87.
9. Schepeler, T., et al., 2007. Clusterin expression can be modulated by changes in TCF1-mediated Wnt signaling. *J Mol Signal.* 2, 6.

## HYDROGENATED AMORPHOUS CARBON NANOGROOVES INDUCE NEURONAL CELLS DIFFERENTIATION FROM HUMAN BONE MARROW-MESENCHYMAL STEM CELLS

D'Angelo F.<sup>1</sup>, Armentano I.<sup>2</sup>, Mattioli S.<sup>2</sup>, Crispoltoni L.<sup>1</sup>, De Maglie D.<sup>1</sup>, Tiribuzi R.<sup>1</sup>, di Girolamo I.<sup>1</sup>, Kenny J.M.<sup>2</sup>, Martino S.<sup>1</sup> and Orlacchio A.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>*Department of Experimental Medicine and Biochemical Science, Section of Biochemistry and Molecular Biology, University of Perugia, Perugia, Italy.* <sup>2</sup>*Materials Engineering Center, UdR Interuniversity Consortium on Materials Science and Technology, University of Perugia, Terni, Italy.*

Interfaces between engineered materials and stem cells play a critical role in biomedical applications where the interaction between cells and the material surface dictates cell performance and therefore, the success of the implanted device.

Recently, exploring the interface between human bone marrow mesenchymal stem cells (hBM-MSCs) and hydrogenated amorphous carbon (a-C:H) film designed with uniform groove or grid nano-patterns, we have demonstrated that hBM-MSCs responded to different nano-pattern designs with specific changes of microtubule organization. In particular, we observed that the grid pattern induced a square-localized distribution of  $\alpha$ -tubuline/actine fibres while the groove pattern exerted a more dynamic effect, associated with microtubule alignment and elongation [1].

In this study, we asked if the interaction between hBM-MSCs and aC:H with grooves nano-pattern could be useful for neural differentiation. To this end we explored if the combination of two different types of stimuli, such as chemical ligands that bind to specific receptors, or physical signals that are transduced by cytoskeleton tension, could preferentially affect this process. BDNF was used as the model chemical ligand, whereas surface nanotopography in the form of nanochannels was investigated as the physical stimulus. We found that the two stimuli could individually increase the percentage of neurons in culture with a more drastic effect for the combination of soluble neurotrophic factor administration and topography.

### **References**

1. Martino Sabata, D'Angelo Francesco, Armentano Ilaria, Tiribuzi Roberto, Pennacchi Manuela, Dottori Mariaserena, Mattioli Samantha, Caraffa Auro, Cerulli Giuliano Giorgio, Kenny Jose` Maria, and Orlacchio Aldo. Hydrogenated Amorphous Carbon Nanopatterned Film Designs Drive Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Cytoskeleton Architecture. *Tissue Eng Part A*. 2009 Oct;15(10):3139-49.

### **Acknowledgements and grants**

This study was supported by the Italian *Fondazione Cassa di Risparmio di Perugia* (grant no. 2009.020.0050), the Italian *Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca* (grant *FIRB Idea Progettuale* no. RBIP06FH7J\_002), the *Istituto Nazionale Biostrutture e Biosistemi*, the INBB and the *Italian Ministero della Salute* (grant no. RF-UMB-2006-339457) to A.O.

## EFFECTS OF CLUSTERIN DEPLETION IN TRAMP MODEL OF PROSTATE CANCER

S Bettuzzi<sup>1</sup>, P Davalli<sup>2</sup>, S Davoli<sup>1</sup>, O Chayka<sup>3</sup>, F Rizzi<sup>1</sup>, L Belloni<sup>1</sup>, D Pellacani<sup>2</sup>, G Fregni<sup>2</sup>, S Astancolle<sup>2</sup>, M Fassan<sup>4</sup>, A Corti<sup>2</sup>, R Baffa<sup>4,5</sup> and A Sala<sup>3</sup>

<sup>1</sup>*Department of Experimental Medicine, University of Parma, Parma, Italy;* <sup>2</sup>*Department of Biomedical Sciences, University of Modena and Reggio Emilia, Modena, Italy;* <sup>3</sup>*Molecular Haematology and Cancer Biology Unit, Institute of Child Health, London, UK;* <sup>4</sup>*Department of Urology, Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA, USA and* <sup>5</sup>*Research, MedImmune LLC, Gaithersburg, MD, USA*

TRAMP is a transgenic mouse model that spontaneously develops prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) by 8-12 weeks of age, with a progression to adenocarcinoma and distant metastases by 24-30 weeks of age in 100% of cases, strictly mimicking the human disease (1). Clusterin (Clu) protein is widely distributed in animal tissues and is involved in many different biologic processes. It has been shown to modulate cell survival and neoplastic transformation (2), but its function in human cancer is still highly controversial. Changes in Clu expression have been documented in a broad variety of different malignancies (3). It has been observed that Clu is down regulated during prostate cancer progression in human (4) and in the TRAMP mouse model (5). In this study, we examined the prostate of mice in which Clu has been genetically inactivated, in order to evaluate the effects of Clu lacking in prostate cancer progression.

Surprisingly, we observed transformation of the prostate epithelium in the majority of Clu knockout mice. Either PIN or differentiated carcinoma was observed in 100 and 87% of mice with homozygous or heterozygous deletion of Clu, respectively, at 40-weeks of age. Wild type siblings did not show any cancer lesions. Higher Ki-67 labeling index, if compared with the prostates of wild-type controls, was found by IHC assays in the prostate tissue of Clu<sup>+/-</sup> and Clu<sup>-/-</sup> mice. In addition, in the same organs we observed a much more intense p65 NF- $\kappa$ B staining, which corresponds perfectly with its phosphorylated, thus activated, form. Crossing Clu knockout with TRAMP -mice, the survival at 28 weeks of age was 100% for TRAMP Clu<sup>+/+</sup>, but 83% and 70% of TRAMP Clu<sup>+/-</sup> and TRAMP Clu<sup>-/-</sup> respectively. Furthermore, while all TRAMP Clu<sup>+/+</sup> mice examined at necropsy developed large in situ prostate tumors and rare metastatic diffusion to lymph nodes, all TRAMP Clu<sup>+/-</sup> and TRAMP Clu<sup>-/-</sup> mice showed cancer invasion spreading in many different body sites including kidney and liver. These in situ neoplastic lesions and metastatic prostatic cells, expressing the SV40 antigen transgene, were also consistently Ki67-positive, and with an even stronger NF- $\kappa$ B staining in TRAMP Clu<sup>-/-</sup> mice if compared with TRAMP Clu<sup>+/+</sup> mice. Finally, 8% of TRAMP Clu<sup>-/-</sup> females, normally cancer free, were affected by tumours, mostly localized to thyroid and uterus but also to lymph nodes and lungs.

Our data indicate that suppression of Clu affects prostate carcinogenesis in TRAMP mice, mainly through a shift towards a more invasive and malignant behaviour. Mechanistically, deletion of Clu induces activation of NF- $\kappa$ B, a potentially oncogenic transcription factor, important for proliferation and survival of prostate cells.

### REFERENCES

- 1) Greenberg et al., PNAS, 1995
- 2) Trougakos IP, Gonos ES, Int J Biochem Cell Biol, 2002
- 3) Shannan B, Cell Death Differ, 2006
- 4) Scaltriti M et al, Int J Cancer, 2004
- 5) Caporali A et al., Carcinogenesis, 2004

## AGGREGATION AND TOXICITY OF AMYLOIDOGENIC PEPTIDES CAN BE AFFECTED BY GLYCATING CONDITIONS

Nicoletti Vincenzo Giuseppe<sup>1a</sup>, Distefano Donatella<sup>1</sup>, Cataldo Sebastiano<sup>2</sup>, Attanasio Francesco<sup>3</sup>, Pignataro Bruno<sup>2</sup>, Spina Vittoria<sup>1</sup>, Giuffrida-Stella Anna Maria<sup>1a</sup>, Rizzarelli Enrico<sup>1a</sup>

<sup>1</sup> *Dipartimento di Scienze Chimiche, Sezione di Biochimica e Biologia Molecolare – Università di Catania.*

<sup>2</sup> *Dipartimento di Chimica Fisica, Università di Palermo*

<sup>3</sup> *Istituto di Biostrutture e Bioimmagini (IBB), CNR, Catania*

<sup>a</sup> *Istituto Nazionale di Biostrutture e Biosistemi (INBB)*

*e-mail: nicovigi@unict.it*

Proteins show an intrinsic propensity to misfolding that is influenced by the amino acid composition, and can be accelerated by certain environmental conditions such as increased temperature, high or low pH, agitation, oxidative agents, transition metals, or elevated glucose.

Glycation is the well-described non-enzymatic Maillard reaction of reducing sugars with protein side chains, lipids, or nucleic acids to form Schiff base. Complex multistep reactions and rearrangements during long-term incubation produce various compounds termed advanced glycation end products (AGEs). AGEs were found to induce conformational changes especially to long-living proteins. This contributes to the onset of several diseases, including diabetic complications, renal failure, inflammation, atherosclerosis, cancer, neurodegenerative disorders and more generally age related diseases. AGEs can be recognized by the multiligand receptor for AGEs (RAGE) that has been therefore implicated in the pathogenesis of such diseases.

Alzheimer's disease (AD), Parkinson's disease (PD), Huntington's disease (HD), amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and prion diseases show common cellular and molecular mechanisms including protein misfolding and aggregation, a process termed amyloidogenesis. The amyloid aggregates usually consist of elongated, unbranched protein fibrils deposits containing misfolded proteins with a beta-sheet conformation, and represent the end stage of a molecular cascade of several steps. Increasing evidences now support the view that spontaneous aggregation into small soluble oligomeric (protofibrillar) assemblies during earlier steps, is more directly tied to pathogenesis than the insoluble deposits themselves.

