

UNITÀ DI RICERCA

DEL

CONSORZIO INTERUNIVERSITARIO

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

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

*UNITA' DI RICERCA INBB  
Napoli*

**Responsabile Scientifico**

Prof. Alberto Abbruzzese

**Linea di Ricerca**

Studio del meccanismo d'azione e ottimizzazione del profilo farmacocinetico dell'acido zoledronico nel trattamento delle neoplasie umane.

**Composizione del Gruppo**

**Aderenti INBB**

<i>Caraglia Michele</i>	<i>RU</i>	<i>Michele.caraglia@unina2.it</i>
<i>De Rosa Giuseppe</i>	<i>RU</i>	<i>gderosa@unina.it</i>

**Non Aderenti INBB**

<i>Marra Monica</i>	<i>BC</i>	<i>mncmarra@yahoo.it</i>
<i>Salzano Giuseppina</i>	<i>BC</i>	<i>salzano@libero.it</i>
<i>Zappavigna Silvia</i>	<i>BC</i>	<i>Silvia.zappa@libero.it</i>
<i>Misso Gabriella</i>	<i>DR</i>	<i>Gabriella.misso@unina2.it</i>
<i>Gaia Giuberti</i>	<i>BC</i>	<i>Gaia.giuberti@unina2.it</i>
<i>Lombardi Angela</i>	<i>DR</i>	<i>Angela.lombardi@unina2.it</i>
<i>La Rotonda Maria Immacolata</i>	<i>PO</i>	<i>Larotonda@unina.it</i>

**Sede Unità di Ricerca**

*Indirizzo- Dipartimento di Biochimica e Biofisica, Seconda Università di Napoli, Via Costantinopoli, 16 80138 Napoli  
- Dipartimento di Tossicologia e Chimica Farmaceutica, Università "Federico II" di Napoli, Via Montesano 80131,  
Napoli*

*Telefono 0815665871*

*Fax 0815665863*

*E-mail alberto.abbruzzese@unina2.it*

**Sezione INBB di appartenenza**

Napoli

**Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni**

*Obiettivi*

1. Determinazione delle basi molecolari e biochimiche della inibizione proliferativa indotta da ZOL e l'inibitore della farnesil-transferasi Tipifarnib in cellule di carcinoma prostatico: individuazione di meccanismi di fuga protettivi dall'apoptosi indotta da ZOL e tipifarnib.
2. Definizione di combinazioni farmacologiche in grado di indurre effetti sinergici sulla inibizione proliferativa di cellule di carcinoma prostatico. Studio dei meccanismi molecolari e biochimici alla base della interazione farmacologica tra l'inibitore della isoprenilazione ZOL e tipifarnib allo scopo di incrementarne l'effetto anti-tumorale.
3. Verifica in modelli di tumori xenotrapiantati in topi nudi degli effetti sinergici delle varie combinazioni farmacologiche determinati negli esperimenti in vitro nella precedente fase della ricerca. Studi immunoistochimici e molecolari sui tumori derivati dai modelli murini.
4. Studio dei pattern di espressione genica e proteica derivati da tecniche di cDNA microarray e proteomica sia su linee cellulari trattate con la combinazione farmacologica ZOL/tipifarnib che su tessuti di carcinoma prostatico murino. Tali studi avranno il duplice obiettivo di contribuire alla definizione delle basi molecolari delle interazioni farmacologiche e dell'altro quello di individuare nuovi markers molecolari di prognosi e di predittività di risposta alla terapia anti-androgenica.
5. Incapsulazione dei farmaci in liposomi pegilati allo scopo di migliorarne il trasporto nei siti tumorali.

*Risultati ottenuti*

1. Abbiamo identificato una combinazione farmacologica tra ZOL e tipifarnib in grado di avere effetti sinergici sulla inibizione proliferativa ed apoptosi di cellule di carcinoma prostatico ormono-dipendenti od indipendenti sia in modelli in vitro che in tumori xeno trapiantati in topi nudi.
2. Abbiamo dimostrato che tali effetti erano dovuti ad un potenziamento dell'inibizione dell'attività di ras e alla modulazione dell'espressione e della fosforilazione di fattori anti-apoptotici mitocondriali.

3. Abbiamo dimostrato che ZOL agisce sulle cellule di carcinoma prostatico ormono-indipendente attraverso la riduzione dell'espressione del gene Cyr61 che avviene a livello trascrizionale e che è coinvolto negli effetti anti-invasivi indotti dallo ZOL in tali cellule. Tale modulazione avviene attraverso l'inibizione della geranyl-geranilazione di ras.

4. Abbiamo ottenuto e brevettato una nuova formulazione di ZOL incapsulata in liposomi pegylati che ha dimostrato un'attività da 2 a 3 volte superiore rispetto allo ZOL libero nella inibizione di cellule di carcinoma prostatico e mieloma multiplo xeno trapiantate in topi nudi.

#### **Pubblicazioni più significative nel periodo 2007-2010**

1) M. Caraglia, M. Marra, C. Leonetti, G. Meo, A. M. D' Alessandro, A. Baldi, D. Santini, G. Tonini, R. Bertieri, G. Zupi, A. Budillon and A. Abbruzzese

"R115777 (Zarnestra1)/Zoledronic Acid (Zometa1) Cooperation on Inhibition of Prostate Cancer Proliferation Is Paralleled by Erk/Akt Inactivation and Reduced Bcl-2 and Bad Phosphorylation"  
J. Cell. Physiol. 211, 533-43, 2007

2) Marra M, Agostinelli E, Tempera G, Lombardi A, Meo G, Budillon A, Abbruzzese A, Giuberti G, Caraglia M.

"Anticancer drugs and hyperthermia enhance cytotoxicity induced by polyamine enzymatic oxidation products"  
Amino Acids 33, 273-81, 2007

3) A. Lamberti, O. Longo, M. Marra, P. Tagliaferri, E. Bismuto, A. Fiengo, C. Viscomi, A. Budillon, U. R. Rapp, E. Wang, S. Venuta, A. Abbruzzese, P. Arcari and M. Caraglia

"C-Raf antagonizes apoptosis induced by IFN- $\alpha$  in human lung cancer cells by phosphorylation and increase of the intracellular content of Elongation Factor 1A"  
Cell Death Differ. 14, 952-962, 2007

4) M Caraglia, C. Viscomi, M Marra, A.M D'Alessandro, A Budillon, G Meo, C Arra, A Barbieri, A Baldi, C Palmieri, P Tassone, S Venuta, A Abbruzzese, P Tagliaferri

"The farnesyltransferase inhibitor R115777 (Zarnestra®) enhances the pro-apoptotic activity of Interferon-alpha through the inhibition of multiple survival pathways."  
Int. J. Cancer 121, 2317-30, 2007

5) A. Lentini, B. Provenzano, M. Caraglia, A. Shevchenko, A. Abbruzzese, and S. Beninati

"Impairment of the metastatic activity of melanoma cells by transglutaminase-catalyzed incorporation of polyamines into laminin and matrigel"  
Amino Acids 34, 251-6 2008.

6) M. Caraglia, M. Carteni, A. Dicitore, D. Cassese, S. De Maria, P. Ferranti, G. Giuberti, A. Abbruzzese, P. Stiuso  
Experimental study on vasoactive intestinal peptide (VIP) and its diaminopropane bound (VIP-DAP) analog in solution.  
Amino Acids 35, 275-81 2008

7) Marra M, Lombardi A, Agostinelli E, Giuberti G, Zappavigna S, Tempera G, Vitale G, Bifulco M, Abbruzzese A, Caraglia M.

Bovine serum amine oxidase and spm potentiate docetaxel and interferon-alpha effects in inducing apoptosis on human cancer cells through the generation of oxidative stress.  
Biochim Biophys Acta. 1783, 2269-78. 2008

9) Marra M, Giudice A, Arra C, Vitale G, Castiglioni S, Nasti G, Lombardi A, Ottaiano A, Facchini G, Iaffaioli RV, Abbruzzese A, Caraglia M.

Target-based agents in neo-adjuvant treatment of liver metastases from colo-rectal cancer: Secret weapons in anti-cancer war?  
Cancer Biol Ther. 2009 Sep 24;8(18).

10) Sirangelo I, Iannuzzi C, Vilasi S, Irace G, Giuberti G, Misso G, D'Alessandro A, Abbruzzese A, Caraglia M.

W7FW14F apomyoglobin amyloid aggregates-mediated apoptosis is due to oxidative stress and AKT inactivation caused by Ras and Rac.  
J Cell Physiol. 2009 ;221(2):412-23. [INBB affiliation](#)

11) Marra M, Santini D, Meo G, Vincenzi B, Zappavigna S, Baldi A, Rosolowski M, Tonini G, Loeffler M, Lupu R, Addeo SR, Abbruzzese A, Budillon A, Caraglia M.

Cyr61 downmodulation potentiates the anticancer effects of zoledronic acid in androgen-independent prostate cancer cells.  
Int J Cancer. 2009 ;125(9):2004-13.

12) Addeo R, Caraglia M, Bellini S, Abbruzzese A, Vincenzi B, Montella L, Miragliuolo A, Guarrasi R, Lanna M, Cennamo G, Faiola V, Del Prete S.

Randomized Phase III Trial on Gemcitabine Versus Mytomicin in Recurrent Superficial Bladder Cancer: Evaluation of Efficacy and Tolerance.

**J Clin Oncol.** 2009 IN PRESS

13). Tassone P, Tagliaferri P, Rossi M, Calimeri T, Bulotta A, **Abbruzzese A**, Caraglia M, Neri P.

Challenging the current approaches to multiple myeloma-related bone disease: from bisphosphonates to target therapy. *Curr Cancer Drug Targets.* 2009 Nov;9(7):854-70.

14). Marra M, **Abbruzzese A**, Addeo R, Del Prete S, Tassone P, Tonini G, Tagliaferri P, Santini D, Caraglia M. Cutting the limits of aminobisphosphonates: new strategies for the potentiation of their anti-tumour effects. *Curr Cancer Drug Targets.* 2009 Nov;9(7):791-800.

15). Caraglia M, Marra M, Naviglio S, Botti G, Addeo R, **Abbruzzese A**. Zoledronic acid: an unending tale for an antiresorptive agent. *Expert Opin Pharmacother.* 2010 Jan;11(1):141-54.

#### **Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni**

- Definizione del coinvolgimento di Cyr61 nella regolazione della proliferazione cellulare ed apoptosi di cellule tumorali umane mammarie, di colon e di pancreas in vivo ed in vitro.
- Definizione di Cyr61 come fattore predittivo di risposta al trattamento con ZOL in pazienti affetti da neoplasie umane ed in corso di trattamento con ZOL.
- Definizione dei meccanismi di regolazione di Cyr61 da parte di aminobifosfonati ed altri inibitori della isoprenilazione. Potenziamento dell'attività antitumorale di questi ultimi attraverso l'impiego di piccoli inibitori od anticorpi diretti contro Cyr61.
- Sviluppo clinico delle formulazioni liposomiali di ZOL e disegno di nuovi nano vettori destinati al targeting attivo delle neoplasie umane.

#### **Collaborazioni internazionali in atto**

- Ingunn Holen, Department of Oncology, The Medical School, Beech Hill Road, Sheffield S10 2RX UK Office: DU39
- Ruth Lupu, Professor of Laboratory Med/Pathology, Mayo Clinic Division of Experimental Pathology, Mayo Cancer Center, Rochester, MN, USA

#### **Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca**

- Apparat per elettroforesi e western blot – Cell culture facility – Citofluorimetro a tre fluorescenze (FACScan B&D)-
- Apparat per elettroforesi 2D di proteine – RT PCR – HPLC.

#### **Parole Chiave**

- Acido zoledronico – Aminobifosfonati- Carcinoma prostatico- Tumori dell'apparato urogenitale maschile – Liposomi

UNITA' DI RICERCA INBB  
Napoli

**Responsabile Scientifico**

Prof.ssa Lucia Altucci

**Linea di Ricerca**

Epigenetica, Ricerca sul cancro

**Composizione del Gruppo**

**Aderenti INBB**

<i>Lucia Altucci</i>	<i>PA</i>	<i>lucia.altucci@unina2.it</i>
----------------------	-----------	--------------------------------

**Non Aderenti INBB**

<i>Nebbioso Angela</i>	<i>A</i>	<i>angela.nebbioso@unina2.it</i>
<i>Carafa Vincenzo</i>	<i>A</i>	<i>vincenzo.carafa@unina2.it</i>
<i>Gianluigi Franci</i>	<i>A</i>	<i>gianluigi.franci@unina2.it</i>
<i>Miceli Marco</i>	<i>A</i>	<i>marco.miceli@unina2.it</i>

**Sede Unità di Ricerca**

*Dipartimento di Patologia generale Via Luigi de Crecchio 7, 80138, Napoli*

*Telefono 081-5667569*

*Fax 081-2144840*

*E-mail lucia.altucci@unina2.it;*

**Sezione INBB di appartenenza**

Napoli

**Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni**

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

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

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

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

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

neoplastiche e potranno rappresentare la base per studi in diversi modelli o studi preclinici. Questi studi stati pubblicati sulla rivista Nature Medicine (due articoli) e sono stati riportati dai maggiori quotidiani nazionali (Repubblica, Corriere della Sera, etc etc) nonché dalla televisione pubblica (RAI TRE).

