



Istituto Nazionale di Biostrutture e Biosistemi

CONSORZIO INTERUNIVERSITARIO

IX CONVEGNO NAZIONALE

SU

SCIENZE DELLA VITA

ROMA, 21-22 OTTOBRE 2010

CNR

IX CONVEGNO NAZIONALE I.N.B.B.

<i>Comitato Scientifico</i>

Prof. Damiano Gustavo Mita

Prof. Enrico Rizzarelli

Prof. Vittorio Tomasi

<i>Segreteria Organizzativa</i>
--

I.N.B.B.

Viale delle Medaglie D'Oro, 305

00136 Roma

Tel 06/35340153 Fax. 06/35451637

inbbamm@inbb.it

www.inbb.it

ORGANI DEL CONSORZIO I.N.B.B.

Presidente INBB

Prof. Damiano Gustavo Mita

Direttore INBB

Dott. Paolo Occhialini

Consiglio Direttivo INBB

Prof. Saverio Bettuzzi
Prof.ssa Rita Casadio
Prof. Carlo Di Benedetta
Prof.ssa Flavia Franconi
Prof. Leonardo Gaspa
Prof. Gaetano Irace
Prof. Alberto Albertini
Dott. Giuseppe Martini
Prof. Aldo Roda
Prof. Giuseppe Palleschi
Prof. Damiano Gustavo Mita
Dott. Paolo Occhialini
Prof. Piero Pucci
Prof. Adelio Rigo
Prof. Enrico Rizzarelli
Prof. Giuseppe Rotilio
Dott.ssa Donatella Tirindelli
Prof. Vittorio Tomasi
Prof. Paolo Viglino
Prof. Carlo Ventura

Giunta Esecutiva INBB

Prof. Aldo Roda
Prof. Piero Pucci
Prof.ssa Flavia Franconi
Prof. Damiano Gustavo Mita
Dott. Paolo Occhialini
Prof. Enrico Rizzarelli
Prof. Vittorio Tomasi
Prof. Paolo Viglino

Collegio dei Revisori

Dott.ssa Anna Sciandrone
Dott.ssa Daniela Procaccia
Dott.ssa Marina Tesauro

INDICE

<i>Programma IX Convegno Nazionale</i>	<i>Pag.</i>	<i>7</i>
<i>Relazione introduttiva del Presidente Prof. D.G. Mita</i>	<i>Pag.</i>	<i>11</i>
<i>Abstract comunicazioni scientifiche</i>	<i>Pag.</i>	<i>17</i>
<i>Abstract ricercatori non strutturati</i>	<i>Pag.</i>	<i>71</i>
<i>Unità di Ricerca INBB</i>	<i>Pag.</i>	<i>99</i>

IX CONVEGNO NAZIONALE I.N.B.B.
Programma

GIOVEDÌ 21 OTTOBRE

h. 10,30 **Registrazione dei partecipanti**

h. 11,00 **Apertura dei Lavori**
PROF. DAMIANO GUSTAVO MITA

h. 11,45 – 13,30 *Sessione “Misfolding Proteico e Amiloidosi”*

Chairman: **PROF. PIERO PUCCI** (*Univ. Napoli*)

DOTT.SSA ALESSANDRA CORAZZA (Univ. UD) “Caratteristiche strutturali e dinamiche dell’acilfosfatasi da *Sulfolobus solfataricus* nello stato monomero e negli aggregati prefibrillari”

DOTT.SSA ANGELA ARCIELLO (Univ. NA) “Internalizzazione e percorso intracellulare del frammento fibrillogenico di APOA-I in cardiomioblasti”

DOTT.SSA FRANCESCA TATINI (Univ. FI) “Gli oligomeri della proteina modello HypF-N inibiscono la plasticità sinaptica in maniera simile a quelli del peptide β -amiloide (1-42)”

DOTT.SSA ADRIANA PIETROPAOLO (Univ. CT) “Metodi computazionali per lo studio del misfolding proteico: Interazione tra l’amiloide beta e la regione Nterminale del prione umano”

DOTT.SSA PALMA MANGIONE (Univ. PV) “Stabilizzazione della transtiretina e prevenzione del misfolding: nuove prospettive per il trattamento dell’amiloidosi da transtiretina”

h. 13,30 **Lunch**

h. 14,30 – 16,30 *Sessione “Cellule Staminali e Medicina Rigenerativa”*

Chairman: **PROF. CARLO VENTURA** (*Laboratorio di Biologia Molecolare e Bioingegneria delle Cellule Staminali*)

PROF. CARLO VENTURA (Univ. BO) “Cellule Staminali e Medicina Rigenerativa Cardiovascolare: Nuove Prospettive da Sintesi Chimiche e Stimoli Fisici”

PROF.SSA LAURA CALZÀ (Univ. BO) “Cellule staminali e medicina rigenerativa per il sistema nervoso: problemi sottostimati e nuove soluzioni”

PROF. UMBERTO GALDERISI (Univ. NA) “Rimodellamento della cromatina e modulazione della senescenza delle cellule staminali mesenchimali: ruolo del gene BRG1”

PROF. ANTONIO BALDINI (CNR NA) “Progenitori cardiaci nello sviluppo normale e patologico”

PROF. CARLO ALBERTO REDI (San Matteo - PV) “Riprogrammazione genetica di cellule somatiche con citoplasti oocitari”

h. 16,30 **Coffee Break**

h. 16,45 - 18,45 *Sessione “Ricerca Oncologica: dal Laboratorio alla Clinica”*

Chairman: **PROF. SAVERIO BETTUZZI (Univ. Parma)**

DOCT. LEO IZZI (Euroclone) “Ricerca sperimentale e ricerca industriale in ambito oncologico: il nodo del trasferimento tecnologico”

DOCT.SSA FEDERICA RIZZI (Univ. PR) “Sviluppo di un metodo in Real Time PCR per la diagnosi e la prognosi molecolare del carcinoma prostatico umano”

PROF. GIANLUCA TELL (Univ. UD) “Utilizzo degli enzimi di riparazione del danno al DNA nella terapia antitumorale: l’esempio paradigmatico della proteina multifunzionale APE1”

PROF. PAOLO CIANA (Univ. MI) “Modelli animali biotecnologici per lo studio traslazionale di nuovi farmaci oncologici”

PROF. ALBERTO ABBRUZZESE (II Univ. NA) “Sviluppo nanotecnologico dell’acido zoledronico: da agente rimineralizzante osseo a farmaco anti-tumorale”

h. 18,45 *Chiusura dei lavori della giornata*

VENERDI’ 22 OTTOBRE

h. 9,15 – 11,15 *Sessione “Nanobioteχνologie in biomedicina”*

Chairman: **PROF. ADELIO RIGO (Univ. Padova)**

PROF ADELIO RIGO Univ. PD) “Nano-strutture di biossido di titanio: possibili impieghi in campo biomedico”

PROF JOSÉ KENNY (Univ. PG) “Nanocompositi a matrice polimerica biodegradabile per l’ingegneria tissutale”

PROF.SSA MARINA SCARPA (Univ. TN) “Le nano strutture di silicio come punto di partenza di nuove strategie nel monitoraggio di segnali biologici”

PROF.SSA ANTONELLA SAIJA (Univ. ME) “Nanoparticelle e drug delivery: vantaggi e rischi”

PROF. FILIPPO CAUSA (Univ. NA) “Rilascio di nanoparticelle in tumori solidi: implicazioni per terapia e diagnosi”

h. 11,15 *Coffee break*

h. 11,30 – 13,30 *Sessione “Interferenti Endocrini”*

Chairman: **PROF. FABRIZIO BIANCHI (CNR Pisa)**

PROF.SSA MARIA MARINO (Univ. Roma 3) “Interferenti delle azioni degli ormoni sessuali steroidei: valutazione di una possibile differente suscettibilità dipendente dal sesso”

PROF.VITTORIO COLANTUONI (Univ. Sannio) “I peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) possibili nuovi bersagli dell’azione degli interferenti endocrini”

PROF. TRIFONE SCETTINO (Univ. Salento) "Studio dell’effetto di interferenti endocrini sull’attività catalitica di anidrase carbonica II"

PROF.SSA PAOLA NEGRI CESI (Univ. MI) “Epigenoma e ambiente: influenza dell’esposizione prenatale ai PCB sull’impronta epigenetica nel ratto neonato ”

PROF.SSA PAOLA PALANZA (Univ. PR) “Interferenti endocrini e sviluppo neuro-comportamentale in modelli animali: cosa sappiamo e cosa vorremmo sapere”

h. 13,30 ***Lunch***

h. 14,30 – 16,30 ***Sessione “Biosensoristica per l’Ambiente e la Salute”***

Chairman: ***PROF. LUIGI CAMPANELLA (Presidente Società Italiana di Chimica)***

DOTT.SSA ELISA MICHELINI (Univ. BO) “Biosensori cellulari luminescenti in formato multiplex: applicazioni per monitoraggio eco-tossicologico sul campo”

DOTT.SSA MARIANNA PORTACCIO (II Univ. NA) “Microspettroscopia FT-IR per la caratterizzazione di supporti catalitici per la realizzazione di biosensori”

DOTT.SSA VIVIANA SCOGNAMIGLIO (CNR RM) “Tecnologie biosensoristiche avanzate per lo sviluppo di strumenti innovativi per il rilevamento di contaminanti ambientali ed agroalimentari”

DOTT.SSA ILARIA PALCHETTI (Univ. FI) “Analisi di *biomarkers* clinici mediante biosensori elettrochimici e particelle magnetiche”

DOTT. GIANLUCA ADORNETTO (Univ. RM2) “Sviluppo di un sensore elettrochimico per la misura diretta e quantitativa di anticorpi anti-DNA”

h. 16,30 ***Chiusura del Convegno***

RELAZIONE INTRODUTTIVA

Sono ormai più di dodici anni che mi trovo a fare la relazione di apertura del Convegno Nazionale dell'INBB e diventa sempre più difficile differenziare il contenuto da quelle precedenti in quanto nulla o poco è cambiato per quel che riguarda il panorama dell'Università e della Ricerca, compresi i tagli finanziari annuali, nuovi o confermati, in questo settore. Voglio subito chiarire che questa mia non è una valutazione di parte, ma una constatazione di fatti da parte di un operatore del settore che quotidianamente si sforza di sopravvivere alle difficoltà. Chiunque sia stato al Governo, destra o sinistra, non ha fatto altro che tradire le promesse elettorali di un aumento degli investimenti per l'Università e Ricerca, investimenti ritenuti indispensabili nella fase elettorale perché solo investendo in Università e Ricerca si può concorrere allo sviluppo economico e sociale del paese. Promesse tradite in un'Italia che vive alla giornata senza una reale utilizzazione delle spese programmate. La nostra comunità scientifica ha una sola certezza: i tagli sicuri ai fondi destinati all'Università e Ricerca. Probabilmente sarà più facile indovinare un sei al superenalotto più che assistere ad una inversione di tendenza in questo settore. E' vero che tutte le Nazioni sono state travolte da una crisi di carattere mondiale finanziaria prima, economica poi, ed è altrettanto vero che non siamo ancora usciti da questa crisi, ma nessun grande paese industrializzato, eccetto il nostro, ha ridotto i fondi per l'Università e la Ricerca, anzi li ha aumentati. Viene da domandarsi se facciamo veramente parte del gruppo del G8 visto che siamo l'unica Nazione che nell'operare i tagli li opera indiscriminatamente eguali in tutti i Ministeri. Tagliare lì dove l'investimento è ed è stato storicamente piccolo, significa ridurre ancor di più la linfa vitale a quel soggetto e quindi condannarlo ad una morte lenta e sicura. A volte mi chiedo: ma siamo veramente un lusso per il paese? Siamo veramente dei fannulloni, peraltro privilegiati? E' chiaro che si tratta di una domanda retorica: non siamo un lusso, non siamo dei fannulloni, certamente siamo dei privilegiati, almeno coloro che hanno raggiunto posizioni di stabilità di occupazione e di valore scientifico in quanto sono liberi di lavorare su quel che li gratifica e sono motivati esclusivamente dalla curiosità e dal desiderio della conoscenza.

a)- Stato della ricerca in Italia

Possiamo definire la ricerca scientifica come una "impresa" collettiva a carattere internazionale, dando alla parola "impresa" il significato di "attività produttiva". Diciamo subito che per rendere produttivi gli investimenti in ricerca è indispensabile intervenire sul fronte del trasferimento tecnologico, ovvero su quel complesso di attività svolte per portare le innovazioni tecnologiche dal soggetto che le detiene e le sviluppa al soggetto che le traduce in un prodotto commerciabile sul mercato.

La ricerca scientifica e lo sviluppo economico coinvolgono, invero, una grande quantità di attori diversi: industria, università, Enti ed istituti di ricerca non universitari, governi ed istituzioni sopranazionali. I percorsi attraverso i quali si struttura il sistema di ricerca scientifica nei paesi industrializzati sono molto simili e tra di loro collegati, pur nel rispetto delle diverse "vocazioni nazionali", in un rapporto di collaborazione e di competizione. La competizione è la molla principale per il progresso della scienza. Senza la competizione il mondo della scienza si trasforma in un pantano uniforme. Non si può essere competitivi con le armi spuntate e le armi spuntate, in questo caso, sono sia la scarsità di risorse finanziarie e sia la mancanza di strategie politiche di largo respiro. Discuteremo tra poco di questi problemi.

E' ben noto che l'Italia, che presenta nel contesto internazionale un buon livello di ricerca, come dimostrato dalla quantità e qualità dei nostri ricercatori, nonché dai loro brevetti, non primeggia negli investimenti nel settore. Si tratta di osservazioni così note che potrebbe essere superfluo ricordarle.

Per rimanere a livello europeo dobbiamo ricordare che gli investimenti pubblici in Italia sono solo lo 0.6 % del PIL, contro una Media europea dello 0.70 % , e contro valori di 0.75 e 0.8% per Francia e

Germania, rispettivamente (Fonte Eurostat 2005). I nostri valori impallidiscono di fronte a quelli di Stati Uniti, Cina e Giappone.

Se guardiamo al parametro “numero dei ricercatori” notiamo che l’Italia è fanalino di coda, o quasi, con 70.000 ricercatori, contro i 100.000 della Spagna, i 200.000 della Francia ed i 270.000 della Germania.

Le cose non vanno meglio per quanto riguarda la percentuale dei ricercatori sul numero totale degli occupati: anche in questo caso siamo vicini al primato negativo.

Queste negatività sono certamente figlie del calo degli investimenti in Ricerca e Sviluppo, ma quello che preoccupa maggiormente è il calo degli iscritti nelle Facoltà scientifiche, anche se è vero che la ricerca scientifica non è solo quella delle scienze applicate. Quel che preoccupa maggiormente è quel fenomeno conosciuto come “fuga dei cervelli”. Dobbiamo smetterla di strumentalizzare questo fenomeno, ma dobbiamo meglio sostenere “i cervelli che restano”. Questi ultimi non hanno niente da invidiare, sul piano personale, agli altri colleghi. Certamente è più facile ed incoraggiante lavorare in laboratori super attrezzati, senza eccessive limitazioni di fondi ed in un ambiente culturale più stimolante. Lavorare in Italia invece è più difficile, ma – come già detto – i nostri ricercatori sul piano della preparazione e del valore professionale, non hanno niente da invidiare ai colleghi stranieri tanto è vero che i famosi “cervelli che fuggono” non sono forse preparati da noi? E’ un miracolo che i nostri ricercatori riescano a produrre scientificamente quel che producono ed a fornire una preparazione accademica elevata con il poco che hanno. Nessuno nega che i tagli alla spesa pubblica per riuscire a contenere il debito pregresso 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 pesanti tagli previsti al Fondo di Funzionamento per il sistema universitario nei prossimi anni (279 milioni di Euro in meno per l’anno in corso, 1355 mln nel 2011 e 1433 mln nel 2012) 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.

In presenza di queste difficoltà e per far crescere meglio il sistema ricerca, credo che sarebbe necessario istituire una vera e propria anagrafe della ricerca in Italia, intendendo con ciò una banca dati con tutte le ricerche finanziate (non solo dal MIUR) e, assolutamente, con tutti i risultati ottenuti. Adoperando questa banca dati si eviterebbe che le stesse ricerche vengano finanziate da più istituzioni e che quindi continuino a piovere fondi sempre sulle stesse persone e sulle stesse ricerche. Sicuramente si tratta di colleghi bravi, ma se raccolgono sempre e solo loro, i giovani non cresceranno mai. Questa anagrafe permetterebbe inoltre di assicurare una specie di rotazione nei finanziamenti così come si sta facendo per i PRIN e per Futuro in ricerca. In ogni caso è fondamentale che quanto prima l’Agenzia ANVUR entri pienamente in funzione, come l’INBB ha sempre sostenuto, fuori da appesantimenti burocratici e in piena trasparenza, con valutatori indipendenti di specchiata autorevolezza scientifica, anche a livello internazionale.

b)- Piano Nazionale della Ricerca (PNR) 2010-2012

E’ disponibile sul sito del MIUR la bozza (sic!) del Piano Nazionale della Ricerca 2010-2012. Questo documento, come è noto, riporta le attività e le modalità con cui il Governo si ripromette di migliorare e sviluppare il nostro sistema ricerca. L’ultimo Piano Nazionale riguardava il periodo 2005-2007. L’obiettivo che il PNR si ripropone è quello di favorire da una parte la ricerca di base nelle Università e negli Enti di Ricerca, dall’altra di stimolare e migliorare le connessioni e la sinergia fra il nostro sistema di ricerca pubblico ed il nostro sistema di ricerca industriale. L’anello debole della ricerca in Italia, infatti, non è soltanto l’impegno economico dello stato, ma anche la scarsa presenza di ricerca all’interno delle imprese, l’incapacità del settore economico e tecnologico di creare risorse e richieste per il sistema ricerca, il rapporto tra imprese ed istituzioni di ricerca pubbliche. La Commissione Europea ha rivelato che, considerando come parametro positivo il numero delle imprese operanti in settori ad alta innovazione che cooperano a scopo di ricerca con

altre imprese, università o centri di ricerca pubblici, l'Italia, con solo il 10% delle imprese impegnate in accordi di questo tipo, occupa anche in questo caso l'ultimo posto in classifica. Negli altri paesi si va dal 18% della Grecia al 70% della Finlandia. Conclusione: In Italia le imprese fanno poca ricerca e la finanziano altrettanto poco.

A tal proposito è nostra opinione che non si migliora il rapporto tra sistema pubblico di ricerca ed il sistema delle imprese con grossi bandi in cui la partecipazione industriale è prevista con grandi investimenti. Il settore industriale italiano è costituito in gran parte da piccole e medie imprese, non ancora mature per la ricerca e l'innovazione, per cui il loro impegno economico in ricerca e sviluppo è considerato un azzardo ed un rischio piuttosto che un investimento. Ridurre l'entità del cofinanziamento industriale ed incrementare i benefici fiscali potrebbe essere la mossa vincente per favorire la collaborazione pubblica e privata nella ricerca. Su queste basi sarà più facile far crescere e sviluppare iniziative in tal senso quali le *Piattaforme Tecnologiche*, i *Distretti ad Alta tecnologia* ed i *Poli di Eccellenza*. Poiché ciascuna di queste iniziative ha l'obiettivo di generare, secondo il testo del PNR, "un sistema che permetta di integrare tutte le risorse e tutti i soggetti, pubblici e privati, sviluppando in modo integrato le attività di ricerca fondamentale, industriale, di trasferimento tecnologico e di formazione del capitale umano, assicurando, nel contempo il raggiungimento di una massa critica e di livelli di eccellenza nazionale ed internazionale", crediamo opportuno che si chiariscano le caratteristiche peculiari dei suddetti strumenti, distinguendone i ruoli caratterizzanti ed evitando sovrapposizioni e dispersioni di risorse.

Comunque, è importante capire, in fin dei conti, se il Governo è realmente intenzionato ad approvare secondo la procedura istituzionale prevista il PNR 2010-2012 elaborato e a stanziare adeguate risorse per il raggiungimento degli obiettivi in esso contenuti. Sarebbe un fattore di chiarezza e di dimostrazione di una volontà politica nella direzione da noi tutti auspicata, a vantaggio della competitività del Paese.

c)- Disegno di Legge Gelmini

Mi si permettano alcune osservazioni. Ovviamente sono osservazioni che riguardano alcune criticità, glissando sulle positività perché quelle sono evidenti di per sé come ad esempio, non credo che sia opportuno soffermarsi sui principi di valutazione meritocratica sui quali siamo tutti d'accordo, come andiamo ripetendo da anni.

- Il principio di virtuosità da solo non può costituire elemento premiante per le Università. Nel contesto della legge, "virtuose" sono le Università che riescono a mantenere i conti a posto. Il "virtuosismo" nei conti deve essere accoppiato con la "qualificazione" nella didattica e nella ricerca". Senza questo accoppiamento si corre il rischio concreto che il mancato investimento in didattica e ricerca nei fatti renda "virtuosa" una università che risulta "peggiorata" per quel che riguarda le sue missioni istituzionali fondamentali.

- La legge si propone di ridurre il potere dei "baroni", ammesso che si possa parlare ancora di baroni, visto che l'anello più debole e ricattabile, quello dei Ricercatori, sta di fatto in questi giorni bloccando il funzionamento delle Università. La nostra solidarietà più piena ai ricercatori. Mi domando: dove è la riduzione del potere dei baroni se d'ora in poi tutte le commissioni concorsuali saranno costituite esclusivamente da professori ordinari?