Consequently, there is current emphasis in understanding the microenvironmental conditions that favour the initial oligomerization. Glycation plays a prominent role in the conversion of a protein from its native structure to the amyloid and toxic state. This process can be accelerated by free radicals and certain transition metals, particularly Cu(II) and Zn(II). Toxic activity is enhanced by the interaction with RAGE, that functions as a signal transducer for cell impairment. A full understanding of the mechanism of protein misfolding and cross-linking as well as specific receptor signalling is helpful in designing new pharmacological/chemical tools against amyloidogenesis and related diseases.

*Acknowledgements: FIRB RBNE 03PX83.*

## PLGA/SWNT COMPOSITE SHEETS: BIOCOMPATIBILITY AND *IN VITRO* OSTEOCONDUCTIVITY-BY HUMAN ALVEOLAR BONE-DERIVED CELLS

Mariaserena Dottori\*<sup>1,2</sup>, Ilaria Armentano<sup>2</sup>, Elena. Fortunati<sup>2</sup>, José Maria Kenny<sup>1,2,3</sup>, Eduardo Villarreal<sup>4</sup>, Juan L. Chávez<sup>4</sup>, Higinio Arzate<sup>4</sup>

<sup>1</sup> INBB at Material Science and Technology Centre, University of Perugia, Terni, Italy

<sup>2</sup> Materials Engineering Centre, UdR INSTM, NIPLAB, University of Perugia, Terni, Italy

<sup>3</sup> Institute of Polymer Science and Technology, CSIC, Madrid, Spain

<sup>4</sup> Laboratorio de Biología Periodontal y Tejidos Mineralizados, Facultad de Odontología, Universidad Nacional Autónoma de México

Corresponding Author\*. Tel.: +39 0744-492914, Fax: +39 0744-492950, e-mail: mariaserena.dottori@unipg.it

Poly(DL-Lactide-co-Glicolide) (PLGA) can be selected as a collagen-like matrix providing the synthetic, physical sheet in osteogenesis to optimize integration with a surrounding bone tissue [1,2]. Single wall carbon nanotubes (SWNT) can sustain osteoblast matrix deposition and allow mineralization in bone-like tissue regeneration [3]. The purpose of the present work was to determine if nanostructured PLGA sheets based on pristine (p-SWNTs) and functionalized (SWNTs-COOH) carbon nanotubes can promote *in vitro* cell attachment, proliferation of human alveolar bone-derived osteoblasts (HABDCs) and mineralized matrix deposition. In addition, SWNT biological safety need to be truly investigated [4].

Composite PLGA/SWNT 2D films were produced by solvent casting in chloroform. PLGA/SWNT porous 3D sheets (scaffolds) were successfully developed by particulate leaching technique. Micrographs obtained by field emission scanning electron microscopy (FESEM) showed 3D sheets with pore diameter ranging from 100-200  $\mu\text{m}$ . All scaffolds were highly interconnected. PLGA sheet showed spherical pores. In PLGA/p-SWNTs scaffolds an open porous architecture was detected with rough pore sidewalls and wide distribution of pores shape and size since diameters lower than 10  $\mu\text{m}$  and higher than 300  $\mu\text{m}$  have been measured. In PLGA/SWNTs-COOH the pore shape distribution was uniform since pores remain in the leached shape of the porogen salt template. Biological results showed that all PLGA/SWNT composite film and porous samples were characterized by higher cell attachment level and proliferation rate respect to PLGA samples. Scaffolds exhibit an improved *in vitro* osteoconductivity respect to films since HABDCs adhesion and proliferation was enhanced by the substrate porosity. The osteoconductivity of all samples was related to the excellent HABDCs adhesion, proliferation and mineralized matrix deposition. PLGA/SWNT scaffolds, that better simulate the bone trabecular structure, showed Ca/P value similar to hydroxyapatite. The PLGA/SWNTs-COOH porous samples guaranteed optimum biocompatibility during *in vitro* HABDCs cell attachment and growth.

The results indicated that PLGA/SWNTs-COOH scaffold might induce osteogenic maturation, probably by adsorbing more specific proteins as it has been previously reported [5,6]. The same results suggest that PLGA/SWNT 3D substrates hold great promise in specific bone tissue engineering applications.

### References

1. Lo CM, Wang HB, Dembo M, Wang YI. Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophysical Journal* 2000, 79:144.
2. Serino G, Rao W, Iezzi G, Piattelli A. Polylactide and polyglycolide sponge used in human extraction sockets: bone formation following 3 months after its application. *Clin Oral Implants Res* 2008, 19:26.
3. Shi X, Hudson JL; Spicer PP, Tour JM, Krishnamoorti R, Mikos AG. Injectable Nanocomposites of Single-Walled Carbon Nanotubes and Biodegradable Polymers for Bone Tissue Engineering. *Biomacromolecules* 2006, 7:2237.
4. Dumortier H; Lacotte S; Pastorin G; Marega R; Wu W; Bonifazi D; Bri JP; Prato M; Muller S; Bianco A. Functionalized carbon nanotubes are non-cytotoxic and preserve the functionality of primary immune cells. *Nano Letters* 2006, 6:1522.
5. Li X, Gao H, Sato Y, Akasaka T, Abe S, Feng Q, et al. Maturation of osteoblasts-like induced by carbon nanotubes. *Biomed Mater* 2009, 4:15005.
6. Bosshardt DD, Zalzal S, McKee MD, Nanci A. Developmental appearance and distribution of bone sialoprotein and osteopontin in human and rat cementum. *Anat Rec* 1998, 250:13.

## EFFECT OF SILVER NANOPARTICLES ON THE PLGA PROPERTIES

E. Fortunati<sup>1</sup>, S. Mattioli<sup>1</sup>, I. Armentano<sup>1</sup>, S. Rinaldi<sup>2</sup>, L. Latterini<sup>2</sup>, Maria Sonia Sbarra<sup>4,5</sup>, Enrica Saino<sup>4,5</sup>, Livia Visai<sup>4,5</sup>, F. Elisei<sup>2</sup>, J.M. Kenny<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Materials Engineering Center, UdR INSTM, NIPLAB, University of Perugia, Str. Pentima 4, Terni, Italy  
elena.fortunati@unipg.it

<sup>2</sup>Department of Chemistry and CEMIN, University of Perugia, Perugia – Italy

<sup>3</sup>Institute of Polymer Science and Technology, CSIC, Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid – Spain

<sup>4</sup>Biochemistry Department, Viale Taramelli 3/B, University of Pavia – Italy

<sup>5</sup>Center for Tissue Engineering (CIT), Via Ferrata, 1, University of Pavia - Italy

### Abstract

In the past several decades nanoparticles have been the focus of intense researches not only due to their novel properties, which differ greatly from the bulk materials, but also for their wide practical applications. Recently, nanoparticle polymer systems have attracted considerable interest because they exhibit enhanced electrical and mechanical properties at low loading levels.

Biodegradable polyester including poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) with various lactide/glycolide ratios is becoming an important part of tissue engineering materials [1]. However, it has poor hydrophilicity, and there are no cell recognition sites on the surface of poly(lactide-co-glycolide). Gas plasma treatment is extensively used for surface chemical modification of poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) and plasma processes have been used to increase the polyester hydrophilicity of polylactide (PLA) and to improve cell adhesion [2].

Silver (Ag) nanoparticles have found wide applications in catalysis, antimicrobials, conductive inks and electronic devices. Therefore, functional nanocomposites can be tailored by incorporating Ag nanoparticles into the polymers. Silver-ion releasing compounds and in particular silver nanoparticles, have drawn considerable interest for their capability to release silver ions in a controlled manner which in turn leads to a powerful antibacterial activity against a wide spectrum of bacteria [3,4,5].

The purpose of this study is to develop and characterize a novel biodegradable material with antibacterial properties modulated during the degradation process. Moreover the effect of oxygen plasma treatment on the surface properties of PLGA, including hydrophilicity, surface chemical composition and morphology was investigated. In-vitro degradation studies were conducted using organic solution under physiological conditions.

Using a solvent casting process, different silver nanoparticles amount was embedded in poly (DL-lactide-co-glycolide) copolymer (50:50 PLGA) and nanocomposites were prepared.

The in-vitro degradation of nanocomposites can be engineered by varying the silver content.

Wettability and morphological properties of nanocomposite surface, induced by the presence of silver nanoparticles, can directly affect the bacteria adhesion process on the nanocomposite surface. The bacteria adhesion was affected by the contact with nanocomposite, demonstrating that surface phenomena may play an important role. The results of the colony forming units (CFU) plate counting in vitro indicate that the bacterial adhesion is dependent on the silver loading and is correlated with the surface properties induced by the metal nanoparticles and by the plasma treatment. The first effect, in fact, on the PLGA/Ag surface, after an oxygen-plasma exposure time of 10 minutes at 30W, is the change of the initial pores shape and depth, while, after 20 or 30 minutes of treatment, it is possible to see distinct cavities on the surface and a good defined surface roughness. These studies suggest that PLGA properties can be modified introducing a small percentage of silver nanoparticles. By processing biopolymers with metal nanoparticles, it is possible to change matrix properties and to develop hybrid enhanced materials.

### References

1. Hasirci V, Berthiaume F, Bondre SP, et al. *Tissue Eng.*, 2001.
2. Yang J, Bei JZ, Wang SG. *Polym Adv Technol.*, 2002.
3. Evanoff, D.D. Jr., and Chumanov, G., *Chem Phys Chem.*, 2005.
4. Chen, B.; Sun, K.; *Science*, 2005.
5. Xu X., Yang Q., Wang Y., Yu H., Chen X., Jing X., E. *Polymer Journal.*, 2006.