### **Pubblicazioni più significative nel periodo 2007-2010**

1. HDACs class II selective inhibition alters nuclear receptor dependent differentiation. Nebbioso A, Dell'aversana C, Bugge AK, Sarno R, Valente S, Rotili D, Manzo F, Teti D, Mandrup S, Ciana P, Maggi AC, Mai A, Gronemeyer H, Altucci L. *J Mol Endocrinol*. 2010 Jul 16. [Epub ahead of print]
2. PML-RARalpha/RXR Alters the Epigenetic Landscape in Acute Promyelocytic Leukemia. Martens JH, Brinkman AB, Simmer F, Francoijs KJ, Nebbioso A, Ferrara F, Altucci L, Stunnenberg HG. *Cancer Cell*. 2010 Feb 17;17(2):173-85.
3. Histone deacetylase inhibitors induce thyroid cancer-specific apoptosis through proteasome-dependent inhibition of TRAIL degradation. Borbone E, Berlingieri MT, De Bellis F, Nebbioso A, Chiappetta G, Mai A, Altucci L, Fusco A. *Oncogene*. 2010 Jan 7;29(1):105-16.
4. Growth factor-antagonized rexinoid apoptosis involves permissive PPARgamma/RXR heterodimers to activate the intrinsic death pathway by NO. Shankaranarayanan P, Rossin A, Khanwalkar H, Alvarez S, Alvarez R, Jacobson A, Nebbioso A, de Lera AR, Altucci L, Gronemeyer H. *Cancer Cell*. 2009 Sep 8;16(3):220-31.
5. Molecular analysis of the apoptotic effects of BPA in acute myeloid leukemia cells. Bontempo P, Mita L, Doto A, Miceli M, Nebbioso A, Lepore I, Franci G, Menafra R, Carafa V, Conte M, De Bellis F, Manzo F, Di Cerbo V, Benedetti R, D'Amato L, Marino M, Bolli A, Del Pozzo G, Diano N, Portaccio M, Mita GD, Vietri MT, Cioffi M, Nola E, Dell'aversana C, Sica V, Molinari AM, Altucci L. *J Transl Med*. 2009 Jun 18;7:48.
6. Selective class II HDAC inhibitors impair myogenesis by modulating the stability and activity of HDAC-MEF2 complexes. Nebbioso A, Manzo F, Miceli M, Conte M, Manente L, Baldi A, De Luca A, Rotili D, Valente S, Mai A, Usiello A, Gronemeyer H, Altucci L. *EMBO Rep*. 2009 Jul;10(7):776-82.
7. Salermide, a Sirtuin inhibitor with a strong cancer-specific proapoptotic effect. Lara E, Mai A, Calvanese V, Altucci L, Lopez-Nieva P, Martinez-Chantar ML, Varela-Rey M, Rotili D, Nebbioso A, Roperio S, Montoya G, Oyarzabal J, Velasco S, Serrano M, Witt M, Villar-Garea A, Imhof A, Mato JM, Esteller M, Fraga MF. *Oncogene*. 2009 Feb 12;28(6):781-91.
8. HDAC2 blockade by nitric oxide and histone deacetylase inhibitors reveals a common target in Duchenne muscular dystrophy treatment. Colussi C, Mozzetta C, Gurtner A, Illi B, Rosati J, Straino S, Ragone G, Pescatori M, Zaccagnini G, Antonini A, Minetti G, Martelli F, Piaggio G, Gallinari P, Steinkuhler C, Clementi E, Dell'Aversana C, Altucci L, Mai A, Capogrossi MC, Puri PL, Gaetano C. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Dec 9;105(49):19183-7.
9. New pyrrole-based histone deacetylase inhibitors: binding mode, enzyme- and cell-based investigations. Mai A, Valente S, Nebbioso A, Simeoni S, Ragno R, Massa S, Brosch G, De Bellis F, Manzo F, Altucci L. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009 Jan;41(1):235-47. Epub 2008 Sep 12.
10. Epi-drugs to fight cancer: from chemistry to cancer treatment, the road ahead. Mai A, Altucci L. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009 Jan;41(1):199-213
11. Laccase treatment impairs bisphenol A-induced cancer cell proliferation affecting estrogen receptor alpha-dependent rapid signals. Bolli A, Galluzzo P, Ascenzi P, Del Pozzo G, Manco I, Vietri MT, Mita L, Altucci L, Mita DG, Marino M. *IUBMB Life*. 2008 Dec;60(12):843-52.
12. Effect of bisphenol A with or without enzyme treatment on the proliferation and viability of MCF-7 cells. Ricupito A, Del Pozzo G, Diano N, Grano V, Portaccio M, Marino M, Bolli A, Galluzzo P, Bontempo P, Mita L, Altucci L, Mita DG. *Environ Int*. 2009 Jan;35(1):21-6.

### **Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni**

Studio del meccanismo di indicibilità di TRAIL nei tumori

Identificazione e caratterizzazione di nuovi modulatori epigenetici come farmaci contro le patologie umane

**Collaborazioni internazionali in atto**

Manel Esteller, CNIO, ES

HG Stunnenberg, Radbaud University, NL

H Gronemeyer, IGBMC, FR

**Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca**

FACS, Camera cellule, fluorimetro a micro piastra, sistemi di congelazione

**Parole Chiave**

Epigenetica, cancro, HDACs, ormoni, recettori nucleari

*UNITA' DI RICERCA INBB*  
*Roma*

**Responsabile Scientifico**

Prof. Giovanni Antonini

**Linea di Ricerca**

Struttura, funzione ed applicazioni biotecnologiche di proteine ed enzimi

**Composizione del Gruppo**

**Aderenti INBB**

<i>Antonini Giovanni</i>	<i>PO</i>	<i>giovanni.antonini@uniroma3.it</i>
--------------------------	-----------	--------------------------------------

**Non Aderenti INBB**

<i>Giansanti Francesco</i>	<i>RU</i>	<i>francesco.giansanti@cc.univaq.it</i>
<i>Mari Alberto</i>	<i>A</i>	<i>a.mari@emmebiesse.net</i>
<i>Leboffe Loris</i>	<i>BC</i>	<i>lleboffe@uniroma3.it</i>
<i>Bottini Giorgia</i>	<i>DR</i>	<i>g.bottini@emmebiesse.net</i>
<i>Priolisi Francesca Romana</i>	<i>BC</i>	<i>fr.priolisi@emmebiesse.net</i>

**Sede Unità di Ricerca**

*Dipartimento di Biologia*

*Università Roma Tre*

*v.le Marconi 446, 00146 Roma,*

*tel. +39.06.5733.6233*

*fax +39.06.5733.6405*

**Sezione INBB di appartenenza**

Roma

**Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni**

*Obiettivi*

- Correlazione struttura.funzione e meccanismi molecolari alla base della attività di proteine ed enzimi
- Comprensione dei meccanismi molecolari alla base della attività protettiva della lattoferrina
- Applicazioni biotecnologiche dello studio di enzimi redox batterici

*Risultati ottenuti*

- Sono stati delucidati i meccanismi molecolari alla base del ruolo della emopessina nel controllo della concentrazione dell'NO ed meccanismi molecolari alla base della attivazione del pro-farmaco brostacillina da parte della glutatione transferasi.
- Sono state sviluppate e comprovate nuove ipotesi sul meccanismo molecolare della attività antivirale ed antiparassitaria della lattoferrina.
- E' stato sviluppato un metodo per la rilevazione e conta selettiva dei microrganismi basato sul dosaggio colorimetrico della attività di enzimi redox batterici. Tale ricerca ha portato nel 2007 alla costituzione del primo spin-off dell'Università' Roma Tre ed ha usufruendo di un finanziamento MIUR ex art. 11 DM 593/00. Nel 2008 è stato concesso il relativo brevetto internazionale (WO2008007206)

**Pubblicazioni più significative nel periodo 2007-2010**

Paolo Ascenzi, Alessio Bocedi, Giovanni Antonini, Martino Bolognesi and Mauro Fasano  
Reductive nitrosylation and peroxynitrite-mediated oxidation of heme-hemopexin  
FEBS J. 274:551-562, 2007.

Francesco Giansanti, Maria Federica Giardi, Maria Teresa Massucci, Dario Botti and Giovanni Antonini.  
Ovotransferrin expression and release by chicken cell lines infected with Marek's disease virus.  
Biochem Cell Biol.;85:150-155, 2007.

Stefano Ricagno, Sonia Caccia, Graziella Sorrentino, Giovanni Antonini and Martino Bolognesi  
Human neuroserpin: structure and time-dependent inhibition.  
J Mol Biol.; 388:109-21, 2009



Loris Leboffe, Francesco Giansanti and Giovanni Antonini  
Antifungal and Antiparasitic Activities of Lactoferrin  
Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry; 8: 114-127, 2009

Silvia Pezzola, Giovanni Antonini, Cristina Geroni, Italo Beria, Maristella Colombo, Massimo Broggin, Nicola Mongelli, Loris Leboffe, Robert MacArthur, Alessia Francesca Mozzi, Giorgio Federici and Anna Maria Caccuri  
Role of glutathione transferases in the mechanism of brostallicin activation.  
Biochemistry;49:226-235, 2010.

#### **Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni**

Nei prossimi tre anni continueranno le linee di ricerca già

- Correlazione struttura.funzione e meccanismi molecolari alla base della attività di proteine ed enzimi
- Comprensione dei meccanismi molecolari alla base della attività protettiva della lattoferrina
- Applicazioni biotecnologiche dello studio di enzimi redox batterici

#### **Collaborazioni internazionali in atto**

- Molecular Genetics Group, John Curtin School of Medical Research, Australian National University, Canberra ACT 2601, Australia,
- Biota Structural Biology Laboratory, St Vincent's Institute of Medical Research, 9 Princes Street, Fitzroy, Victoria 3065, Australia,
- Department of Chemistry and Biochemistry, Massey University, Palmerston North, New Zealand

#### **Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca**

Strumentazione per microscopia (microscopi ottici, a fluorescenza, confocale, a forza atomica, elettronici a trasmissione e a scansione)

Strumentazione per biochimica (spettrofluorimetro, ultracentrifuga analitica, stopped-flow, HPLC, workstation)

#### **Parole Chiave**

Correlazione struttura e funzione di proteine

Enzimologia

Lattoferrina

Biotecnologia

Metodi microbiologici rapidi

UNITA' DI RICERCA INBB  
Napoli

**Responsabile Scientifico**

Prof. Antonio Baldini

**Linea di Ricerca**

Regolazione trascrizionale dei progenitori cardiaci  
Biologia dello sviluppo cardiovascolare  
Genetica delle cardiopatie congenite  
Sindrome di DiGeorge

**Composizione del Gruppo**

**Aderenti INBB**

Antonio Baldini	PO	baldini@igb.cnr.it
-----------------	----	--------------------

**Non Aderenti INBB**

Gabriella Fulcoli	BC	e-mail
Luna Pane	BC	e-mail
Cinzia Caprio	DR	e-mail
Gabriella Lania	BC	e-mail
Rosa Ferrentino	PT	

**Sede Unità di Ricerca**

Indirizzo Via Pietro Castellino, 111  
Telefono 081-6132401  
Fax 081-6132706  
E-mail baldini@igb.cnr.it

**Sezione INBB di appartenenza**

Napoli

**Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni**

La ricerca e' focalizzata sul ruolo del fattore di trascrizione Tbx1 durante lo sviluppo embrionale, specialmente per quel che riguarda lo sviluppo cardiovascolare. Tbx1 e' il gene responsabile della sindrome di DiGeorge. Gli approcci sperimentali principali riguardano la manipolazione genetica del topo (gene targeting), sistemi cellulari, compreso riprogrammazione cellulare, e approcci genome-wide come RNA-seq e CHIP-seq.

I risultati piu' importanti negli ultimi anni riguardano il ruolo di questo fattore di trascrizione nel mantenere un pool di progenitori cardiaci attraverso la regolazione positiva della proliferazione (tramite regolazione del segnale FGF), e regolazione negativa del differenziamento (tramite regolazione del segnale BMP e del fattore trascrizionale SRF).

**Pubblicazioni più significative nel periodo 2007-2010**

- Vitelli F, Lania G, Huynh T, Baldini A. Partial Rescue of the *Tbx1* mutant Heart Phenotype by Fgf8: genetic evidence of impaired tissue response to Fgf8. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2010 (in press).
- Chen L, Mupo A, Huynh T, Cioffi S, Woods M, Jin C, McKeehan W, Thompson-Snipes L, Baldini A, Illingworth E. Tbx1 regulates *Vegfr3* and is required for lymphatic vessel development. *Journal of Cell Biology* 189:417-424, 2010.
- Chen L, Fulcoli FG, Tang S, Baldini A. Tbx1 Regulates Proliferation and Differentiation of Multipotent Heart Progenitors. *Circulation Research* 105:842-851, 2009
- Fulcoli G, Huynh T, Scambler PJ, Baldini A. Tbx1 regulates the BMP-Smad1 pathway in a transcription independent manner. *PLoS ONE*, 4:e6049, 2009.
- Lania G, Zhang Z, Huynh T, Caprio C, Moon AM, Vitelli, F, Baldini A. Early thyroid development requires a Tbx1-Fgf8 pathway. *Dev. Biol.* 328:109-117, 2009.
- Zhang Z, Baldini A. In vivo response to high-resolution variation of *Tbx1* mRNA dosage. *Hum. Mol. Genet.* 17:150-157, 2008.
- Xu H, Chen L, Baldini A. In vivo genetic ablation of the periotic mesoderm affects cell proliferation survival and differentiation in the cochlea. *Dev. Biol.* 310:329-340, 2007.
- Brunelli L, Cieslik AK, Alcorn JL, Vatta M, and Baldini A. PPAR $\delta$  up-regulates 14-3-3 $\epsilon$  in human endothelial cells via C/EBP $\beta$ . *Circ. Res.* 100:e59-71, 2007.

**Collaborazioni internazionali in atto**

Institute of Biosciences and Technology, Texas A&M Health Sciences Center, Houston, TX USA

Institute of Child Health, London, UK

Texas Heart Institute, St. Lukes Hospital, Houston, TX, USA

**Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca**

Microscopia, istologia, deep sequencing, citofluorimetria, ecc.

**Parole Chiave**

Regolazione trascrizionale, sviluppo cardiovascolare, progenitori cardiaci.

*UNITA' DI RICERCA INBB  
Pavia*

**Responsabile Scientifico**

Prof. Vittorio Bellotti

**Linea di Ricerca**

Studio dei meccanismi molecolari responsabili della deposizione fibrillare di proteine amiloidogeniche

*titolo*

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

**Composizione del Gruppo**

**Aderenti INBB**

*Bellotti Vittorio*

*PO*

*vbellot@unipv.it*

*Stoppini Monica*

*PA*

*stoppini@unipv.it*

**Non Aderenti INBB**

*Mangione Palma*

*RU*

*p.mangione@unipv.it*

*Giorgetti Sofia*

*RU*

*s.giorgetti@unipv.it*

*Raimondi Sara*

*contrattista*

*sara.raimondi@unipv.it*

*Marchese Loredana*

*DR*

*loredana.marchese@unipv.it*

*Porcari Riccardo*

*DR*

*riccardo.porcari@unipv.it*

**Sede Unità di Ricerca**

*Dipartimento di Biochimica – Università di Pavia*

*Indirizzo: via Taramelli, 3b - 27100 Pavia*

*Telefono: 0382 987932*

*Fax: 0382 423108*

*E-mail: vbellot@unipv.it*

**Sezione INBB di appartenenza**

Milano

**Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni**

*Obiettivi*

- Studio degli eventi molecolari responsabili dell'aggregazione fibrillare di due proteine umane amiloidogeniche: la  $\beta$ 2-microglobulina ( $\beta$ 2-m) e l'ApolipoproteinaA-I (ApoA-I).
- Caratterizzazione dell'attività citotossica dei vari intermedi del processo di fibrillogenesi.
- Caratterizzazione di piccoli ligandi o macromolecole biologiche capaci di legare la  $\beta$ 2-m e di solubilizzare fibrille preformate o di inibire la fibrillogenesi.

*Risultati ottenuti*

L'aggregazione fibrillare della  $\beta$ 2-m, la proteina responsabile dello sviluppo di amiloidosi nei pazienti emodializzati, aumenta notevolmente in presenza di collagene ed eparina. L'eparina induce una rapida oligomerizzazione della  $\beta$ 2-m, e la concentrazione di questi oligomeri è direttamente correlata con la cinetica di formazione delle fibrille. Le forme oligomeriche sono responsabili anche della citotossicità della proteina, infatti la forma monomeriche della  $\beta$ 2-m non è citotossica per le cellule SH-SY5Y, a differenza delle forme oligomeriche. Lo studio delle fibre di  $\beta$ 2-m mediante ssNMR ha dimostrato che la proteina fibrillare conserva i principali elementi di struttura secondaria della proteina nativa, la modificazione più rilevante riguarda l'isomerizzazione della P32. Nell'ambito della ricerca di ligandi capaci di interferire con il processo di fibrillogenesi, stiamo sperimentando la capacità inibente di anticorpi monoclonali di cammello anti- $\beta$ 2-m e di analoghi della tetraciclina.