- In considerazioni dei tagli al Fondo di Funzionamento Ordinario il turnover dei professori sarà ridotto al 20% per le Università "non virtuose e cattive", ed al 50% per le Università "virtuose e qualificate". In queste condizioni che senso ha richiamare professori e ricercatori dall'estero garantendo loro finanziamenti e borse per un periodo molto breve, senza alcuna certezza di stabilità occupazionale a prescindere dai risultati ottenuti? O tutti saranno sottoposti ad una verifica seria o è meglio non far ridere i nostri colleghi all'estero. Ma quanti sono in Italia i professori, ordinari ed associati, che non hanno superato lo straordinariato? Siamo veramente così bravi? Allora non tagliateci i fondi!!"

- Ben vengano i concorsi nazionali idoneativi, ma questi devono essere a numero chiuso ed espletati esclusivamente per meriti comparativi tra i candidati che hanno una produttività superiore alla soglia minima stabilita dalle rispettive aree scientifiche. Senza una comparazione fra i vari candidati si formerebbe un elenco nazionale di “quasi professori” aspiranti ad entrare nei ruoli esclusivamente “ope legis”.

Una ultima considerazione di carattere generale sugli Atenei privati e su quelli “on line”, che comunque sono dei competitors degli Atenei pubblici. Di fronte alla crisi degli Atenei pubblici, resistono senza tagli gli atenei privati: è la stessa sperequazione tra scuola d’obbligo pubblica e privata! Gli Atenei crescono grazie al denaro pubblico: circa 90 milioni di euro che vengono direttamente dal Ministero e grazie ai finanziamenti delle fondazioni locali che fanno a gara per avere ciascuna nel proprio orto il proprio piccolo “campus” universitario. Le uscite di questi atenei, poi, sono minime in quanto pescano il personale docente con contratti più o meno equivalenti a quelli di un giovane borsista. Il Comitato Nazionale di Valutazione sulle Università (CNVSU) ha relazionato che su 30 atenei non statali, riconosciuti e sovvenzionati dal Ministero, e che quindi rilasciano titoli con valore legale, quelli che si salvano – come la Bocconi, la Luiss e la Cattolica – si contano sulle dita di una mano, o poco più. Alle numerose Università private, poi, si aggiungono le Università on line, ancora non supportate dal finanziamento pubblico in quanto bloccato dai due ultimi Ministri del MIUR, salvo poi, come nel caso dell’ E-Campus visitate recentemente e congiuntamente dall’attuale Ministro e Premier. Il ministero ha stabilito per le Università statali un criterio ben preciso, con cui concordiamo, per le attivazioni dei corsi: minimo nove docenti di ruolo. Questo dovrebbe valere anche per le Università private, ma non sembra che per queste ultime le cose siano così. Ci auguriamo che lo stesso organismo che valuterà le Università “virtuose” e “non virtuose” possa valutare comparativamente tutte le Università, pubbliche, private ed on line, e soprattutto con gli stessi criteri.

d) - Stato dell’INBB e prospettive

Veniamo ora brevemente all’attività del nostro Consorzio in questi ultimi anni ed alla proposta di alcune linee programmatiche per il futuro.

- Il Consiglio Direttivo nel corso dell’ultimo anno ha elaborato un piano programmatico di sviluppo delle attività scientifiche del Consorzio stesso. Con questo piano abbiamo inteso indicare le linee lungo le quali per massa critica interna ed aree scientifiche emergenti e/o consolidate, l’attività di ricerca del consorzio potrebbe presentarsi come punto di riferimento verso l’esterno ed essere pronta per presentare sollecitazioni per nuove iniziative scientifiche
- Negli ultimi anni è aumentato il numero degli aderenti, pur con i nostri criteri selettivi di accettazione.
- Ci siamo aperti al territorio stipulando nuove convenzioni di collaborazione scientifica con la Regione Lazio, la Regione Campania e la Regione Sicilia. In questa regione, in particolare, siamo entrati a far parte come soci di due Distretti Tecnologici e stiamo presentando attività progettuali in vista dei bandi che saranno a breve emanati.
- Siamo diventati titolari di nuovi progetti di ricerca in ambito nazionale (FIRB) ed in ambito Europeo, come pure abbiamo sottoscritto nuovi contratti di ricerca con PMI e con aziende multinazionali. Degno di menzione è anche il successo riportato con i bandi di “Futuro in Ricerca”.
- Abbiamo organizzato convegni INBB che hanno avuto notevole risonanza scientifica e da cui sono scaturite collaborazioni precedentemente impensabili.
- Abbiamo continuato a tenere attivo il Laboratorio Nazionale INBB di Osilo-Sassari ed il laboratorio nazionale a Bologna.
- Abbiamo continuato ad elargire borse di studio rispettando i criteri stabiliti.
- Il Consorzio si è fatto promotore e coordinatore di chiarimenti, incontri e dibattiti con il Ministero riuscendo ad interfacciare CUN e Ministero su problemi vitali per la sopravvivenza dei consorzi e sul loro ruolo.

Questi risultati ci guidano nel rivolgere uno sguardo al futuro, per il quale nutriamo più di una preoccupazione. Tra i criteri premianti per la valutazione delle attività dei Consorzi c'è la capacità di far fruttare il finanziamento del Ministero incrementando sia la capacità di attrazione di fondi esterni e sia la produzione di lavori scientifici con l'affiliazione del Consorzio. Nel primo caso non c'è dubbio che noi abbiamo dimostrato in questi anni di essere capaci di attrarre finanziamenti esterni, ma quello era il tempo in cui esistevano fonti molteplici e differenziate di finanziamento esterno. Ora il numero dei bandi è drasticamente diminuito e quindi risulta sempre più difficile incrementare le risorse. Un aspetto molto importante è quello di aumentare le collaborazioni con le imprese e con le Fondazioni bancarie. Occorre avere un occhio vigile ed attento alle Fondazioni bancarie che nel quinquennio 2005-2009 hanno erogato oltre un miliardo di euro per iniziative di interesse pubblico e che hanno visto beneficiare al secondo posto il settore ricerca scientifica, dopo Arte e Beni Culturali. Nel solo 2009 sono stati erogati ben 200 milioni di euro esclusivamente alla ricerca.

Per quanto riguarda il secondo aspetto ringrazio tutti gli aderenti per come hanno risposto ai miei precedenti inviti a pubblicare anche con il nome dell'INBB. L'osservanza di questo appello è mandataria per coloro che hanno fondi personali gestiti da noi od ottenuti tramite noi, ma è auspicabile anche per tutti gli aderenti che intendono interagire con il consorzio sentendosene parte attiva.

Mi piace concludere questo intervento con un appello: chiunque crede nell'INBB lo aiuti a crescere, a cominciare dai più giovani professori o ricercatori. Il futuro del nostro Consorzio, ancora più di prima, è nelle vostre mani: diamoci tutti da fare!

Grazie a tutti per l'attenzione

ABSTRACT
DELLE COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE

Sessione
“Misfolding Proteico e Amiloidosi”

INTERNALIZZAZIONE E PERCORSO INTRACELLULARE DEL FRAMMENTO FIBRILLOGENICO DI APOA-I IN CARDIOMIOBLASTI

Angela Arciello¹, Daria Maria Monti¹, Nadia De Marco¹, Rita Del Giudice¹, Maria Monti^{2,3}, Piero Pucci^{2,3} and Renata Piccoli¹

¹Dipartimento di Biologia Strutturale e Funzionale, Università di Napoli Federico II; ² Dipartimento di Chimica Organica e Biochimica, Università di Napoli Federico II; ³ CEINGE Biotecnologie Avanzate, Napoli

Diverse forme di amiloidosi sono associate a mutazioni del gene codificante l'apolipoproteina A-I (ApoA-I). In tali amiloidosi gli aggregati fibrillari sono costituiti dai frammenti N-terminali della proteina, lunghi 90-100 residui amminoacidici, che si accumulano in maniera tessuto-specifica a seconda del tipo di mutazione presente nella sequenza proteica. Il frammento corrispondente alla regione 1-93, denominato [1-93]ApoA-I, è risultato il principale costituente delle fibrille cardiache estratte dal cuore dei pazienti. E' stata prodotta una versione ricombinante del polipeptide fibrillogenico (1), un polipeptide altamente destrutturato, in grado di subire transizioni conformazionali che portano alla formazione di fibrille, in maniera analoga alla sua controparte naturale (2).

Sono stati analizzati gli effetti di [1-93]ApoA-I su cardiomioblasti in coltura e si è dimostrata l'esistenza di siti di legame sulla membrana cellulare specifici sia per [1-93]ApoA-I che per il suo precursore proteico. Si è dimostrato inoltre che il polipeptide fibrillogenico ed ApoA-I sono internalizzati utilizzando vie diverse. Entrambe le proteine sono infatti in parte internalizzate attraverso vescicole rivestite di clatrina, ma l'ingresso di ApoA-I avviene anche mediante macropinosi, mentre [1-93]ApoA-I è internalizzato anche mediante *lipid rafts*. Nel compartimento intracellulare il polipeptide fibrillogenico è degradato attraverso i sistemi lisosomiali e proteasomiale, mentre ApoA-I è in parte destinata ai lisosomi ed in parte riciclata sulla membrana. La definizione dell'interazione del polipeptide fibrillogenico con le cellule bersaglio ed il suo destino intracellulare sono rilevanti nella comprensione delle basi molecolari della patologia.

Analisi di proteomica hanno inoltre consentito l'identificazione di potenziali interattori proteici del polipeptide amiloidogenico. L'analisi di tale interattoma consentirà di far luce sulle basi molecolari del meccanismo d'azione del polipeptide nello sviluppo della patologia.

1. S. Di Gaetano et al. (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 351, 223.

2. L. Obici et al. (1999) *Am. J. Pathol.* 155, 695.

CARATTERISTICHE STRUTTURALI E DINAMICHE DELL'ACILFOSFATASI DA SULFOLOBUS SOLFATARICUS NELLO STATO MONOMERICO E NEGLI AGGREGATI PREFIBRILLARI

Katiuscia Pagano¹, Francesco Bemporad², Federico Fogolari^{1,3}, Gennaro Esposito^{1,3}, Paolo Viglino^{1,3}, Fabrizio Chiti^{2,3} e Alessandra Corazza^{1,3}

¹*Department of Biomedical Sciences and Technologies, University of Udine, P.le Kolbe 4, 33100 Udine, Italy.*

²*Department of Biochemical Sciences, University of Firenze, Viale Morgagni 50, 50134, Firenze, Italy.*

³*Consorzio Interuniversitario "Istituto Nazionale di Biostrutture e Biosistemi" (I.N.B.B.), Viale Medaglie d'Oro 305, 00136 Roma, Italy.*

Molte informazioni sperimentali portano a pensare che proteine globulari con una struttura tridimensionale ben definita debbano passare per un unfolding parziale o globale per poter essere in grado di formare fibrille. Tuttavia si sta accumulando un numero sempre maggiore di evidenze che mostrano esempi di proteine foldate che possono aggregare passando attraverso intermedi con una struttura di tipo nativo, direttamente accessibili attraverso fluttuazioni termiche dello stato nativo e senza la necessità di transizioni che superino barriere di unfolding. Questo meccanismo di aggregazione può avere importanza fisiologica poiché le proteine globulari spendono la maggior parte del loro tempo in una conformazione folded, piuttosto che in uno stato non-nativo. Una delle proteine che mostra di aggregare direttamente a partire dalla proteina nativa è l'acilfosfatasi da *Sulfolobus solfataricus* (Sso AcP) come precedentemente proposto in base a dati di dicroismo circolare e di attività enzimatica.

In base alla struttura, già determinata in soluzione via NMR, che mostra un fold globulare tipico della classe delle ferredossine, ma caratterizzata dalla presenza all'N-terminale di un segmento di 11 residui non strutturato, abbiamo dimostrato, a livello atomico, che la proteina posta in condizioni sperimentali che favoriscono l'aggregazione mantiene la struttura nativa così come gli aggregati prefibrillari a basso peso molecolare. I nostri studi rivelano inoltre come sia la dinamica della proteina, studiata attraverso misure NMR di scambio idrogeno/deuterio, a subire le maggiori variazioni in funzione di condizioni sperimentali in grado di favorire o meno i processi aggregativi. L'analisi accoppiata di fibrillogenesi e misure NMR ha permesso quindi di individuare nel segmento non strutturato N-terminale, nelle regioni apicali che coinvolgono gli strands S4 e S5 e nel loop che li connette le regioni coinvolte nelle interazioni intermolecolari all'interno degli aggregati nativi.

STABILIZZAZIONE DELLA TRANSTIRETINA E PREVENZIONE DEL MISFOLDING: NUOVE PROSPETTIVE PER IL TRATTAMENTO DELL'AMILOIDOSI DA TRANSTIRETINA

Palma, Patrizia Mangione

Dipartimento di Biochimica "A. Castellani", Via Taramelli 3B, 27100 Pavia

Amyloid Centre London UK

Il lavoro di caratterizzazione di due nuovi ligandi la transtiretina (1) è stato svolto in collaborazione con il gruppo del Prof Mark Pepys (Centre for Amyloidosis and Acute Phase Proteins, Division of Medicine, Royal Free Campus, University College London).

La transtiretina è una proteina omotetramerica la cui funzione fisiologica è quella di trasportare la tiroxina ed il retinolo, quest'ultimo presente in un complesso macromolecolare in cui la transtiretina interagisce con la proteina che lega il retinolo (RBP). Il misfolding della transtiretina è l'evento chiave che porta al rilascio delle subunità monomeriche responsabili della formazione di depositi fibrillari amiloidi. La transtiretina è infatti una proteina intrinsecamente amiloidogena associata all'insorgenza dell'amiloidosi cardiaca senile tipica dell'età avanzata. Le forme più severe sono comunque quelle ereditarie associate a varianti genetiche che si trasmettono con modalità autosomica dominante. Il quadro clinico è molto grave ed è caratterizzato da neuropatie periferiche ed autonome spesso associate a patologie cardiache o renali. La riduzione del precursore amiloidogenico è sicuramente la via più efficace per il trattamento delle patologie amiloidi. Nel caso della transtiretina, una proteina a sintesi prevalentemente epatica, l'unica terapia curativa è il trapianto di fegato che rimane comunque una possibilità terapeutica solo per quei pazienti per i quali la funzione cardiaca e neurovegetativa non sono compromesse. Un'altra strategia attivamente perseguita è quella rivolta alla ricerca di piccole molecole in grado di legare selettivamente la transtiretina occupando i siti di legame per la tiroxina con l'effetto di stabilizzare la proteina nella sua conformazione nativa tetramerica prevenendone così la dissociazione in monomeri e l'aggregazione patologica. Una di queste molecole, tafamidis, identificata dal gruppo di Jeff Kelly e prodotta dalla compagnia americana FoldRx Pharmaceuticals, e' già entrata in fase II/III della sperimentazione clinica. Sulla base delle caratteristiche della struttura e funzione dei più efficaci composti monovalenti leganti la transtiretina, abbiamo disegnato due molecole palindrome appartenenti alla classe delle bisarilammine, mds 84 e 4ajm15. I due composti, che differiscono solo per la lunghezza del linker che unisce i due nuclei aromatici, legano la transtiretina in condizioni native occupando entrambi i siti di legame per la tiroxina; i due ligandi spiazzano la tiroxina marcata con ¹²⁵I non solo dalla proteina in buffer ma anche dalla proteina presente nel siero umano completo. L'analisi di spettrometria di massa ha dimostrato che i composti legano la proteina wild type formando un complesso equimolecolare anche quando la transtiretina viene preventivamente saturata con il complesso retinolo-RBP. Stesso comportamento viene osservato tra i ligandi e due varianti patologiche della proteina, Val30Met e Leu55Pro; è da sottolineare che in presenza di wild type e variante mds84/4ajm15 sembrano legare preferenzialmente la forma mutata della proteina.

Lo studio della cinetica di associazione e dissociazione del complesso ha dimostrato che il legame ligando/proteina si instaura nel giro di pochi secondi ed è virtualmente irreversibile. L'effetto di mds84/4ajm15 sulla stabilità della proteina è notevole, infatti il legame alla proteina: 1. inibisce completamente lo scambio tra le subunità; 2. stabilizza la transtiretina nella sua forma tetramerica anche in condizioni acide che tipicamente favoriscono il misfolding; 3. stabilizza il tetramero in campioni di siero umano sottoposto a denaturazione per trattamento con urea con un effetto marcatamente superiore a quello di altri composti già in terapia (diflunisal) o in sperimentazione clinica (tafamidis). I nuovi ligandi inibiscono efficacemente l'aggregazione *in vitro* della proteina wild type e della sua variante patologica più aggressiva, Leu55Pro. Da segnalare inoltre che i due composti non inibiscono le cicloossigenasi, sono biodisponibili dopo somministrazione orale e

presentano un profilo farmaco-cinetico molto favorevole, sicuramente ottimi requisiti per lo sviluppo di nuove terapie farmacologiche per il trattamento dell'amiloidosi da transtiretina.

1. *Kolstoe SE, Mangione PP, Bellotti V, Taylor GW, Tennent GA, Deroo S, Morrison AJ, Cobb AJA, Coyne A, McCammon MG, Warner TD, Mitchell J, Gill R, Smith MD, Ley SV, Robinson CV, Wood SP and Pepys MB. Trapping of palindromic ligands within native transthyretin prevents amyloid formation. Submitted to Proc Natl Acad Sci USA*

METODI COMPUTAZIONALI PER LO STUDIO DEL MISFOLDING PROTEICO: INTERAZIONE TRA L'AMILOIDE BETA E LA REGIONE NTERMINALE DEL PRIONE UMANO

Adriana Pietropaolo

Il misfolding di proteine coinvolge il raggiungimento di stati non nativi termodinamicamente stabili. Lo studio della struttura secondaria e i fattori chimico-fisici che la determinano sono dunque cruciali per la piena comprensione del fenomeno. Recentemente è stato presentato un algoritmo per l'assegnazione della struttura secondaria basato sulla chiralità locale delle proteine (Pietropaolo et al Proteins 2008, 70, 667). Uno sviluppo del metodo sull'intero database delle proteine ha permesso di descrivere la struttura nativa/non nativa attraverso la stima di free-energy ed interpretare così i diversi stati proteici. Come applicazione viene presentato lo studio dell'interazione tra l'amiloide beta e la regione N-terminale del prione umano.

GLI OLIGOMERI DELLA PROTEINA MODELLO HYPF-N INIBISCONO LA PLASTICITÀ SINAPTICA IN MANIERA SIMILE A QUELLI DEL PEPTIDE β -AMILOIDE (1-42)

Francesca Tatini¹, Anna Maria Pugliese², Fabrizio Chiti¹

¹*Dipartimento di Scienze Biochimiche, Università di Firenze.*

²*Dipartimento di Farmacologia, Università di Firenze.*

Molte proteine o peptidi, a seguito di un errato meccanismo di folding, possono convertirsi in aggregati oligomerici, che in seguito possono evolvere in fibrille amiloidi. Questi aggregati proteici sono coinvolti nella patogenesi di molte malattie dell'uomo, alcune delle quali interessano il sistema nervoso, come il morbo di Parkinson e il morbo di Alzheimer.

Gli aggregati oligomerici che si formano durante il processo di fibrillogenesi sono ritenuti la principale specie patogena in molte malattie da deposizione amiloide. Gli oligomeri del frammento 1-42 della proteina β -Amiloide ($A\beta_{1-42}$) hanno un ruolo significativo nella patogenesi dell'Alzheimer, inibendo il Potenzamento a Lungo Termine (LTP)¹ e determinando alterazioni a livello delle spine dendritiche, rilevabili anche mediante la colocalizzazione degli oligomeri con marcatori sinaptici².

Il dominio N-terminale del fattore di maturazione delle idrogenasi di *E. coli* (HypF-N) è una proteina che può evolvere, in opportune condizioni sperimentali, verso fibrille che risultano morfologicamente, tintorialmente e strutturalmente simili a quelle formate da proteine coinvolte in patologie^{3,4}. HypF-N è anche in grado di produrre due diverse specie oligomeriche, una delle quali è tossica in colture cellulari endoteliali e di neuroblastoma mentre l'altra non ha alcun effetto⁵.

Fino ad ora la tossicità del primo tipo di oligomeri di HypF-N è stata osservata con sonde generiche di tossicità, quali il test MTT, l'aumento di Ca^{2+} e ROS intracellulare, l'attività della caspasi-3, etc. Il nostro interesse si è adesso focalizzato nel chiarire se il pattern di tossicità neurologica della specie tossica fosse sovrapponibile a quello di $A\beta_{1-42}$ e se i due oligomeri di HypF-N avessero un diverso effetto sui fenomeni di tossicità ritenuti specifici di $A\beta_{1-42}$. In particolare abbiamo valutato l'effetto sull'LTP nella regione CA1 di fettine di ippocampo di ratto e la localizzazione di queste diverse specie in relazione alle sinapsi in colture primarie di neuroni ippocampali di ratto. I nostri esperimenti mostrano che gli oligomeri tossici inibiscono l'LTP e colocalizzano con le densità post-sinaptiche (PSD) mentre gli oligomeri non tossici non hanno questi effetti.