**REDOX PROTEOMICS ANALYSIS ON SENESCENT RAT BRAIN REGIONS:  
INVOLVEMENT OF CARNOSINASE AND PROTEIN OXIDATION  
IN THE AGING PROCESS**

V. Calabrese<sup>1</sup>, M. Perluigi<sup>2</sup>, M.S. Locascio<sup>1</sup>, F. Di Domenico<sup>2</sup>, M.T. Cambria<sup>1</sup>, F. Bellia<sup>1</sup>, A. Giorgi<sup>2</sup>, M.E. Schininà<sup>2</sup>, M. Cavallaro<sup>1</sup>, C. Cornelius<sup>1</sup>, AM Giuffrida Stella<sup>1</sup> and E. Rizzarelli<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>*Department of Chemistry, Section of Biochemistry and Molecular Biology, University of Catania.*

<sup>2</sup>*Department of Biochemical Sciences, Sapienza University of Rome*

Free radical-mediated oxidative stress plays a critical role in the age-related decline of cerebral functions as a result of the oxidation of proteins, nucleic acids and lipids. Because proteins are major components of biological systems and play an important role in a variety of cellular functions such as signal transduction, mitosis, cellular transport systems and chaperone activity, an age-related increase in oxidative damage to proteins is considered one of the principal events involved in cellular impairment during aging (1). In the present study we identified, by redox proteomics analysis, oxidatively modified proteins in four brain regions generally affected by age-related neurodegeneration, i.e., hippocampus, cortex, cerebellum and striatum. Senescent (28 months old) rats in comparison with adult (12 months old) rats, exhibited higher levels of protein oxidation, particularly for bioenergetic proteins involved in energy transduction processes such as pyruvate kinase, ATP synthase, aldolase, creatine kinase and alpha-enolase. The oxidative modification of these enzymes likely lead to their inactivation. Interestingly, expression of carnosinase 1 (CN1), Hsp72, heme oxygenase-1 and thioredoxin reductase increased during aging with a maximum induction observed in hippocampus and substantia nigra, followed by cerebellum, cortex, septum and striatum. Hsps induction was associated with significant changes in total SH groups as well as glutathione (GSH) redox state, carbonyls and HNE levels. These results are in line with current notion that free radical-induced oxidative stress and cellular damage are characteristic hallmarks of the aging process and sustain the critical role of cellular stress response mechanisms as possible targets for novel antiaging strategies (2,5).

***Bibliography:***

- (1) Stadtman ER and Berlett BS, *Chem Res Toxicol* 1997, 10(5), pp 485-494.
- (2) Calabrese V., Cornelius C., Mancuso C., Ientile R., Giuffrida Stella A.M., Butterfield D.A. (2008) Redox Homeostasis and Cellular Stress Response in Aging and Neurodegeneration. In: *Free Radical and Antioxidant Protocols (2nd Edition)*, Uppu, R.M.; Murthy, S.N.; Pryor, W.A.; Parinandi, N.L. (Eds.), Humana Press, LA, USA.
- (3) Calabrese V., Cornelius C., Mancuso C., Pennisi G., Calafato S., Bellia F., Bates T.E, Giuffrida Stella A.M., Schapira T., Dinkova Kostova A.T., Rizzarelli E. (2008) Cellular Stress Response: A Novel Target for Chemoprevention and Nutritional Neuroprotection in Aging, Neurodegenerative Disorders and Longevity. *Neurochem. Res.* 33, 2444-2471.
- (4) Calabrese V., Cornelius C., Mancuso C., Barone E., Calafato S., Bates T., Rizzarelli E., Dinkova Kostova A. (2009) Vitagenes, dietary antioxidants and neuroprotection in neurodegenerative diseases. *Frontiers in Bioscience* 14, 376-397.
- (5) Calabrese V., Mancuso C., Calvani M., Rizzarelli E., Butterfield D.A., Giuffrida Stella A.M. (2007) Nitric Oxide in the CNS: Neuroprotection versus Neurotoxicity. *Nature Neuroscience* 8, 766-775.

## BIOREMEDIATION OF WATERS POLLUTED BY ENDOCRINE DISRUPTORS

C. Menale<sup>1</sup>, C. Nicolucci<sup>1,2</sup>, L. Caputo<sup>1,2</sup>, S. Rossi<sup>1</sup>, U. Bencivenga<sup>1</sup>, D.G. Mita<sup>1,2,3</sup>, N. Diano<sup>1,2,3</sup>.

<sup>1</sup> Institute of Genetics and Biophysics, CNR, Via Pietro Castellino, 111-80131, Naples, Italy

<sup>2</sup> National Institute of Biosystems and Biostructures (INBB), Via le Medaglie d'Oro, 305, 00136 Rome, Italy

<sup>3</sup> Department of Experimental Medicine, Second University of Naples, Via S. M. di Costantinopoli 16, 80138 Naples, Italy

Many chemical pollutants, known as endocrine disrupting chemicals (EDCs), owing to their ability in interfering with the endocrine system, have become increasingly abundant in raw wastewaters from different industries, such as polymeric resin production, oil refining, and coking plants. When adsorbed by the living systems, humans or wild life, they cause adverse effects spanning from disturbances on the reproductive organs to cancer. For this reason the EDCs concentration in the environmental, and in the waters in particular, must be decreased.

Treatments of wastewaters are usually conducted by conventional methods, either physical or chemical, such as ion exchange, reverse osmosis, UV irradiation. However, these treatments are complex and expensive. This situation is triggering for the development of new technologies, such as the application of bioremediation processes, using biological systems (bacteria, fungi or enzymes) capable of metabolizing or degrading the contaminants.

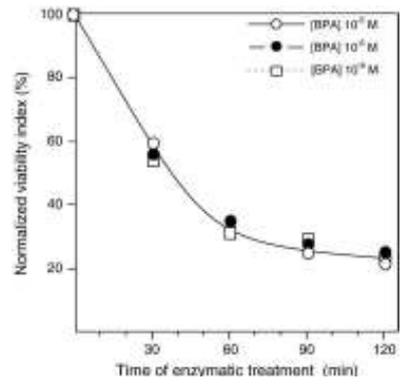
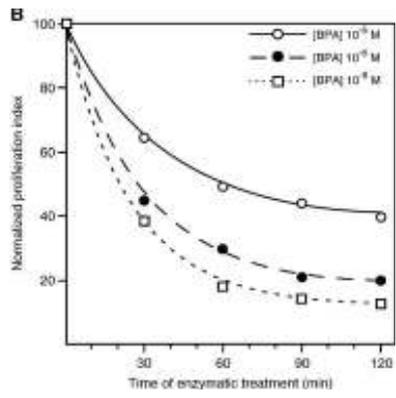
To reduce the EDCs pollution in waters we have proposed the employment of continuous biodegradation processes in non-isothermal bioreactors. Bisphenol A (BPA) was chosen as model of EDCs. As biological element we used immobilized polyphenoloxidases, laccase or tyrosinase. Each catalytic system was biophysically and biochemically characterized by determining the kinetic parameters, the pH and temperature profile, as well as the time stability.

The kinetic parameters relative to the experiments are listed in Table 1. Data in Table 1 show that the  $K_m$  values under non-isothermal conditions are lower than those of the corresponding isothermal condition. This result indicates that the non-isothermal conditions increase the apparent affinity of immobilized enzymes for BPA. Under non-isothermal conditions the laccase is more efficient than tyrosinase in degrading BPA.

To assess *in vitro* the occurred bioremediation, the proliferation and viability indexes of MCF-7 cells incubated in the presence of aqueous solutions of BPA, or of enzyme-treated BPA solutions, have been measured as a function of the initial BPA concentration. In this manner, we demonstrated also that the metabolites of the enzyme reaction were less estrogenic than the original pollutant.

Table 1

$T_{av}$ (°C)	$\Delta T$ (°C)	<i>laccase</i>		<i>tyrosinase</i>	
		$K_m$ (mM)	$V_{max}$ ( $\mu\text{moles min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ )	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ ( $\mu\text{moles min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ )
20	0	1.20	0.0057	0.323	0.476
	10	0.41	0.0067	0.223	0.500
	20	0.40	0.0083	0.222	0.550
	30	0.39	0.0096	0.225	0.600



## DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY: 3D STUDIES OF HUMAN CD133+ STEM CELL MUSCLE HOMING BY HIGH-RESOLUTION X-RAY MICROTOMOGRAPHY

K.Marozzi<sup>1</sup>, F.Fiori<sup>1,2</sup>, A.Giuliani<sup>1</sup>, A.Manescu<sup>1</sup>, F.Rustichelli<sup>1,2</sup>, A.Farini<sup>3</sup>, C.Villa<sup>3</sup> and Y.Torrente<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department SAIFET – Section of Physical Sciences, Polytechnic University of Marche, Via Brecce Bianche 1, 60131 Ancona, Italy

<sup>2</sup>INBB – Istituto Nazionale Biostrutture e Biosistemi, Italy

<sup>3</sup> Fondazione IRCCS Ospedale Policlinico di Milano and University of Milan, Department of Neurological Sciences (Centro “Dino Ferrari”) - Stem Cell Laboratory, Via Francesco Sforza 35, 20122 Milan, Italy

Attempts to repair muscle damage in Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) by transplanting myogenic progenitors directly into muscles are hampered by limited cell survival and the limited migration of donor cells in the muscles. Recent work supports the idea that stem cells can reach the site of muscle regeneration through systemic routes and thus contribute to muscle repair more efficiently than canonical myogenic progenitors [1,2]. A subpopulation of human circulating stem cells expressing the CD133+ antigen that can participate in muscle regeneration, and also replenish the satellite cell compartment in the injected dystrophic muscles, was recently identified at some of the authors' laboratory. CD133+ cells caused a significant regeneration of skeletal muscle structure and function when delivered intra-arterially to skeletal muscle tissues of scid-mdx mice [1]. The possibility of a 3D visualization of donor cells inside transplanted tissues, with a resolution at the micron scale, is of crucial importance. To this end, we used X-ray computed microtomography (micro-CT), which offers the unique possibility of monitoring the kinetics of the human CD133+ stem cell homing from the blood stream inside the muscle tissue.