La determinazione dei livelli plasmatici dell'ApoA-I wild type e di una variante amiloidogenica (L75P) in due giovani pazienti eterozigoti privi di depositi amiloidi, e studi di espressione della proteina wild type e di due varianti (L75P e L174S) in cellule COS-7 hanno dimostrato che la bassa concentrazione plasmatica della proteina amiloidogenica riscontrata nei pazienti è imputabile all'attività del sistema intracellulare di controllo di qualità, che rappresenta il primo sistema di difesa per la secrezione delle varianti patologiche.

**Pubblicazioni più significative nel periodo 2007-2010 (\*affiliazione INBB)**

1. Giorgetti S, Stoppini M, Tennent GA, Relini A, Marchese L, Raimondi S, Monti M, Marini S, Ostergaard O, Heegaard NH, Pucci P, Esposito G, Merlini G, Bellotti V. Lysine 58-cleaved beta2-microglobulin is not detectable by 2D electrophoresis in ex vivo amyloid fibrils of two patients affected by dialysis-related amyloidosis. *Protein Sci.* (2007) 16:343-9.

2. Carazzone C, Colombo R, Quaglia M, Mangione P, Raimondi S, Giorgetti S, Caccialanza G, Bellotti V, De Lorenzi E. Sulfonated molecules that bind a partially structured species of beta2-microglobulin also influence refolding and fibrillogenesis. *Electrophoresis*. (2008) 29:1502-10.
3. Esposito G, Ricagno S, Corazza A, Rennella E, Gümral D, Mimmi MC, Betto E, Pucillo CE, Fogolari F, Viglino P, Raimondi S, Giorgetti S, Bolognesi B, Merlini G, Stoppini M, Bolognesi M, Bellotti V. The controlling roles of Trp60 and Trp95 in beta2-microglobulin function, folding and amyloid aggregation properties. *J Mol Biol*. (2008) 378:885-95.
4. Relini A, De Stefano S, Torrassa S, Cavalleri O, Rolandi R, Gliozzi A, Giorgetti S, Raimondi S, Marchese L, Verga L, Rossi A, Stoppini M, Bellotti V. Heparin strongly enhances the formation of beta2-microglobulin amyloid fibrils in the presence of type I collagen. *J Biol Chem*. (2008) 283: 4912-20 (\*)
5. Bellotti V, Chiti F. Amyloidogenesis in its biological environment: challenging a fundamental issue in protein misfolding diseases. *Curr Opin Struct Biol*. (2008) 18:771-9
6. Rennella E, Corazza A, Fogolari F, Viglino P, Giorgetti S, Stoppini M, Bellotti V, Esposito G. Equilibrium unfolding thermodynamics of beta2-microglobulin analyzed through native-state H/D exchange. *Biophys J*. (2009) 96:169-79. (\*)
7. Stoppini M, Obici L, Lavatelli F, Giorgetti S, Marchese L, Moratti R, Bellotti V, Merlini G. Proteomics in protein misfolding diseases. *Clin Chem Lab Med*. (2009) 47:627-35.
8. Kolstoe SE, Ridha BH, Bellotti V, Wang N, Robinson CV, Crutch SJ, Keir G, Kukkastenvehmas R, Gallimore JR, Hutchinson WL, Hawkins PN, Wood SP, Rossor MN, Pepys MB. Molecular dissection of Alzheimer's disease neuropathology by depletion of serum amyloid P component. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (2009) 106:7619-23.
9. Ricagno S, Raimondi S, Giorgetti S, Bellotti V, Bolognesi M. Human beta-2 microglobulin W60V mutant structure: Implications for stability and amyloid aggregation. *Biochem Biophys Res Commun*. (2009) 380:543-7.
10. Giorgetti S, Raimondi S, Cassinelli S, Bucciantini M, Stefani M, Gregorini G, Albonico G, Moratti R, Montagna G, Stoppini M, Bellotti V. beta2-Microglobulin is potentially neurotoxic, but the blood brain barrier is likely to protect the brain from its toxicity. *Nephrol Dial Transplant*. (2009) 24:1176-81. (\*)
11. Barbet-Massin E, Ricagno S, Lewandowski JR, Giorgetti S, Bellotti V, Bolognesi M, Emsley L, Pintacuda G. Fibrillar vs crystalline full-length beta-2-microglobulin studied by high-resolution solid-state NMR spectroscopy. *J Am Chem Soc*. 82010) 132:5556-7.
12. Marchesi M, Parolini C, Valetti C, Mangione P, Obici L, Giorgetti S, Raimondi S, Donadei S, Gregorini G, Merlini G, Stoppini M, Chiesa G, Bellotti V. The intracellular quality control system down-regulates the secretion of amyloidogenic apolipoprotein A-I variants: A possible impact on the natural history of the disease. *Biochim Biophys Acta*. (2010) in press

#### **Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni**

- Valutazione dell'attività di inibitori e di disgregatori delle fibre amiloidi in sistemi di fibrillogenesi in vitro che riproducono condizioni simili a quelle fisiopatologiche
- Preparazione di una linea transgenica di *C.elegans* in grado di esprimere la  $\beta$ 2-m wild type e una sua isoforma altamente amiloidogena. Questo modello in vivo verrà utilizzato anche per valutare l'attività di molecole capaci di inibire la fibrillogenesi, come nanoanticorpi e analoghi della tetraciclina
- Valutazione del ruolo delle mutazioni dell'ApoA-I nella modulazione della cinetica di formazione delle fibrille.

#### **Collaborazioni internazionali in atto**

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

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

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

#### **Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca**

1. Spettrofluorimetro Perkin Elmer LS50 e spettropolarimetro Jasco 710
2. Sistema di analisi delle interazioni biomolecolari BIACORE
3. Apparato a flusso interrotto (Bio-Logic SFM-300) per misure spettrofluorimetriche e spettropolarimetriche
4. Calorimetro Nano ITC III (Setaram)
5. Spettrometro di massa MALDI TOF e sistema liquido massa ibrido quadrupolo tempo di volo connesso con sistema nanoHPLC (Waters)
6. Laser light scattering (Nano DLS, Brookhaven instrument Corporation)

#### **Parole Chiave**

Amiloidosi;  $\beta$ 2-microglobulina; Apolipoproteina A-I; misfolding proteico; citotossicità.

*UNITA' DI RICERCA INBB*  
*Parma*

**Responsabile Scientifico**

Prof. Saverio Bettuzzi

**Linea di Ricerca**

Ruolo biologico del gene clusterina (CLU).

CLU e la sua forma nucleare (NCLU) come fattori oncosoppressivi nel cancro della prostata.

Studio della struttura e delle proprietà dei trascritti e delle isoforme proteiche di CLU

Attività anti-tumorale delle catechine del tè verde.

Meccanismo d'azione delle catechine del tè verde.

Chemioprevenzione del cancro prostatico.

Gene profiling del cancro prostatico.

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

**Composizione del Gruppo**

**Aderenti INBB**

Saverio Bettuzzi

PO

*saverio.bettuzzi@unipr.it*

Daniele Del Rio

RU

*daniele.delrio@unipr.it*

Federica Rizzi

BC

*federica.rizzi@nemo.unipr.it*

**Non Aderenti INBB**

Maria Giovanna Troglio

PT

*mariagiovanna.troglio@unipr.it*

Daisy Corvetta

DR

*daisy.corvetta@nemo.unipr.it*

Mariangela Coletta

DR

*mariangela.coletta@nemo.unipr.it*

Alessandro Silva

DR

*alessandro.silva@nemo.unipr.it*

**Sede Unità di Ricerca**

*Dipartimento di Medicina Sperimentale,*

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

*Via Volturno, 39- 43100 PARMA*

*Telefono 0521-903803*

*Fax 0521-903802*

*E-mail: saverio.bettuzzi@unipr.it*

**Sezione INBB di appartenenza**

Milano

**Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni**

*Obiettivi*

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

*Risultati ottenuti*

- 2006: dimostrazione clinica che la somministrazione di un estratto purificato e standardizzato di catechine del tè verde inibisce la progressione del cancro della prostata in soggetti ad alto rischio di sviluppo della malattia;

- 2006: validazione di una “gene signature” con metodo Real-Time qPCR per la prognosi molecolare del cancro prostatico nel modello TRAMP;
- 2007: dimostrazione che l’attività anti-tumorale, anti-motilità ed anti-invasione di nCLU è mediata dalla modificazione dell’organizzazione del citoscheletro attraverso l’interazione con alfa-actinina;
- 2008: dimostrazione che l’effetto anti-tumorale dell’estratto purificato e standardizzato di catechine del tè verde nei confronti della progressione del cancro della prostata non è citostatico ma citotossico, perché il beneficio per i pazienti rimane tale anche 2 anni dopo la sospensione del trattamento. Questo risultato ha permesso di formulare l’ipotesi che le catechine svolgano un’azione terapeutica citotossica contro le fasi iniziali di trasformazione neoplastica;
- 2009: dimostrazione che CLU è un onco-soppressore per il cancro della prostata e per il neuroblastoma in modelli transgenici;
- 2010: pubblicazione della monografia in due tomi “Clusterin” per *Advances in Cancer Research* (Casa Editrice Elsevier, USA).

#### **Publicazioni più significative nel periodo 2007-2010 (\*Affiliazione INBB)**

- Patra S.K. and Bettuzzi S, Epigenetic DNA methylation regulation of genes coding for lipid rafts associated components: a role for rafts proteins in cell transformation and cancer progression, *Oncology Reports*; 17; 1279-1290; 2007 (\*)
- Maioli M, Asara Y, Pintus A, Ninniri S, Bettuzzi S, Scaltriti M, Galimi F, Ventura C., Creating prodynorphin-expressing stem cells alerted for a high-throughput of cardiogenic commitment, *Regen Med*, 2, 193-202, 2007 (\*)
- Brausi M., Rizzi F. and Bettuzzi S. Chemoprevention of human prostate cancer by oral administration of green tea catechins: two years later. A follow-up update, *Eur Urol*, 54, 472-473, 2008 (\*)
- Patra S.K., Patra A., Rizzi F., Ghosh T.C. and Bettuzzi S, Demethylation of (Cytosine-5-C-methyl) DNA and regulation of transcription in the epigenetic pathways of cancer development, *Cancer and Metastasis Reviews*, 27, 315-34, 2008 (\*)
- Rizzi F., Belloni L, Crafa P., Mirca L., Remondini D., Ferretti S., Cortellini P., Corti A. and Bettuzzi S., A Novel Gene Signature for Molecular Diagnosis of Human Prostate Cancer by RT-qPCR, *PLoS ONE*, 3, e3617, 2008 (\*)
- Patra S.K., Rizzi F., Silva A., Olivia R.D. and Bettuzzi S., Molecular Targets Of (–)-Epigallocatechin-3-Gallate (Egcg): Specificity And Interaction With Membrane Lipid Rafts, *J Physiol Pharmacol*, 59 Suppl 9, 217-235, , 2008 (\*)
- Rizzi F. and Bettuzzi S., Targeting CLU In Prostate Cancer, *J Physiol Pharmacol*, 59 Suppl 9, 265-274, , 2008 (\*)
- Bettuzzi S, Davalli P, Davoli S, Chayka O, Rizzi F, Belloni L, Pellacani D, Fregni G, Astancolle S, Fassan M, Corti A, Baffa R, Sala A, Genetic inactivation of ApoJ/clusterin: effects on prostate tumourigenesis and metastatic spread, *Oncogene*, Epub ahead of print, 2009 (\*)
- Chayka O., Corvetta D., Dews M., Caccamo A.E., Piotrowska I., Santilli G., Gibson S., Subire N.J., Himoudi N., Hogarty M.D., Anderson J., Bettuzzi S., Thomas-Tikhonenko A. and Sala A, Clusterin, a haploinsufficient tumor suppressor gene in neuroblastomas, *Journal of the National Cancer Institute*, 101, 663-677, 2009 (\*)
- Patra S.K. and Bettuzzi S. Epigenetic DNA-(Cytosine-5-Carbon) Modifications: 5-Aza-2'-Deoxycytidine and DNA-Demethylation, *Biochemistry (Moscow)*, 74, 613-619, 2009 (\*)
- Rizzi F., Caccamo A.E., Belloni L. and Bettuzzi S., Clusterin is a short half-life, poly-ubiquitinated protein which controls the fate of prostate cancer cells, *J Cell Physiol*, 219, 314-323, 2009 (\*)

#### **Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni**

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

**Collaborazioni internazionali in atto**

*Dr. Arturo Sala,*

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

*Prof. Norman J. Maitland*

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

*Prof. Alan Crozier*

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

**Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca**

Microscopio a Fluorescenza

Nucleic Acid Prep station

Real-Time qPCR

Personal Arrayer per lo spottaggio di DNA chip custom-made

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

Spettrofluorimetro LS-55 Perkin Elmer

**Parole Chiave**

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



UNITA' DI RICERCA INBB  
L'Aquila

**Responsabile Scientifico:**

Prof. Argante Bozzi

**Linee di Ricerca:**

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

*Titoli:*

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

**Composizione del Gruppo**

**Aderenti INBB**

<i>Bozzi Argante</i>	<i>PO</i>	<i>bozzi@cc.univaq.it</i>
----------------------	-----------	---------------------------

**Non Aderenti INBB**

<i>Di Giulio Antonio</i>	<i>PA</i>	<i>antonio.digiulio@cc.univaq.it</i>
<i>D'Andrea Gabriele</i>	<i>PA</i>	<i>gabriele.dandrea@cc.univaq.it</i>
<i>Brisdelli Fabrizia</i>	<i>RIC</i>	<i>fabrizia.brisdelli@cc.univaq.it</i>
<i>Luzi Carla</i>	<i>PT</i>	<i>carla.luzi@cc.univaq.it</i>
<i>Coccia Cristina</i>	<i>BC</i>	<i>cristina_coccia@yahoo.it</i>
<i>Di Placido Giuseppe</i>	<i>DR</i>	<i>gepydp@katamail.com</i>

**Sede Unità di Ricerca:**

*Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche, Università L'Aquila*

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

*Telefono: 0862-433472*

*Fax: 0862-433472*

*E-mail: bozzi@cc.univaq.it*

**Sezione INBB di appartenenza:**

Roma

**Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni**

*Obiettivi*

**Linea di ricerca 1: Struttura e funzione di biopeptidi ad attività antimicrobica:** Negli ultimi tre anni abbiamo focalizzato i nostri studi sugli aspetti strutturali e funzionali di peptidi provenienti da pelle di rana (temporine, bombinine, epcidine) o da sezioni di proteine batteriche (Vitr-p-13, da Hb da vitreoscilla). Tali peptidi sono abbastanza corti (13-25 aa), hanno una carica netta positiva (da +1 a +3), presentano una percentuale variabile di struttura ad alfa-elica e una natura anfipatica. L'interazione con modelli di membrana (monolayers e liposomi di diversa natura e costituzione lipidica) e con membrane di cellule batteriche e fungine è stata esaminata con differenti metodologie.