Questi risultati mostrano che oligomeri diversi hanno effetti diversi sulla plasticità sinaptica associata con gli stadi precoci delle patologie neuropatiche da deposizione amiloide, come la malattia di Alzheimer, e che gli oligomeri formati da una proteina modello che non ha alcun legame con malattie umane possono riprodurre gli effetti specifici associati con il peptide $A\beta_{1-42}$.

¹ Selkoe, D.J. Soluble oligomers of the amyloid beta-protein impair synaptic plasticity and behavior. *Behav. Brain Res.* 192(1):106-130 (2004).

² Lacor, P.N. *et al.* Synaptic targeting by Alzheimer's-related Amyloid beta oligomers. *J. Neurosci.* 24(45):10191-200 (2004).

³ Chiti, F. *et al.* Solution conditions can promote formation of either amyloid protofilaments or mature fibrils from the HypF N-terminal domain. *Protein Sci.* 10(12):2541-7 (2001).

⁴ Relini, A. *et al.* Monitoring the process of HypF fibrillization and liposome permeabilization by protofibrils. *J. Mol. Biol.* 338(5):943-57 (2004).

⁵ Campioni, S. *et al.* A causative link between the structure of aberrant protein oligomer and their toxicity. *Nat. Chem. Biol.* 6(2):140-7 (2010).

Sessione
“Cellule Staminali e Medicina Rigenerativa”

PROGENITORI CARDIACI NELLO SVILUPPO NORMALE E PATOLOGICO.

Antonio Baldini

Istituto di Genetica e Biofisica "Adriano Buzzati Traverso" e Universita' Federico II, Napoli.

Le cardiopatie congenite rappresentano un gruppo eterogeneo di patologie in termini di eziologia e genetica. Appare sempre piu' evidente che almeno parte dei casi sono dovuti a mutazioni di geni che hanno un ruolo chiave durante lo sviluppo cardiaco attraverso funzioni nelle cellule progenitrici cardiache. Dunque, l'analisi di geni coinvolti nelle cardiopatie congenite puo' portare a nuove conoscenze nell'ambito della biologia delle cellule staminali.

Un esempio e' il gene *TBX1*, la cui mutazione causa diversi difetti di sviluppo, compreso difetti cardiaci, nell'uomo e nel topo. Attraverso esperimenti di gene targeting nel topo, abbiamo determinato che *Tbx1* ha un ruolo importante in una popolazione di progenitori cardiaci noti con il nome di Second Heart Field (SHF) localizzata nel mesoderma splancnico. Le cellule dell'SHF hanno le caratteristiche di cellule staminali cardiache tri-potenti in quanto hanno la capacita' di differenziarsi in cardiomiociti, endotelio e cellule muscolari lisce. Abbiamo determinato che *Tbx1* e' espresso in queste cellule tri-potenti dove ha la funzione di mantenere la proliferazione cellulare e inibirne il differenziamento. Abbiamo poi cercato di identificare il meccanismo/i attraverso il quale *Tbx1* favorisce la proliferazione e inibisce il differenziamento di progenitori cardiaci. Dati ottenuti recentemente in laboratorio indicano che *Tbx1* non solo regola l'espressione di *Fgf8* ma regola anche la risposta cellulare all'*Fgf8*. Dunque, l'effetto pro-proliferativo potrebbe essere secondario all'effetto positivo su *Fgf8*, che e' noto avere un effetto mitogenico. Per quello che riguarda l'effetto anti-differenziativo, abbiamo identificato almeno due meccanismi. Uno riguarda una interazione diretta (proteina-proteina) con *Smad1* che ha come conseguenza una modulazione negativa sul segnale BMP (il quale ha un effetto pro-differenziativo nei progenitori cardiaci). L'altro meccanismo si esplica attraverso una interazione diretta con il fattore trascrizionale serum response factor (SRF), un fattore essenziale per il differenziamento muscolare. Anche questa interazione si traduce in un effetto soppressivo della funzione di SRF, e quindi un effetto negativo sul differenziamento cardiomiocitico.

In conclusione, i nostri dati posizionano *Tbx1* in un ruolo critico per il mantenimento dello stato indifferenziato dei progenitori cardiaci dell'SHF attraverso interazioni con i segnali FGF e BMP, e attraverso la modulazione negativa del fattore di trascrizione SRF.

Queste informazioni costituiscono una nuova base di conoscenze per comprendere i meccanismi omeostatici di una popolazione di cellule progenitrici cardiache.

RIMODELLAMENTO DELLA CROMATINA E MODULAZIONE DELLA SENESCENZA DELLE CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI: RUOLO DEL GENE BRG1

Nicola Alessio^{1,2}, Tiziana Squillaro^{1,3}, Marilena Cipollaro⁴, Luigi Bagella^{1,2}, Antonio Giordano^{1,5,6} and Umberto Galderisi^{1,4}

- 1. Sbarro Institute for Cancer Research and Molecular Medicine, Center For Biotechnology, Temple University, Philadelphia, PA, USA.*
- 2. Dipartimento Scienze Biomediche, Università di Sassari.*
- 3. Genetica Medica, Università di Siena.*
- 4. Dipartimento Medicina Sperimentale, Seconda Università di Napoli.*
- 5. Dipartimento di Patologia Umana ed Oncologia, Università di Siena.*
- 6. Human Health Foundation, Spoleto.*

La senescenza di un organismo rappresenta il periodo in cui si verifica un calo lento e graduale di numerose funzioni vitali (invecchiamento), associato ad un declino fisico e psicologico. Lo studio di tale processo biologico è di particolare interesse in Italia, in quanto uno dei paesi con il maggior numero di anziani al mondo. Durante i processi di invecchiamento le nostre cellule staminali, cellule non specializzate dotate della singolare capacità di trasformarsi in qualunque altro tipo di cellula del corpo, perdono progressivamente la loro funzionalità e diventano esse stesse cellule invecchiate (senescenti). Studiare i processi molecolari coinvolti nell'induzione e nello sviluppo del processo di senescenza delle cellule staminali è particolarmente interessante. Normalmente tali cellule presiedono al riparo dei tessuti danneggiati, e pertanto un loro malfunzionamento contribuisce in maniera significativa all'invecchiamento dell'organismo.

Un particolare tipo di cellule staminali “le cellule staminali mesenchimali” (MSC) rivestono un ruolo chiave nell'organismo, in quanto oltre a dare origine a tessuti quali l'osso, la cartilagine ed il grasso, contribuiscono al riparo di molti organi prevenendo o rallentando i processi di invecchiamento.

Il nostro progetto di ricerca è incentrato sullo studio del gene BRG1, appartenente alla classe dei “rimodellatori della cromatina” e sul ruolo che tale gene riveste nel processo di senescenza delle MSC.

I rimodellatori della cromatina svolgono di fatto un ruolo chiave nella regolazione della funzione dei geni, essi infatti, agendo da “interruttori molecolari” possono attivare o reprimere il funzionamento di altri geni.

I nostri studi hanno già dimostrato che minime alterazioni nel funzionamento del gene BRG1 possono innescare la senescenza cellulare. Pertanto nell'immediato futuro ci proponiamo di identificare più in dettaglio i meccanismi molecolari responsabili di tali fenomeni.

La comprensione dei processi molecolari alla base della senescenza delle cellule staminali potrà essere utile per l'identificazione di nuovi bersagli terapeutici per il rallentamento dei processi degenerativi dell'organismo associati con l'invecchiamento.

RIPROGRAMMAZIONE GENETICA DI CELLULE SOMATICHE CON CITOPLASTI OOCITARI

Carlo Alberto Redi

Università di Pavia – Dip. Biologia Animale – lab Biologia dello Sviluppo

Nella ultima decade la concezione classica dello sviluppo embrionale per la quale vi è una progressiva restrizione della potenza differenziativa della cellula (dalla condizione di totipotenza dello zigote alla condizione terminalmente differenziata) è stata del tutto riconsiderata sulla base di quattro linee di evidenze:

- 1) Gli esperimenti di trasferimento nucleare che hanno dimostrato come il genoma di nuclei di cellule somatiche terminalmente differenziate possa essere geneticamente riprogrammato quando ha contatto del citoplasma oocitario;
- 2) la scoperta che alcune cellule staminali adulte possono differenziarsi in altri tipi cellulari, se esposte alle condizioni ambientali appropriate;
- 3) la capacità di ibridi cellulari e di estratti cellulari isolati da cellule embrionali e somatiche di diversa natura di riprogrammare l'espressione genica di altri tipi di cellule somatiche o dei loro nuclei isolati.
- 4) la induzione di pluripotenza grazie alla trasfezione di 4, 3, 2 geni di staminalità ed ancora più recentemente del solo prodotto proteico di alcune di queste combinazioni.

Al di là del valore teorico di queste quattro linee di sperimentazione, esse costituiscono quattro metodologie per l'ottenimento di cellule staminali.

L'uso della trasfezione di geni di staminalità e quello degli estratti cellulari (citoplasti) aumenta enormemente il numero di cellule che possono essere funzionalmente riprogrammate in coltura.

Diversi i vantaggi e gli svantaggi di queste due metodiche (saranno brevemente illustrati).

Ad oggi sono ancora sconosciuti i meccanismi e le molecole coinvolte nei processi di riprogrammazione nucleare. Mentre si stanno individuando sempre nuove piccole molecole capaci di indurre riprogrammazione genetica (si parla di una vera e propria chimica della riprogrammazione, vedi *Y. Xu, Y. Shi, S. Ding: A chemical approach to stem-cell biology and regenerative medicine. Nature 453:338 – 344, 2008; L. Anastasia, G. Pelissero, B. Venerando, G. Tettamanti: Cell reprogramming: expectations and challenges for chemistry in stem cell biology and regenerative medicine. Cell Death and Differentiation 17:1230–1237, 2010*), Ian Wilmut nel gennaio 2010 scrive un chiarissimo editoriale per indicare le linee strategiche della Biologia delle Cellule Staminali del “dopo Shinya Yamanaka” giungendo addirittura a cambiare il nome della rivista “Cloning and Stem Cells” in “Cellular reprogramming” (*I. Wilmut: A New Title and a New Focus: Cellular Reprogramming. Cellular Reprogramming 12:1, 2010*).

L'impiego dei citoplasti per la riprogrammazione genetica è una delle più promettenti strategie per giungere ad ottenere cellule iPS poiché pare molto efficace nel rimodellare la condizione epigenomica dei nuclei terminalmente differenziati che sono caratterizzati da marcature di metilazione difficilmente azzerabili (si veda *J.M. Polo et al., Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. Nature Biotechnology AOP, DOI: 10.1038/nbt1667, 2010; K. Kim et al., Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells, Nature AOP, DOI: 10.1038/nature09342, 2010*) e che costituiscono una “memoria epigenetica”, apparentemente il principale ostacolo alla completa induzione di pluripotenza.

Verranno brevemente illustrati i risultati delle: 1) colture di fibroblasti STO e NIH-3T3 in presenza di citoplasti da oociti competenti allo sviluppo embrionale (percentuali di riprogrammazione, ~0.003 - 0.04%, del tutto comparabili con quelle ottenibili da retrotrasfezione di geni di staminalità; induzione della espressione di Oct-4 e Rex-1 e della attività della fosfatasi alcalina); 2) analisi di spettroscopia infrarosso con trasformate di Fourier della differenziazione delle staminali embrionali nei primi sette giorni di coltura (cambiamenti di espressione genomica e traduzione di mRNA).

CELLULE STAMINALI E MEDICINA RIGENERATIVA CARDIOVASCOLARE: NUOVE PROSPETTIVE DA SINTESI CHIMICHE E STIMOLI FISICI

*Carlo Ventura (Professore Ordinario di Biologia Molecolare, Facoltà di Medicina, Università di Bologna)
Laboratorio di Biologia Molecolare e Bioingegneria delle Cellule Staminali – Istituto Nazionale di Biostrutture e Biosistemi – Università di Bologna. Dipartimento Cardiovascolare, Ospedale S. Orsola – Malpighi, Bologna.
Bioscience Institute, San Marino*

Le cellule staminali rappresentano elementi “pluripotenti” responsabili sia dello sviluppo di organi e apparati durante la vita embrionale, sia del mantenimento dell’integrità morfo-funzionale di alcuni tessuti nell’individuo adulto. Le potenzialità differenziative e di “autorinnovamento” delle cellule staminali hanno recentemente suggerito un nuovo approccio al danno tissutale, quello della “terapia cellulare”, aprendo la strada ad un nuovo ipotetico scenario, la cosiddetta “Medicina Rigenerativa”. Le aspettative generate sono immediatamente percepibili se si pensa all’enorme vantaggio che deriverebbe dalla cura, e forse guarigione, di patologie quali l’infarto miocardico, lo scompenso cardiaco, le gravi sofferenze vascolari dei pazienti diabetici, o dalla possibilità di contrastare il deterioramento cardiovascolare associato all’invecchiamento. Il successo della terapia cellulare dipenderà dalla comprensione dei meccanismi molecolari responsabili dell’induzione e del mantenimento di differenziamenti specifici nelle cellule staminali. L’identificazione di progenitori cardiaci in cellule staminali mesenchimali umane (hMSCs) può offrire promesse importanti per lo sviluppo di nuovi approcci in ingegneria tissutale e medicina rigenerativa cardiovascolare. Al riguardo, abbiamo sviluppato esteri misti di acido ialuronico, butirrico e retinoico (HBR), in grado di orchestrare il differenziamento di hMSCs in senso cardiovascolare (Ventura C. et al. *J Biol Chem.* 279, 23574, 2004; Ventura C. et al. *J Biol Chem* 282, 14243, 2007). In particolare, il trapianto di hMSCs precondizionate *ex vivo* con HBR in un modello *in vivo* di infarto miocardico acuto prodotto nel ratto ha portato ad un ripristino completo della contrattilità miocardica, assieme ad un aumento consistente della densità capillare coronarica. Questi effetti riparativi erano dovuti sia ad una attivazione mirata da parte dell’HBR di un programma trascrizionale cardio/vasculogenetico nelle hMSCs trapiantate, sia ad una stimolazione “paracrina” dell’angiogenesi indotta nel tessuto ricevente da fattori di crescita secreti dalle stesse hMSCs in risposta al pretrattamento con l’estere misto.

Recentemente, siamo riusciti a rigenerare cuori di ratto sottoposti ad infarto sperimentale con la sola iniezione intracardiaca di HBR, senza ricorrere al trapianto di cellule staminali. La somministrazione di HBR ha indotto la formazione di nuovi vasi coronarici e ha ridotto notevolmente sia la mortalità cellulare cardiaca, sia l’estensione della cicatrice infartuale, normalizzando l’assetto metabolico del tessuto miocardico. L’HBR ha inoltre causato un reclutamento nell’area infartuale di cellule staminali endogene provenienti dal midollo osseo.

La possibilità di utilizzare l’HBR come “segnale di sopravvivenza e riparazione cardiovascolare” apre nuove prospettive nella medicina rigenerativa. Infatti, le cellule staminali rappresentano una speranza per la rigenerazione di cuori danneggiati che l’utilizzo della molecola HBR contribuirà a rendere ancora più concreta. Gli attuali ostacoli all’impiego di staminali per questa patologia sono la scarsa vitalità delle cellule staminali trapiantate e il loro incerto destino differenziativo *in vivo*. Inoltre, i tempi tecnici necessari a far moltiplicare queste cellule *ex vivo* prima del trapianto determinano un ritardo nell’effettuare l’impianto delle staminali anche di alcune settimane, quando il danno miocardico dovuto alla cicatrice infartuale, ormai formata, compromette la contrattilità del cuore. La tempestiva somministrazione intracardiaca di HBR potrebbe servire da soccorso immediato e duraturo, in grado di trasformare rapidamente l’ambiente ostile del tessuto ischemico in un “contesto” più incline al reclutamento di cellule staminali endogene, a cui far seguire un

trapianto di staminali adulte trattate in laboratorio con la stessa molecola (Hyaluronan mixed esters of butyric and retinoic acid affording myocardial survival and repair without stem cell transplantation. Lionetti V, Cantoni S, Cavallini C, Bianchi F, Valente S, Frascari I, Olivi E, Aquaro GD, Bonavita F, Scarlata I, Maioli M, Vaccari V, Tassinari R, Bartoli A, Recchia FA, Pasquinelli G, and Ventura C. *J Biol Chem* **285**, 9949-9961, 2010).

Da questi risultati si potrebbe arguire che le cellule staminali siano in grado di rispondere esclusivamente a stimoli chimici capaci di influenzare l'espressione genica e reti di segnali molecolari. Tuttavia, abbiamo recentemente dimostrato come campi magnetici pulsati a frequenza estremamente bassa (ELF-MF) siano in grado di trasformare cellule staminali embrionali murine in cellule miocardiche, aumentando la trascrizione di geni cardiogenetici e cardiospecifici (Ventura C. et al. *FASEB J.* express article 10.1096/fj.04-2695fje). Pertanto, il destino delle cellule staminali può essere anche guidato da stimoli fisici. In questo contesto, in collaborazione con il Prof. Jmaes K. Gimzeski del "Department of Chemistry and Biochemistry, at the University of California, Los Angeles, USA" stiamo integrando tecnologie sviluppate su scala nanometrica, quali la microscopia a forza atomica (AFM) e la sonocitologia (Pelling AE et al. *Science* **305**, 1147, 2004) con approcci di biologia molecolare e cellulare. Il risultato atteso è quello di individuare gli eventi "nanomeccanici" che sottendono al "riconoscimento biomolecolare" responsabile di specifici processi differenziativi staminali. Una simile strategia potrebbe avere notevoli implicazioni nello sviluppo della medicina rigenerativa, consentendo sia una comprensione degli intimi meccanismi responsabili di processi differenziativi complessi, sia l'ottenimento di rese estremamente elevate di differenziamento cardiovascolare in cellule staminali di diversa tipologia.

Sessione
“Ricerca Oncologica: dal Laboratorio alla Clinica”

SVILUPPO NANOTECNOLOGICO DELL'ACIDO ZOLEDRONICO: DA AGENTE RIMINERALIZZANTE OSSEO A FARMACO ANTI-TUMORALE

A. Abbruzzese & M. Caraglia

Dipartimento di Biochimica e Biofisica, Seconda Università di Napoli

L'acido zoledronico (ZOL) appartiene alla classe dei nuovi bisfosfonati contenenti azoto (NBP) che sono utilizzati per il trattamento delle complicanze derivate dalle metastasi ossee cosiddetti skeletal related events (dolore, fratture spontanee, necessità di radioterapia sull'osso etc.) e per la prevenzione dell'osteopenia indotta dal trattamento farmacologico anti-tumorale (ormonoterapia nel carcinoma della mammella e della prostata).

Tuttavia a tutt'oggi lo ZOL non ha trovato alcun impiego come farmaco ad attività anti-tumorale ed anche la sua capacità di ridurre la crescita della neoplasia nell'osso non è mai stata pienamente dimostrata questo anche per i limiti di rilevazione radiologica delle metastasi ossee. Inoltre non è stato mai dimostrato un vantaggio di sopravvivenza dei pazienti trattati con NBP rispetto a quelli non trattati se si eccettua il lavoro di M. Gnant et al (N Engl J Med. 2009 Feb 12;360(7):679-91) che dimostra un vantaggio di sopravvivenza nel setting adiuvante del carcinoma mammario ormono-dipendente. D'altra parte non sono mai stati dimostrati effetti dello ZOL sulla riduzione della massa tumorale e nel determinare risposte cliniche se non in casi sporadici riferiti dalla letteratura (Kijima et al. Int J Urol. 2008 Jun;15(6):546-7; Okamoto et al. Ann Oncol. 2009 Apr;20(4):796-7; Boudou-Rouquette et al. Ann Oncol. 2009). Tali limiti degli NBP e dello ZOL in particolare sono quasi del tutto dovuti al loro particolare profilo farmacocinetico. Infatti c'è una rapida eliminazione dello ZOL dal plasma dovuta alla sua escrezione renale che avviene in parallelo ad un rapido e sostenuto accumulo nell'osso dovuto al suo particolare osteo-tropismo. Una dose intravenosa di 4 mg di ZOL risulta in una rapida diminuzione della sua concentrazione, con una distribuzione e un'emivita plasmatica di 15 min ($t_{1/2}$) e 105 min ($t_{1/2\beta}$), rispettivamente. La concentrazione plasmatica massima (C_{max}) di ZOL è circa di 1 μ M che è 10-100 volte inferiore a quella richiesta negli studi *in vitro* per indurre inibizione proliferativa di linee di cellule tumorali; inoltre circa il 55% della dose somministrata inizialmente è trattenuta nello scheletro ed è lentamente rilasciata in circolo (M. Caraglia et al. Endocrine-Related Cancer 2006).

Alla luce di queste considerazioni, è evidente l'interesse a poter disporre di formulazioni contenenti ZOL che consentano di ridurre la sua affinità per l'osso, con una più lunga emivita in circolo ed una maggiore probabilità di colpire i tumori periferici in modo da poterle applicare al trattamento di forme tumorali a localizzazione diversa dall'osso.