We present the results of some micro-CT experiments, carried out at the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) in Grenoble, France. The CD133+ stem cells, previously labeled with iron oxide nanoparticles (Endorem®), were injected in dystrophic mice by intra-arterial transplantation. The 3D distribution of the cells inside the skeletal muscle was determined both directly on the living mice [3] and in *ex-vivo* biopsies [4]. In particular, the *in-vivo* experiment allowed to determine the time evolution of the stem cell muscle homing process while the *ex-vivo* experiment allowed to achieve a quantification of the number of cells that are able to migrate from the blood stream inside the muscle tissue.

### References

- [1] Torrente, Y. et al., *Human circulating AC133+ stem cells replenish the satellite cell pool, restore dystrophin expression and ameliorate function upon transplantation in murine dystrophic skeletal muscle*, J. Clin. Invest. 114 (2004) 182–195.
- [2] Sampaolesi, M., Torrente, Y., Innocenzi, A., Tonlorenzi, R., D'Antona, G., Pellegrino, M.A., Barresi, R., Bresolin, N., Gusella De Angelis, M.G., Campbell, K.P., Bottinelli, R. and Cossu, G. *Cell therapy of alpha-sarcoglycan null dystrophic mice through intra-arterial delivery of mesangioblasts*, Science 301 (2003) 487–492.
- [3] Farini, A., Fiori, F., Giuliani, A., Manescu, A., Rustichelli, F., Torrente, Y., Villa, C., to be published.
- [4] Torrente, Y., Belicchi, M., Gavina, M., Fiori, F., Komlev, V., Rustichelli, F., *High-resolution X-ray microtomography for three-dimensional visualization of human stem cell muscle homing*, FEBS Letters 580 (24) (2006) 5759-5764.

## ADENOSINE A<sub>2A</sub> RECEPTOR ANTAGONISM IS PROTECTIVE IN *IN VIVO* MODEL OF FOCAL CEREBRAL ISCHEMIA

Alessia Melani

*Department of Preclinical and Clinical Pharmacology, University of Florence, Florence, Italy;*

*E-mail: alessia.melani@unifi.it*

Adenosine is a potent biological mediator whose concentration increases dramatically following brain ischemia (Melani et al. *Stroke* 30: 2448-2455, 1999). In the extracellular space, during ischemia, adenosine is in a concentration range ( $\mu\text{M}$ ) that stimulates all four adenosine receptor subtypes (A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> and A<sub>3</sub>). The protective role of adenosine A<sub>1</sub> receptors is well accepted during cerebral ischemia. However the use of selective A<sub>1</sub> agonists is hampered by unwanted peripheral effects and attention has been focused on A<sub>2A</sub> receptors. In recent years, evidence has indicated that the A<sub>2A</sub> receptor subtype is of critical importance in stroke (Chen and Pedata *Curr Pharm Des.* 14(15), 1490-9, 2008). Genetic deletion of A<sub>2A</sub> receptors reduces ischemic and functional damage in a mouse model where focal ischemia is induced by middle cerebral artery occlusion (MCAo) (Chen et al. *J Neurosci.* 19(21), 9192-200, 1999). The mechanisms by which A<sub>2A</sub> receptors are noxious during cerebral ischemia still remain elusive. Adenosine A<sub>2A</sub> receptor expression increases on neurons and microglial cells of striatum and cortex after focal ischemia induced by MCAo (Trincavelli et al. *J. Neurochem.* 104, 479-90, 2008). In the same model of MCAo, the selective A<sub>2A</sub> antagonist, 7-(2-phenylethyl)-5-amino-2-(2-furyl)-pyrazole-[4,3-*e*]-1,2,4-triazolo[1,5-*c*] pyrimidine (SCH58261) (subchronically administered 0.01 mg/kg i.p, 5 min, 6 and 20 h after MCAo) protects from neurological deficit and cortical and striatal damage evaluated 24 h after ischemia (Melani et al. *Brain Res.* 959, 243-50, 2003). In the first hour after MCAo, SCH58261 reduces glutamate outflow (Melani et al. *Brain Res.* 959, 243-50, 2003), and 24 h thereafter, significantly reduces activation of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) in microglial cells (Melani et al. *Brain Res.* 1073, 470-80, 2006) within ischemic striatum. MAPKs are essential in regulating cell growth, survival, differentiation and death. Results indicate that A<sub>2A</sub> receptor antagonism mediates neuroprotective effects by reducing excitotoxicity in the first hours after ischemia and thereafter reducing p38 pro-inflammatory pathways. Moreover our studies have highlight, 24 after MCAo, an increase of JNK MAPK activation in oligodendrocytes within the white matter fascicula of the ventral caudate-putamen and of ERK1/2 MAPK activation mostly in microglia within the ischemic striatum. SCH58261, subchronically administered, did not affect ERK1/2 activation pathway but reduces JNK activation in oligodendrocytes in the ischemic striatum and brings about protection against myelin disorganization (Melani et al. *Brain* 132(Pt 6), 1480-95, 2009). Since activation of JNK is involved in oligodendrocyte death, the A<sub>2A</sub> antagonist, by reducing JNK activation, may improve tissue myelination. A<sub>2A</sub> receptor antagonists may represent an important therapeutic tool when administered after brain ischemia.

**POLYADP)RIBOSYLATION AND COLD TOLERANCE  
IN *CISTUS INCANTUS L.* PLANTS**

Mistretta Carmela , Natale E., Arena C., Faraone-Mennella M.R., De Maio A..

*Dipartimento di Biologia Strutturale e Funzionale, Università "FedericoII", Napoli e-mail: andemaio@unina.it*

In this study we have focused our attention on *Cistus incanus L.*, one of the most common evergreen species of Southern Italy Mediterranean maquis.

Plant of Mediterranean-type ecosystems are subjected during the year at two stressful environmental conditions: cold winter and summer drought characterized respectively by low temperatures and high temperatures and elevated irradiances. The evergreen species are very interesting to study because the adaptation of plants to this particular environment implicates the occurrence of biochemical, structural, and eco-physiological mechanisms to face environmental constraints without to run into serious tissues damages. Recently, many researchers provided evidences for a role of plant PARP in energy homeostasis and stress tolerance ( De Block M. et al. (2005), *Plant Journal* 41:95). Strong stresses induce poly(ADP-ribosyl)ation-activity, causing NAD<sup>+</sup> breakdown enhancing mitochondrial respiration. By reducing stress-induced poly(ADP-ribosyl)ation-activity NAD<sup>+</sup> breakdown is inhibited preventing high energy consumption (De Block M. et al. (2005), *Plant Journal* 41:95). Under these conditions, plants preserve their energy homeostasis without an overactivation of the mitochondrial respiration, thus avoiding the production of reactive oxygen species. Therefore, plants with lowered poly(ADP-ribosyl)ation activity appear tolerant to multiple stresses (Van breusegem F., Dat J.F. (2006) *Plant Physiol.* 141: 384).

The aim of this work was to study the synthesis and degradation of polyADPribose, regulated by sequential polyADPR)polimerase (PARP) and polyADPglicohydrolase (PARG) activities respectively. Therefore, from comparing biochemical and eco-physiological responses we also hypothesized a possible role of polyADPriboseylation in *Cystus incanus L.* plants grown in greenhouse (GH), outdoor in winter (WO) and outdoor in spring (SO).

Our results demonstrate that the energy homeostasis and cold acclimatation of *Cistus* depend on PARP activity reduction, consequent to photochemical apparatus efficiency decline. The combination of both events promotes plant survival.

## ELECTROSPUN MICROFIBROUS POLY(STYRENE-ALT-MALEIC ANHYDRIDE)/POLY(STYRENE-CO-MALEIC ANHYDRIDE) MEMBRANES FOR BIOREMEDIATION OF WATERS POLLUTED BY BPA

C. Nicolucci<sup>1,2</sup>, O. Stoilova<sup>3</sup>, M. Ignatova<sup>3</sup>, N. Manolova<sup>3</sup>, I. Rashkov<sup>3</sup>, D.G. Mita<sup>1,2,4</sup>, N. Diano<sup>1,2,4</sup>.

<sup>1</sup> National Institute of Biosystems and Biostructures (INBB), Via le Medaglie d'Oro, 305, 00136 Rome, Italy

<sup>2</sup> Institute of Genetics and Biophysics, CNR, Via Pietro Castellino, 111-80131, Naples, Italy

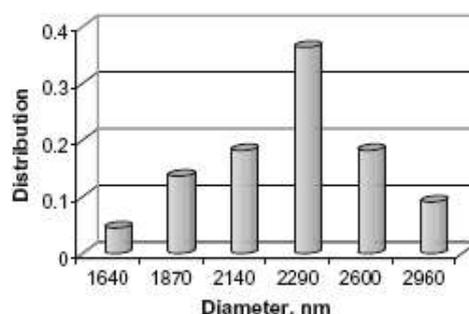
<sup>3</sup> Laboratory of Bioactive Polymers, Institute of Polymers, Bulgarian Academy of Sciences, Acad. G. Bonchev Str 103A, 1113 Sofia, Bulgaria

<sup>4</sup> Department of Experimental Medicine, Second University of Naples, Via S. M. di Costantinopoli 16, 80138 Naples, Italy

The bioremediation of waters polluted by Endocrine Disruptors (ED) has taken particular interest because of the adverse effects that these compounds have on human health. Several phenolic compounds are classified as ED, including 2,2-bis-(4-hydroxyphenyl)-propane, known as Bisphenol A (BPA), which is widely used for the production of polycarbonate plastics and epoxy resins. We evaluated the biodegradation of BPA in aqueous solutions, using the enzyme laccase from *Trametes versicolor* covalently immobilized on polymer nanofibers (Figure 1) of styrene/maleic anhydride (P-St-MA), obtained by electrospinning.