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

*Risultati ottenuti:*

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

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

#### **Pubblicazioni più significative nel periodo 2007-2010**

1. F.Brisdelli, C.Coccia, B.Cinque, M.G.Cifone and A.Bozzi. Induction of apoptosis by quercetin: different response of human chronic myeloid (K562) and acute lymphoblastic (HSB-2) leukemia cells. *Mol. Cell. Biochem.* 296; 137-149, 2007.
2. A.R.Lizzi, A.M.D'Alessandro, A.Bozzi, B.Cinque, A.Oratore and G.D'Andrea. Pattern expression of glycan residues in AZT-treated K562 cells analyzed by lectin cytochemistry. *Mol. Cell. Biochem.* 300 (1-2); 29-37, 2007.
3. A.Bozzi, C.Coccia, A.Di Giulio, A.C.Rinaldi, A.Amadei, G.Mignogna, A.Bonamore, A.Fais, and M.Aschi. Folding propensity and biological activity of peptides: New insights from conformational properties of a novel peptide derived from Vitreoscilla haemoglobin. *Biopolymers* 87 (1); 85-92, 2007.
4. G.D'Andrea, F.Brisdelli and A.Bozzi. AZT: An old drug with new perspectives (Review). *Current Clinical Pharmacology* 3 (1); 20-37, 2008.
5. A.Bozzi, M.L.Mangoni, A.C.Rinaldi, G.Mignogna and M.Aschi. Folding propensity and biological activity of peptides: The effect of a single stereochemical isomerization on the conformational properties of bombinins in aqueous solution. *Biopolymers* 89 (9); 769-778, 2008.
6. A.Giuliani, G.Pirri, A.Bozzi, A.Di Giulio, M.Aschi and A.C. Rinaldi. Antimicrobial peptides: natural templates for synthetic membrane-active compounds. *Cell. Mol. Life Sci.* 65; 2450-2460, 2008.
7. T.Bucciarelli, M.Saliola, F.Brisdelli, A.Bozzi, C.Falcone, C.Di Ilio and F.Martini. Oxidation of Cys278 of ADH I isozyme from *Kluyveromyces lactis* by naturally occurring disulfides causes its reversible inactivation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1794 (3); 563-568, 2009.
8. F.Brisdelli, G.D'Andrea and A.Bozzi. Resveratrol: a natural polyphenol with multiple chemopreventive properties (Review). *Current Drug Metab.* 10; 530-546, 2009.
9. M.Aschi, A.Bozzi, R.Di Bartolomeo and R.Petruzzelli. The role of disulfide bonds and N-terminus in the structural properties of hepcidins: Insights from molecular dynamics simulations. *Biopolymers*, 93(10):917-26, 2010.

#### **Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni**

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

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

#### **Collaborazioni internazionali in atto**

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

#### **Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca**

1. Apparato per formazione di liposomi di varia natura e composizione
2. Spettrofotometro UV/VIS, termostato e computerizzato Perkin Elmer  $\lambda$ 19
3. Spettrofluorimetro Perkin Elmer LS 50B
4. Apparati HPLC ed FPLC
5. Apparati per EIfor mono- bidimensionale
6. Apparati per blotting (Western, Northern e Southern)

#### **Parole Chiave**

Antimicrobial peptides; liposomes; resveratrol; quercetin; apoptosis

UNITA' DI RICERCA INBB  
Novara

**Responsabile Scientifico:**

Prof.ssa Sandra Brunelleschi

**Linea di Ricerca:**

Modulazione dell'attività di monocito/macrofagi nel volontario sano e nel paziente

**Composizione del Gruppo**

**Aderenti INBB**

Brunelleschi Sandra	PO	sandra.brunelleschi@med.unipmn.it
---------------------	----	-----------------------------------

**Non Aderenti INBB**

Fresu Luigia Grazia	RU	fresu@med.unipmn.it
Amoruso Angela	A	amoruso@med.unipmn.it
Bardelli Claudio	A	bardelli@med.unipmn.it
Federici Canova Donata	DR	donata.federici@med.unipmn.it

**Sede Unità di Ricerca**

Indirizzo: Dip. Scienze Mediche, Università del Piemonte Orientale "A. Avogadro", Via Solaroli, 17 – 28100 Novara

Telefono: 0321-660648

Fax: 0321-620421

E-mail: sandra.brunelleschi@med.unipmn.it

**Sezione INBB di appartenenza**

Milano

**Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni**

I principali temi di ricerca affrontati negli ultimi 3 anni e relativi risultati possono essere così riassunti:

**1. Regolazione dell'espressione di PPAR-gamma nei monocito/macrofagi di volontario sano, di paziente con coronaropatia (CAD), patologie infiammatorie croniche o autoimmuni ed eventuali differenze di genere.** Il gruppo è da tempo impegnato in questo filone di ricerca (pubbl. 4, 5, 7 e 9) e sta proseguendo nella valutazione di eventuali differenze di genere. PPAR-gamma è costitutivamente più espresso (circa 4 volte) nei monocito/macrofagi di pazienti con CAD rispetto al volontario sano; donne con CAD non fumatrici presentano i più alti livelli di espressione di PPAR-gamma e il più basso "release" spontaneo di citochine. Abbiamo iniziato a valutare il ruolo di PPAR nei monocito/macrofagi di pazienti affetti da asma bronchiale ed artrite reumatoide (AR); i dati preliminari finora ottenuti evidenziano una aumentata espressione del recettore nelle cellule di pazienti con AR.

**2. Glucocorticoidi e prevenzione della restenosi dopo angioplastica coronarica: analisi dei meccanismi molecolari nei monociti di paziente.** Nostre osservazioni (pubbl. 10-11) evidenziano l'efficacia del prednisone nel prevenire la restenosi dopo intervento di angioplastica. Questo progetto ha indagato i meccanismi molecolari, che ne sottendono l'efficacia terapeutica, tramite uno studio pilota che ha coinvolto pazienti sottoposti ad angioplastica, così ripartiti: gruppo 1) controllo: stent metallico tradizionale (BMS); gruppo 2) BMS e prednisone per 30 giorni; gruppo 3) stent medicato. I risultati indicano una significativa riduzione, rispetto al valore al tempo 0, del "release" di TNF-alfa e IL-6 e dell'attivazione di NF-kB nei prelievi effettuati 8 e 30 giorni dopo angioplastica nel gruppo 1 e 2 (pubbl. 3), ma non nel gruppo 3.

**3. Effetti anti-infiammatori di nitrostatine e altri "NO donors" nei monocito/macrofagi umani.** L'aggiunta di una "NO-releasing moiety", ovvero una porzione di molecola in grado di liberare NO, a differenti composti, conferisce proprietà anti-infiammatorie alla molecola nativa e/o le potenzia. Nei monocito/macrofagi, la nitropravastatina (NCX 6550) induce l'attivazione di PPAR-gamma, inibisce la traslocazione di NF-kB e la liberazione di citochine pro-infiammatorie, dimostrandosi più attiva della pravastatina e di farmaci donatori di NO di largo uso clinico, quali il nitroprussiato di sodio e l'isosorbide dinitrato (pubbl. 2).

**4. Valutazione delle possibili azioni anti-infiammatorie di composti naturali.** Da qualche tempo stiamo valutando i possibili effetti anti-infiammatori di composti naturali. Abbiamo dimostrato che un estratto "defattato" di olio di oliva inibisce la traslocazione nucleare di NF-kB e la liberazione di citochine (pubbl. 8), e che la clovamide (presente nel cacao) esercita azioni neuroprotettive in vari modelli in vitro (pubbl. 6) e importanti effetti antiinfiammatori nei monocito/macrofagi umani (manoscritto in preparazione).

### **Pubblicazioni più significative nel periodo 2007-2010**

1. Ribichini F, Graziani M, Gambaro G, Pasoli P, Pighi M, Pesarini G, Abaterusso C, Yabarek T, Brunelleschi S, Rizzotti P, Lupo A, Vassanelli C. Early creatinine shifts predict contrast-induced nephropathy and persistent renal damage after angiography. *Am J Med.* 2010; 123:755-63.
2. Amoruso A, Bardelli C, Fresu LG, Poletti E, Palma A, Canova DF, Zeng HW, Ongini E, Brunelleschi S. The nitric oxide-donating pravastatin, NCX 6550, inhibits cytokine release and NF-kappaB activation while enhancing PPARgamma expression in human monocyte/macrophages. *Pharmacol Res.* 2010 Jul 27. [Epub ahead of print] PMID: 20670683
3. Pesarini G, Amoruso A, Ferrero V, Bardelli C, Fresu LG, Perobelli L, Scappini P, De Luca G, Brunelleschi S, Vassanelli C, Ribichini F. Cytokines release inhibition from activated monocytes, and reduction of in-stent neointimal growth in humans. *Atherosclerosis.* 2010; 211:242-8.
4. Amoruso A, Gunella G, Rondano E, Bardelli C, Fresu LG, Ferrero V, Ribichini F, Vassanelli C, Brunelleschi S. Tobacco smoke affects expression of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in monocyte/macrophages of patients with coronary heart disease. *Br J Pharmacol.* 2009;158:1276-84.
5. Amoruso A, Bardelli C, Fresu LG, Palma A, Vidali M, Ferrero V, Ribichini F, Vassanelli C, Brunelleschi S. Enhanced peroxisome proliferator-activated receptor-gamma expression in monocyte/macrophages from coronary artery disease patients and possible gender differences. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009;331:531-8.
6. Fallarini S, Miglio G, Paoletti T, Minassi A, Amoruso A, Bardelli C, Brunelleschi S, Lombardi G. Clovamide and rosmarinic acid induce neuroprotective effects in in vitro models of neuronal death. *Br J Pharmacol.* 2009;157:1072-84.
7. Amoruso A, Bardelli C, Gunella G, Ribichini F, Brunelleschi S. A novel activity for substance P: stimulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma protein expression in human monocytes and macrophages. *Br J Pharmacol.* 2008;154:144-52.
8. Brunelleschi S, Bardelli C, Amoruso A, Gunella G, Ieri F, Romani A, Malorni W, Franconi F. Minor polar compounds extra-virgin olive oil extract (MPC-OOE) inhibits NF-kappa B translocation in human monocyte/macrophages. *Pharmacol Res.* 2007;56:542-9.
9. Amoruso A, Bardelli C, Gunella G, Fresu LG, Ferrero V, Brunelleschi S. Quantification of PPAR-gamma protein in monocyte/macrophages from healthy smokers and non-smokers: a possible direct effect of nicotine. *Life Sci.* 2007;81:906-15.
10. Ferrero V, Ribichini F, Pesarini G, Brunelleschi S, Vassanelli C. Glucocorticoids in the prevention of restenosis after coronary angioplasty: therapeutic potential. *Drugs* 2007;67:1243-55. Review.
11. Ferrero V, Ribichini F, Rognoni A, Marino P, Brunelleschi S, Vassanelli C. Comparison of efficacy and safety of lower-dose to higher-dose oral prednisone after percutaneous coronary interventions (the IMPRESS-LD study). *Am J Cardiol.* 2007;99:1082-6.
12. Ribichini F, Ferrero V, Feola M, Rognoni A, Brunelleschi S, Vacca G, Vassanelli C. Neutropenia in patients treated with thienopyridines and high-dose oral prednisone after percutaneous coronary interventions. *J Interv Cardiol.* 2007;20:209-13.

### **Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni**

Intendiamo meglio evidenziare eventuali differenze di genere nell'espressione di PPAR-gamma in patologie immuni ed autoimmuni e vogliamo proseguire nella valutazione delle azioni antinfiammatorie di molecole "NO-donors" e di differenti composti di origine naturale.

### **Collaborazioni internazionali in atto**

Prof. Wei-dong Zhang, Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Second Military Medical University, Shanghai, Cina

### **Parole Chiave**

Monocito/macrofagi, PPAR-gamma, NF-kB, infiammazione, coronaropatia

UNITA' DI RICERCA INBB  
Catania

**Responsabile Scientifico**

Prof. Vittorio Calabrese

**Linee di Ricerca**

- a) redox proteomica e risposta cellulare allo stress
- b) applicazioni biotecnologiche della laccasi fungina

**Composizione del Gruppo**

**Aderenti INBB**

Vittorio Calabrese

PO

calabres@unict.it

Maria Teresa Cambria

RU

cambrimt@unict.it

Antonio Cambria

A (Presidente Onorario Sezione INBB  
Università di Catania)

cambrian@alice.it

**Non Aderenti INBB**

Trovato Angela

Ricercatore tempo indeterminato

trovato@unict.it

Cornelius Carolin

Ricercatore tempo indeterminato

Carolin.cornelius@receptura.de

Cavallaro Monia

DR

Mariamonia.cavallaro@tin.it

Manuela Pennisi

DR

manuelapennisi@libero.it

**Sede Unità di Ricerca**

Dipartimento di Scienze Chimiche, Università di Catania – Viale Andrea Doria 6, 95125 - Catania

Telefono : 0039-3288310716

Fax : 0039-095-530138

E-mail : calabres@unict.it

**Sezione INBB di appartenenza**

Catania

**Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni**

Linea a)

*Obiettivi*

Scopo della ricerca degli ultimi anni è stato l'applicazione della redox proteomica per lo studio della resistenza cellulare allo stress, quale nuovo approccio per la valutazione del danno cellulare nell'invecchiamento e nelle patologie neurodegenerative e metaboliche.

*Risultati ottenuti*

Lo stato redox cellulare ha un ruolo importante nella patogenesi delle principali patologie neurodegenerative e nella gran parte delle patologie associate ad una condizione di infiammazione cronica, quali la sindrome metabolica, il diabete e la insufficienza renale. Dati preliminari prodotti dal nostro gruppo in modelli animali per patologie neurodegenerative come Alzheimer's, Huntington, ataxia di Friedreich, sclerosi laterale amiotrofica o sclerosi multipla o in pazienti diabetici con insufficienza renale hanno messo in evidenza un significativo aumento di prodotti carbonilici (DPNE), 4-idrossi 2-nonenali ed isoprostani tutti indici di un marcato stress ossidativo con aumento della espressione delle Heat Shock Proteins. Nostri recenti studi effettuati in modelli *in vivo* di invecchiamento cerebrale hanno, inoltre, messo in evidenza un aumento dell'espressione della carnosinasi in aree cerebrali particolarmente suscettibili allo stress ossidativo, come l'ippocampo, la corteccia e lo striato, dove abbiamo evidenziato una significativa correlazione tra alterazione dello stato redox (indicato da deplezione di GSH e incremento del GSSG), con un significativo aumento di prodotti carbonilici (DPNH), HNE (4-idrossi 2-nonenali) ed isoprostani, ed induzione di Hsps. Lo stato redox cellulare, fondamentale per la sopravvivenza delle cellule sottoposte a stress ossidativo, è regolato da un importante fattore trascrizionale redox-sensibile, denominato Nrf2, capace di riconoscere specifiche sequenze denominate ARE (antioxidant responsive element) presenti in un set di geni denominati *Vitageni*. In particolare, sostanze elettrofili che, quali composti nutraceutici di natura polifenolica, o composti ad azione metabolica e/o epigenetica come le carnitine e/o la carnosina, sono in grado di indurre, anche a piccole dosi, la sintesi di enzimi detossificanti di fase II, quali l'eme ossigenasi (HO-1), la NADPH chinone ossidoreduttasi, la superossido dismutasi mitocondriale, la tioredoxina reduttasi e la  $\gamma$ -glutamyl cysteine ligase ( $\gamma$ -GCL), quest'ultimo un'enzima chiave per la sintesi del glutatione, il maggiore antiossidante intracellulare. La significanza biologica del sistema vitageni, e dell'HO-1 in particolare, sta emergendo prepotentemente quale target farmacologico per nuove strategie terapeutiche nel campo delle patologie infiammatorie croniche, in particolare nella patogenesi del danno neurodegenerativo. La possibilità clinica di modificare in modo duraturo queste condizioni patofisiologiche associate ad aumentato stress ossidativo cellulare attraverso un approccio

nutrizionale mirato rappresenta un target nutrizionale-terapeutico di emergente interesse clinico, dagli indubbi vantaggi terapeutici che troverebbe un campo di applicazione clinica quanto mai esteso in quanto, come precedentemente accennato, il campo delle patologie umane in cui tali alterazioni sono presenti è molto ampio e comprende oltre alle principali malattie di interesse neurologico, anche patologie sistemiche come il diabete e il cancro.