A tale scopo abbiamo disegnato e preparato una nuova formulazione di ZOL incapsulato in nanovettori liposomiali pegylati (PEG-LIPOZOL) o non (LIPO-ZOL). L'incapsulazione nei liposomi di circa 100 nm di diametro permette il prolungamento della emivita plasmatica dello ZOL e l'attraversamento dei soli capillari fenestrati che sono tipici della neo-angiogenesi tumorale (effetto EPR). Inoltre l'aggiunta del polietilenglicole permette ai liposomi di sfuggire all'opsonizzazione da parte delle cellule del sistema reticolo-endoteliale. Abbiamo confrontato la citotossicità dello ZOL con quella indotta da PEG-LIPOZOL e LIPO-ZOL in diverse linee cellulari tumorali in coltura di diversa istogenesi. Abbiamo rilevato un incremento della inibizione proliferativa indotta da PEG-LIPO-ZOL mentre l'inibizione di crescita indotta da LIPO-ZOL in tutte le linee cellulari saggiate era pari a quella indotta dallo ZOL non incapsulato in liposomi. Il fattore di potenziamento (ovvero il rapporto tra la concentrazione di PEG-LIPO-ZOL o LIPO-ZOL capace di inibire del 50% la proliferazione e quella equipollente di ZOL) era compreso sempre tra da 5 e 20 volte per il PEG-LIPO-ZOL (Tab. 1) mentre era sempre pari a 1 per il LIPO-ZOL. Sulla base di tali dati abbiamo valutato l'attività del PEG-LIPO-ZOL in vivo su cellule di carcinoma prostatico o mieloma multiplo (MM) umani xeno-trapiantati in topi nudi. Abbiamo rilevato un significativo incremento della sopravvivenza sia nei topi xeno trapiantati con tumori derivati da MM che da carcinoma prostatico con un corrispondente incremento della inibizione della crescita

dei tumori rispetto a quella ottenuta con la somministrazione di ZOL libero. Simili dati sono stati anche ottenuti attraverso l'impiego di un'altra formulazione costituita ZOL incapsulato in nanoparticelle pegylate auto assemblanti. Anche in questo caso è stato ottenuto un incremento significativo della riduzione della crescita del tumore ed un aumento della sopravvivenza degli animali xeno-trapiantati con cellule di carcinoma prostatico umano in confronto allo ZOL libero.

Cell lines	ZOL libero	PEG2LipoZOL	P.F.	PEG20LipoZOL	P.F.
Prostata					
PC3	10	7	1.4	5	2
DU145	34	5	6.8	7	4.8
LNCaP	18	4	4.5	6	3
Mammella					
MCF7	48	5	9.6	12	4
MDA-MB468	10	6	1.7	5	2
CG5	295	152	1.9	230	1.2
Rene					
Caki2	192	200	0.96	190	1
769P	10	0.5	20	1.5	6.7
Melanoma					
M14	48	4	12	8	6
M14+	20	2	10	2	10
Testa/collo					
KB	10	8	1.25	5	2
Polmone					
H1355	48	8	6	30	1.6
Pancreas					
BXPC3	28	7	4	6	4.7
Mieloma multiplo					
RPMI	192	24	8	96	2
KMS	5	1	5	1	5
DOX	65	90	0.7	20	3.25
OPM2	120	96	1.25	96	1.25

Tabella 1. Concentrazioni (μ M) inibenti la proliferazione del 50% (IC:50) e fattori di potenziamento (P.F.) in linee cellulari tumorali umane di differente derivazione istologica. PEG2LipoZOL: ZOL incapsulato in liposomi con il 2 % di PEG; PEG20LipoZOL: ZOL incapsulato in liposomi con il 20 % di PEG. Gli studi in vivo hanno dimostrato un'attività anti-proliferativa superiore del PEG20LipoZOL rispetto a quella indotta da PEG2LipoZOL anche se la differenza non raggiungeva la significatività statistica.

Questi dati suggeriscono da un lato lo studio della bio-distribuzione e farmacodinamica dello ZOL incapsulato nei liposomi e dall'altro il rapido sviluppo clinico di tali formulazioni nel trattamento del carcinoma prostatico e MM.

CELLULE STAMINALI E MEDICINA RIGENERATIVA PER IL SISTEMA NERVOSO: PROBLEMI SOTTOSTIMATI E NUOVE SOLUZIONI

Laura Calzà

CIRI Scienze della Vita e Tecnologie per la Salute, Università di Bologna

La riparazione spontanea del sistema nervoso è un fenomeno modesto, che si esplica efficacemente solo per le lesioni demielinizzanti della guaina mielinica. Anche in questo caso, nella malattia demielinizzante più comune, la sclerosi multipla, questo processo è funzionalmente efficace solo nelle fasi iniziali, per poi risultare inadeguato e incapace di contrastare la progressione della malattia e la comparsa di lesioni della componente neurale, alla base della invalidità cronica. La possibilità di utilizzare cellule indifferenziate, fra cui le staminali per la riparazione di lesioni acute e croniche, rappresenta quindi una prospettiva scientifica e terapeutica di straordinario interesse. Ma la possibilità di successo di questi approcci, siano essi intesi come rigenerativi che, forse più realisticamente, come riparativi, passa attraverso la chiarezza su alcuni problemi talora sottostimati. In questa presentazione saranno trattati alcuni di questi punti, ed in particolare:

1. Quali lesioni riparare con terapia cellulare: acute o croniche? Parlare genericamente di “degenerazione neuronale” significa accomunare processi assai diversi in termini di patogenesi, quali la degenerazione acuta a seguito di danno vascolare (come accade nello “stroke” e in lesioni traumatiche) e lesioni croniche progressive, quali le degenerazioni neuronali nella malattia di Parkinson o nella demenza di Alzheimer. Sarà discusso il ruolo dell’infiammazione nella regolazione della biologia delle cellule staminali neurali endogene e nella regolazione del destino di cellule esogene, con riferimento a condizioni acute e croniche.
2. Riparare e/o proteggere attraverso le staminali endogene. Il cervello adulto contiene almeno due aree neurogeniche, che garantiscono il turnover fisiologico di popolazioni neuronali del bulbo olfattorio e del giro dentato dell’ippocampo. Una strategia alla quale si guarda con interesse è la possibilità di utilizzare queste riserve funzionali per modificare la storia naturale di sintomi cognitivi in malattie croniche, quali la demenza di Alzheimer e la sindrome di Down. Saranno discussi alcuni risultati relativi a trattamenti farmacologici, neurogenesi e performance cognitive in modelli animali di malattia di Alzheimer e sindrome di Down.
3. Homing, engrafting e colture 3D. Il trapianto di cellule staminali (o fetali) per la riparazione neurale è un approccio seguito da molto tempo. L’idea alla base del trapianto di cellule staminali, era che queste cellule potessero spontaneamente differenziare nel fenotipo richiesto, in funzione del microambiente nel quale venivano inserite. In realtà, questa visione un po’ semplicistica è stata negli anni smentita. Gli esperimenti di trapianto di cellule staminali in modelli di lesione acuta e cronica del sistema nervoso hanno anzi evidenziato che pochissime delle cellule trapiantate (o iniettate per via venosa) permangono nelle sede di lesione, e queste non mostrano alcuna tendenza differenziativa. Si discuterà della possibilità di mantenere nella sede di lesione un numero consistente di cellule staminali, attraverso approcci di ingegneria tissutale basati sull’impiego di scaffolds biologici e sintetici.
4. Proprietà paracrine. Alle proprietà paracrine di cellule staminali si guarda con crescente interesse per spiegare i modesti effetti protettivi anatomici e/o funzionali osservati dopo trapianto di diversi tipi di cellule staminali. Le cellule trapiantate sarebbero in grado di rilasciare fattori trafici, antiinfiammatori, angiogenici, neurotrofici, modificando in tal modo il microambiente della lesione e favorendo la protezione delle cellule nervose residue. Si discuterà del profilo paracrino di diversi tipi di cellule staminali umane e animali, e di come la coltura in dispositivi di ingegneria tissutale possa condizionarlo.

MODELLI ANIMALI BIOTECNOLOGICI PER LO STUDIO TRASLAZIONALE DI NUOVI FARMACI ONCOLOGICI

A. Maggi e P. Ciana

Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Università di Milano paolo.ciana@unimi.it

L'imaging molecolare non invasivo è un potente strumento di indagine biomedica che offre la possibilità di osservare e misurare eventi molecolari nella dimensione spazio-temporale ed in modo non-invasivo, negli organismi viventi. Durante più di dieci anni di attività il laboratorio ha generato sistemi per l'imaging di bioluminescenza di processi biologici generali quali l'apoptosi, la proliferazione (in collaborazione con l'Istituto Regina Elena, laboratorio Dr.ssa G. Piaggio) e l'arresto della crescita cellulare, nonché per l'imaging dell'azione molecolare di bersagli farmacologici specifici come il recettore estrogenico (ER) ed il recettore dell'attivatore della proliferazione dei perossisomi (PPAR). Attraverso diversi studi abbiamo dimostrato come l'applicazione dell'imaging molecolare a questi modelli transgenici consenta di valutare la successione nel tempo e nello spazio degli eventi molecolari che caratterizzano la condizione fisiologica (Ciana et al 2003, Lyons et al 2006) e la perdita di tale condizione durante il processo patogenetico (Stell et al 2008, Hsieh et al 2007). Inoltre, la possibilità offerta dai nostri modelli di misurare l'attività di bersagli farmacologici nella dimensione spazio-temporale, consente una analisi preclinica innovativa di composti ad attività terapeutica, permettendo di combinare in un unico studio le informazioni tradizionalmente ottenute dagli studi di farmacocinetica, farmacodinamica e tossicologia (Maggi e Ciana 2005, Biserni et al 2008, Rando et al 2010).

Le metodologie di studio sviluppate si basano sulla generazione di topi geneticamente modificati con sistemi reporter e sull'uso di substrati bioluminescenti che permettono la misurazione degli eventi molecolari attraverso l'imaging multimodale di bioluminescenza, di fluorescenza e di tomografia ad emissione di positroni (PET). Dopo un'ampia validazione degli strumenti sviluppati volta a dimostrare che i sistemi reporter sono in diretta relazione con l'evento misurato, tali strumenti sono attualmente applicati allo studio del processo di carcinogenesi mammaria nel topo.

I risultati presentati forniscono una chiara evidenza che attraverso i modelli di topo reporter è possibile visualizzare molto precocemente i cambiamenti molecolari che intervengono durante la progressione neoplastica, anticipando ampiamente i cambiamenti fenotipici che caratterizzano la trasformazione tumorale.

Lo studio ha permesso inoltre di dimostrare che è possibile visualizzare lo stato di attivazione del bersaglio farmacologico (ER) e di funzioni biologiche correlate con la carcinogenesi (proliferazione, apoptosi o infiammazione) nel tempo e quindi cogliere la dinamica delle variazioni più significative che avvengono durante il processo di carcinogenesi; tale analisi comprende tutti i tessuti del corpo e non solo quello interessato dalla neoplasia, fornendo una visione globale "olistica" del processo. Crediamo che questo nuovo approccio se opportunamente integrato con dati di biologia dei sistemi possa fornire una completa caratterizzazione della riprogrammazione genetica che interviene nella carcinogenesi mammaria con la possibilità di identificare nuovi marcatori per la stadiazione tumorale e nuovi bersagli farmacologici per la terapia.

Bibliografia

- Biserni A, Giannessi F, Sciarroni AF, Milazzo FM, Maggi A, Ciana P. *Mol Pharmacol.* 2008, May;73(5):1434-43.
- Ciana P, Raviscioni M, Mussi P, Vegeto, E, Que I, Parker MG, Lowik C and Maggi A *Nature Medicine* 2003, 9 (1): 82-86.
- Hsieh CL, Xie Z, Yu J, Martin WD, Datta MW, Wu GJ, Chung LW. 2007, May 15;67(7):685-91.
- Lyons SK, Lim E, Clermont AO, Dusich J, Zhu L, Campbell KD, Coffee RJ, Grass DS, Hunter J, Purchio T, Jenkins D. *Cancer Res.* 2006 May 1;66(9):4701-7.
- Maggi A, Ciana P. *Nat Rev Drug Discov.* 2005, Mar;4(3):249-55.
- Rando G, Horner D, Biserni A, Ramachandran B, Caruso D, Ciana P, Komm B, Maggi A. *Mol Endocrinol.* 2010, Apr;24(4):735-44.
- Stell A, Biserni A, Della Torre S, Rando G, Ramachandran B, Ottobrini L, Lucignani G, Maggi A, Ciana P. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007, 39(7-8):1288-96.

RICERCA SPERIMENTALE E RICERCA INDUSTRIALE IN AMBITO ONCOLOGICO: IL NODO DEL TRASFERIMENTO TECNOLOGICO

Leo Izzi

Euroclone SpA – Pero (MI)

R&D and Strategic Marketing Manager

La relazione tra Ricerca Sperimentale e Ricerca Industriale rappresenta un passaggio determinante nella realizzazione di innovazione e competitività economica. Tra le due tipologie di attività vi è una componente definita ‘trasferimento tecnologico’ che viene variamente interpretata a seconda della provenienza dell’operatore. In altre parole, se i documenti redatti per tale trasferimento derivano dalla ricerca sperimentale gli stessi, almeno nell’ambito del comparto Life Science, definiscono in genere la composizione di un prodotto o fanno riferimento ad un brevetto. La documentazione utile, vista dal punto di vista della Ricerca Industriale o sviluppo precompetitivo, assume altre connotazioni, legate a procedure analitiche atte alla definizione di parametri chimico-fisici, a volte non riscontrabili nei report della Ricerca Sperimentale.

Il termine trasferimento tecnologico assume, in tal modo, una connotazione di “zona grigia” con diversi idiomi e con notevoli difficoltà nel trasformare eventuali ricerche innovative in prodotti ad alto contenuto tecnologico. La rilevante produzione scientifica di alto livello, anche in campo oncologico, necessita invece di un supporto definito e condiviso per tale attività, che assume sempre di più la prerogativa di una area di lavoro nuova ed economicamente adeguata sia per le strutture di Ricerca e per i singoli ricercatori, sia per le aziende e, in definitiva, per il sistema economico in generale.

Il processo che porta ad un corretto trasferimento tecnologico rappresenta un momento essenziale per l’acquisizione di vantaggi economici in termini di finanziamento/autofinanziamento in quanto “ponte” tra le attività di ricerca e la realizzazione di prodotti (attività industriali). Un circuito “virtuoso” ideale è quello che si realizza attraverso la realizzazione di specifiche procedure e documenti da parte della componente ricerca, aggiuntivi rispetto alla descrizione brevettuale o metodologica, integrati con quelli derivati dall’attività della componente industriale. E’ chiaro che, quanto più completo è il file tecnico della componente ricerca, tanto più rapida diventa la realizzazione di un prodotto. Il circuito “virtuoso” che viene in tal modo attivato, mediante il corretto trasferimento tecnologico, permette la rapida realizzazione del prodotto e il trasferimento di risorse finanziarie (p.e.: sotto forma di royalties) alla Ricerca Scientifica da parte della componente Industriale. In tal modo si verificano e si realizzano i seguenti benefici per entrambe le componenti (Ricerca e Industria):

- Acquisizione di contratti di ricerca e, soprattutto, di sviluppo sperimentale da parte della componente Ricerca
- Realizzazione di prodotti proprietari innovativi da parte dell’Industria
- Ritorno, attraverso royalties alla componente Ricerca da parte dell’Industria

Il metodo di trasferimento corretto permette all’Industria di realizzare un vantaggio in termini di mercato/profitto, e alla componente Ricerca di ottenere un continuo ritorno in termini di finanziamento.

La presentazione cercherà di puntualizzare alcuni aspetti critici relativi al trasferimento tecnologico che sono molte volte di ostacolo alla realizzazione di un ritorno sull’investimento a partire da idee o sviluppo sperimentali.

Sarà poi presentata, dal relatore successivo, un esempio specifico su sviluppo sperimentale e trasferimento tecnologico di un test per l’analisi dell’over-espressione di geni candidati per diagnosi e prognosi del Tumore della Prostata.

SVILUPPO DI UN METODO IN REAL TIME PCR PER LA DIAGNOSI E LA PROGNOSE MOLECOLARE DEL CARCINOMA PROSTATICO UMANO

Federica Rizzi

Il tumore della prostata (CaP) rappresenta in Italia la neoplasia più frequentemente diagnosticata nel maschio adulto ed è la seconda causa di morte dopo il tumore del polmone. L'incidenza del CaP, che è pressoché raddoppiata negli ultimi dieci anni, è da mettere in relazione con due fattori rilevanti: l'invecchiamento progressivo della popolazione e l'aumento della pressione diagnostica (test del PSA, Antigene prostatico Specifico). La procedura diagnostica in uso è incentrata sulla misurazione del PSA totale sierico e sull'esame istologico di reperti biotici, prelevati dalle prostate di pazienti, nei quali un rialzo dei valori sierici di PSA (> 4 ng/mL di plasma) faccia nascere il sospetto di una neoplasia in corso. Si tratta quindi di un esame soggettivo, che dipende drammaticamente dall'esperienza e dall'abilità del medico refertatore. Poiché la trasformazione morfologica è la manifestazione fenotipica di una precedente e necessaria alterazione molecolare, la ricerca è da anni impegnata nell'identificazione di uno o più marker molecolari che in modo oggettivo, sensibile e riproducibile, possano essere usati nella diagnosi del carcinoma prostatico. Ad oggi nessun marcatore molecolare singolo è stato associato in modo soddisfacente alla identificazione di questa neoplasia. Le "gene signatures" (o firme di geni) sono usate nei pazienti per prevedere informazioni cliniche rilevanti per la gestione clinica, come la prognosi, il tempo di sopravvivenza o la sensibilità a protocolli chemioterapici in funzione del livello di espressione dell'mRNA di un certo numero di geni predittivi. Il nostro gruppo di ricerca ha individuato, mediante tecnica Northern Blot, un gruppo di 8 geni il cui livello di espressione risulta significativamente alterato nell'adenocarcinoma prostatico. Quattro di questi appartengono alla via del metabolismo delle poliammine: ODC, OAZ, AdoMetDC, e SSAT; 2 geni, H3 e GAS1, sono rispettivamente marcatori della fase S e della fase G₀ del ciclo cellulare; GAPDH è un enzima non regolatorio della via glicolitica; mentre CLU è un gene che codifica per una glicoproteina ubiquitaria, sovra-espressa nei processi di involuzione e rimodellamento della ghiandola prostatica e sotto-espressa nel tumore prostatico. I dati di espressione genica della firma molecolare sopra descritta, usati in combinazione con le informazioni clinico-patologiche tradizionali, consentono di predire con una accuratezza del 95% la ricorrenza di malattia in pazienti affetti da carcinoma prostatico organo-confinato (Bettuzzi, S. et al, Cancer Research 2003).

Sulla base di queste osservazioni preliminari abbiamo dato inizio ad un progetto di ricerca traslazionale per sviluppare un metodo, implementabile a livello industriale, per la diagnosi molecolare del carcinoma prostatico. Nello specifico ci siamo serviti del modello sperimentale del topo TRAMP (Transgenic Adenocarcinoma Mouse Prostate), per mettere a punto un protocollo "high throughput" per la misurazione mediante Real-Time PCR (q-RT-PCR) dei trascritti degli 8 geni informativi. Sulla base dei soli dati di espressione genica, opportunamente elaborati, è stato possibile non solo distinguere il tessuto murino prostatico sano da quello tumorale, ma sono stati anche correttamente classificati campioni di tessuto prostatico di animali responsivi al protocollo di chemioprevenzione con catechine del tè verde da quelli provenienti da animali resistenti alla chemioprevenzione (Scaltriti, M. et al, Carcinogenesis 2006). Confortati dai risultati ottenuti nel modello animale, l'attività di ricerca è proseguita su campioni di tessuto prelevati da prostate di pazienti sottoposti ad intervento prostatectomia radicale con l'obiettivo di:

- 1) mettere a punto un protocollo sperimentale per la misurazione dei trascritti degli 8 geni informativi mediante q-RT-PCR in tessuti prostatici umani cancerosi e benigni;
- 2) mettere a punto un metodo statistico per la classificazione dei tessuti sani e dei tessuti patologici, basato sui livelli di espressione acquisiti;
- 3) ottenere una stima della sensibilità e della specificità del metodo.

Nessuno dei geni considerati, preso singolarmente, può essere impiegato come marker affidabile della presenza di neoplasia, ma presi nel loro insieme i valori di espressione possono essere usati

con successo per la classificazione dei tessuti prostatici mediante la metodica statistica multifattoriale, denominata dei “primi vicini” o “Nearest Neighbour” (NN). Il metodo molecolare da noi implementato discrimina il tessuto tumorale da quello benigno e permette di diagnosticare il tumore della prostata con una accuratezza dell' $80 \pm 5\%$, una sensibilità del $81 \pm 6\%$ ed una specificità del $78 \pm 7\%$. La sub-classificazione dei tessuti tumorali in funzione del grado Gleason, ovvero del differenziamento istologico della neoplasia, risulta corretta per il 71% dei campioni considerati (Rizzi, F. et al, PLoS one 2009).

Lo studio, ancora in corso, prevede un follow-up di almeno 5 anni dello stesso gruppo di pazienti che ha lo scopo di confermare se la classificazione molecolare ottenuta al momento dell'intervento chirurgico possa fornire anche un'indicazione prognostica sulla ricorrenza della patologia neoplastica.

Qualora lo studio di follow-up confermasse una buona correlazione fra i valori di espressione genica misurati e la ricorrenza della malattia, questo metodo acquisirebbe una importante valenza prognostica in quanto capace di guidare la scelta delle migliori opzioni terapeutiche personalizzate. Rappresenterebbe pertanto un utile aiuto nella gestione clinica del paziente malato di carcinoma prostatico.