Figure 1



Electrospinning is a technique that allows producing continuous polymer fibers with diameters below the micron. The presence of surface pores makes the electrospun fibres suitable for the immobilization of enzymes in that it is possible to bind large amounts of protein per unit of mass of fibrous material (about 40 mg/g of material).

Once prepared in form of circular membranes, the catalytic polymeric nanofibers were housed on mesh discs and used as filling of a tubular reactor (Figure 2) through which the aqueous polluted solution was circulated. The results showed that processing an aqueous solution polluted by BPA 1mM, the initial concentration was reduced by 60% after 90 min. The catalytic activity of the catalytic membranes remained stable for about 30 reuses. Moreover, as expected, the activity of laccase immobilized on the nanofibers of P-St-MA showed a greater stability to pH and temperature extremes than the free enzyme. Also the dependence of the yield of the catalytic process on the circulation rate has been evaluated.

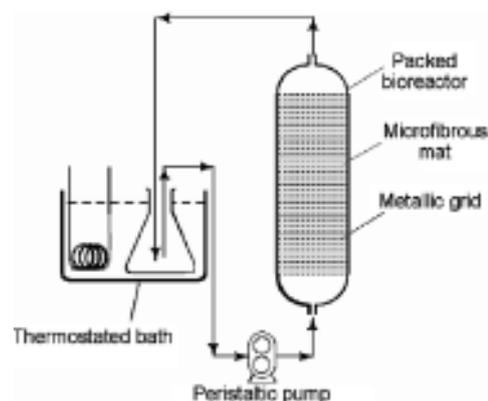


Figure 2

## IL TESSUTO ADIPOSO: UNA FONTE ALTERNATIVA DI CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI PER LA TERAPIA CARDIOVASCOLARE

E. Olivi, V. Vaccari, R. Tassinari, S. Cantoni, F. Bianchi, I. Frascari, F. Bonavita, C. Cavallini, C. Ventura.

*Laboratorio di Biologia Molecolare e Ingegneria delle Cellule Staminali-INBB. Università di Bologna.*

### **Introduzione**

In ambito cardiovascolare, la medicina rigenerativa si propone, tramite terapia cellulare con cellule staminali volta a sostituire tessuto cardiaco danneggiato e migliorare la vascolarizzazione dell'area colpita, di offrire in futuro una valida alternativa agli odierni trattamenti per quelle patologie, quali ad esempio l'infarto del miocardio, il cui decorso determina una diminuzione della funzionalità del cuore che sfocia in scompenso cardiaco. Attualmente infatti, per queste malattie, l'unica terapia a lungo termine è il trapianto di cuore che, purtroppo, non rappresenta una soluzione per tutti i pazienti sia per la scarsità di organi a disposizione, sia per i rischi legati ad un'operazione così complessa e alla possibilità di rigetto.

Le cellule staminali mesenchimali umane (hMSCs) hanno avuto, negli ultimi anni, un utilizzo sempre più ampio in medicina rigenerativa. Finora il midollo osseo è stato la fonte principale di hMSCs, ma il suo utilizzo presenta diversi problemi in quanto la presenza di hMSCs nel midollo osseo dell'uomo adulto è relativamente bassa, il numero di cellule staminali e la capacità di differenziamento diminuiscono significativamente con l'aumentare dell'età dell'individuo e, infine, il metodo di raccolta prevede una procedura invasiva e dolorosa. Da qui la necessità di trovare fonti alternative da cui isolare hMSCs.

La cellula staminale ideale per l'utilizzo in applicazioni di medicina rigenerativa dovrebbe soddisfare i seguenti criteri: (i) essere presente in grandi quantità; (ii) poter essere raccolta con una procedura il meno invasiva possibile; (iii) poter differenziare in *lineage* cellulari multipli in maniera regolabile e riproducibile.

Negli ultimi anni è stato scoperto che il tessuto adiposo possiede una popolazione di cellule staminali multi-potenti a cui noi assegniamo il nome di "cellule staminali mesenchimali umane derivate da tessuto adiposo" (ADhMSCs) e che riteniamo possano presentare una valida alternativa alle hMSCs di derivazione midollare.

L'obiettivo di questo studio, una volta stabilita la natura mesenchimale delle ADhMSCs, è quello di valutare la risposta di questa tipologia cellulare all'HBR (un estere misto dell'acido ialuronico con acido butirrico e retinoico). Questa molecola ha mostrato in nostri studi precedenti, infatti, di promuovere il differenziamento di FMhMSCs (hMSCs derivate da membrane fetali di placenta a termine) in elementi cardiovascolari in grado di migliorare la funzionalità ventricolare in ratti sottoposti ad infarto sperimentale.

### **Metodi**

Le ADhMSCs sono state isolate da lipoaspirati, caratterizzate e trattate con HBR. L'espressione di geni cardiaci (GATA-4) ed endoteliali (VEGF e KDR) è stata analizzata con Real Time PCR. È stata valutata, tramite immunofluorescenza, la presenza sia di marker cardiaci (actinina  $\alpha$ -sarcomerica e connessina-43) che endoteliali (fattore von Willebrand – vWF – e CD31). La capacità delle cellule trattate di formare strutture capillari-simili è stata determinata mediante test su Matrigel. La secrezione di citochine angiogeniche è stata ricercata attraverso una analisi multipanel con metodica Luminex.

### **Risultati**

HBR svolge un'azione di riprogrammazione genica determinando un aumento consistente della trascrizione dei geni cardiaci ed endoteliali. A supporto di questi dati, l'analisi con immunofluorescenza mostra la presenza di marker cardiaci o endoteliali nelle cellule trattate. Inoltre, il test su Matrigel ha dimostrato che le cellule trattate sono in grado di formare strutture capillari-simili. Questa molecola induce anche la secrezione di fattori angiogenici da parte delle ADhMSCs.

### **Conclusioni**

Le ADhMSCs hanno dimostrato di possedere plasticità e caratteristiche antigeniche proprie delle classiche hMSCs. Hanno risposto al trattamento con HBR con la formazione di cellule *cardiac* o *endothelial like* e con la secrezione di fattori angiogenici. Sono quindi delle candidate ideali per un utilizzo in una futura terapia cellulare autologa di riparazione del danno cardiovascolare nell'uomo. Inoltre, molecole a logica differenziativa, quali HBR, possono fornire nuove conoscenze nella biologia delle cellule staminali e aprire la strada a nuovi approcci nelle tecniche di riparazione del danno cardiovascolare: orientare la sorte di una cellula staminale a livello dell'espressione genica rappresenta, infatti, un approccio terapeutico di grande potenzialità in quanto fornisce una resa elevata di cellule indirizzate verso il *lineage* cardiovascolare e induce la secrezione paracrina di fattori trofici, essenziali per stimolare un processo fisiologico di riparazione del danno che coadiuvi l'azione diretta delle cellule stesse.

## NEW FEATURES IN THE BIOCHEMISTRY AND STRUCTURE OF PARP-LIKE SULFOLOBAL THERMOZYME

Porzio E.<sup>1</sup>, De Maio A.<sup>1</sup>, Romano I.<sup>2</sup>, Nicolaus B.<sup>2</sup>, Faraone-Mennella M.R.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Dipartimento di Biologia Strutturale e Funzionale, Università "FedericoII", Napoli

<sup>2</sup>CNR, Pozzuoli

e-mail: faraone@unina.it

*Sulfolobus solfataricus* is an archeon isolated from an acidic hot spring in Agnano (Naples, Italy), where it lives optimally at 87°C and pH 3.5.

In this microorganism a poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)-like thermoprotein (PARPSso), that differs from PARP-1 (116kDa), for molecular mass (46.5kDa), a lower isoelectric point (pH 7.0-7.2) and high thermophily (80°C) was found [1].

The thermozyyme cleaves  $\beta$ -NAD<sup>+</sup> to synthesize short ADP-ribose oligomers (4-5 units) and cross-reacts with both polyclonal anti-PARP-1 catalytic site and anti-poly(ADP-ribose) polymerase antibodies, but not with anti-DNA-binding PARP-1-N-terminus antibodies [1].

As eucaryotic PARP-1, PARPSso is activated by and binds DNA with high affinity and non-specifically [2], modifies itself (automodification) and a 7kDa protein that binds and condenses archaeal DNA (heteromodification) [3].

Although the PARPSso has been characterized biochemically, in all genome of *S. solfataricus* (strain P2) no gene sequence has been found, corresponding either to PARP-1 or to the sulfolobal protein [4]. Although biochemically similar to PARP 1, its partial amino acid sequence overlaps those of DING proteins [5,6]. This group of proteins, widely occurring in animals, plants and eubacteria, shows a characteristic and highly conserved N-terminus, DINGGGATL. [6] In the light of these findings structural data (PARPSso is similar to a DING protein) seem to be in contrast with biochemical results (PARPSso is a PARP-like enzyme).