Linea b)

*Obiettivi*

Scopo dell'attività di ricerca svolta in questi ultimi anni è consistito nell'individuare i rapporti fra struttura e funzione della laccasi, una ossidasi di origine fungina contenente ioni rame, che catalizza la degradazione di una varietà di fenoli e di altri composti aromatici.

*Risultati ottenuti*

a) La laccasi proveniente da un ceppo selezionato di *Rigidoporus lignosus* è stata estratta e purificata e ne sono state studiate le caratteristiche biochimiche ; b) successivamente, si è proceduto alla cristallizzazione dell'enzima e all'esame della struttura atomica della molecola mediante raggi X ; c) esperimenti di simulazione, con la tecnica del docking, hanno consentito di identificare il sito di legame del substrato con l'enzima ; d) sono stati selezionati alcuni composti fenolici naturali e sintetici quali possibili induttori per incrementare la produzione della laccasi in vitro; e) è stata saggiata la possibilità di degradazione, di una serie di idrocarburi policiclici aromatici, notoriamente non biodegradabili, mediante l'impiego della laccasi in presenza o in assenza di " mediatori ".

### **Publicazioni più significative nel periodo 2007-2010. (\* Affiliazione INBB)**

Calabrese V., Mancuso C., Ravagna A., Perluigi M., Cini C., De Marco C., Butterfield D.A., Giuffrida Stella A.M. (2007) In vivo induction of heat shock proteins in the substantia nigra following L-DOPA administration is associated with increased activity of mitochondrial complex I and nitrosative stress in rats: regulation by glutathione redox state. *J. Neurochem.* 101, 709-717 (\*)

Calabrese V., Mancuso C., De Marco C., Giuffrida Stella A.M., Butterfield DA. (2007) Nitric oxide and cellular stress response in Brain aging and neurodegenerative disorders. In: *Oxidative Stress and Neurodegenerative Disorders*, Qureshi GA.,and Parvez SH eds., pp. 115-134. Elsevier, Oxford, UK.

Cambria MT, Minniti Z, Librando V, Cambria A. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Rigidoporus lignosus* laccase. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2008, 149, 1-8. (\*)

Calabrese V., Cornelius C., Mancuso C., Pennisi G., Calafato S., Bellia F., Bates T.E, Giuffrida Stella A.M., Schapira T., Dinkova Kostova A.T., Rizzarelli E. (2008) Cellular Stress Response: A Novel Target for Chemoprevention and Nutritional Neuroprotection in Aging, Neurodegenerative Disorders and Longevity. *Neurochem. Res.* 33, 2444-2471. (\*)

Calabrese V., Signorile A., Cornelius C., Mancuso C., Scapagnini G., Ventimiglia B., Ragusa N., Dinkova-Kostova A. ( 2008 )Practical approaches to investigate redox regulation of heat shock protein expression and intracellular glutathione redox state. *Methods Enzymol.* 441, 83-110

Calabrese V., Ientile R., Cornelius C., Scalia M., Cambria M.T., Ventimiglia B., Pennisi G., Mancuso C., Butterfield D.A. (2008) Nutritional redox homeostasis and cellular stress response: Differential role of homocysteine and acetylcarnitine. In: *Dietary modulation of cell signaling pathways*. Surh Y.J., Dong Z., Cadenas E., Packer L. Eds. CRC Press, New York, N.Y. (USA

Cambria MT, Di Marino D, Falconi M, Garavaglia S, Cambria A. Docking simulation and competitive experiments validate the interaction between the 2,5-xylidine inhibitor and *Rigidoporus lignosus* laccase. *J.Biomol. Struct.Dinamics*, 2009, 27, 501-510. (\*)

Calabrese V., Perluigi M., Cornelius C., Coccia R., Di Domenico F., Mancuso C., Pennisi G., Dinkova-Kostova A.T. (2009) Phenolics in aging and neurodegenerative disorders. In: *Phenolic Compounds of Plant Origin and Health: The Biochemistry behind their Nutritional and Pharmacological Value"*, pp. 427-451. C.G. Fraga Ed., Wiley & Sons, NY. USA.

Calabrese V., Cornelius C., Rizzarelli E., Owen J.B., Dinkova-Kostova A.T., Butterfield D.A. (2009) Nitric oxide in cell survival: a Janus molecule. *Antioxid. Redox. Signal.* 11, 2717-2739

Calabrese V., Cornelius C., Trovato A., Cambria M.T., Lo Cascio M.S., Di Rienzo L., Condorelli D., De Lorenzo A., Calabrese E.J. (2010) The hormetic role of dietary antioxidants in free radical-related diseases. *Curr. Pharm. Des.* 16: 8778-83.

Cambria MT, Ragusa S, Calabrese V, Cambria A. Enhanced laccase production in white-rot fungus *Rigidoporus lignosus* by addition of selected phenolic and aromatic compounds. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2010 (\*)

Calabrese V., Cornelius C., Dinkova-Kostova AT., Calabrese E.J., Mattson MP. Cellular stress responses, the hormesis paradigm and vitagenes: novel targets for therapeutic intervention in neurodegenerative disorders. *Antioxid Redox Signal.* 2010 E-pub May 6.

#### **Altre pubblicazioni del Gruppo nel periodo 2007-2010**

Calabrese V., Guagliano E., Sapienza M., Panebianco M., Calafato S., Puleo E., Pennisi G., Mancuso C., Butterfield A.D., Giuffrida Stella A.M. (2007) Redox regulation of cellular stress response in aging and neurodegenerative disorders: role of vitagenes. *Neurochem Research* 32, 757-773.

Mancuso C., Scapagini G., Curro D., Giuffrida Stella A.M., De Marco C., Butterfield D.A., Calabrese V. (2007) Mitochondrial dysfunction, free radical generation and cellular stress response in neurodegenerative disorders. *Front Biosci.* 2007 12, 1107-1123.

Calabrese V., Mancuso C., Ravagna A., Perluigi M., Cini C., De Marco C., Butterfield D.A., Giuffrida Stella A.M. (2007) In vivo induction of heat shock proteins in the substantia nigra following L-DOPA administration is associated with increased activity of mitochondrial complex I and nitrosative stress in rats: regulation by glutathione redox state. *J. Neurochem.* 101, 709-717.

Piroddi M., Depunzio I., Calabrese V., Mancuso C., Aisa CM., Binaglia L., Minelli A., Butterfield AD Galli F. (2007) Oxidatively-modified and glycated proteins as candidate pro-inflammatory toxins in uremia and dialysis patients. *Amino Acids* 32, 573-592.

Calabrese V., Mancuso C., De Marco C., Giuffrida Stella A.M., Butterfield DA. (2007) Nitric oxide and cellular stress response in Brain aging and neurodegenerative disorders. In: *Oxidative Stress and Neurodegenerative Disorders*, Qureshi GA., and Parvez SH eds., pp. 115-134. Elsevier, Oxford, UK.

Calabrese V. (2007) Highlight Commentary on "Redox proteomics analysis of oxidatively 3 modified proteins in G93A-SOD1 transgenic mice—A model of 4 familial amyotrophic lateral sclerosis". *Free Radical Biol. Med.* 43, 160-162.

Calabrese V., Mancuso C., Calvani M., Rizzarelli E., Butterfield D.A., Giuffrida Stella A.M.. (2007) Nitric Oxide in the CNS: Neuroprotection versus Neurotoxicity. *Nature Neuroscience* 8, 766-775.

Athanasidou A., Clarke A.B., Turner A.E., Kumaran N.M., Vakilpour S., Smith P.A., Bagiokou D., Bradshaw T.D., Westwell A.D., Fang L., Lobo D.N., Constantinescu C.S., Calabrese V., Loesch A., Alexander S.P., Clothier R.H., Kendall D.A., Bates T.E. (2007) Cannabinoid receptor agonists are mitochondrial inhibitors: a unified hypothesis of how cannabinoids modulate mitochondrial function and induce cell death. *Biochem Biophys Res Commun.* 364, 131-137.

Calabrese V., Pennisi G., Calvani M., Giuffrida Stella A.M., Butterfield D.A., Mancuso C. (2007) Heme Oxygenase As Therapeutic Funnel in Nutritional Redox Homeostasis and Cellular Stress Response: Role of Acetylcarnitine. In: *Heat Shock Protein in Neural Cells*, Christiane Ritcher-Landsberg Eds., pp. 39-52, Springer, N.Y. USA.

Mancuso C., Bates T.E., Butterfield D.A., Calafato S., Cornelius C., De Lorenzo A., Dinkova Kostova A.T., Calabrese V. (2007) Natural antioxidants in Alzheimer's disease. *Expert Opin Investig Drugs.* 16, 1921-1931.

Calabrese V., Mancuso C., Sapienza M., Puleo E., Calafato S., Cornelius C., Finocchiaro M., Mangiameli A., Di Mauro M., Stella A.M., Castellino P. (2007) Oxidative stress and cellular stress response in diabetic nephropathy. *Cell Stress Chaperones* 12, 299-306.

Calabrese V., Cornelius C., Mancuso C., Pennisi G., Calafato S., Bellia F., Bates T.E., Giuffrida Stella A.M., Schapira T., Dinkova Kostova A.T., Rizzarelli E. (2008) Cellular Stress Response: A Novel Target for Chemoprevention and Nutritional Neuroprotection in Aging, Neurodegenerative Disorders and Longevity. *Neurochem. Res.* 33, 2444-2471.

Mancuso C., Capone C., Ranieri S.C., Fusco S., Calabrese V., Eboli M.L., Preziosi P., Galeotti T., Pani G. (2008) Bilirubin as an endogenous modulator of neurotrophin redox signaling. *J. Neurosci Res.* 86, 1212-1230.

Calabrese V., Signorile A., Cornelius C., Mancuso C., Scapagnini G., Ventimiglia B., Ragusa N., Dinkova-Kostova A. Practical approaches to investigate redox regulation of heat shock protein expression and intracellular glutathione redox state. *Methods Enzymol.* 441, 83-110.

Calabrese V., Bates T.E., Mancuso C., Cornelius C., Ventimiglia B., Cambria M.T., Di Renzo L., De Lorenzo A., Dinkova-Kostova A.T. (2008) Curcumin and the cellular stress response in free radical-related diseases. *Mol. Nutr. Food Res.* 52, 1062-1073.

Calabrese V., Calafato S., Puleo E., Cornelius C., Sapienza M., Morganti P., Mancuso C. (2008) Redox regulation of cellular stress response by ferulic acid ethyl ester in human dermal fibroblasts: role of vitagenes. *Clin. Dermatol.* 26, 358-363.

Di Renzo L., Bertoli A., Bigioni M., Del Gobbo V., Premrov M.G., Calabrese V., Di Daniele N., De Lorenzo A. (2008) Body composition and -174G/C interleukin-6 promoter gene polymorphism: association with progression of insulin resistance in normal weight obese syndrome. *Curr. Pharm. Des.* 14, 2699-2706.

Calabrese V., Ientile R., Cornelius C., Scalia M., Cambria M.T., Ventimiglia B., Pennisi G., Mancuso C., Butterfield D.A. (2008) Nutritional redox homeostasis and cellular stress response: Differential role of homocysteine and acetylcarnitine. In: Dietary modulation of cell signaling pathways. Surh Y.J., Dong Z., Cadenas E., Packer L. Eds. CRC Press, New York, N.Y. (USA).

Calabrese V., Butterfield D.A., Stella A.M. (2008) Aging and oxidative stress response in the CNS. In: Development and Aging Changes in the Nervous System. *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*, Lajtha Abel, Perez-Polo J. Regino, Rossner Steffen (Eds.), 3rd ed., pp. 128-234. ISBN: 978-0-387-32670-2.

Calabrese V., Cornelius C., Mancuso C., Ientile R., Giuffrida Stella A.M., Butterfield D.A. (2008) Redox Homeostasis and Cellular Stress Response in Aging and Neurodegeneration. In: Free Radical and Antioxidant Protocols (2nd Edition), Uppu, R.M.; Murthy, S.N.; Pryor, W.A.; Parinandi, N.L. (Eds.), Humana Press, LA, USA.

Calabrese V., Perluigi M., Cornelius C., Coccia R., Di Domenico F., Mancuso C., Pennisi G., Dinkova-Kostova A.T. (2009) Phenolics in aging and neurodegenerative disorders. In: Phenolic Compounds of Plant Origin and Health: The Biochemistry behind their Nutritional and Pharmacological Value", pp. 427-451. C.G. Fraga Ed., Wiley & Sons, NY. USA.

#### **Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni**

- a) Identificazione mediante redox proteomica di pathways intracellulari, ed in particolare, proteine redox sensibili vulnerabili allo stress ossidativo, con un significativo ruolo patogenetico nell'invecchiamento cerebrale e nei disordini neurodegenerativi associato all'aging ed alle neuro degenerazioni, mediante modelli di studio *in vivo* ed *in vitro* di neurodegenerazione. Valutazione di composti antiossidanti sull'espressione ed attività dei Vitageni.
- b) Degradazione dei polifenoli contenuti nelle acque di vegetazione degli oleifici mediante l'impiego della laccasi fungina su scala industriale; estrazione e purificazione dei polifenoli presenti in elevata concentrazione nelle acque reflue degli oleifici e loro utilizzazione come integratori in preparazioni farmaceutiche considerata la loro specifica attività biologica antiossidante.

#### **Collaborazioni internazionali in atto**

Prof. Allan Butterfield  
Department of Chemistry, Center of Membrane Sciences, and Sanders-Brown Center on Aging  
University of Kentucky, Lexington, KY 40506-0055 USA.