UTILIZZO DEGLI ENZIMI DI RIPARAZIONE DEL DANNO AL DNA NELLA TERAPIA ANTITUMORALE: L'ESEMPIO PARADIGMATICO DELLA PROTEINA MULTIFUNZIONALE APE1

Prof. Gianluca Tell

Professor of Molecular Biology

Department of Biomedical Sciences and Technologies

University of Udine

Piazzale Kolbe 4, 33100 Udine - ITALY

Tel.: +39 0432 494311; Fax +39 0432 494301

E-mail: gianluca.tell@uniud.it

Lo studio sempre più approfondito dei meccanismi molecolari e delle vie di trasduzione del segnale che regolano la proliferazione cellulare ha consentito l'accesso a pieno titolo, nell'arena clinica, delle terapie mirate contro il cancro.

Un numero sempre maggiore di evidenze dimostrano chiaramente che alcuni composti in grado di inibire l'attività degli enzimi chiave nel processo riparativo del DNA danneggiato possono essere efficacemente utilizzati nella mono-terapia antitumorale per trattare diversi tipi di tumore, evidenziando un significativo grado di specificità e mostrando scarsi effetti collaterali. Inoltre, poiché in alcune forme tumorali alcune vie di riparazione del DNA risultano alterate o inefficienti, la comprensione dettagliata e la possibilità prospettata di manipolare in maniera strategica i meccanismi di riparazione potrebbero migliorare l'efficacia di terapie basate sull'utilizzo dei comuni agenti di danno al DNA.

L'endonucleasi apurinic-apirimidinica 1, denominata APE1, è un enzima che gioca un ruolo essenziale nella via di riparazione del danno al DNA, qualora esso sia causato da ossidazione o alchilazione, mediante escissione della base (BER). Altrettanto importante è la funzione 'redox' di APE1, capace di mantenere allo stato ridotto e funzionalmente attivo alcuni fattori di trascrizione coinvolti nella promozione e progressione del processo tumorale (NF-kB, AP-1 e HIF-1 α). Recentemente nel nostro laboratorio è stato scoperto che APE1 svolge una nuova, fondamentale, funzione nel controllo del metabolismo del RNA. Tale scoperta apre la strada a importantissime ed innovative prospettive di carattere scientifico e applicativo per questa proteina multifunzionale.

Dati sperimentali pre-clinici e clinici indicano che APE1 riveste un ruolo determinante nella patogenesi del cancro e nel processo di insorgenza di resistenza ai trattamenti antitumorali, in particolare nel caso vengano somministrati agenti alchilanti monofunzionali e antimetaboliti. Recentissimi studi dimostrano inoltre che APE1 risulterebbe essere estremamente efficace nell'aumento della sensibilità delle cellule tumorali al trattamento chemioterapico. Se ne evince pertanto l'impellente necessità di comprendere in maniera approfondita i meccanismi molecolari che regolano finemente le diverse funzioni di APE1, allo scopo di poter trasferire questa proteina dal laboratorio al letto del paziente.

Lo scopo di questa presentazione è quello di fornire una visione aggiornata e completa, allo stato attuale degli studi condotti in laboratorio, sia dei molteplici ruoli assunti da APE1 sia della loro regolazione biologica e funzionale. Il tutto allo scopo di palesare il ruolo innovativo di questa proteina nella terapia antitumorale e di fornire una registrazione sincronica dello sviluppo di composti in grado di inibire in maniera selettiva ed efficiente le diverse funzioni di APE1.

Sessione
“Nanobioteconologie in biomedicina”

RILASCIO DI NANOPARTICELLE IN TUMORI SOLIDI: IMPLICAZIONI PER TERAPIA E DIAGNOSI

Filippo Causa – Università degli studi di Napoli “Federico II”

Il successo clinico di qualsiasi terapia sistemica del cancro dipende fortemente dal rilascio efficiente di agenti bioattivi. L'uso di nanotecnologie può fornire un valido strumento per valorizzare e migliorare l'efficienza di rilascio di molecole disponibili commercialmente per trattamenti terapeutici e, al tempo stesso, offre nuove prospettive nella rilevazione e nella terapia del cancro. Tuttavia, qualsiasi dispositivo o molecola somministrato per via sistemica deve superare una serie di barriere fisiologiche e fisiopatologiche prima di raggiungere la massa tumorale ed entrare in contatto con le sue cellule.

Pertanto la comprensione dei fattori biologici e fisici che regolano il trasporto vascolare e interstiziale di nano-oggetti ha un'importante implicazione nel controllo dello sviluppo di strategie atte a migliorare la penetrazione del farmaco nel tumore solido.

In questo intervento saranno presentati e discussi le barriere al trasporto di nanovettori più rilevanti, le tecniche sperimentali utilizzati per quantificarle e caratterizzarle insieme ai più recenti dati sperimentali sull'utilizzo delle nanotecnologie nel cancro in terapia e diagnosi.

NANOCOMPOSITI A MATRICE POLIMERICA BIODEGRADABILE PER L'INGEGNERIA TISSUTALE

*I. Armentano, M. Dottori, E. Fortunati, S. Mattioli, J.M. Kenny
Laboratorio di Scienza e Tecnologia dei Materiali e Unità di Ricerca INBB
Università di Perugia, Terni, Italy
e-mail: jkenny@unipg.it*

L'utilizzo di materiali polimerici, e in particolare di polimeri biodegradabili, costituisce da diversi anni una strategia affermata nella preparazione di strutture di supporto per la crescita cellulare, base dell'ingegneria tissutale. Recentemente questa strategia è stata ulteriormente sviluppata aggiungendo il concetto di multifunzionalità attraverso l'aggiunta di nanoparticelle che permettono lo sviluppo di nanocompositi polimerici con modulate proprietà meccaniche, termiche, elettriche, etc. per la preparazione di materiali di uso biomedico. L'acido polilattico (PLA), il poliglicolico (PGA) e il policaprolattone (PCL) sono alcune delle principali matrici polimeriche che hanno attratto l'attenzione dei ricercatori per le loro proprietà di biodegradabilità e biocompatibilità nel corpo umano. In particolare, l'introduzione di *nanofiller* organici e/o inorganici come idrossiapatite, nanoparticelle metalliche e nanostrutture di carbonio nei polimeri biodegradabili ha portato alla progettazione e realizzazione di nuovi biomateriali con proprietà avanzate. Le loro proprietà sono fortemente dipendenti dalla dimensione, contenuto, grado di dispersione e forma della nanostruttura dispersa e il miglioramento dell'adesione tra il polimero e le nanoparticelle è un punto chiave nella preparazione dei nanocompositi.

In questo lavoro saranno discussi i diversi risultati sulla progettazione di nanocompositi a matrice polimerica biodegradabile ottenuti grazie all'introduzione di diverse tipologie di *nanofillers*, mettendo in evidenza l'evoluzione e le potenzialità di questo approccio nell'ingegneria tissutale. In particolare si analizzeranno i materiali: i polimeri biodegradabili e le nanoparticelle organiche/inorganiche; l'interazione tra il polimero e la nanostruttura incluse le strategie per la preparazione di scaffold nanocompositi con pori interconnessi. Saranno analizzati anche la degradazione in-vitro, gli effetti del processo di sterilizzazione e delle modifiche superficiali sulle proprietà dei nanocompositi. Inoltre le proprietà dei nuovi biomateriali saranno messe in relazione al loro comportamento come supporti per l'adesione, la proliferazione e il differenziamento di cellule staminali. Nella Figura 1 si presenta, a modo di esempio, una fotografia ottenuta al microscopio elettronico che conferma l'interazione tra cellule staminali adulte e scaffold ottenuti per elettrofilatura di nanocompositi a base di acido polilattico e nanoidrossiapatite.

La combinazione tra polimeri biodegradabili e nanostrutture apre nuove e importanti prospettive nell'ingegneria tissutale in quanto permette la realizzazione di nanomateriali con proprietà meccaniche, termiche ed elettriche modulabili.

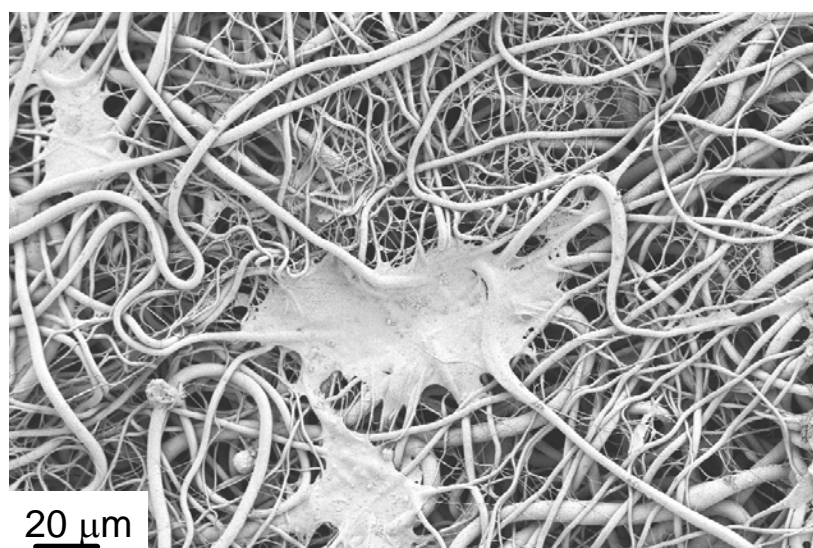


Figura 1: Immagine SEM dell'interazione tra cellule staminali adulte e matrice elettrofilate nanocomposite a base di acido polilattico e nanoidrossiapatite. Lavoro svolto in collaborazione con i gruppi della Prof. Bianco dell'Università di Roma TorVergata e del Prof. Orlacchio dell'Università di Perugia

Riferimenti bibliografici

1. Harrison BS, Atala A. Review, Carbon nanotube applications for tissue engineering, *Biomaterials* 2007; 28:344-353.
2. Shin H, Jo S, Mikos AG. Biomimetic materials for tissue engineering, *Biomaterials* 2003; 24:4353-4364.
3. Sun S, Titushkin I, Cho M. Regulation of mesenchymal stem cell adhesion and orientation in 3D collagen scaffold by electrical stimulus. *Bioelectrochem* 2006; 69:133141.
4. Pek YS, Wan ACA, Ying JY. The effect of matrix stiffness on mesenchymal stem cell differentiation in a 3D thixotropic gel. *Biomaterials* 2010; 31:385-391.
5. Armentano I, Dottori M, Fortunati E, Mattioli S., Kenny J.M. Biodegradable Polymer Matrix Nanocomposites For Tissue Engineering: A Review. *Polymer Degradation and Stability* 2010; 1-21. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2010.06.007.
6. Martino S, D'Angelo F, Armentano I, Tiribuzi R, Pennacchi M, Dottori M, Mattioli S, Caraffa A Cerulli GG, Kenny JM and Orlacchio A., a-C:H nanopatterned film designs drive human bone marrow mesenchymal stem cell cytoskeleton architecture, *Tissue Eng Part A* 2009;15:3139-3149.
7. Bianco, A., Del Gaudio, C., Baiguera, S., Armentano, I., Bertarelli, C., Dottori, M., Bultrini, G., Lucotti, A., Kenny, J.M., Folin, M., Microstructure and cytocompatibility of electrospun nanocomposites based on poly(ϵ -caprolactone) and carbon nanostructures, *International Journal of Artificial Organs* 2010; 33 (5), pp. 271-282

NANO-STRUTTURE DI BIOSSIDO DI TITANIO: POSSIBILI IMPIEGHI IN CAMPO BIOMEDICO

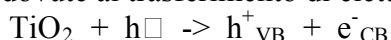
Adelio Rigo

Dipartimento di Chimica Biologica

Università di Padova

Il biossido di titanio è oggetto di vaste ricerche per le sue potenziali applicazioni nel campo della conversione dell'energia, della fotocatalisi e dei materiali biocompatibili. Per quanto riguarda quest'ultimo punto caratteristiche specifiche di questo materiale sono la non tossicità, la biocompatibilità, l'alta stabilità chimica e il costo relativamente basso.

Un'altra caratteristica peculiare del biossido di titanio è la formazione di lacune caratterizzate da un potenziale di ossidazione molto positivo quando il TiO_2 è illuminato con fotoni nel campo uv-Vis dovute al trasferimento di elettroni dalla banda di valenza a quella di conduzione:



Elettroni e lacune possono ricombinarsi, o essere intrappolati in stati superficiali metastabili, o reagire con composti elettrone-donatori o elettrone accettori. Ad esempio la reazione di h^+_{VB} e di e^-_{CB} con i gruppi $-\text{OH}$ presenti sulla superficie del TiO_2 ($>\text{TiOH}$) o con ossigeno molecolare può generare specie altamente reattive (ROS). Questi radicali sono estremamente reattivi e possono condurre alla completa mineralizzazione dei composti organici eventualmente presenti. L'insieme di queste caratteristiche delinea i possibili campi di applicazione delle nano strutture del biossido di titanio. In particolare in questi ultimi anni nano-particelle e nano-tubi ottenuti con differenti procedure sono stati utilizzati in campo biomedico. Tuttavia alcuni degli impieghi di queste nano-strutture di biossido di titanio sono preclusi dalla loro insolubilità: infatti questi materiali si presentano come macro-aggregati non solubili.

A partire da queste considerazioni sono state messe a punto delle procedure per l'ottenimento di soluzioni di queste nano strutture che nel caso dei nanotubi, ottenuti per fusione alcalina dell'anatasio, si sono rivelate stabili in un ampio intervallo di concentrazioni e di pH attorno a valori fisiologici mentre nel caso delle nano-particelle le soluzioni ottenute sono stabili solo a valori di pH inferiori a 3.

Per aumentare il campo dei possibili impieghi delle nano strutture di TiO_2 sono state depositate sulla loro superficie nano-particelle di metalli pesanti ed in particolare nano particelle di Au, Ag e Pt. Le caratteristiche spettrometriche e morfologiche delle varie strutture ottenute sono riportate e discusse dalla luce delle possibili applicazioni in campo biomedico.

NANOPARTICELLE E DRUG DELIVERY: VANTAGGI E RISCHI

Antonella Saija

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

Esiste un gran numero di esempi di applicazioni di successo delle nanoparticelle nel campo della medicina, in particolare per il drug delivery. In questo settore, infatti molte sostanze sono allo studio, soprattutto per quanto riguarda la terapia del cancro e delle patologie del sistema nervoso centrale; esse sono estremamente diverse nella natura chimica, includendo materiali di origine naturale (come albumina, gelatina e fosfolipidi) e non (come diversi polimeri e nanoparticelle contenenti metalli).

La progettazione di nanoparticelle per il drug delivery dovrebbe essere intesa, nell'ambito della nanomedicina, come lo studio di sistemi complessi in scala nanometrica, formati da almeno due componenti, dei quali uno è una sostanza farmacologicamente attiva (sebbene possano esistere formulazioni nanoparticolari del farmaco di per sè).

I principali scopi della ricerca in questo campo includono: un più specifico drug targeting e delivery; la riduzione della tossicità del farmaco a parità di effetto terapeutico; maggiore sicurezza e biocompatibilità; più rapido sviluppo di nuove medicine.

Problemi di base nella ricerca sulle nanoparticelle per il drug delivery sono quelli stessi che rappresentano un prerequisito per lo sviluppo di nuove formulazioni, includendo: l'incorporazione ed il release del farmaco; la stabilità e la shelf-life della formulazione; la biocompatibilità; la biodistribuzione; l'efficienza.

Le dimensioni estremamente piccole delle nanoparticelle ne permettono il passaggio attraverso le barriere biologiche nell'organismo. Dal punto di vista dei vantaggi, questo è positivo, specie se si pensa alla barriera emato-encefalica e quindi al drug delivery al SNC.

Ma le nanoparticelle possono penetrare anche all'interno delle cellule e all'interno di vari compartimenti cellulari incluso il nucleo. Se da una parte il design di nuove formulazioni basate su nanoparticelle può ridurre la tossicità e gli effetti collaterali del farmaco, c'è quindi un rischio, ancora sottodimensionato, per la potenziale capacità del sistema di veicolazione di indurre esso stesso effetti tossici.

Mentre sono numerosi gli studi condotti per valutare l'efficacia e l'utilità di formulazioni farmaceutiche basate su nanoparticelle, ci sono invece meno tentativi di valutarne i potenziali effetti tossici. Particolare enfasi infatti dovrebbe essere posta proprio sullo studio degli effetti tossici delle nanoparticelle vuote, cioè non caricate con il farmaco.

La nanotossicologia è una nuova scienza che può essere definita come quel campo della biomedicina che studia e cerca di comprendere i meccanismi e le vie attraverso cui le nanoparticelle possono interferire con l'organizzazione strutturale e funzionale dei sistemi biologici causando tossicità. Essa si propone quindi, tra l'altro, di sviluppare nuove metodologie di analisi sensibili e robuste per la valutazione del rischio di effetti tossici indotti da nanoparticelle per la salute dell'uomo.

Come già detto, è evidente che per le piccole dimensioni, comparabili con quelle dei meccanismi molecolari e degli organuli cellulari, le nanoparticelle possono facilmente attraversare la barriera biologiche dell'organismo e alterare le normali funzioni fisiologiche delle cellule e causare citotossicità. D'altra parte, le esperienze con l'asbesto e la silice ci hanno insegnato che le proprietà chimico-fisiche dei materiali sono determinanti fondamentali per il potenziale tossico di un agente.

Alla luce delle attuali conoscenze, più che la reale composizione e la purezza del materiale in questione, ai fini della possibile tossicità sono importanti varie altre caratteristiche delle nanoparticelle, in primo luogo le dimensioni, ma anche la forma, la cristallinità, la porosità, l'area della superficie, la solubilità, lo stato di dispersione e le caratteristiche chimiche superficiali.

Quali siano le dimensioni minime delle nanoparticelle che rappresentino un limite per la loro tossicità non è ancora del tutto noto, ma sembra che siano tra 65 nm e 200 nm. Studi in vitro su

colture cellulari hanno confermato la loro significativa capacità di produrre radicale e specie reattive dell'ossigeno (ROS) che possono essere responsabili di danno cellulare quindi sembrano rappresentare il principale fattore contribuente alla tossicità delle nanoparticelle. La membrana cellulare, i mitocondri e il nucleo cellulare sono i principali target della possibile tossicità da nanoparticelle. Alla luce di queste considerazioni, potrebbero essere considerate come ottimali le nanoparticelle biodegradabili che hanno una persistenza limitata nell'organismo.

Infine un secondo aspetto, comunque non trascurabile della tossicità delle nanoparticelle finalizzate al drug delivery, è rappresentato dalle modificazioni della biodisponibilità e della distribuzione del farmaco di per sé, conseguente alle caratteristiche del sistema carrier stesso.

In conclusione, alla luce della poca conoscenza della potenziale tossicità delle nanoparticelle e della scarsa comprensione dei meccanismi che sono alla base delle loro interazioni con le cellule e gli organismi viventi, appare necessario che nel futuro si sviluppi una stretta collaborazione tra ricercatori che lavorino rispettivamente nel campo del drug delivery e della tossicologia del particolato.

LE NANO STRUTTURE DI SILICIO COME PUNTO DI PARTENZA DI NUOVE STRATEGIE NEL MONITORAGGIO DI SEGNALI BIOLOGICI

Marina Scarpa

Dipartimento di Fisica, Università di Trento

marina.scarpa@unitn.it

La rivelazione veloce e ultrasensibile di molecole o segnali prodotti in ambiente biologico costituisce un obiettivo trasversale a molti settori di ricerca, sia per le nuove informazioni di base può fornire che per i diversi campi di applicazione a cui si presta, tra cui la diagnostica e i sistemi sensoristici avanzati.

Le vie che vengono seguite per rivelare molecole o segnali biologici sono molteplici, tuttavia le più recenti innovazioni sembrano sfruttare una strategia comune: la progettazione e modifica, fino al livello nanometrico, di una superficie che viene esposta all'ambiente dove molecola o segnale devono essere rivelati. Ne segue che, oltre alla messa a punto dei sistemi di trasduzione ed amplificazione dei segnali, diventa fondamentale sviluppare la superficie dove il segnale viene generato.

Il silicio cristallino è un materiale particolarmente adatto alla nano strutturazione e alla modifica superficiale. Si possono infatti produrre strutture tridimensionali su scala opportuna e ben controllata (micro-nanometrica) mediante procedure a secco e in soluzione. In particolare si possono sintetizzare o fabbricare mediante etching o macinazione ed eventualmente sonicazione, strutture quali il silicio poroso (pSi), le micropolveri di silicio, i nano cristalli di silicio. Questi materiali, oltre ad offrire una grande area superficiale, possiedono alcune proprietà peculiari. Infatti: a) si prestano a modifiche chimiche efficienti che forniscono interfacce ibride silicio/materiale organico b) permettono di realizzare dispositivi facilmente interfacciabili con la microelettronica c) sono ben tollerati dai sistemi viventi. Inoltre, quando le strutture di silicio sono di dimensioni nanometriche, emettono luminescenza nel visibile e IR.

In questa presentazione verranno esposti alcuni risultati ottenuti nei nostri laboratori utilizzando superfici ibride di silicio (o derivati inorganici del silicio come ossido e nitrato di silicio) e materiali organici. In particolare si discuteranno alcune interfacce ibride da noi realizzate (interfacce silicio, ossido di silicio, nitrato di silicio / materiali organici di varia natura) da utilizzarsi per la rivelazione di analiti, lo sviluppo di sensori ottici, il monitoraggio di eventi cellulari.