The present research was addressed to study any common behaviour of PARPSso and bacterial DING proteins.

### References

[1] Faraone-Mennella M.R., Gambacorta A., Nicolaus B., Farina B. Purification and biochemical characterization of a poly(ADP-ribose) polymerase-like enzyme from the thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. Biochem. J. 335, 441-447(1998)

[2] Faraone-Mennella M.R., De Luca P., Giordano A., Gambacorta A., Nicolaus B., Farina B. High stability binding of poly(ADPribose) polymerase-like thermozyyme from *S. solfataricus* with circular DNA. J.Cell. Biochem. 85(1), 158-166 (2002)

[3] Faraone-Mennella M.R., Farina B. In the thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* a DNA-binding protein is in vitro (Adpribosyl)ated. Biochem. Biophys. Res Commun 208(1), 55-62 (1995),

[4] Charleboisa R., Gaasterlandc T., Ragane M.A., Doolittlef W.F., Sensen C.W. The Sulfolobus solfataricus P2 genome project. Febs Lett. 389, 88-91 (1996).

[5] Di Maro A., De Maio A., Castellano S., Parente A., Farina B., Faraone-Mennella M.R. The ADP-ribosylating thermozyyme from *Sulfolobus solfataricus* is a DING protein. Biol Chem. 390(1), 27-30 (2009)

[6] Berna A., Scott K., Chabriere E., Bernier F.. The DING family of proteins: ubiquitous in eukaryotes, but where are the genes? BioEssay , 31, 570-580 (2009)

## 3D STUDY OF VILLOUS VASCULAR TREE IN HUMAN PLACENTAS AFFECTED BY PREECLAMPSIA USING PHASE CONTRAST X-RAY MICROTOMOGRAPHY

C. Renghini<sup>1,2</sup>, D. Marzioni<sup>3</sup>, A. Giuliani<sup>1</sup>, K. Marozzi<sup>1</sup>, F. Fiori<sup>1,2</sup>, M. Castellucci<sup>3</sup> and F. Rustichelli<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Department SAIFET – Section of Physical Sciences, Polytechnic University of Marche, Via Brezze Bianche 1, 60131 Ancona, Italy*

<sup>2</sup>*INBB – Istituto Nazionale Biostrutture e Biosistemi, Medaglie d'Oro 305, 00136 Roma, Italy*

<sup>3</sup>*Department of Molecular Pathology and Innovative Therapies, Polytechnic University of Marche, via Tronto 10/a, 60020 Torrette di Ancona, Italy*

Preeclampsia (PE) is a heterogeneous disorder of pregnancies still leading to maternal and perinatal mortality and morbidity as well as preterm birth [1]. The cause of PE is a matter of debate, but recent studies suggest that the primary fetoplacental lesions are sufficient to initiate the disease. An ischemic placenta with a high-resistance vasculature, which cannot deliver an adequate blood supply to the fetoplacental unit was described [2]. When intrauterine growth restriction (IUGR) is observed in PE, it is associated with a decrease in umbilical blood flow [3]. Absence of end diastolic velocities (AED) in the umbilical arteries reflects severe fetoplacental vascularisation disturbance [3].

In this study we supplied a three-dimensional (3D) definition of the placental villous vascular tree of PE and PE with IUGR placentas to define, once and for all, the different vasculature lesions detectable in these two gestational pathologies and to open new perspectives concerning possible therapeutical implications. These structures have been identified by Phase Contrast X-ray Microtomography. The data has been treated by the Modified version of the Bronnikov's Algorithm (MBA) [4-5].

Traditional histology provides unique insight into tissue morphology, but fails in revealing the spatial organization of the microscopical structures, unless a tedious and time-, resource-, and energy-consuming sectioning and histological analysis of the all samples is performed. In addition, histology and image processing inherently result in small, local tissue artifacts that can introduce errors in the determination of microscopic tissue structure. On the contrary, this innovative technique is a promising powerful tool to investigate angio- and microvasculogenesis in advanced biomedical research areas with no need of contrast agents.

The 3D images obtained by using MBA method in control placentas and in placentas affected by preeclampsia with or without intrauterine growth restriction represent a very innovative progress in the understanding the different placental villous vascular tree development. In addition, 3D images give new insights into the mechanisms leading to abnormal placental hemodynamics in PE with IUGR patients and open new perspectives to study these pathologies.

### References

- [1] Mütze S. et al., *L Perinat Med*, 2008, 36, 38-58.
- [2] Baumwell S, Karumanchi SA. *Nephron Clin Pract*, 2007, 106, 72-81.
- [3] Todros T., Sciarrone A., Piccoli E., Guiot C. et al., *Obstet Gynecol*, 1999, 93, 499-503.
- [4] Groso A., Stampanoni M., Abela R., Schneider P., Linga S., and Müller R., *Appl. Phys. Lett.*, 2006, 88, 214104.
- [5] Groso A., Abela R., Stampanoni M., *Optics Express*, 2006, 14(18), 8103-8110.

## **A MUTATION IN GFER GENE DISCLOSES THE INVOLVEMENT OF THE MITOCHONDRIAL DISULFIDE RELAY SYSTEM IN HUMAN MITOCHONDRIAL DISORDERS AND NEURODEGENERATION**

D. Ronchi, A. Di Fonzo, T. Lodi, E. Fassone, M. Tigano, C. Lamperti, S. Corti, A. Bordoni, F. Fortunato, M. Nizzardo, L. Napoli, C. Donadoni, S. Salani, M. Moggio, N. Bresolin, I. Ferrero, G.P. Comi

*University of Milan (Milan, IT); University of Parma (Parma, IT)*

A disulfide relay system (DRS) has been recently identified in the yeast intermembrane mitochondrial space (IMS) and consists of two essential components: the sulfhydryl oxidase Erv1 and the redox-regulated import receptor Mia40. The DRS drives the import of several cysteine-rich proteins into IMS by an oxidative folding mechanism. Erv1p is reoxidized within this system, transferring its electrons onto molecular oxygen via interaction with cytochrome c and Cytochrome c Oxidase (CcO), thereby linking the DRS to respiratory chain activity.

The role of the human homologue of Erv1, named GFER, in DRS has been poorly explored.

We investigated a Moroccan pedigree where three of five children, born from consanguineous parents, presented a progressive mitochondrial myopathy with congenital cataract. Magnetic resonance imaging showed a thin corpus callosum.

Through a family-based approach we discovered that an homozygous mutation in the GFER gene is the molecular cause of this phenotype. The consequence of the mutation at the patients' muscle and fibroblast levels are: 1) a reduction of multiple respiratory chain complexes activity, partially rescued by overexpressing the wild-type protein; 2) a reduction in mitochondria isolated from proband's primary fibroblasts of human cysteine-rich proteins, known to be imported through the DRS in yeast; 3) an abnormal mitochondrial ultrastructural morphology, with enlargement of the IMS space; 4) defective mtDNA maintenance, with accelerated time-dependent accumulation of multiple mtDNA deletions in muscle. The *Saccharomyces cerevisiae* erv1R182H mutant strain reproduced the CcO activity defect and showed genetic instability of mtDNA and mitochondrial morphological defects.

Mitochondrial dysfunction has long been implicated in neurodegenerative disorders. In recent years the role of Cu,Zn superoxide dismutase (SOD1) and Parkinson protein 7 (DJ1) inside IMS has been investigated. In particular, the regulation of mitochondrial localization, based upon DRS, has resulted impaired in SOD1 bearing mutations associated with amyotrophic lateral sclerosis. Moreover IMS contains several pro-apoptotic proteins which trigger programmed cell death if released into the cytosol.

Our findings, shedding light on a novel mechanism of mitochondrial disease, establish for the first time the role of ERV1 homologue in the human DRS. Further studies of IMS proteins and the process underlying their mitochondrial import will improve our comprehension of several human disorders, including neurodegeneration.

## ROLE OF CLUSTERIN AS POSSIBLE MEDIATOR OF ANTI-TUMOR ACTIVITY OF POLYPHENON E FOR PROSTATE CANCER CELLS.

Alessandro Silva<sup>1</sup>, Federica Rizzi<sup>1</sup>, Dumitrita Olivia Rugina<sup>2</sup>, Mariangela Coletta<sup>1</sup>, Saverio Bettuzzi<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Università di Parma, Dipartimento di Medicina Sperimentale, Parma, e Istituto Nazionale Biosistemi e Biostrutture, Roma.

<sup>2</sup>University of agricultural Sciences and Veterinary Medicine, Biochemistry, Bucharest, Romania.

**Background:** The results of numerous epidemiologic and preclinical studies indicate that green tea consumption has been linked to cancer-preventive action in a variety of tissues. Polyphenolic catechins are the active agents in green tea. We found that administration of green tea catechin extracts (GTEs) was effective at inhibiting prostate cancer progression in a selected population of patients bearing High Grade Prostate Intraepithelial Neoplasia (HGPIN)<sup>1</sup>.

Dis-regulation of proteins expression occurs in many cancer types, including prostate cancer. It is well known that Clusterin (CLU) expression upregulation and/or nuclear localization of CLU (nCLU) is associated to induction of apoptosis in prostate cancer cells<sup>2-4</sup>.

Green tea, or its constituent compounds, inhibits tumor formation through a variety of mechanisms. The well-described antioxidant properties, the inhibition of angiogenesis and stimulation of apoptosis may contribute to the antiproliferative and pro-apoptotic capacity of green tea<sup>5,6</sup>. Polyphenon E (PolyE), for example, is a green tea-derived catechin extract found safe for human<sup>7</sup>.

**Objective:** The aim of this study is to assess whether GTEs administration (as PolyE) would affect CLU expression in responsive cells. This finding would provide a possible mechanism for anti-cancer effect of GTEs.