Prof. Albena Dinkova-Kostova  
The Biomedical Research Institute, University of Dundee, Scotland, UK and Division of Clinical Pharmacology, Departments of Medicine and Pharmacology and Molecular Sciences, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland, USA.

Prof. Edward J. Calabrese  
University of Massachusetts, Environmental Health Sciences Division, School of Public Health, Amherst, Massachusetts, USA;

#### **Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca**

HPLC-MS (Thermo)  
GC-MS (Thermo)  
Spectramax M5 (Molecular Device)  
Fermentatore per colture cellulari  
Work station per modellistica molecolare

#### **Parole Chiave (max 5)**

Stress Ossidativo; redox Omeostasi; Antiossidanti; Redox proteomica; Laccasi



*UNITA' DI RICERCA INBB  
Verona*

**Responsabile Scientifico**

Prof. Carlo Capelli

**Linea di Ricerca**

Fisiologia dell'esercizio muscolare, adattamenti fisiologici alla microgravità, cinetica degli scambi gassosi durante esercizio nell'uomo, biomeccanica e bioenergetica della locomozione umana

**Composizione del Gruppo**

**Aderenti INBB**

<i>Carlo Capelli</i>	<i>PO</i>	<i>carlo.capelli@univr.it</i>
----------------------	-----------	-------------------------------

**Non Aderenti INBB**

<i>Pogliaghi Silvia</i>	<i>RU</i>	<i>silvia.pogliaghi@univr.it</i>
<i>Valeria Marconi</i>	<i>DR</i>	<i>valeria.marconi@univr.it</i>
<i>Elisa Calabria</i>	<i>BC</i>	<i>elisa.calabria@univr.it</i>
<i>Davide Conte</i>	<i>DR</i>	<i>davide.conte@univr.it</i>

**Sede Unità di Ricerca**

*Dipartimento di Scienze Neurologiche, Neuropsicologiche, Morfologiche e Motorie, Sezione di Scienze Motorie, Via F.*

*Casorati 43, 37131, Verona*

*Telefono 045 8425140*

*Fax 045 8425131*

*E-mail carlo.capelli@univr.it*

**Sezione INBB di appartenenza**

Udine

**Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni**

**Obiettivi**

L'unità di ricerca si è prefissa nel triennio 2007-2010 i seguenti obiettivi scientifici:

1. Studio della cinetica degli scambi gassosi, ossigenazione muscolare e trasporto di ossigeno durante esercizio muscolare nell'uomo in diverse popolazioni di soggetti, prima e dopo deallenamento ed immobilità, prima e dopo allenamento, in condizioni di esercizio supra massimale, dopo blocco farmacologico e in ipo e normossia allo scopo di chiarire quali siano i fattori in vivo che condizionano l'adeguamento del metabolismo ossidativo alla variazione delle richieste energetiche nell'uomo.
2. Studio delle conseguenze della microgravità simulata mediante bed rest sul sistema cardiovascolare, massimo consumo di ossigeno, massima capacità di trasporto dell'ossigeno e capacità di esercizio massimale e sub massimale aerobico allo scopo di chiarire il contributo combinato del decondizionamento cardiovascolare centrale e dell'adattamento muscolare periferico sulla diminuzione della capacità di esercizio dopo esposizione alla microgravità.
3. Studio della biomeccanica, bioenergetica e delle risposte cardiopolmonari in varie forme di locomozione umana inclusa la marcia naturale in piano del paziente affetto da paralisi cerebrale infantile.

**Risultati ottenuti**

1. Si è evidenziato un ruolo dell'ipossia, correlato all'attivazione del sistema ortosimpatico, nel condizionare le risposte precoci cardiovascolari e degli scambi gassosi all'inizio dell'esercizio muscolare. Si è evidenziato che l'immobilità di breve durata è in grado di rallentare le risposte cardiovascolari all'inizio dell'esercizio, ma non quelle del metabolismo ossidativo. Ciò suggerisce che la velocità con la quale il metabolismo ossidativo si adatta alle richieste energetiche imposte dall'esercizio sia condizionata dai meccanismi muscolari che controllano la respirazione mitocondriale e/o la perfusione muscolare locale piuttosto che dall'inerzia della gittata cardiaca nel rispondere alla sollecitazione indotta dall'esercizio.
2. È stato possibile dimostrare che la caduta della massima potenza erogata dopo esposizione alla microgravità obbedisce ad una cinetica bi-fasica essendo molto veloce nei primi 15-20 giorni di adattamento e più lenta in tempi successivi. La prima fase è direttamente riconducibile alla rapida instaurazione di un decondizionamento cardiovascolare principalmente indotto dall'ipovolemia; la seconda rispecchia il graduale rimodellamento morfologico, biochimico e funzionale del muscolo inattivo. Questi risultati sono stati interpretati alla luce di un

3. I risultati acquisiti hanno permesso di descrivere in modo quantitativo le caratteristiche bioenergetiche della locomozione umana con l'utilizzo di peculiari mezzi di trasporto e di chiarire il peso ed il ruolo di alcuni fattori idrostatici sull'economia e rendimento della locomozione in acqua nell'uomo.

#### **Pubblicazioni più significative nel periodo 2007-2010**

- Di Prampero, PE, Dekerle J, Capelli C, Zamparo P. The critical velocity in swimming. *Eur. J. Appl. Physiol.* 102: 164-171, 2008. [IF 2008, 1,931]
- Lador F, Tam E, Azabji MK, Cautero M, Moia C, Morel DR, Capelli C, Ferretti G. The early adjustments of cardiac output systemic O<sub>2</sub> delivery and lung O<sub>2</sub> uptake at exercise onset in men acutely exposed to normobaric hypoxia. *Am J Physiol Integr Comp Physiol*, 295: R624-R632, 2008. [IF 2008, 3,272].
- Capelli C, Ardigo LP, Schena F, Zamparo P. Energy cost and mechanical efficiency of riding a human powered recumbent vehicle. *Ergonomics*, 51: 1565 -1575, 2008. [IF 2007, 1.484].
- Wüst R, Aliverti A, Capelli C, Kaiser B. Breath-by-breath changes of lung oxygen stores at rest and during exercise in humans. *Resp Physiol Neurobiol*, 164: 291-299, 2008. [IF 2008, 2,035]
- Capelli C, Antonutto G, Cautero M, Tam E, Ferretti G. Metabolic and cardiovascular responses during sub-maximal exercise in humans after 14 days of head – down tilt bed rest and inactivity. *Eur J Appl Physiol*, 104: 909 - 918, 2008. [IF 2008, 1,931]
- Capelli C, Tarperi C, Schena F, Cevese A. Energy cost and efficiency of Venetian rowing on a traditional, flat hull boat (Bissa) *Eur J Appl Physiol*, 105: 653 – 661, 2009. DOI: 10.1007/s00421-008-0949-6. [IF 2008, 1,931]
- Ferretti G, Capelli C Maximal O<sub>2</sub> Consumption: Effects of gravity withdrawal and resumption, *Resp Physiol Neurobiol* 169 Suppl 1: S50 - S54, 2009, doi: 10.1016/j.resp.2009.03.012. [IF 2008, 2,035]
- Capelli C, Adami A, Antonutto G, Cautero M, Tam E Oxygen deficits and oxygen delivery kinetics during submaximal intensity exercise in humans after 14 days of head-down tilt-bed rest. *Eur J Appl Physiol.*, 107: 51-59, 2009. doi 10.1007/s00421-009-1098. [IF 2008, 1,931].
- Aliverti A, Kaiser B; Cautero M, Dellacà RL, di Prampero PE, Capelli C. Pulmonary V'O<sub>2</sub> kinetics at the onset of exercise is faster when actual changes in alveolar O<sub>2</sub> stores are considered. *Resp Physiol Neurobiol* 169: 78 - 82, 2009. doi:10.1016/j.resp.2009.08.012 [IF 2008, 2,035].
- Bringard A, Pogliaghi S, Adami A, De Roia G, Lador F, Lucini D, Pizzinelli P, Capelli C, Ferretti G. Cardiovascular determinants of maximal oxygen consumption in upright and supine posture at the end of prolonged bed rest in humans. *Resp Physiol Neurobiol*. 171: 128 – 134, 2010; DOI: 10.1016/j.resp.2010.01.018.
- Bonjour J, Capelli C, Antonutto G, Calza S, Tam E, Linnarsson D, Ferretti G. Effects of gravity acceleration on oxygen consumption during submaximal exercise in humans. In stampa, *Resp Physiol Neurobiol* 171: 128 – 134, 2010, doi: 10.1016/j.resp.2010.02.013.
- Capelli C, Cautero M, Pogliaghi S. Algorithms, modelling and V'O<sub>2</sub> kinetics. In stampa *Eur J Appl Physiol*, DOI 10.1007/s00421-010-1398-8.
- Zamparo P, Capelli C, Pendergast D. Energetics of swimming: an historical perspective. In stampa *Eur J Appl Physiol*, doi: 10.1007/s00421-010-1433-7.

#### **Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni**

Nel prossimo triennio l'unità di ricerca si prefigge l'obiettivo di continuare a sviluppare le linee di ricerca delineate in precedenza. In particolare.

1. intende potenziare l'analisi biomeccanica e bioenergetica della locomozione in pazienti neurologici. A questo scopo, un progetto specifico di dottorato mira alla messa punto di strumentazione e metodi originali per la quantificazione del lavoro meccanico durante locomozione assistita con "walker" nei pazienti affetti da paralisi cerebrale infantile.
2. Intraprenderà, in collaborazione con un biologo borsista, un progetto che miri ad identificare mediante analisi di microarray quali siano le maggiori modifiche nei livelli di espressione genica delle cellule mononucleate del

**Collaborazioni internazionali in atto**

Prof. Guido Ferretti, Dipartimento di Neuroscienze di Base, facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Ginevra, Svizzera

Prof Dag Linnarsson, Dipartimento di Fisiologia farmacologia, Karolinska Institute, Stoccolma, Svezia

Prof. David R. Pendergast, Centre for Research in Special Environments, State University of New York, Buffalo NY, USA.

**Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca**

metabolimetro portatile (3) e unità metabolica (2), NIRS, Innocor (per determinazione della gettata cardiaca in vivo mediante rirespirazione di gas inerti), sistema di motion capture Vicon a 6 telecamere, EMG telemetrico a 16 canali, piattaforme dinamometriche triassiali, Portapres (2), per la determinazione non invasiva in continuo del profilo pressorio arterioso nell'uomo, treadmill Saturn, ecografo portatile con sonda doppler per esami vascolari.

**Parole Chiave**

Esercizio, scambi gassosi, microgravità, locomozione umana

*UNITA' DI RICERCA INBB  
Napoli - Milano*

**Responsabile Scientifico**

Prof. Michele Caraglia

**Linea di Ricerca**

Caratterizzazione delle vie di fuga dall'attività antiproliferativa degli interferoni di tipo I: disegno di strategie per il potenziamento della loro attività anti-tumorale.

**Composizione del Gruppo**

**Aderenti INBB**

*Abbruzzese Alberto*

*PO*

*Alberto.abbruzzese@unina2.it*

*Vitale Giovanni*

*RU*

*Vanni10@yahoo.com*

**Non Aderenti INBB**

*Zappavigna Silvia*

*BC*

*Silvia.zappa@libero.it*

*Dicitore Alessandra*

*BC*

*dicitore@libero.it*

*Misso Gabriella*

*DR*

*Gabriella.misso@unina2.it*

*Gaia Giuberti*

*BC*

*Gaia.giuberti@unina2.it*

*Marra Monica*

*BC*

*mncmarra@yahoo.it*

*Lombardi Angela*

*DR*

*Angela.lombardi@unina2.it*

*Castiglioni Sara*

*BC*

*Castiglioni@libero.it*

**Sede Unità di Ricerca**

- Dipartimento di Biochimica e Biofisica, Seconda Università di Napoli, Via Costantinopoli, 16 80138 Napoli

- Department of Medical Sciences, Università degli Studi di Milano, Milan, Italy

Telefono 0815665871

Fax 0815665863

E-mail *michele.caraglia@unina2.it*

**Sezione INBB di appartenenza**

Napoli

**Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni**

*Obiettivi*

1. Determinazione delle basi molecolari e biochimiche della inibizione proliferativa indotta da IFNa e IFNb in cellule di carcinoma epidermoide testa/collo e polmone ed in cellule di adenocarcinoma del pancreas.
2. Disegno di strategie per il potenziamento dell'attività dell'IFNa e IFNb attraverso il superamento di vie di fuga dalla loro attività antiproliferativa.
3. Studio del sinergismo tra Interferoni di tipo I e l'inibitore della farnesil-transferasi Tipifarnib o agonisti di PPAR gamma rosiglitazone e troglitazone.
4. Verifica in modelli di tumori xenotraplantati in topi nudi degli effetti sinergici delle varie combinazioni farmacologiche determinati negli esperimenti in vitro nella precedente fase della ricerca. Studi immunoistochimici e molecolari sui tumori derivati dai modelli murini.
5. Studio dell'interazione tra vie di sopravvivenza ed il macchinario della sintesi proteica in cellule tumorali umane: definizione dei meccanismi di regolazione della sintesi proteica e suo coinvolgimento nella morte cellulare programmata.

*Risultati ottenuti*

1. Abbiamo identificato una via di fuga all'interferone alfa (IFNa) che è mediata da un pathway EGF-ras-Erk dipendente in linee cellulari di carcinoma epidermoide testa/collo e del polmone e in linee di adenocarcinoma del pancreas.
2. Abbiamo disegnato strategie finalizzate al potenziamento dell'attività antitumorale di agenti biologici come IFNa: l'inibitore della farnesiltransferasi Tipifarnib (inibitore di ras) ha un potente effetto sinergico sia in vivo che in vitro in combinazione con IFNa.
3. Analogamente all'IFNa, l'interferone beta (IFNb) elicit le stesse vie di sopravvivenza in cellule di carcinoma del pancreas e gli agonisti di PPAR gamma rosiglitazone e troglitazone sono in grado di antagonizzare tali effetti e di sinergizzare con l'IFNb nell'induzione di inibizione proliferativa attraverso l'innescamento di un programma autofagico.

4. IFN $\alpha$  induce un precoce incremento dell'espressione proteica di del fattore di allungamento della sintesi proteica eEF-1A dovuta all'inibizione della degradazione proteasoma-dipendente di EF-1A. Tale effetto è mediato dalla fosforilazione in residui di serina e treonina di EF-1A da parte di Raf-1 che è iperattivato nelle cellule di carcinoma epidermoide esposte ad IFN $\alpha$ . La stabilizzazione dei livelli di espressione di EF-1A ha un ruolo importante nella protezione delle cellule tumorali dall'apoptosi indotta da IFN $\alpha$ .

#### **Pubblicazioni più significative nel periodo 2007-2010**

1) Naviglio S, Spina A, Marra M, Sorrentino A, Chiosi E, Romano M, Improta S, Budillon A, Illiano G, Abbruzzese A, Caraglia M. Adenylate cyclase/cAMP pathway downmodulation counteracts apoptosis induced by IFN- $\alpha$  in human epidermoid cancer cells.  
J Interferon Cytokine Res. 27(2):129-36, 2007.