Sessione
“Interferenti Endocrini”

I PEROXISOME PROLIFERATOR ACTIVATED RECEPTORS (PPARS) POSSIBILI NUOVI BERSAGLI DELL'AZIONE DEGLI INTERFERENTI ENDOCRINI

Vittorio Colantuoni

Dipartimento di Scienze Biologiche e Ambientali, Facoltà di Scienze MM.FF.NN., Università degli Studi del Sannio, Benevento.

Gli interferenti endocrini (IE) sono contaminanti ambientali che esercitano effetti dannosi sulla salute e sul benessere degli uomini e degli animali attraverso un'alterazione delle funzioni endocrine.

Ftalati e bisfenoli sono tra i principali IE per la loro ampia diffusione; essi sono, infatti, utilizzati nella produzione di materie plastiche, cosmetici, profumi, vernici industriali, solventi, dispositivi medici e imballaggi per alimenti. Non essendo legati covalentemente alle matrici in cui sono incorporati, possono facilmente diffondere contaminando cibi, bevande ed ambiente.

Gli effetti tossici di ftalati e bisfenoli possono essere esplicitati attraverso una grande varietà di meccanismi, dall'interferenza diretta con l'azione ormonale a quella con i loro recettori nucleari, con conseguente alterazione del programma genico da essi regolato. Entrambe le classi di composti interferiscono con gli effetti degli ormoni sessuali avendo come bersaglio gli ormoni o i loro recettori. È noto, infatti, che alcuni ftalati (quali il DEHP) e alcuni bisfenoli (quali BPA, BPB e BPF) hanno una ben caratterizzata tossicità a livello delle gonadi e della ghiandola mammaria sia nello stadio fetale che nella vita post-natale. Il BPA è anche in grado di interferire con la maturazione degli oociti.

Recentemente altri recettori nucleari, quali i Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs), sono stati annoverati fra i bersagli di tali molecole, ampliando così il concetto di "interferenza endocrina".

La famiglia dei PPARs è composta dagli isotipi PPAR α , PPAR β/δ e PPAR γ che rappresentano dei veri e propri sensori lipidici operanti in differenti organi per regolare il metabolismo glicidico, lipidico, energetico, il differenziamento cellulare e la sensibilità all'insulina. Essi hanno quindi un ruolo centrale nella regolazione di diverse funzioni metaboliche. La possibilità da parte degli IE di interferire con i PPARs dipende in parte dall'ampia tasca di legame al ligando (LBD) che permette a tali recettori di accomodare molecole molto diverse per struttura e funzione fra cui plasticizzanti, pesticidi e solventi industriali. Gli effetti prodotti da queste sostanze sono molteplici e riguardano vari distretti, a seconda dell'isotipo coinvolto. L'attivazione patologica di PPAR α determina carcinogenesi epatica nei roditori, mentre quella di PPAR γ determina un aumento dell'adipogenesi con conseguente sviluppo di obesità e malattie metaboliche associate; infine, l'alterazione delle vie di segnalazione dei PPARs può avere anche effetti a carico degli organi riproduttivi e sullo sviluppo fetale.

Noi ci siamo proposti di verificare se alcuni ftalati e bisfenoli possano interferire con l'attività dei PPARs e di investigare i risultati di tali interferenze su cellule di derivazione intestinale. L'apparato gastrointestinale rappresenta, infatti, il primo distretto tissutale dell'organismo con cui queste sostanze vengono a contatto. A tale scopo, abbiamo eseguito esperimenti di trasfezione in transiente utilizzando un vettore di espressione codificante per i recettori PPAR α o PPAR γ e un gene reporter posto sotto il loro controllo trascrizionale. In cellule esposte a DEHP abbiamo osservato un aumento dell'attività del gene reporter concentrazione-dipendente. Entrambi gli isotipi analizzati sono stimolati da questo IE e l'induzione è bloccata dall'aggiunta di inibitori irreversibili. L'effetto agonistico del DEHP nei confronti di PPAR α e di PPAR γ si osserva anche sulla proteina endogena che, così attivata, va a stimolare la trascrizione di specifici geni bersaglio la cui espressione risulta aumentata. Inoltre, i recettori stessi subiscono, in sua presenza, il turnover tipico che si osserva in seguito al trattamento con un ligando specifico, come ad esempio il fenofibrato o il troglitazone, farmaci utilizzati in caso di ipertrigliceridemia e di diabete, che sono ligandi dell'isoforma α e γ ,

rispettivamente. Gli esperimenti sono stati estesi anche ai principali metaboliti del DEHP: DMP (di-metil-ftalato), MMP (mono-metil-ftalato) e PA (acido ftalico). I primi due, rispetto al precursore, mostrano un'azione agonistica fortemente ridotta nei confronti sia dei recettori esogeni che endogeni; questo dato è in linea con l'idea che essi si possano considerare prodotti di biorisanamento ("*bioremediation*") e cioè privi degli effetti tossici delle sostanze di partenza. Sorprendentemente, il PA, prodotto ultimo del catabolismo degli ftalati e ritenuto privo delle proprietà di IE, ha manifestato capacità di interazione con il recettore RXR, partner permissivo dei PPARs nella transattivazione genica. Anche questa inattesa attività di IE è stata determinata sia con esperimenti di trasfezione in transiente che con stimolazione del gene endogeno.

Abbiamo poi voluto investigare gli effetti del BPA sull'attività degli stessi recettori PPAR α e PPAR γ sempre mediante esperimenti di trasfezione in transiente. In questo caso si è osservato un effetto antagonista nei confronti di entrambe le isoforme recettoriali analizzate. Tale effetto è confermato sulle proteine endogene in quanto sia PPAR α che PPAR γ subiscono un progressivo decremento per esposizione a dosi crescenti di BPA. Tale riduzione è accompagnata da una parallela riduzione degli mRNA specifici, suggerendo un'interferenza diretta del BPA sulla trascrizione dei rispettivi geni. Conseguentemente, risultano ridotti anche alcuni geni bersaglio coinvolti nei processi di differenziamento, sopravvivenza e adesione cellulare.

Infine, sono stati condotti saggi funzionali per determinare gli effetti di DEHP, MMP, DMP, PA e BPA sulla proliferazione, la motilità e la sopravvivenza cellulare. Saggi di trypan blue exclusion, wound-healing e MTT hanno rivelato che il DEHP, agonista di PPAR α e PPAR γ , riduce la proliferazione e la motilità cellulare, inducendo invece l'apoptosi. MMP e DMP non hanno, invece, effetti significativi in termini di sopravvivenza e motilità, mentre il PA, ligando di RXR, determina un forte incremento della mortalità cellulare. Il BPA, infine, mostra un effetto opposto a quello osservato con gli ftalati, infatti esso determina un aumento della sopravvivenza, della proliferazione e della motilità cellulare.

Questi risultati suggeriscono che i PPARs possono essere considerati come nuovi possibili bersagli dell'azione di diversi IE e possono dare ragione di alcuni effetti non ancora chiariti espliciti da queste sostanze. I PPARs potrebbero, perciò, essere utilizzati sia per analizzare la tossicità di nuovi composti che per verificare il loro avvenuto biorisanamento.

INTERFERENTI DELLE AZIONI DEGLI ORMONI SESSUALI STEROIDEI: VALUTAZIONE DI UNA POSSIBILE DIFFERENTE SUSCETTIBILITÀ DIPENDENTE DAL SESSO

Maria Marino

Dipartimento di Biologia, Università Roma Tre, Viale Guglielmo Marconi 446, I-00146 Roma.

Gli studi condotti negli ultimi 20 anni hanno messo in evidenza i molteplici ruoli svolti dagli ormoni sessuali steroidei (androgeni ed estrogeni) nella fisiologia maschile e femminile, ruoli che vanno ben oltre la loro azione canonica di regolatori della funzione gonadica. Questi ormoni, infatti, in sinergia con alcuni prodotti genici, sono i principali responsabili del dimorfismo dei tratti anatomici, fisiologici e comportamentali che caratterizzano molte specie di vertebrati, uomo incluso. La letteratura disponibile include sia differenze morfologiche/strutturali riscontrate in diversi organi e sistemi che una più elevata suscettibilità agli effetti secondari dei farmaci nelle donne rispetto agli uomini. Sebbene diversi dati si stiano accumulando sulle differenze legate al sesso nella fisiologia e nella incidenza di alcune patologie, scarsa attenzione è stata rivolta alla possibilità che esista tra maschi e femmine una differente suscettibilità agli inquinanti ambientali ed, in particolare, ad una classe di sostanze presenti nell'ambiente classificate come interferenti endocrini.

Gli interferenti endocrini, definiti come 'sostanze esogene che causano effetti avversi alla salute negli organismi e nella loro progenie conseguenti alle variazioni della funzione endocrina', sono ampiamente presenti nell'ambiente e mostrano attività biologica a concentrazioni ben al di sotto della loro soglia di tossicità. Questi composti rappresentano un eterogeneo gruppo di sostanze nelle quali sono inclusi a) sostanze di sintesi usate nell'agricoltura, industria e nei prodotti di consumo (es. bisfenolo A, BPA); b) sostanze di sintesi usate come farmaci (es. estrogeni sintetici); e c) sostanze di origine naturale presenti nei cibi (es. flavonoidi). Diversi dati epidemiologici correlano l'esposizione agli interferenti endocrini con l'inizio di varie patologie tra cui neoplasie, disturbi della fertilità, endometriosi e, più recentemente, l'obesità.

Obiettivo di questo lavoro è stato quello di valutare l'esistenza di differenze nella suscettibilità delle azioni degli ormoni androgeni (di-idrotestosterone, DHT, e testosterone, T) e degli ormoni estrogeni (17 β -estradiolo, E2) a composti chimici noti per la loro attività di interferenti endocrini e comunemente presenti come contaminanti o componenti degli alimenti (BPA e il flavonoide naringenina, Nar). In particolare, sono stati valutati gli effetti di BPA e Nar (singoli o in miscela) su alcune azioni diversamente modulate dagli ormoni quali il differenziamento muscolare, la proliferazione cellulare e la migrazione cellulare. Inoltre, i meccanismi alla base di questi effetti sono stati valutati. Diverse linee cellulari umane e colture di cellule primarie isolate da animali maschi e femmina sono state utilizzate come modelli sperimentali caratterizzandone il livello di recettori ormonali presenti, la risposta agli ormoni e il meccanismo di azione.

I risultati principali ottenuti indicano una maggiore suscettibilità delle attività delle due isoforme dei recettori per gli estrogeni agli interferenti presi in considerazione rispetto alle attività dei recettori per gli androgeni. Ciò comporta una maggiore effetto interferente di BPA e Nar sulle azioni di E2. Il differente impatto degli interferenti tra i due sessi sarà esaminato in dettaglio anche alla luce del ruolo che E2 svolge nella fisiologia del maschio.

EPIGENOMA E AMBIENTE: INFLUENZA DELL'ESPOSIZIONE PRENATALE AI PCB SULL'IMPRONTA EPIGENETICA NEL RATTO NEONATO

L. Casati¹, R. Sedra², M. Esteller², A. Colciago¹, O. Mornati¹, F. Celotti¹, P. Negri-Cesi¹

¹Dipartimento di Endocrinologia, Fisiopatologia e Biologia Applicata, Unità di Ricerca INBB, Università degli Studi di Milano, Via Balzaretti 9, Milano

²Cancer Epigenetic and Biology Program; Bellvitge Institute for Biomedical Research (IDIBELL) and Catalan Institute of Oncology (ICO) – Barcellona, Spagna

Epigenetica è lo studio della modulazione della trascrizione tramite processi che, senza mutare la sequenza del DNA, modificano l'espressione genica poiché alterano l'accessibilità fisica degli apparati di trascrizione al genoma. I due meccanismi di controllo epigenetico più studiati sono la metilazione del DNA e le modificazioni post-traduzionali degli istoni. Il primo consiste nell'aggiunta covalente di gruppi metilici alle citosine dei dinucleotidi CpG presenti nelle regioni prossimali al sito d'inizio della trascrizione di numerosi geni. Grazie all'ingombro sterico prodotto, l'ipermetilazione impedisce l'aggancio dell'apparato di trascrizione a questa zona; viceversa, se le isole CpG sono ipometilate la trascrizione è attiva. Il secondo livello di controllo epigenetico comporta le modifiche post-traduzionali degli istoni (metilazioni o acetilazioni dei residui di lisina o arginina a livello delle estremità N terminali), che, alterando la natura del nucleosoma, influenzano il grado di compattamento della cromatina (*rimodellamento cromatinico*); si ipotizza che combinazioni specifiche di modificazioni istoniche possano essere interpretate come un codice di attivazione o disattivazione genica. La metilazione e l'acetilazione degli istoni sono catalizzate da enzimi che generalmente sono residuo-, ma non gene-specifici. In risposta a differenti stimoli ambientali, gli attivatori o repressori della trascrizione reclutano tali enzimi presso geni specifici, determinando così il profilo trascrittomico. La reversibilità e la natura dinamica del rimodellamento cromatinico è un punto critico per l'interazione tra ambiente e stato epigenetico globale di una cellula (epigenoma). Numerosi fattori ambientali, fra cui alcuni componenti dietetici e numerosi *endocrine disruptors* (EDC) sono in grado di alterare l'epigenoma, specialmente durante lo sviluppo embrionale. Ad esempio una dieta materna ricca o povera in folato (che è il donatore di metili per la DNA metil-transferasi) altera il pattern di metilazione del DNA; un effetto analogo viene indotto anche da una dieta arricchita in genisteina, un fitoestrogeno che appartiene alla classe degli EDC.

La modificazione dell'epigenoma indotta dagli EDC può essere ereditata (effetti trans-generazionali); ad esempio, un'esposizione alla vinclozolina o al bisfenolo A nel ratto è in grado di modificare il pattern di metilazione del DNA in più di una generazione successiva. Come dimostrato nel nostro laboratorio, oltre ad alterare gli assi endocrini (perlopiù l'asse tiroideo, somatotropo e riproduttivo), i PCB (bifenili policlorurati) modificano anche l'espressione di geni coinvolti nel meccanismo d'azione degli steroidi sessuali a livello centrale; studi recenti suggeriscono che l'effetto dei PCB sul profilo trascrittomico dell'organismo sia dovuto a modificazioni epigenetiche. I PCB sono infatti in grado di influenzare sia il grado di metilazione del DNA (nel fegato di animali esposti a questi inquinanti) sia le modificazioni istoniche, effetto mediato quest'ultimo dall'attivazione del recettore per gli aril-idrocarburi, che induce modificazioni post-traduzionali specifiche. E' da sottolineare infine che alcuni dei recettori per gli ormoni steroidei oltre ad influenzare direttamente la trascrizione genica, possono esercitare anche effetti di tipo epigenetico, agendo come cofattori degli enzimi coinvolti nelle modificazioni istoniche.

Sulla base di queste premesse, **scopo** del nostro lavoro è stato quello di indagare se l'esposizione in utero ad una miscela ricostituita di PCB (composta dai PCB maggiormente presenti nell'ambiente) potesse alterare il profilo epigenetico e, di conseguenza, il profilo trascrittomico nel fegato della prole giovane (PN12). Gli esperimenti sono stati compiuti sul fegato in quanto questo organo è sia sede di accumulo e di metabolismo dei PCB, sia bersaglio della loro azione.

Dai **risultati** ottenuti emerge innanzitutto che, in generale, l'effetto della miscela dei PCB sull'epigenoma della prole (in particolar modo sulle modificazioni istoniche) è sesso specifico e per alcuni parametri altera una situazione già dimorfica in partenza. Gli effetti che ci paiono più interessanti riguardano la trimetilazione della lisina 4 dell'istone H3 (H3K4me3), l'acetilazione della lisina 16 dell'istone H4 (H4K16Ac) e le modificazioni degli enzimi che catalizzano tali reazioni: i dati mostrano innanzitutto che i livelli di espressione H3K4me3 e di H4K16Ac nel fegato dei controlli sono dimorfici (F>M); l'esposizione ai PCB riduce l'espressione delle modificazioni istoniche in entrambi i sessi, ma in modo più marcato nelle femmine, annullando, di fatto, il dimorfismo fisiologico. Analizzando l'espressione genica degli enzimi coinvolti specificamente nella modificazione post-traduzionale H4K16Ac, è stata riscontrata un'induzione dell'espressione della deacetilasi SirtT1 (appartenente alla più ampia famiglia delle sirtuine) solo nei maschi. E' ipotizzabile quindi che l'acetilazione sia sotto il controllo di meccanismi differenti nei due sessi, ipotesi che giustificherebbe anche la presenza del dimorfismo fisiologico. Inoltre, poiché H4K16Ac è correlabile positivamente con (e consegue alla) presenza della modificazione H3K4me3, è possibile che la riduzione significativa di questa modificazione osservata nelle femmine trattate sia conseguente alla riduzione di H4K16Ac. Abbiamo quindi valutato l'espressione genica delle demetilasi coinvolte nella rimozione specifica dei gruppi metilici di H3K4me3 (Jarid1A e di Jarid1B) ed abbiamo osservato che l'esposizione causa un significativo aumento di entrambi gli enzimi, soprattutto nelle femmine.

Come già detto, i recettori degli ormoni steroidei, in particolare il recettore androgenico (AR), possono essere anche cofattori delle demetilasi; abbiamo quindi analizzato il profilo di espressione genica e proteica di AR nel fegato degli animali esposti. I risultati evidenziano anche per AR un'espressione dimorfica nei controlli (F>M), che viene ridotta fino ad annullarsi dopo esposizione ai PCB. Da notare che l'analisi delle isole CpG presenti nella sequenza promotrice del gene di AR non ha messo in evidenza alcuna alterazione del pattern di metilazione. E' probabile quindi che la modulazione dell'espressione di AR dipenda a sua volta dal rimodellamento cromatinico. Per capire quindi se la modulazione dell'espressione genica di AR fosse imputabile a tale meccanismo (per esempio ad una ridotta presenza di H3K4me3 a livello del suo promotore), è stato condotto un esperimento di immunoprecipitazione della cromatina per H3K4me3 seguito dall'amplificazione con real time PCR della sequenza relativa alla zona promotrice di AR. Poiché non sono state riscontrate alterazioni differenziali per la presenza di H3K4me3 nella zona considerata fra gli animali di controllo e quelli esposti, è probabile che la diminuita espressione di AR non sia una conseguenza dell'alterazione di H3K4me3 e che gli effetti dei PCB osservati siano dovuti all'alterazione degli enzimi coinvolti nelle modificazioni istoniche post-traduzionali; in questo contesto, AR potrebbe agire da cofattore di questi enzimi, influenzando anche la loro attività trascrizionale. In base ai risultati ottenuti in questa serie di esperimenti è possibile ipotizzare che i PCB agiscano sul complesso AR-Jarid, influenzando l'epigenoma, e che in un secondo momento AR stesso sia in grado di down-regolare la sua espressione genica e proteica (fenomeno che ci proponiamo di indagare al più presto).

In **conclusione** è possibile supporre che l'esposizione ai PCB durante la fase dello sviluppo e differenziamento dell'individuo alteri l'epigenoma, probabilmente influenzando in modo selettivo il rimodellamento cromatinico. A riconferma di quanto già dimostrato nel nostro e in altri laboratori, sembra che l'azione più subdola di questi inquinanti sia quella di agire in modo in modo differente nel maschio e nella femmina, annullando il dimorfismo fisiologico presente non solo a livello del pattern di espressione genica, ma anche dell'epigenoma. Tale effetto si esplicherebbe soprattutto sulle modificazioni post-traduzionali degli istoni.

Il chiarimento del significato funzionale del dimorfismo dell'epigenoma e la piena comprensione di come i PCB possano influenzare l'attività del complesso AR-Jarid coinvolto nel rimodellamento cromatinico costituiscono il principale obiettivo della nostra ricerca futura.

INTERFERENTI ENDOCRINI E SVILUPPO NEURO-COMPORTAMENTALE IN MODELLI ANIMALI: COSA SAPPIAMO E COSA VORREMMO SAPERE

Paola Palanza, Stefano Parmigiani

Dipartimento di Biologia Evolutiva e Funzionale, Università degli Studi di Parma, 43100 Parma.