**Methods:** The SV-40 immortalized human prostate epithelial cells PNT1a and prostate cancer cells PC-3 were used. The IC<sub>50</sub> dose of PolyE has been determined and both cell lines were treated for 24-48 hours. CLU protein has been detected by Western Blot and immunocytochemistry. Apoptosis induction and cell cycle progression were studied by FACS and Western Blot. Caspase-3 activity has been also measured.

**Results:** In PNT1a cells PolyE causes G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> cell cycle arrest and cell morphology alteration, inducing cell death by an unknown caspase-3 independent mechanism. A weak increase in CLU cytoplasmic and nuclear staining was observed while PCNA protein expression undergoes an initial increase and then decreases after 24 hours for treatment. The PARP1 expression remains unchanged except for a decrease to 12 hours. The cleaved form appears to 24h. After the treatment, the PNT1a cells show a progressive cytoplasmic CLU precursor storing.

PC-3 cells treated with PolyE show an increase in caspase-3-independent cell death. Cells remained attached to surface showing drastic morphological changes. At 24h treatment a CLU specific staining localized at perinuclear and plasmalemma level has been detected. PCNA protein levels slightly decrease, consistently with inhibition of cell proliferation. Interestingly, expression of each clusterin proteic forms (secreted, cytoplasmic and nuclear) undergoes a significant decrease.

**Conclusions:** PolyE inhibits the growth of transformed prostate cells inducing caspase-3-independent cell death. Translocation of CLU to the nucleus was observed under these conditions. Thus, PolyE may act as anti-cancer agent by altering CLU sub-cellular localization and promoting accumulation of pro-death nuclear CLU. On the basis of these results, PolyE may be a useful drug in a chemopreventive protocol for subjects at high risk for prostate cancer.

### References

1. Bettuzzi S. et al. *Cancer Research*, 66, 1234-13330, 2001
2. Caccamo AE et al. *Ann NY Acad Sci.*, 1010, 514-519, 2003
3. Caccamo AE. et al. *Biochemical Journal*, 382, 157-168, 2004
4. Caccamo AE. et al. *Cell Death and Differentiation*, 12, 101-104, 2005
5. Liao J et al. *Nutr Cancer.*, 48(1): 44-53, 2004
6. Ahmad N et al. *J Natl Cancer Inst.*, 89 (24):1881-6, 1997
7. Stockfleth E. et al. *Br J Dermatol.*, 158 (6), 1329-1338, 2008

## LYSOSOMAL ENZYMES IN ALZHEIMER DISEASES AND TYPE 2 DIABETES MELLITUS PATIENTS

Tiribuzi R.<sup>1</sup>, Orlacchio An.<sup>2,3</sup>, Tortori A.<sup>1</sup>, Crispoltoni L.<sup>1</sup>, D'Angelo F.<sup>1</sup>, di Girolamo I.<sup>1</sup>, Datti A.<sup>1</sup>, Maiotti M.<sup>4</sup>, De Angelis M.<sup>5</sup>, Bernardi G.<sup>2,3</sup>, Mecocci P.<sup>6</sup>, Zampolini M.<sup>4</sup>, Santeusano F.<sup>5</sup>, Martino S.<sup>1</sup> and Orlacchio A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Dipartimento di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche, Sezione di Biochimica e Biologia Molecolare, Università degli Studi di Perugia;* <sup>2</sup> *Laboratorio di Neurogenetica, CERC-IRCCS Santa Lucia, Roma;* <sup>3</sup> *Dipartimento di Neuroscienze, Università di Roma "Tor Vergata";* <sup>4</sup> *Neuropsicologia Clinica, Ospedale S. Giovanni Battista, Foligno;* <sup>5</sup> *U.O. S.S. Ambulatoriale di Diabetologia. Di.M.I, Università degli Studi di Perugia;* <sup>6</sup> *Sezione di Gerontologia e Geriatria-Azienda Ospedaliera di Perugia.*

Alzheimer's Disease (AD) is the most common form of dementia and several epidemiological studies reveal a two-five fold increase in the risk of developing AD in patients with type 2 Diabetes Mellitus (T2DM). Growing evidences showed that alterations in the endosomal-lysosomal system are one of the earliest findings in AD brain, and precede the formation of plaque and tangle associated neuropathology. In this regard we have demonstrated that the lysosomal glycohydrolases  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -hexosaminidase and  $\alpha$ -mannosidase are up-regulated in fibroblasts from AD patients, either familial AD (FAD) or sporadic AD (SAD) whereas cathepsin D is down-regulated [1-3]. Remarkable, alterations in the lysosomal system were also reported in diabetes with a role of the lysosomal enzymes as putative indicators for metabolic compensation.

The aim of our study is the identification of biochemical markers in the early stages of both AD and AD-T2DM.

To this purposes we examined the expression of the lysosomal enzymes  $\beta$ -galactosidase,  $\alpha$ -mannosidase,  $\beta$ -hexosaminidase, cathepsin D, B and S in AD (n=71), T2DM (n=50), AD-T2DM (n=59) and in aged healthy controls (n=64) plasma and Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs). Statistical analysis of data from plasma samples reveal that  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -Gal) activity showed the highest value in AD subjects ( $6,12 \pm 0.64$  mU/ml) and the lowest level in T2DM patients ( $3,24 \pm 0.1$  mU/ml), whereas this enzyme reacted comparable activity levels in AD-T2DM and healthy controls ( $4,98 \pm 0.33$  mU/ml;  $p < 0,05$ ). Moreover, we found the highest level of the  $\beta$ -Hex activity measured with MUG substrate in AD-T2DM patients ( $1170 \pm 22.8$  mU/ml;  $p < 0.05$ ) even if this enzyme activity in AD ( $838,8 \pm 22$  mU/ml) and T2DM ( $835 \pm 38.4$  mU/ml) subjects was also increased with respect to healthy controls ( $733,8 \pm 24$  mU/ml;  $p < 0.05$ ). Comparable trend was detected for the  $\beta$ -Hex activity measured with MUGS substrate. The levels of  $\alpha$ -mannosidase ( $\alpha$ -Man) activity were comparable in all groups of patients analyzed.

Opposite results arise from enzyme activities in PBMCs, in particular we found that the levels of  $\beta$ -galactosidase activity were significantly lower in PMBCs from AD subjets ( $154.2 \pm 15$  mU/mg) as well as in cells from AD-T2DM patients ( $102 \pm 13.2$  mU/mg) compared to controls ( $235.2 \pm 24.1$  mU/mg,  $p < 0,01$ ). Conversely, levels of  $\beta$ -Gal activity in T2DM patients ( $204 \pm 21$  mU/mg), was similar to that measured in healthy controls. The  $\alpha$ -Man activity was found lower in AD ( $146.4 \pm 12.6$  mU/mg), T2DM ( $105.6 \pm 19.8$  mU/mg) and AD-T2DM ( $96.6 \pm 7.8$  mU/mg) patients with respect to controls ( $245.6 \pm 28$  mU/mg);  $p < 0,05$  respectively. The activity of the  $\beta$ -hexosaminidase assayed with MUG substrate showed no statistically significant differences between AD ( $2670 \pm 258$  mU/mg), T2DM ( $3050 \pm 220$  mU/mg) and controls cells ( $3060 \pm 144$  mU/mg), whereas the levels of activity measured in AD-T2DM patients ( $1998 \pm 194.4$  mU/mg) were strongly decreased with respect to values detected in cells from healthy controls ( $p < 0.01$ ).

Together these data indicate a correlation between  $\beta$ -galactosidase and  $\beta$ -hexosaminidase secretion activity and a pathological phenotype.

The analysis of cathepsin D, B and S reveals no differences in plasma from all patients groups analyzed and controls, while opposite results have been highlighted for cathepsin B and S expression in PBMCs from AD and T2DM patients, where both cathepsins are decreased with respect to healthy controls.

Globally our data showed that the activity of the lysosomal enzymes analyzed were different between AD, T2DM and AD-T2DM patients with respect to controls, either in plasma or in PBMCs samples and generate a disease specific panel that could be taken in account to monitor the AD development in aging individuals and patient previously affected by T2DM.

**Grants support:** Ministero della Salute, RF-UMB-2006-339457.

**References:**

1. Emiliani C, Urbanelli L, Racanicchi L, Orlacchio A, Pelicci G, Sorbi S, Bernardi G, Orlacchio A (2003) Up-regulation of glycohydrolases in Alzheimer's Disease fibroblasts correlates with Ras activation. *J Biol Chem* 278, 38453-38460.
2. Urbanelli L, Emiliani C, Massini C, Persichetti E, Orlacchio A, Pelicci G, Sorbi S, Hasilik A, Bernardi G, Orlacchio A (2008) Cathepsin D expression is decreased in Alzheimer's disease fibroblasts. *Neurobiol Aging* 29, 12-22.
3. Costanzi E, Martino S, Persichetti E, Tiribuzi R, Massini C, Bernardi G, Orlacchio A, Orlacchio A. Effects of vitamin C on fibroblasts from sporadic Alzheimer's disease patients. *Neurochem Res.* 2008;33: 2510-2515.

## VALUTAZIONE DELLA PRESENZA DI BISFENOLO A (BPA) IN ALCUNI PESCI DI ACQUA DI MARE DI LARGO CONSUMO

Mita L.<sup>1,2</sup>, Monaco G.<sup>3</sup>, Bianco M.<sup>1,2</sup>, Portaccio M.<sup>1,2</sup>, Diano N.<sup>1,2</sup>, Tufano M.<sup>1,2</sup>, Sica V.<sup>1,4</sup>, Mita D.G.<sup>1,2</sup>.