2) Lamberti A, Longo O, Marra M, Tagliaferri P, Bismuto E, Fiengo A, Viscomi C, Budillon A, Rapp UR, Wang E, Venuta S, Abbruzzese A, Arcari P, Caraglia M\*. C-Raf antagonizes apoptosis induced by IFN- $\alpha$  in human lung cancer cells by phosphorylation and increase of the intracellular content of elongation factor 1A.  
Cell Death Differ. 2007 Mar 2.

3) Caraglia M\*, Marra M, Leonetti C, Meo G, D'Alessandro AM, Baldi A, Santini D, Tonini G, Bertieri R, Zupi G, Budillon A, Abbruzzese A. R115777 (Zarnestra(R))/Zoledronic acid (Zometa(R)) cooperation on inhibition of prostate cancer proliferation is paralleled by Erk/Akt inactivation and reduced Bcl-2 and bad phosphorylation.  
J Cell Physiol. 211(2):533-43, 2007.

4) M. Marra, E. Agostinelli, G. Tempera, A. Lombardi, G. Meo, A. Budillon, G. Giuberti, A. Abbruzzese and M. Caraglia\*. Anticancer drugs and hyperthermia enhance cytotoxicity induced by polyamine enzymatic oxidation products.  
Amino Acids 2007 Jul 4.

5) Caraglia M, Marra M, Viscomi C, D'Alessandro AM, Budillon A, Meo G, Arra C, Barbieri A, Rapp UR, Baldi A, Tassone P, Venuta S, Abbruzzese A, Tagliaferri P. The farnesyltransferase inhibitor R115777 (ZARNESTRA) enhances the pro-apoptotic activity of interferon- $\alpha$  through the inhibition of multiple survival pathways.  
International Journal of Cancer. 121(10):2317-30, 2007. IF 4.693

6) Caraglia M, Carteni M, Dicitore A, Cassese D, De Maria S, Ferranti P, Giuberti G, Abbruzzese A, Stiuso P. Experimental study on vasoactive intestinal peptide (VIP) and its diaminopropane bound (VIP-DAP) analog in solution.  
Amino Acids. 2007 Jul 6. IF 2.104

7) M. Marra, A. Lombardi, E. Agostinelli, G. Giuberti, S. Zappavigna, G. Tempera, G. Vitale, M. Bifulco, A. Abbruzzese, M. Caraglia. Bovine serum amine oxidase and spermine potentiate docetaxel and interferon- $\alpha$  effects in inducing apoptosis on human cancer cells through the generation of oxidative stress.  
BBA - Molecular Cell Research 1783(12):2269-78, 2008 IF 6.09

8) Laezza C, Fiorentino L, Pisanti S, Gazzero P, Caraglia M, Portella G, Vitale M, Bifulco M. Lovastatin induces apoptosis of k-ras-transformed thyroid cells via inhibition of ras farnesylation and by modulating redox state. J Mol Med. 86(12):1341-51, 2008 IF 4.82

9) Vitale G, Caraglia M, van Koetsveld PM, Maroni P, Marra M, Colao A, Lamberts SW, Cavagnini F, Hofland LJ. Potential role of type I interferons in the treatment of pituitary adenomas.  
Rev Endocr Metab Disord. 2008 IF 1.9

10) Naviglio S, Caraglia M, Abbruzzese A, Chiosi E, Di Gesto D, Marra M, Romano M, Sorrentino A, Sorvillo L, Spina A, Illiano G. Protein kinase A as a biological target in cancer therapy.  
Expert Opin Ther Targets. 2009 Jan;13(1):83-92 IF 3.3

12. Marra M, Santini D, Meo G, Vincenzi B, Zappavigna S, Baldi A, Rosolowski M, Tonini G, Loeffler M, Lupu R, Addeo S, Abbruzzese A, Budillon A, Caraglia M\*. CYR61 down-modulation potentiates the anti-cancer effects of zoledronic acid in androgen-independent prostate cancer cells.  
Int J Cancer. 125: 2004-2013, 2009

\*Corresponding Author

13) Sirangelo I, Iannuzzi C, Vilasi S, Irace G, Giuberti G, Misso G, D'Alessandro A, Abbruzzese A, Caraglia M. W7FW14F apomyoglobin amyloid aggregates-mediated apoptosis is due to oxidative stress and AKT inactivation caused by Ras and Rac. *J Cell Physiol.* 2009 Nov;221(2):412-23. INBB

14) Caraglia M, Marra M, Tagliaferri P, Lamberts SW, Zappavigna S, Misso G, Cavagnini F, Facchini G, Abbruzzese A, Hofland LJ, Vitale G. Emerging strategies to strengthen the anti-tumour activity of type I interferons: overcoming survival pathways. *Curr Cancer Drug Targets.* 2009 Aug;9(5):690-704.

15) Caraglia M, Marra M, Naviglio S, Botti G, Addeo R, Abbruzzese A. Zoledronic acid: an unending tale for an antiresorptive agent. *Expert Opin Pharmacother.* 2010 Jan;11(1):141-54.

#### **Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni**

- Studio del ruolo del cAMP nell'interazione farmacologica tra IFN $\alpha$  e tipifarnib: meccanismi di azione.
- La definizione dei meccanismi molecolari alla base dell'apoptosi indotta dall'IFN $\alpha$  attraverso l'interazione con fattori della sintesi proteica come EF-1A.
- Analisi del pattern di espressione proteomica nelle cellule tumorali trattate con le diverse combinazioni farmacologiche.
- Sviluppo di formulazioni liposomiali agonisti di PPAR $\gamma$  e disegno di nuovi nanovettori destinati al targeting attivo delle neoplasie umane.
- Sviluppo preclinico di combinazioni farmacologiche tra agonisti di PPAR $\gamma$  e IFN $\beta$ .

#### **Collaborazioni internazionali in atto**

- Ulf Rapp, Max Planck Institute of Biochemistry, Department of Molecular Biology, Martinsried, Germany
- Gerhard Unteregger, Department of Urology and Pediatric Urology, University Clinic of the Saarland, Homburg/Saar, Germany.
- Leo Hofland, Department of Internal Medicine, Division of Endocrinology, Erasmus Medical Center, Rotterdam, The Netherlands.

#### **Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca**

- Appareti per elettroforesi e western blot – Cell culture facility – Citofluorimetro a tre fluorescenze (FACScan B&D)-
- Appareti per elettroforesi 2D di proteine – Apparato per analisi del metiloma – HPLC.

#### **Parole Chiave**

- Interferoni di tipo I – Autofagia - Carcinoma epidermoide e adenocarcinoma del pancreas- Agonisti di PPAR  $\gamma$
- Liposomi

*UNITA' DI RICERCA INBB*  
*Ancona*

**Responsabile Scientifico**  
Prof.ssa Oliana Carnevali

**Linea di Ricerca**

Qualità dei gameti, ecotossicologia riproduttiva, sistemi che controllano appetito e metabolismo

**Composizione del Gruppo**

**Aderenti INBB**

<i>Carnevali Oliana</i>	<i>PO</i>	<i>o.carnevali@univpm.it</i>
-------------------------	-----------	------------------------------

**Non Aderenti INBB**

<i>Olivotto Ike</i>	<i>RU</i>	<i>i.olivotto@univpm.it</i>
<i>Maradonna Francesca</i>	<i>PT</i>	<i>f.maradonna@univpm.it</i>
<i>Migliarini Beatrice</i>	<i>BC</i>	<i>b.migliarini@univpm.it</i>
<i>Gioacchini Giorgia</i>	<i>DR</i>	<i>giorgia.gioacchini@univpm.it</i>
<i>Piccinetti Chiara</i>	<i>DR</i>	<i>c.piccinetti@univpm.it</i>
<i>Lombardo Francesco</i>	<i>DR</i>	<i>f.lombardo@univpm.it</i>

**Sede Unità di Ricerca**

*Università Politecnica delle Marche, Dipartimento di Scienze del Mare*

*Indirizzo Via Brezze Bianche 60131 Ancona*

*Telefono 071-2204990*

*Fax 071-2204650*

*E-mail o.carnevali@univpm.it*

**Sezione INBB di appartenenza**

Roma

**Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni**

*Obiettivi e Risultati ottenuti*

Gli inquinanti presenti nell'ambiente possono influenzare l'endocrinologia dei teleostei acquatici, sia marini che d'acqua dolce. Gli inquinanti classificati come distruttori endocrini, in particolare, possono interferire con la biologia riproduttiva ma anche con altre funzioni di vitale importanza quali lo stimolo dell'appetito e l'omeostasi energetica.

A tale riguardo, negli ultimi anni, si è focalizzata l'attenzione su un inquinante ubiquitario come il Di-etil-esil-ftalato (DEHP), sostanza comunemente utilizzata per la produzione di materie plastiche. E' stato innanzitutto messo in evidenza che il DEHP è in grado di modulare l'espressione di geni chiave coinvolti nell'accrescimento (VTG), nella maturazione ovocitaria (BMP15, LHR, mPRs) e nell'ovulazione (cox-2) di zebrafish portando ad una minore fecondità degli ovociti, nonché ad un ridotto numero di ovociti ovulati.

E' stato inoltre verificato che il DEHP è in grado di interferire anche con l'espressione genica di molecole responsabili dello stimolo dell'appetito (NPY, CB1, LPT, GHRL), nonché del metabolismo lipidico (LPT, SREBP, CB1) comportando una significativa diminuzione della fame, ma un incremento nella sintesi degli acidi grassi.

E' stato sorprendente e di grande rilevanza scientifica rilevare che, sia per quanto riguarda l'effetto sui gameti, che per quanto concerne l'effetto sul metabolismo/appetito la dose più bassa di DEHP tra quelle somministrate è risultata la più deleteria per l'organismo.

**Pubblicazioni più significative nel periodo 2007-2010** (affiliazione anche al Consorzio\*)

1. Piccinetti C.C., Migliarini B., Olivotto I., Coletti G., Amici A. and Carnevali O. (2010) Appetite regulation: The central role of melatonin in Danio rerio. *Horm Behav.* IN PRESS. \*
2. Carnevali O., Tosti L., Speciale C, Peng C, Zhu Y., and F Maradonna (2010). DEHP impairs zebrafish reproduction by affecting critical factors in oogenesis *PLOS one* 5 ( 4 ):e10201\*
3. Piccinetti CC, Migliarini B, Petrosino S, Di Marzo V, Carnevali O. (2010) Anandamide and AM251, via water, modulate food intake at central and peripheral level in fish. *Gen Comp Endocrinol.* 166(2):259-67\*

4. Illuminati S.;Truzzi C.;Annibaldi A.;Migliarini B.;Carnevali O and Scarponi G (2010) Cadmium bioaccumulation and metallothionein induction in the liver of the Antarctic teleost *Trematomus bernacchii* during an on-site short-term exposure to the metal via sea water. *Toxicological & Environmental Chemistry* 92 : 617-640
5. Carnevali O., Conti C, Ferraris P, Garavaglia MG, Gioacchini G Giorgini E, Rubini C, Sabbatini S, Tosi G (2009) FT-IR Microspectroscopy on molecular building of Zebrafish oocytes *J Mol Structure* 938, 207–213
6. Maradonna F, Batti S, Marino M, Mita DG, Carnevali O. (2009) Tamoxifen as an emerging endocrine disruptor. effects on fish reproduction and detoxification target genes. *Ann N Y Acad Sci.*;1163:457-9.\*
7. Migliarini B. and Carnevali O. (2009). A novel role for the endocannabinoid system during zebrafish development. *Mol. Cell Endocrinol.* 299( 2), 172-177
8. Margiotta-Casaluci L. and Carnevali O. (2009). Can estrogenic compounds enhance the activity of cathepsin D and Cathepsin L in the mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Chem and Ecol.* 25 (1): 1-12.
9. Zhang T., Rawson D.M., Tosti L. and Carnevali O. (2008). Cathepsin activities and membrane integrity of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes after freezing to -196 degrees °C using controlled slow cooling. *Cryobiology.* 56(2):138-43.
10. Migliarini B. and Carnevali O. (2008). Anandamide modulates growth and lipid metabolism in the zebrafish *Danio rerio*. *Mol Cell Endocrinol.* 16, 286 (1-2 Suppl. 1):S12-6.
11. Carnevali O., Cionna C., Tosti L., Cerdà J. and Gioacchini G.(2008). Changes in cathepsin gene expression and relative enzymatic activity during gilthead sea bream ovarian follicle maturation. *Mol Rep Develop.* 75(1) 97-104.
12. Maradonna F. and Carnevali O. (2007). Vitellogenin, zona radiata protein, cathepsin D and heat shock protein 70 as biomarkers of exposure to xenobiotics. *Biomarkers.* 12(3) 240-255.

#### **Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni**

Il gruppo della professoressa Carnevali si propone di approfondire gli effetti dei distruttori endocrini sulla riproduzione e sul metabolismo focalizzando l'attenzione sui plasticizzanti come ftalati, BPA etc. Si intende analizzare i pathway che controllano l'appetito per comprendere se la presenza di tali sostanze nell'ambiente possa essere responsabile dei sempre più diffusi disordini alimentari. Si proseguirà inoltre sull'interferenza delle suddette sostanze con la fertilità. Il modello utilizzato sarà lo zebrafish e si applicheranno tecniche di genomica e proteomica.

#### **Collaborazioni internazionali in atto**

Daniel Merrifield BSc PhD  
 Research Scientist  
 The University of Plymouth  
 A403 Portland Square  
 Drake Circus  
 Plymouth

Gary Hardiman  
 Director BIOGEM  
 (BioMedical Genomics Microarray Facility)  
 Associate Professor  
 Department of Medicine  
 University of California San Diego

#### **Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca**

Spettrofluorimetro, sistema HPLC munito di detector UV/VIS e rilevatore fluorimetrico, termociclatori, Real Time PCR, microscopi ad epifluorescenza, analizzatore di immagine, polarografi.

#### **Parole Chiave**

Tossicologia riproduttiva , qualità dei gameti, fecondità , appetito, interferenti endocrini



UNITA' DI RICERCA INBB  
Bologna

**Responsabile Scientifico**

Prof.ssa Rita Casadio

**Linea di Ricerca**

Sviluppo di tools per l'annotazione di genomi e proteomi

**Composizione del Gruppo**

**Aderenti INBB**

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

**Non Aderenti INBB**

Tasco Gianluca	PT	gluca@biocomp.unibo.it
Fronza Raffaele	DR	raffo@biocomp.unibo.it
Savojardo Castrense	DR	savojard@biocomp.unibo.it
Piovesan Damiano	DR	damiano@biocomp.unibo.it
Rajan Deepak	DR	deepak@physics.iisc.ernet.in
Tiwari Shalinee	DR	shalinee@cs.unibo.it
Di Lena Pietro	A	dilena@cs.unibo.it
Indio Valentina	A	valentina@biocomp.unibo.it
Rossi Ivan	A	ivan@biodec.com
Eusebi Alberto	A	alberto@biodec.com

**Sede Unità di Ricerca**

Dip di Biologia; [www.biocomp.unibo.it](http://www.biocomp.unibo.it)

Indirizzo... Via San Giacomo 9/2 - 40126 Bologna

Telefono 0512094005

Fax ...051242576

E-mail [casadio@biocomp.unibo.it](mailto:casadio@biocomp.unibo.it)

**Sezione INBB di appartenenza**

Bologna

**Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni**

*Obiettivi*

Il nostro gruppo di ricerca sviluppa soluzioni computazionali a problemi di rilevanza nell'era genomica e post-genomica occupandosi principalmente della annotazione strutturale e funzionale di geni e proteine e della loro interazione. Inoltre una linea di ricerca specifica è dedicata a stabilire la relazione tra mutazioni e malattie nel genoma umano.