Numerose sostanze naturali o artificiali presenti nell'ambiente e negli alimenti, chiamate collettivamente "distruttori endocrini" o "interferenti endocrini" (IE), sono in grado di interferire con i sistemi ormonali dei vertebrati, mimando o inibendo l'azione degli ormoni naturali. L'Agenzia di Protezione Ambientale degli Stati Uniti d'America definisce gli IE come: "sostanze esogene che alterano la funzionalità endocrina e causano effetti avversi sull'individuo, sulla sua progenie, e sulle popolazioni" (EDSTAC 1998). La prima evidenza che l'esposizione a IE potesse alterare lo sviluppo, provocando effetti sul comportamento, la riproduzione e la fitness, deriva da osservazioni su popolazioni selvatiche di animali (mammiferi, uccelli, rettili, pesci; Colborn et al. 1993; 1998). In seguito studi su modelli animali di laboratorio o epidemiologici hanno dimostrato che alcune delle stesse sostanze che risultavano correlate agli effetti negativi sulla fauna selvatica, come i pesticidi organoclorinati (DDT e analoghi) o i policlorobifenili, sono in grado di provocare alterazioni riproduttive e comportamentali in modelli animali e anomalie nello sviluppo neuro-comportamentale nei bambini (per una review: Colborn et al. 1998; Palanza e vom Saal 2002; Clotfelter et al. 2004). Negli ultimi anni i dati sperimentali hanno messo in evidenza che la caratteristica distintiva degli IE è che, mentre l'esposizione acuta a tali composti può non avere effetti nell'animale adulto, essi possono essere trasmessi dalla madre all'embrione, dove, anche a dosi estremamente basse, possono interferire con il normale sviluppo neuroendocrino ed alterare in modo permanente la funzionalità delle strutture (vom Saal 1995; Crews et al. 2000). Gli IE meglio caratterizzati sono i composti in grado di legarsi ai recettori intracellulari degli ormoni sessuali, in particolare ai recettori degli estrogeni, come i fitoestrogeni naturali (es: nella soia), i pesticidi come DDT, metossicloro, i composti rilasciati dai policarbonati utilizzati come contenitori alimentari, come il bisfenolo A, farmaci, come l'etinil-estradiolo, componente della pillola anticoncezionale, o il dietilstibestolo, o alcuni policlorobifenili (PCB). L'esposizione dell'uomo a tali contaminanti può avvenire direttamente con l'utilizzo di acque contaminate o attraverso l'alimentazione e l'ingestione di cibi (animali o vegetali) che contengano sostanze con attività ormonale. E' quindi di grande interesse lo sviluppo di nuovi metodi di indagine per evidenziare la biodisponibilità ambientale ed il rischio biologico associato a questi contaminanti.

Presi nel loro insieme, i nuovi dati sperimentali ottenuti dagli studi dell'ultimo ventennio sugli IE stanno provocando una serie di rivalutazioni concettuali che minano gli assunti tradizionali alla base degli studi tossicologici e le applicazioni dei risultati ottenuti da questi studi agli standard di valutazione della salute pubblica (EDSTAC 1998). La constatazione della scarsità di informazioni sugli effetti a lungo termine dell'esposizione agli IE ha indotto prima le autorità americane (congresso e US-EPA) e poi l'Organizzazione per la Cooperazione e lo sviluppo Economico (OECD) in Europa e Giappone, a richiedere nuove metodologie di screening e sperimentazione per i composti ad azione endocrina rilasciati nell'ambiente.

I dati recenti sugli effetti di dosi estremamente basse ("ambientali") di IE ad azione estrogenica sulla maturazione sessuale o sul comportamento sottolineano la possibilità che la minaccia ambientale creata da questi inquinanti ormonalmente attivi sia sottovalutata a causa della mancanza di modelli appropriati nella sperimentazione (review: vom Saal & Hughes 2005). Ad esempio, l'esposizione materna durante la gravidanza a dosi molto basse di bisfenolo A, utilizzato nei policarbonati, induce un aumento nel tasso di crescita corporea della prole maschile e femminile e accelera la pubertà nelle femmine (Howdeshell et al. 2000), e riduce la spermatogenesi nei maschi (vom Saal et al. 1998). Effetti di iperattività, alterazioni nella risposta alle novità o alle frustrazioni, cambiamenti nel comportamento aggressivo e sociale, deficit di apprendimento e memoria,

alterazioni del dimorfismo sessuale sono stati descritti come possibili conseguenze dell'esposizione, durante lo sviluppo perinatale, a basse dosi di composti estrogenici, quali i policlorobifenili, i pesticidi DDT e metossicloro, il bisfenolo A, i fitoestrogeni della soia (Farabollini et al. 1999, 2002; Dessì et al. 2002; Lephart et al. 2002; Palanza et al. 1999; 2001; 2002; Laviola et al. 2005; Kobu et al. 2003; Wisniewski et al. 2005).

Nel nostro approccio sperimentale i dati comportamentali rappresentano un indice di alterazione funzionale per dirigere la ricerca successiva sui sistemi neuro-endocrini sensibili agli estrogeni esogeni (ed endogeni!). Lo studio integrato del comportamento, degli ormoni, e del sistema nervoso può permettere di identificare i punti di attacco degli estrogeni esogeni, con la possibilità di differenziare gli effetti nei due sessi. La nostra ricerca più recente (Palanza et al. 1999a,b; 2001; 2002a,b; Laviola et al. 2005; Gioiosa et al. 2007; Palanza et al. 2008) ha indicato effetti a lungo termine dei pesticidi o,p' DDT e metossicloro, e del bisfenolo A a dosi "ambientali" sullo sviluppo e differenziazione sessuale del comportamento.

Bisfenolo A e sviluppo neurocomportamentale

Negli ultimi anni si è concentrato un grande interesse scientifico e non sul bisfenolo A (BPA), che è un componente essenziale nella manifattura delle resine e dei policarbonati che viene rilasciato dalle lattine degli alimenti in scatola durante l'autoclavaggio e dai contenitori in plastica (ad es. i biberon); inoltre è un componente delle resine utilizzate per le otturazioni dentarie. Diversi studi hanno confermato che il BPA è rilevabile nelle popolazioni dei paesi sviluppati (Vandenberg et al., 2007) ed è stato misurato nel fluido amniotico, nel plasma materno e fetale, nella placenta alla nascita e nel latte materno. Recentemente il National Toxicology Program, organo del National Institute of Health degli USA, in un documento provvisorio basato sulla vastissima letteratura esistente (247 citazioni, tra cui numerose prodotte dal GRIDES – gruppo di ricerca interuniversitario su distruttori endocrini e sviluppo neurocomportamentale – www.biol.unipr.it/grides) ha condotto una dettagliata analisi dei lavori scientifici sugli effetti del bpa. Questa analisi - sulla base di studi effettuati su animali - individua una "qualche preoccupazione" che l'esposizione a basse dosi di bisfenolo di feti e infanti (periodo perinatale, infantile e prepuberale) possa interferire con il corretto sviluppo del sistema nervoso e del comportamento ed essere implicata in disordini metabolici e riproduttivi. Il Ministero della Salute e dell'ambiente del Canada ha nel 2008 bandito i contenitori di policarbonato per alimenti per la prima infanzia (biberon) e ha definito il BPA come "sostanza pericolosa".

Noi abbiamo dimostrato che topi esposti durante lo sviluppo fetale e neonatale a basse concentrazioni (compatibili con quelle presenti nell'ambiente) di BPA mostrano alterazioni comportamentali e di substrati neurali. In particolare, abbiamo messo in evidenza che in diversi paradigmi sperimentali i topi di controllo mostrano chiare differenze sessuali nel comportamento in risposta ad un ambiente nuovo e nell'apprendimento di un percorso, mentre la prole esposta a BPA presenta una riduzione o un annullamento delle differenze sessuali (Laviola et al. 2005; Gioiosa et al. 2007). Abbiamo inoltre valutato gli effetti dell'esposizione prenatale a bisfenolo A su alcuni substrati neurali: l'attività del sistema noradrenergico nel locus coeruleus e l'area preottica e la produzione di tirosina idrossilasi in LC. I dati hanno indicato che l'esposizione perinatale riduce le differenze sessuali in queste aree rispetto ai controlli. Insieme con altri studi (vedi Panzica et al. 2007; Palanza et al. 2008, per una sintesi), questi dati confermano che l'esposizione a basse dosi di un interferente endocrino come il bisfenolo A, durante il periodo critico della differenziazione sessuale del sistema nervosa centrale, può esercitare effetti a lungo termine sul comportamento e il SNC degli adulti in un modello animale.

STUDIO DELL'EFFETTO DI INTERFERENTI ENDOCRINI SULL'ATTIVITÀ CATALITICA DI ANIDRASI CARBONICA II

Lionetto M.G., Erroi E., Schettino T.

Dip.to di Scienze e Tecnologie Biologiche e Ambientali, Università del Salento, Lecce.

L'anidraasi carbonica è un metalloenzima che catalizza la reazione reversibile di idratazione della CO_2 in H^+ e HCO_3^- . Tale enzima è coinvolto in un'ampia varietà di processi fisiologici, quali la respirazione, la regolazione acido-base, la secrezione e riassorbimento di elettroliti, il riassorbimento osseo, il processo di calcificazione e svariate reazioni biosintetiche che richiedono lo ione bicarbonato come substrato (ad esempio la litogenesi, la gluconeogenesi e l'ureagenesi). Nei mammiferi sono state descritte 16 isoforme di anidraasi carbonica. Tra queste l'anidraasi carbonica II, avente una localizzazione citosolica, è quella maggiormente espressa nella maggior parte dei tessuti, come ad esempio l'epitelio renale, l'epitelio del tubo digerente, i globuli rossi, gli epitelii degli organi riproduttori e il sistema nervoso centrale. L'anidraasi carbonica II è l'isoforma predominante nel cervello di mammifero e svolge un ruolo molto importante nella secrezione del liquido cerebrospinale. Tale enzima è espresso, inoltre, in diversi tessuti endocrini quali la corticale del surrene, le cellule del Langerhans, l'ipofisi e la sua attività catalitica risulta essere legata alla regolazione della biosintesi e/o secrezione di diversi ormoni. Nell'uomo la sindrome di deficienza di tale enzima provoca alcune patologie come l'osteopetrosi, l'acidosi del tubulo renale e la calcificazione cerebrale. Pertanto, alterazioni nel funzionamento di anidraasi carbonica possono comportare gravi alterazioni patologiche.

Nel presente lavoro di ricerca è stato condotto uno studio *in vitro* sulla sensibilità dell'attività catalitica di tale enzima a varie classi di contaminanti chimici noti per la loro attività di interferenti endocrini quali ftalati, difenileteri polibromurati, policlorobifenili e pesticidi organofosfati. In particolare le sostanze chimiche testate sono state rispettivamente il dietil ftalato, il tetrabromobisfenolo A, l'esabromociclododecano, il malathion e l'arochlor 1248. L'attività enzimatica è stata dosata elettrometricamente misurando le micromoli di H^+ sviluppate nella miscela di reazione contenente CO_2 come substrato. Nel calcolo delle unità di attività enzimatica è stato sottratto il contributo della reazione non catalizzata, determinato aggiungendo acetazolamide (1 μM), noto inibitore di anidraasi carbonica, nella miscela di reazione. Per i dosaggi di attività enzimatica è stata utilizzata l'isoforma II di anidraasi carbonica bovina, la quale presenta un elevato grado di omologia con l'isoforma umana. Per tutte le sostanze testate l'attività dell'anidraasi carbonica ha manifestato un significativo decremento all'aumentare della concentrazione del contaminante presente nella miscela di reazione. Tuttavia, come emerso dal calcolo dei valori di IC_{20} e di IC_{50} , la sensibilità dell'enzima è risultata differente per le diverse classi di xenobiotici analizzati. I composti che esercitano la maggiore inibizione sono rappresentati dagli organofosfati e i PCB, con valori di IC_{50} rispettivamente di 10^{-6} e 10^{-5} g/l, seguiti da ftalati e difenileteri polibromurati.

In conclusione, per la prima volta è stato dimostrato come l'enzima anidraasi carbonica, che svolge un ruolo fondamentale in numerosi aspetti della fisiologia dell'organismo, possa rappresentare un target per l'azione di svariate classi di xenobiotici, quali policlorobifenili, pesticidi organofosfati, ftalati e difenileteri polibromurati, rendendo vulnerabili all'azione di tali sostanze i processi fisiologici che da essa dipendono.

Sessione
“Biosensoristica per l’Ambiente e la Salute”

SVILUPPO DI UN SENSORE ELETTROCHIMICO PER LA MISURA DIRETTA E QUANTITATIVA DI ANTICORPI ANTI-DNA

Gianluca Adornetto^a, Francesco Ricci^{a,b}, Danila Moscone^{a,b}, Giuseppe Palleschi^{a,b}

^aDipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche, Università di Roma Tor Vergata, Via della Ricerca Scientifica, 00133 Roma

^b Consorzio Interuniversitario Biostrutture e Biosistemi "INBB", Viale delle Medaglie d'Oro 305, 00136 Roma

I sensori E-DNA sono biosensori elettrochimici "label-free" sviluppati negli ultimi anni per la rilevazione di sequenze specifiche di DNA. Questi sensori si basano sul ripiegamento e folding di una sonda di DNA, indotti dall'ibridizzazione con la sequenza complementare (target). Recentemente sono stati effettuati nuovi studi che utilizzano la piattaforma E-DNA anche per il rilevamento di proteine leganti sequenze specifiche di DNA e di anticorpi diretti contro antigeni coniugati alla sonda di DNA (DNA scaffold).

In questo contesto si è deciso di ampliare ulteriormente i campi di applicazione di questa piattaforma e di utilizzare il sistema elettrochimico E-DNA per il dosaggio in siero di anticorpi anti-DNA. La misura di questi anticorpi riveste una grande importanza poiché utilizzata per la diagnosi e il monitoraggio del Lupus Eritematoso Sistemico, una patologia autoimmune cronica con elevata incidenza.

Il sistema da noi sviluppato prevede l'utilizzo di una sonda di DNA, modificata con un label elettrochimico (Blu di Metilene), legata alla superficie di un elettrodo d'oro. In una scansione di potenziale si osserva una corrente faradica dovuta alle collisioni del label con la superficie elettrodica. Il legame dell'anticorpo anti-DNA con la sonda riduce la frequenza di collisione del Blu di Metilene, portando così ad una diminuzione della corrente rilevata dal sistema; questa riduzione consente di rilevare la presenza e la concentrazione di anticorpi anti-DNA in soluzione.

I risultati ottenuti sono molto promettenti dal punto di vista clinico (1).

Il sistema infatti rileva anticorpi anti-DNA con un'ottima sensibilità ($EC_{50} = 7$ nM), paragonabile a quella di sistemi immunoenzimatici tradizionali, e in maniera altamente specifica e selettiva tanto che è in grado di dosare questi anticorpi in matrici complesse come il siero.

I sensori possono inoltre essere riutilizzati per più misure dopo un breve lavaggio di pochi secondi. Il sistema è estremamente rapido e si può ottenere una risposta in circa 3 minuti.

Inoltre, il sistema non necessita dell'aggiunta di reagenti esterni, rendendo l'analisi sicuramente più rapida ed economica rispetto ai sistemi attualmente disponibili. Questo, insieme alla semplicità della strumentazione elettrochimica, rende la misura estremamente pratica e adatta al "Point Of Care Testing".

Inoltre questo lavoro consente di ottenere nuove informazioni sul comportamento dei sensori nell'interazione con anticorpi e va inquadrato in uno studio più ampio che propone il sistema E-DNA come una piattaforma generale per lo studio dell'interazione tra DNA e proteine.

1) F. Ricci, G. Adornetto, D. Moscone, K.W. Plaxco, G. Palleschi *Quantitative, reagentless, single-step, electrochemical detection of anti-DNA antibodies directly in blood serum*, *Chem. Commun.*, 2010, 46, 1742- 1744.

BIOSENSORI CELLULARI LUMINESCENTI IN FORMATO MULTIPLEX: APPLICAZIONI PER MONITORAGGIO ECO-TOSSICOLOGICO SUL CAMPO

E. Michelin^{a,b}, L. Cevenini^a, L. Mezzanotte^a, A. Coppa^a, A. Roda^{a,b}*

^aDepartment of Pharmaceutical Sciences, University of Bologna, Bologna, Italy;

^bINBB, Istituto Nazionale di Biostrutture e Biosistemi, Roma, Italy

L'adozione di sistemi di riconoscimento molecolare quali recettori o proteine biospecifiche inseriti in sistemi cellulari ha permesso di espandere il campo di applicazione dei biosensori alla valutazione della biodisponibilità e degli effetti biologici di analiti o sostanze tossiche. Questi sistemi sono ottenuti mediante l'inserimento all'interno della cellula di uno o più geni "reporter" che codificano per proteine rivelabili mediante tecniche di bioluminescenza, posti sotto il controllo di una specifica sequenza che ne induce l'espressione solo in presenza dell'analita.

Recentemente i biosensori cellulari che usano geni reporter bioluminescenti (ad esempio geni che codificano per luciferasi di lucciola, batterica o di *Renilla*, equorina...) hanno trovato largo impiego nel monitoraggio ambientale, nel campo agro-alimentare e nella diagnostica medica. Ad esempio sono stati sviluppati biosensori cellulari per il monitoraggio di composti ad attività androgenica/estrogenica, costituiti da cellule di *Saccharomyces cerevisiae* modificate geneticamente in modo da esprimere i recettori umani per gli androgeni/estrogeni e come gene reporter la luciferasi di *Photinus pyralis*. Tali biosensori sono stati utilizzati per il monitoraggio dell'attività simil-estrogenica e simil-androgenica delle acque sottoposte a trattamento di depurazione in impianti municipali, al fine di fornire una valutazione integrata dell'efficacia dell'impianto nel rimuovere composti con attività pseudo-ormonale.¹

Un'evoluzione di questi strumenti analitici è stata ottenuta tramite l'immobilizzazione delle cellule su superfici funzionalizzate con materiali idonei per mantenerne una ottimale vitalità ed allo stesso tempo per permettere una misura rapida ed affidabile. L'immobilizzazione delle cellule permette l'impiego di formati multianalita (piastre "multititer" e sistemi "microarray"), idonei per eseguire l'analisi simultanea di numerosi analiti e lo sviluppo di sistemi portatili per analisi *in situ*. Inoltre la disponibilità di nuovi geni reporter da nuovi organismi o ottenuti tramite mutagenesi sito-diretta e random ha ulteriormente espanso le potenzialità dei biosensori cellulari luminescenti ponendo le basi per lo sviluppo di sistemi per "High Content Analysis". È infatti possibile ingegnerizzare una cellula con più geni reporter bioluminescenti che emettono a diverse lunghezze d'onda oppure utilizzano diversi substrati e la cui espressione è regolata dalla presenza di diversi analiti. Misurando i singoli segnali bioluminescenti è quindi possibile ottenere più informazioni analitiche complementari dallo stesso campione e durante la stessa analisi.

Utilizzando queste strategie sono stati sviluppati numerosi biosensori cellulari che utilizzano cellule di lievito o linee cellulari umane per monitorare la presenza di molecole ad attività pseudo-ormonale (distruttori endocrini), metalli pesanti, analiti di interesse diagnostico, in matrici ambientali, alimentari e in campioni clinici.² Inoltre è stato sviluppato un prototipo funzionante che permette di analizzare la presenza di analiti con diversa attività biologica (es. agonisti dei recettori per estrogeni/androgeni e metalli pesanti). Il dispositivo è costituito da una cartuccia in cui le cellule sono intrappolate in una matrice polimerica biocompatibile, posta a contatto con un sistema di rivelazione della luce basato su CCD (charge-coupled device).³ Il dispositivo può essere collegato ad un computer portatile e, tramite un software, permette di misurare e correlare l'intensità di emissione luminosa alla concentrazione biodisponibile di analita. L'impiego nel dispositivo di più linee cellulari, ognuna in grado di rispondere ad un diverso analita bersaglio, permette di ottenere più informazioni contemporaneamente dallo stesso campione, es. di determinare la presenza di diversi metalli pesanti (es. mercurio, cadmio, piombo, arsenico, rame, zinco). Tra le possibili applicazioni di questo dispositivo, oltre che la determinazione di metalli pesanti, vi sono lo screening ambientale per l'identificazione di diossine e idrocarburi policiclici aromatici, l'analisi di

contaminanti alimentari e lo screening antidoping. I vantaggi offerti da questo dispositivo sono numerosi: esso è stato progettato per rappresentare un dispositivo portatile a basso costo e di facile uso, le cellule immobilizzate sono sufficientemente stabili da poter essere mantenute a +4°C per periodi di qualche mese (possono quindi essere inviate anche a paesi in via di sviluppo per l'individuazione in tempo reale di siti contaminati), l'analisi è breve (1-2 ore complessive) e non necessita di personale specificatamente addestrato.

[1] E. Michelini, M. Magliulo, P. Leskinen, M. Virta, M. Karp, A. Roda, Recombinant cell-based bioluminescence assay for androgen bioactivity determination in clinical samples, *Clin Chem*, (2005), 51:1995-8E.

[2] E. Michelini, L. Cevenini, L. Mezzanotte, P. Leskinen, M. Virta, M. Karp, A. Roda, A sensitive recombinant cell-based bioluminescent assay for detection of androgen-like compounds, *Nat Protoc*, (2008), 3:1895-902.

[3] E. Michelini, A. Roda, L. S. Dolci, L. Mezzanotte, L. Cevenini. Patent RM2009/A000064

ANALISI DI *BIOMARKERS* CLINICI MEDIANTE BIOSENSORI ELETTROCHIMICI E PARTICELLE MAGNETICHE

I. Palchetti¹, F. Berti², S. Laschi¹, S. Tombelli¹, G. Marrazza¹, M. Mascini^{1,2}

¹ Dipartimento di Chimica Università degli Studi di Firenze, Via della Lastruccia 3, Sesto F.no, Italia
ilaria.palchetti@unifi.it

² I.N.B.B., Istituto Nazionale Biostrutture e Biosistemi Via delle Medaglie d'Oro, 305, 00136 Roma

Le micro- e nano-particelle magnetiche (note anche con il termine inglese di “*magnetic beads*”) sono dei supporti solidi estremamente interessanti nella realizzazione di biosaggi.

E' noto che il loro impiego migliora il bioriconoscimento molecolare. Esse, infatti, consentono sia una cinetica di interazione più veloce, essendo le “*beads*” in sospensione, che una notevole riduzione dell'effetto matrice, grazie alla realizzazione di fasi di lavaggio e di separazione più complete ed efficienti. Inoltre, esse permettono l'analisi di campioni complessi senza la necessità di alcun pre-aricchimento.