1) Istituto Nazionale Biostrutture e Biosistemi (INBB)-Viale Medaglie d'Oro 305, 00136 Roma

2) Dipartimento di Medicina Sperimentale, Seconda Università di Napoli, Via Costantinopoli, 16-80138 Napoli

3) Cattedra di Medicina del Mare, II Facoltà di Medicina e Chirurgia della Sapienza, 00133 Roma

4) Dipartimento di Patologia Generale, Seconda Università di Napoli, Via Costantinopoli, 16-80138 Napoli

Il Bisfenolo A (BPA) è un interferente endocrino (IE) che mima l'azione degli estrogeni naturali inducendo patologie di varia natura negli organismi viventi.

A causa di un aumentato utilizzo di prodotti a base di resine epossidiche e plastiche di policarbonato, di cui il BPA è un costituente principale, l'uomo risulta abbondantemente esposto alla contaminazione di questo IE. Il fatto che l'esposizione al BPA sia tanto diffusa è stato dimostrato largamente dall'analisi di campioni di urine umane. Gli elevati livelli urinari di BPA sono positivamente correlati col consumo di alimenti in genere ed alimenti in scatola in particolare. L'alimentazione a base di pesce, mediante processi di bioaccumulo, rappresenta uno dei modi in cui gli IE raggiungono il nostro organismo.

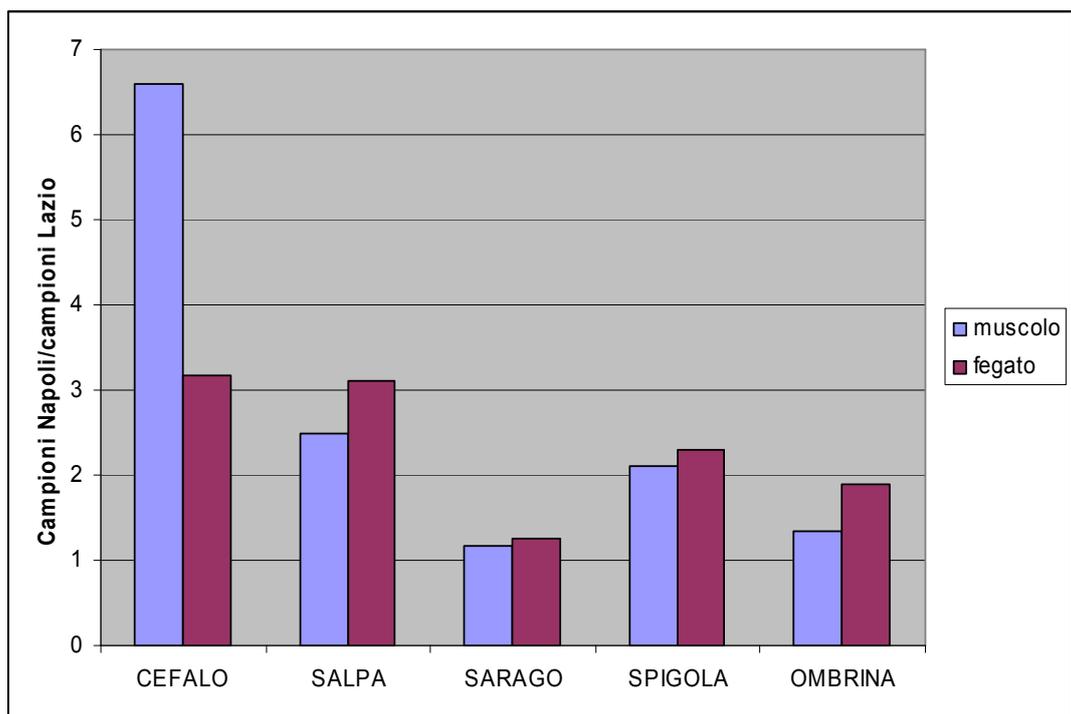
In questa ricerca sono state effettuate analisi relative alla presenza di BPA in cinque diverse specie di pesci (*Mugil cephalus*, *Dicentrarchus labrax*, *Sarpa salpa*, *Ombrina ombrina*, *Diplodus vulgaris*) provenienti dal golfo di Napoli e dalle coste del Lazio prospicienti la foce del Tevere. Le specie ittiche sono state scelte in base alle loro abitudini alimentari, stili di vita e cicli riproduttivi, nonché in base alla forte presenza di tali specie nella nostra dieta. Le zone di provenienza dei pesci sono state scelte sulla base del fatto che, mentre il grosso dell'inquinamento marino delle coste laziali è dovuto essenzialmente all'apporto degli scariche agricoli ed industriali convogliati dal Tevere nel mare, l'inquinamento del golfo di Napoli è amplificato dal traffico navale e dalle raffinerie di petrolio.

Nei nostri laboratori abbiamo messo a punto una tecnica analitica, mediante cromatografia liquida ad alta risoluzione (HPLC), capace di determinare la presenza di BPA in matrici di varia origine da un punto di vista sia qualitativo che quantitativo. I risultati ottenuti sono stati validati dall'utilizzo saltuario della spettrometria di massa. Dagli esemplari sottoposti ad analisi sono state prelevate parti di muscolo e di fegato.

La maggioranza dei campioni analizzati risulta contaminato da BPA. I risultati sono riassunti nella tabella e negli istogrammi di seguito riportati.

Provenienza	LAZIO		NAPOLI	
	Muscolo BPA(pg/g) Valore medio	Fegato BPA(pg/g) Valore medio	Muscolo BPA(pg/g) Valore medio	Fegato BPA(pg/g) Valore medio
Cefalo (42)	591,00	1204,90	3899,57	3807,23
Salpa (42)	1997,61	1932,71	4971,19	5997,71
Sarago (36)	640,22	1438,55	751,88	1812,72
Spigola (30)	327,73	763,20	687,93	1756,60
Ombrina (24)	521,08	1018,00	704,25	1930,00

Per ogni specie, la concentrazione di BPA nel fegato è risultata maggiore di quella nel muscolo, ad eccezione che nel fegato dei cefali di Napoli e nel fegato delle salpe del Lazio.



Rapporto di contaminazione tra le specie provenienti dal golfo di Napoli e quelle provenienti dalle coste del Lazio

I risultati ottenuti indicano chiaramente come i valori medi della concentrazione di BPA ritrovati nei pesci di Napoli sono più alti di quelli ritrovati nei pesci del Lazio.

## DIFFERENTIAL ACCUMULATION LEVELS IN THE BRAIN OF RATS EXPOSED TO THE ENDOCRINE DISRUPTORS 4-TERT-OCTYLPHENOL (OP)

E. Viggiano<sup>1,3</sup>, M. Bianco<sup>1,2</sup>, L. Mita<sup>1,3</sup>, M. Portaccio<sup>1,3</sup>, N. Diano<sup>1,3</sup>, V. Sica<sup>1,2</sup>, B. De Luca<sup>1,3</sup>, D.G. Mita<sup>1,3,4,\*</sup>.

<sup>1</sup> *National Institute of Biosystems and Biostructures (INBB) – Viale Medaglie d'Oro, 305, 00136 Rome, Italy*

<sup>2</sup> *Department of General Pathology – Second University of Naples – Via L. De Crecchio, 7, 80138 Naples, Italy.*

<sup>3</sup> *Department of Experimental Medicine – Second University of Naples – Via S. M. di Costantinopoli, 16, 80138 Naples, Italy.*

<sup>4</sup> *Institute of Genetic and Biophysics “ABT” – Via P. Castellino, 111, 80131 Naples, Italy.*

It is well known that many environmental chemicals, derived from industrial products exert, estrogen-like activity, and for this reason are called as Endocrine Disruptors (EDs). Humans are generally exposed to such compounds, which are found in food, drinking water, soil, dust, smoke, and air. Among the alkylphenols, the Bisphenol A (BPA) and the 4-ter-Octylphenol (OP) are the most studied. 4-t-OP represents a degradation product of the respective polyethoxylates used as a surfactant in household and industrial detergents, emulsifiers and stabilizers for polyvinylchlorure (PVC) and polypropylene (PP). These EDs have been hypothesized to play a role in various neuropsychiatric disorders, including autism, learning disabilities, and attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD), and also in pain modulation.

The aim of the present study was to analyze the areas of accumulation in the central nervous system and the effect of 4-t-OP on pain.

1 group of 8 male Sprague-Dawley rats were treated for 20 days with 50mg/Kg of weight/day of 4-t-OP administered by subcutaneous injection dissolved in DMSO. A control group of 8 male rats were treated with only DMSO. 1% formaldehyde were injected in the upper right lip of rats after 20 days of treatment. The grooming activity time was recorded with a digital camera connected to a computer for 45 min.

The subcutaneous injection of 4-t-OP resulted in different level of accumulation in different areas of the brain. In particular, no accumulation was found in the striatum, whereas in all other areas examined (cerebellum, cerebral cortex, hypothalamus, hippocampus, mesencephalus, ventral hindbrain, thalamus) accumulation was found. Particularly, in the cerebral cortex and cerebellum the accumulation of 4-t-OP is greater than in all other areas (Fig. 1). The formalin test showing no significant differences between the groups of treated animals and the control (Fig.2).

These results could be indicated of a greater effect of 4-t-OP on the motor system in the adult rat, in agreement with the previous indication. This result is in agreement with previous papers showing that administration of 4-t-OP resulted in an increase of motor activity and hence a predisposition to the attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). 4-t-OP in adult has no effect on pain modulation and it is in agreement with the low 4-t-OP accumulation in the ventral hindbrain, implicated in the oro-facial pain transmission.

**Fig. 1** 4-t-OP accumulation in the rat brain.