In questo lavoro si intende presentare l'impiego delle *magnetic beads* come supporti solidi per l'immobilizzazione di molteplici biorecettori (anticorpi, aptameri, acidi nucleici), per lo sviluppo di biosaggi per l'analisi di biomarcatori clinici. In particolare, sono state impiegate per lo sviluppo di un test immuno-elettrochimico per l'individuazione di *markers* del processo infiammatorio, come la neopterinina. Viene anche discusso l'impiego di aptameri per l'identificazione di trombina e proteina C-reattiva (CRP)¹. Sono stati ottimizzati diversi tipi di saggio (sandwich, diretto e competitivo) utilizzando le *magnetic beads* come fase solida ed elettrodi di grafite monouso come trasduttori. In tutti i casi è stato utilizzato il coniugato enzimatico (fosfatasi alcalina- streptavidina) per la valutazione del grado di bioriconoscimento molecolare, accoppiato alla voltammetria di ridissoluzione anodica (DPV) per l'individuazione del prodotto enzimatico. Inoltre, le *magnetic beads* sono state accoppiate ad un sistema di trasduzione elettrochimico per individuare *marker* tumorali attraverso la valutazione della reazione di ibridazione². Per questa specifica applicazione le *magnetic beads* sono state funzionalizzate con sonde oligonucleotiche per il riconoscimento di sequenze complementari di DNA o RNA considerate *marker* tumorali. Viene infine presentata la possibilità di integrare il sistema di rilevazione con una piattaforma microfluidica. A tal fine, è stato utilizzato un particolare chip elettrochimico³. La presenza di nanoelettrodi in ogni canale ha permesso la quantificazione della reazione diretta di affinità effettuando otto misure elettrochimiche in parallelo.

[1] S.Centi, L. Bonel Sanmartin, S. Tombelli, I. Palchetti, M. Mascini, 2009, *Electroanalysis*, 21, 1309 – 1315

[2] S. Laschi, I. Palchetti, G. Marrazza, M. Mascini, 2009, *Bioelectrochemistry* 76 214–220

[3] F. Berti, S. Laschi, I. Palchetti, J. S. Rossier, F. Reymond, M. Mascini, G. Marrazza, 2009, *Talanta* 77, 971–978

MICROSPETTOSCOPIA FT-IR PER LA CARATTERIZZAZIONE DI SUPPORTI CATALITICI PER LA REALIZZAZIONE DI BIOSENSORI

M. Portaccio, B. Della Ventura, D.G. Mita e M. Lepore

Dipartimento di Medicina Sperimentale, Seconda Università di Napoli, Italia

Consorzio Interuniversitario Istituto Nazionale Biostrutture e Biosistemi "INBB", Unità di Napoli

La spettroscopia FT-IR condotta con la tecnica della "Micro-Attenuated Total Reflection" (Micro-ATR) offre molteplici vantaggi per lo studio a livello microscopico di molte caratteristiche fisico-chimiche di supporti catalitici per la realizzazione di biosensori. Questo approccio sperimentale è particolarmente semplice da usare (non è richiesta alcuna preparazione del campione) e non danneggia il campione consentendo misure ripetute dello stesso per seguirne l'evoluzione temporale o i cambiamenti indotti, qualora esso sia sottoposto a particolari trattamenti. L'uso di un microspettrometro FT-IR dotato di un accessorio per micro-ATR ed un rivelatore particolarmente sensibile ha consentito l'indagine di differenti supporti catalitici utilizzati per la realizzazione di biosensori di interesse clinico e ambientale. Sono state esaminate membrane costituite da poliacrilonitrile (PAN) con strati di chitosano di diverso peso molecolare utilizzate per l'immobilizzazione di acetilcolinesterasi. In figura 1 è riportato lo spettro nell'intervallo di 3700-1000 per la membrana di PAN prima (a) e dopo il trattamento con il chitosano (b).

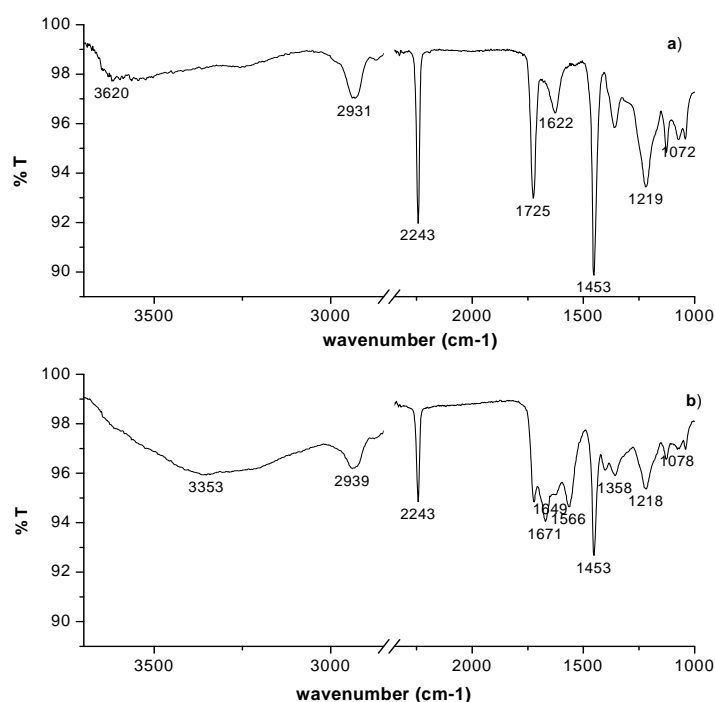


Fig. 1. Spettro FT-IR della membrane di PAN prima (a) e dopo il trattamento con chitosano (b).

Come si può vedere dalla fig.1a, il gruppo nitrile ($C\equiv N$) ha un picco di assorbimento dovuto allo stretching simmetrico a 2243 cm^{-1} . Inoltre è presente un picco di assorbimento a 1725 cm^{-1} dovuto al gruppo $C=O$ ed un picco a 1219 cm^{-1} dovuto alla vibrazione di stretching del gruppo sulfonato. Osservando la fig. 1b compare una nuova banda a 1671 cm^{-1} che è attribuita allo stretching C-O dei gruppi dell'acido carbossilico che si sono formati in seguito all'idrolisi del gruppo nitrile presente sulla membrana prima del trattamento. Inoltre è presente una nuova banda a 1566 cm^{-1} dovuta ai gruppi N-H introdotti sulla membrana dal trattamento con il chitosano. Dal confronto tra le fig.1a ed 1b è quindi evidente che la spettroscopia FT-IR evidenzia le modificazioni chimiche che ha subito la membrana.

Sono stati anche esaminati supporti realizzati in sol – gel prima e dopo l'immobilizzazione di glucosio ossidasi (GOD). Gli spettri ottenuti hanno consentito di individuare il contributo dei principali gruppi funzionali consentendo anche di verificare come le varie procedure di immobilizzazione non abbiano alterato l'attività catalitica dell'enzima coinvolto. I risultati ottenuti sono riportati in fig. 2.

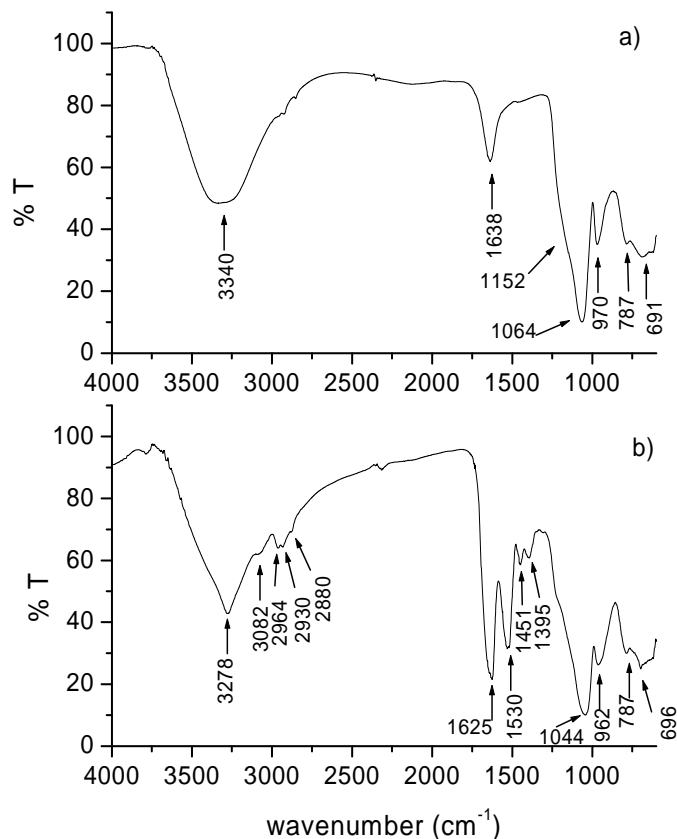


Figure 2. Spettro FT-IR del sol-gel prima (a) e dopo l'immobilizzazione dell'enzima GOD (b)

In particolare in figura 2a è riportato lo spettro del sol-gel mentre nella 2b quello del sol-gel dopo l'immobilizzazione della GOD. Dalla fig. 2a è possibile notare una larga banda nella regione 3750-3000 cm^{-1} dovuto allo stretching del gruppo O-H ed un altro a 1638 cm^{-1} dovuto al bend del gruppo O-H. Lo spettro mostra un'intensa banda asimmetrica a 1064 cm^{-1} dovuta allo stretching asimmetrico del gruppo Si-O-Si. Lo stretching simmetrico della catena Si-O-Si appare a 787 cm^{-1} e la banda a 970 cm^{-1} è generalmente attribuita allo stretch del gruppo Si-O. E' possibile anche osservare dei piccoli picchi a 2930 and 2852 cm^{-1} nella regione della vibrazione di stretching del legame C-H in CH_2 and CH_3 , rispettivamente, ed un piccolo picco a 2960 cm^{-1} attribuito allo stretch simmetrico del CH del CH_3 .

Nella fig. 2b è riportato lo spettro dell'enzima immobilizzato nel sol-gel. Si possono notare i contributi dovuti all'Ammide A (3278 cm^{-1}), Ammide I (1625 cm^{-1}), Ammide II (1530 cm^{-1}) e Ammide IV e/o Ammide V (696 cm^{-1}). Inoltre sono sempre presenti i picchi dovuti al contributo del sol-gel a 1064 cm^{-1} (stretching asimmetrico di Si-O-Si), a 962 cm^{-1} (stretching di Si-O), a 787 cm^{-1} (stretching simmetrico di Si-O-Si), e strutture dovute sia all'enzima che al sol-gel. La presenza dei picchi dell'ammide I e ammide II nella fig. 2b evidenziano che la struttura secondaria e la bioattività del GOD è preservata dopo l'immobilizzazione nella matrice di sol-gel.

In questo caso la spettroscopia FT-IR ha permesso di evidenziare l'immobilizzazione dell'enzima GOD in una struttura che preserva la sua attività catalitica ed ha quindi confermato che la matrice di sol-gel è un ottimo supporto per immobilizzare enzimi da utilizzare in biosensori ottici o amperometrici.

TECNOLOGIE BIOSENSORISTICHE AVANZATE PER LO SVILUPPO DI STRUMENTI INNOVATIVI PER IL RILEVAMENTO DI CONTAMINANTI AMBIENTALI ED AGROALIMENTARI

^{1,2}*Viviana Scognamiglio*, ¹*Paola Romagnoli*, ¹*Irene Rambaldi*, ²*Juan Cano*, ²*Italo Pezzotti*, ²*Gianni Pezzotti*,
³*Fabiana Arduini*, ¹*Maria Teresa Giardi*

¹ *CNR-IC AdRI Dipartimento Agroalimentare Via Salaria Km 29.3 00015 Monterotondo Scalo (Roma)*

² *Biosensor S.r.l. Via degli Olmetti 44 00060 Formello (Roma)*

³ *Università Roma Tor Vergata Dipartimento Scienze Tecnologie Chimiche Via della Ricerca Scientifica 00133 (Roma)*

I biosensori sono strumenti di monitoraggio e di controllo in grado di misurare parametri relativi a processi biologici e/o chimici. Negli ultimi decenni lo sviluppo della tecnologia dei biosensori è andata di pari passo con i progressi tecnologici nel campo della microelettronica, dell'elettrochimica, dell'ottica, dell'acustica, della meccanica, ma anche con l'evoluzione delle tecniche di sintesi chimica e dell'ingegneria biomolecolare, per portare grazie alla loro versatilità allo sviluppo di strumenti applicabili in settori come la medicina, l'automazione industriale, le telecomunicazioni, l'ambiente e l'agricoltura.

Di fatto, qualsiasi analita è potenzialmente rilevabile con l'uso di un biosensore, a patto di trovare la giusta accoppiata tra il biomediatore, il costituente in grado di far avvenire il riconoscimento molecolare, ed il trasduttore, il costituente capace di trasformare l'evento di riconoscimento in un segnale analizzabile elettronicamente. Alcuni biosensori sono aspecifici per disegno e costruzione, quindi applicabili a intere classi di analiti, altri sono dedicati ad una particolare specie o ad un particolare processo di riconoscimento. Questa importante caratteristica rende il biosensore uno strumento analitico che trova larga applicazione in svariati campi.

Uno dei campi applicativi di maggiore interesse è rappresentato negli ultimi anni dal monitoraggio di contaminanti ambientali ed agroalimentari, ed in particolar modo dai pesticidi, la cui presenza in aree particolarmente esposte, è stata associata da recenti ricerche ad effetti tossici sulla salute umana. La prolungata esposizione a pesticidi è correlata all'insorgenza di effetti acuti, quali ad esempio nausea, asma, dermatite, cecità, vertigini, e di effetti cronici, legati allo sviluppo di patologie a carico del sistema nervoso e cancro. Inoltre, molti pesticidi sono stati associati ai noti "endocrine disruptors", sostanze in grado di alterare il normale funzionamento del sistema endocrino mimando o bloccando l'azione degli ormoni.

Attualmente, migliaia di pesticidi vengono utilizzati per il controllo di processi industriali e agroalimentari, accrescendo la necessità di sviluppare tecniche analitiche per il monitoraggio di tali sostanze, al fine di controllarne l'utilizzo. Le metodologie analitiche più comuni ed accreditate sono rappresentate da tecniche cromatografiche quali la gas cromatografia, cromatografia liquida ad alta pressione e spettrometria di massa. In questo contesto la tecnologia dei biosensori rappresenta uno strumento analitico in grado di fornire un supporto valido alle classiche metodiche di laboratorio. Ad esempio, mediante lo sviluppo di sistemi di biosensori ad array che utilizzano svariati biomediatori, è possibile eseguire un rapido screening delle classi o sottoclassi di pesticidi presenti in un campione reale per poi analizzare in dettaglio solo i campioni contaminati.

Abbiamo quindi realizzato una serie di biosensori mediante R&S tra CNR, Università ed aziende per lo sviluppo di strumenti ottici, amperometrici o ibridi elettro-ottici, basati su array di biomediatori quali enzimi, proteine ed organismi in grado di rilevare pesticidi appartenenti a differenti classi (Figura 1). I pesticidi differiscono molto tra loro in termini di struttura chimica, per cui risulta complicato applicare un componente biologico di riconoscimento univoco per discriminare tutti i diversi composti che possono essere presenti in un campione reale. Pertanto, abbiamo messo a punto una strategia per l'analisi in pre-screening di campioni reali, basata sullo sviluppo di una piattaforma di biosensori che combina i principali sistemi di trasduzione del segnale, ottico ed amperometrico, con un array di componenti biologiche di riconoscimento, in grado di identificare un ampio spettro di classi e sottoclassi di pesticidi, quali diazine, triazine, uree,

organofosforici, organotiofosforici, carbamati, composti fenolici. La piattaforma biosensoristica sviluppata è stata testata con differenti biomediatori e differenti sistemi per la trasduzione del segnale (Tabella 1). I biomediatori sono stati immobilizzati su appropriati supporti mediante differenti tecniche d'immobilizzazione, al fine di ottenere componenti biologiche stabili e sensibili nei confronti degli analiti target (Figura 2). I limiti di rilevabilità di tali biosensori rientrano negli intervalli di valori consentiti dalle più importanti legislazioni indette dalla Commissione Europea al riguardo, che impongono concentrazioni di pesticidi inferiori a 0.1 µg/L, per ciascun pesticida, ed a 0.5 µg/L per combinazioni di pesticidi.

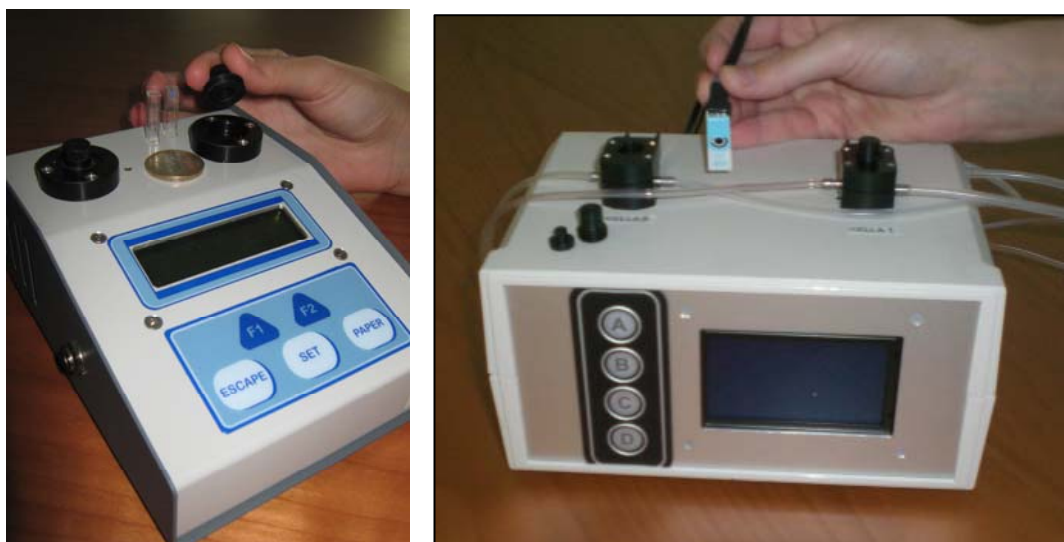


Figura 1. Strumenti ottici, amperometrici ed elettro-ottici per uso biosensoristico, sviluppati in collaborazione tra CNR e Biosensor srl.

Pesticidi (sottoclasse)	Pesticidi (classe)	Biomediatore	Sistema di trasduzione
Paraoxon	Organofosfati	BChE	Amperometrico Ottico
Chlorpyrifos	Organotiofosfati	BChE	Amperometrico Ottico
Carbaryl	Carbamati	AChE	Amperometrico Ottico
Catecolo	Composti fenolici	Laccasi Tirosinasi	Amperometrico
Fenolo	Composti fenolici	Laccasi Tirosinasi	Amperometrico
Bisfenolo A	Composti fenolici	Tirosinasi	Amperometrico Ottico
Atrazina Prometrina	Erbicidi triazinici	Organismi fotosintetici	Amperometrico Ottico
Diuron Linuron	Erbicidi ureici	Organismi fotosintetici	Amperometrico Ottico

Tabella 1. Array di biomediatori utilizzati per lo sviluppo di biosensori ottici, amperometrici o ibridi elettro-ottici, per il rilevamento di contaminanti ambientali ed agroalimentari.



Figura 2. Procedure di immobilizzazione dei biomediatori su elettrodi printati.

Bibliografia

Scognamiglio V, Pezzotti G, Pezzotti I, Cano J, Buonasera K, Giannini D, Giardi MT (2010) Biosensors for effective environmental and agrifood protection and commercialization: from research to market. *Microchim Acta* DOI 10.1007/s00604-010-0313-5

Buonasera K, Pezzotti G, Scognamiglio G, Tibuzzi A, Giardi MT (2010) A new platform of biosensors for pre-screening of pesticide residues to support laboratory analyses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58:5982-5990

Portaccio M, Di Tuoro D, Arduini F, Lepore M, Mita DG, Diano N, Mita L, Moscone D (2010) A thionine-modified carbon paste amperometric biosensor for catechol and Bisphenol A determination. *Biosens Bioelectron* 25:2003-2008

Rea G, Polticelli F, Antonacci A, Scognamiglio V, Katiyar P, Kulkarni SA, Johanningmeier U, Giardi MT (2009) Structure-based design of novel *Chlamydomonas reinhardtii* D1-D2 photosynthetic proteins for herbicide monitoring. *Protein Sci* 18(10):2139-2151

Giardi MT, Scognamiglio V, Rea G, Rodio G, Antonacci A, Lambrea M, Pezzotti G, Johanningmeier U (2009) Optical biosensors for environmental monitoring based on computational and biotechnological tools for engineering the photosynthetic D1 protein of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biosens Bioelectron* 25(2):294-300

Scognamiglio V, Raffi D, Lambrea M, Rea G, Tibuzzi A, Pezzotti G, Johanningmeier U, Giardi MT (2009) *Chlamydomonas reinhardtii* genetic variants as probes for fluorescence sensing system in detection of pollutants. *Anal Bioanal Chem* 394(4):1081-1087

Arduini F, Ricci F, Tuta CS, Moscone D, Amine A, Palleschi G (2006) Detection of carbamic and organophosphorus pesticides in water samples using cholinesterase biosensor based on Prussian Blue modified screen printed electrodes. *Analytica Chimica Acta* 580:155-162