*Risultati ottenuti*

Si sono sviluppate piattaforme per l'annotazione automatica di bio-sequenze. In particolare di estrema rilevanza sono stati:

- l'implementazione di una piattaforma per l'annotazione dei proteomi basata su metodi di cluster dopo allineamento di oltre mille genomi in collaborazione con l'INFN
- l'implementazione di una piattaforma per l'annotazione dello splicing alternativo nel genoma umano in collaborazione con il CNR di Bari e il CASPUR di Roma

**Pubblicazioni più significative nel periodo 2007-2010 (\* affiliazione INBB)**

- Bartoli L, Martelli PL, Rossi I, Fariselli P, Casadio R -Prediction of protein-protein interacting sites: how to bridge molecular events to large scale protein interaction networks- Lect Notes Comp Sci 5688:1-17 (2009) (\*)
- Fariselli P, Savojardo C, Martelli PL, Casadio R -Grammatical-restrained hidden conditional random fields for bioinformatics applications- Algorithms Mol Biol 22:4-13 (2009) (\*)
- Bartoli L, Fariselli P, Krogh A, Casadio R (2009) -CCHMM\_PROF: a HMM-based coiled-coil predictor with evolutionary information- Bioinformatics 25:2757-2763 (2009) (\*)
- Bartoli L, Montanucci L, Fronza R, Martelli PL, Fariselli P, Carota L, Donvito G, Maggi G, Casadio R -The Bologna Annotation Resource: a non-hierarchical method for the functional and structural annotation of protein sequences relying on a comparative large-scale genome analysis- J Proteome Res 8:4362-4371 (2009) (\*)

- Calabrese R, Capriotti E, Fariselli P, Martelli PL, Casadio R -Functional annotations improve the predictive score of human disease-related mutations in proteins- Hum Mutat 30:1237-1244 (2009) (Selected for the Human Mutation Virtual Issue "Evaluating Mutation Patogenicity"; Tavtigian SV and Greenblatt MS, eds; May 2010) (\*)
- Di Lena P, Vassura M, Margara L, Fariselli P, Casadio R -On the reconstruction of three-dimensional protein structures from contact maps- Algorithms 2:76-92 (2009) (\*)
- Ezkurdia I, Bartoli L, Fariselli P, Casadio R, Valencia A, Tress ML -Progress and challenges in predicting protein-protein interaction sites- Brief Bioinform 10:233-246 (2009) (\*)
- Juncker AS, Jensen LJ, Pierleoni A, Bernsel A, Tress ML, Bork P, von Heijne G, Valencia A, Ouzounis CA, Casadio R, Brunak S -Sequence-based feature prediction and annotation of proteins- Genome Biol 10:206 (2009) (\*)
- Pierleoni A, Martelli PL, Casadio R -PredGPI: a GPI anchor predictor- BMC Bioinformatics 9:392 (2008) (\*)
- Montanucci L, Fariselli P, Martelli PL, Casadio R -Predicting protein thermostability changes from sequence upon multiple mutations- Bioinformatics 24:i190-i195 (2008) (\*)
- Capriotti E, Fariselli P, Rossi I, Casadio R -A three-state prediction of single point mutations on protein stability changes- BMC Bioinformatics 9 Suppl 2:S6 (2008) (\*)
- Vassura M, Margara L, Di Lena P, Medri F, Fariselli P, Casadio R -FT-COMAR: fault tolerant three-dimensional structure reconstruction from protein contact maps- Bioinformatics 24:1313-1315 (2008) (\*)

### **Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni**

Sviluppo di tools e piattaforme integrate per l'analisi di dati dopo sequenziamento con sequenziatori di ultimissima generazione

### **Collaborazioni internazionali in atto**

- EBI(UK)-Prof Rolf Apweiler
- Sabanci University(Istanbul, TR)- Prof Ugur Sezerman
- IMIM(Barcelona,ES)-Prof Roderic Guigò

### **Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca**

Cluster con 24 nodi

Due server xeon biprocessore adibiti ad application web servers

Dieci workstation intel P4

### **Parole Chiave**

- Bioinformatics
- Protein Structure Prediction
- Genome annotation
- Machine Learning
- Problem Solving Methods
- SNP annotation

UNITA' DI RICERCA INBB  
Modena

**Responsabile Scientifico**

Dott. D'Arca Domenico

**Linea di Ricerca**

Durante lo sviluppo neoplastico, I geni oncosoppressori rivestono un ruolo fondamentale. Recentemente abbiamo clonato e caratterizzato la funzione di una nuova proteina mitocondriale, chiamata MITOSTATIN. Quest'ultima e' dotata di attività oncosoppressive ed il suo gene è localizzato sul cromosoma 12q24, una regione che presenta una alta frequenza di delezioni in una varietà di neoplasie maligne. MITOSTATIN è una proteina di circa 62 kDa e risulta ubiquitaria. I nostri risultati hanno evidenziato delezioni e mutazioni del gene di MITOSTATIN in circa il 5% di varie linee cellulari tumorali e in circa l'11% di tumori solidi di varie origini. La overespressione transitoria di MITOSTATIN in cellule, causa l'inibizione della formazione di colonie *in vitro*, la crescita tumorale *in vivo* e risulta proapoptotica (caratteristiche condivise dai classici geni oncosoppressori). Viceversa, le cellule knockout per MITOSTATIN hanno mostrato un'aumento della crescita ed un aumentata sopravvivenza. L'espressione di MITOSTATIN e' stata inoltre trovata significativamente ridotta nei tumori della vescica e del seno (riduzione associata agli stadi piu' avanzati del tumore).

Recentemente abbiamo trovato una importante relazione tra la overespressione di MITOSTATIN e la riduzione dei livelli di proteina e dello stato di fosforilazione della Heat-shock protein 27 (Hsp27). Hsp27 ha proprieta' citoprotettive ben note, interferisce direttamente con l'attivazione di caspasi e regola la riorganizzazione del citoscheletro. Tutti questi risultati supportano l'ipotesi che MITOSTATIN ha molte caratteristiche comuni ai classici oncosoppressori, suggerendo un suo possibile coinvolgimento nello sviluppo e progressione del cancro. La nostra attività di ricerca è volta ad ottenere una più approfondita caratterizzazione delle funzioni fisiologiche di MITOSTATIN, che potrebbero portare allo sviluppo di nuove terapie per i tumori maligni.

**Composizione del Gruppo**

**Aderenti INBB**

Arnaldo Corti	PO	arnaldo.corti@unimore.it
Pier Paola Davalli	RU	

**Non Aderenti INBB**

Serenella Astancolle	PA	serenella.astancolle@unimore.it
----------------------	----	---------------------------------

**Sede Unità di Ricerca**

Indirizzo Via Campi 287, Università' Di Modena E Reggio Emilia, dip. Di scienze biomediche, 41100 (MO).

Telefono +39 0592055610

Fax +39 0592055410

E-mail domenico.darca@unimore.it

**Sezione INBB di appartenenza**

Milano

**Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni**

- 2000-2003: Studio delle funzioni dei geni regolatori del metabolismo delle poliammine e della clusterina (SGP-2, TRPM-2, ApoJ ecc.) sul ciclo cellulare e sulla trasformazione neoplastica, Università degli studi di Modena e Reggio Emilia, Italia.

- Gennaio 2003-Agosto 2004: Studio del ruolo delle diverse isoforme della clusterina nelle cellule tumorali prostatiche e nella progressione neoplastica in topi transgenici TRAMP (Transgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate). Azione chemiopreventiva delle catechine sullo sviluppo del tumore in topi TRAMP: identificazione di geni specifici come markers di trasformazione e progressione neoplastica. Università degli studi di Modena e Reggio Emilia, Italia.

- Agosto 2004-Febbraio 2006 : Caratterizzazione ed analisi funzionale di MITOSTATIN, un nuovo oncosoppressore mitocondriale (studi *in vitro* ed *in vivo*). Studio *in vivo* degli effetti di Rofecoxib nell'inibizione o rallentamento dello sviluppo del tumore della vescica in seguito a trattamento con BBN in topi knock-out per FHIT gene oncosoppressore. Department of Urology, Kimmel Cancer Center, Thomas Jefferson University, Philadelphia, USA.

- Maggio 2007-Ottobre 2009 : Analisi dei meccanismi molecolari nell'angiogenesi dei tumori (ruolo delle Id proteins nella pathway Hif $\alpha$ -VEGF). Ruolo di Huwe1, E3 ubiquitina ligasi, che opera a livello della nuova pathway N-Myc-Dll3-Notch, controllando l'attività delle cellule staminali neuronali e promuovendo la loro differenziazione. Department of Neurology and Institute for Cancer Genetics, Columbia University, New York, USA.

- Settembre 2008: Ricercatore presso l'Università' degli studi di Modena e Reggio Emilia, Dipartimento di Scienze Biomediche, Modena, Italia.

### **Pubblicazioni più significative nel periodo 2007-2010**

1. Domenico D' Arca, Xudong Zhao, Wenming Xu, Nadya C. Ramirez-Martinez, Antonio Iavarone and Anna Lasorella. (2010) "The Huwe1 ubiquitin ligase is essential to synchronize neuronal and glial differentiation in the developing cerebellum". Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Mar 15. [Epub ahead of print].
2. Xudong Zhao, Domenico D'Arca, Wei Keat Lim, Manisha Brahmachary, Maria Stella Carro, Thomas Ludwig, Carlos Cordon Cardo, Francois Guillemot, Ken Aldape, Andrea Califano, Antonio Iavarone and Anna Lasorella. (2009) "A novel N-Myc-DLL3 cascade is suppressed by the ubiquitin ligase Huwe1 to inhibit proliferation and promote neurogenesis in the developing brain". Dev Cell. 2009 Aug;17(2):210-21.
3. D'Arca D, LeNoir J, Wildemore B, Gottardo F, Bragantini E, Shupp-Byrne D, Zanesi N, Fassan M, Croce CM, Gomella LG, Baffa R. (2009) "Prevention of bladder cancer in the FHIT knock-out mouse model with ROFECOXIB, a Cox-2 inhibitor". Urol Oncology: Seminars and Original investigations. 2009 Apr 15. [Epub ahead of print].
4. Vecchione A, Fassan M, Anesti V, Morrione A, Goldoni S, Baldassarre G, Byrne D, D'Arca D, Palazzo JP, Lloyd J, Scorrano L, Gomella LG, Iozzo RV, Baffa R. (2009) "MITOSTATIN, a putative tumor suppressor on chromosome 12q24.1, is downregulated in human bladder and breast cancer". Oncogene Jan 15;28(2):257-69. Epub 2008 Oct 20.

### **Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni**

Il nostro obiettivo è quello di ottenere una più approfondita caratterizzazione delle funzioni fisiologiche di MITOSTATIN (nuovo oncosoppressore mitocondriale), che potrebbero portare allo sviluppo di nuove terapie per i tumori maligni.

La ricerca si svolgerà come segue: 1) Analisi del coinvolgimento di MITOSTATIN nel metabolismo ossidativo mitocondriale e nell'instabilità cromosomica. 2) Studio dei meccanismi molecolari attraverso i quali MITOSTATIN favorisce l'apoptosi. 3) Analisi sistematica mutazionale di MITOSTATIN in molti tessuti tumorali di diversa origine (Tissue Bank). I tessuti tumorali in paraffina verranno anche utilizzati per l'analisi di immunoistochimica e di immunoblot per valutare l'espressione della proteina. 4) Analisi dello stato di metilazione del promotore di MITOSTATIN. 7) Studio delle modificazioni post-traduzionali di MITOSTATIN che potrebbero essere responsabili dell'attività/stabilità della proteina stessa. 8) Al fine di individuare possibili "partners proteici" di MITOSTATIN, un'analisi di spettrometria di massa verrà effettuata dopo immunoprecipitazione preparativa. 9) Generazione di topi mutanti "conditional knockout" per MITOSTATIN (modello in vivo).

### **Collaborazioni internazionali in atto**

1. YCR Department of Biology, University of York, UK.
2. Institution Division of Experimental Cardiovascular Medicine, University of Bristol, Bristol, UK.
3. Molecular Haematology and Cancer Biology Unit at the UCL Institute, London, UK.

### **Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca**

1. Automated immunostainer Benchmark (Ventana);
2. Fluorescent microscope (Axiophot, Zeiss);
3. Laser capture microdissection apparatus (Laser Microdissection Systems CKX41, Olympus);
4. 4 Thermocyclers (PTC-200, MJ Research; T3 Thermocycler, Biometra; C1000 Thermal Cycler, BioRad);
5. MJ MiniOpticon Real-time PCR system (BioRad); emitted fluorescence is analyzed by specific software (MJ Opticon Monitor, Analysis Software, BioRad);
6. Automatic Sequencer ABI Prism 310 (Applied Biosystem);

### **Parole Chiave (max 5)**

1. Oncosoppressori
2. Tumori solidi
3. Apoptosi
4. Instabilità genomica
5. Modificazioni post-traduzionali

*UNITA' DI RICERCA INBB  
Catania*

**Responsabile Scientifico**

Prof. Vito De Pinto

**Linea di Ricerca**

Sistemi Proteici Coinvolti Nella Produzione Di Energia E Di Radicali Liberi

**Composizione del Gruppo**

**Aderenti INBB**

<i>Vito De Pinto</i>	<i>PO</i>	<i>vdpbiofa@unict.it</i>
<i>Angela Messina</i>	<i>RU</i>	<i>mess@unict.it</i>
<i>Francesca Guarino</i>	<i>BC</i>	<i>paola14225@yahoo.com</i>
<i>Simona Reina</i>	<i>BC INBB</i>	<i>simonareina@yahoo.it</i>
<i>Cludia Fichera</i>	<i>DR</i>	<i>claudia_fichera@yahoo.it</i>
<i>Annamaria Pappalardo</i>	<i>DR</i>	<i>pappalam@unict.it</i>

**Sede Unità di Ricerca**

*Laboratorio di Biochimica e Biologia Molecolare della Facoltà di Scienze M.F.N., Dip. Di Biologia "M. Lagreca" dell'Università di Catania*

*Indirizzo viale A. Doria, 6*

*Telefono 095-7384244, 7384095, 7384243, 7384092*

*Fax 095-337036.*

*URL: www.unictbiolmol-lab.it*

**Sezione INBB di appartenenza**

Catania

**Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni**

*Obiettivi*

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

- 1) Studi di relazione struttura-attività di peptidi disegnati sulla sequenza della porina eucariotica o VDAC (*Voltage Dependent Anion Selective Channel*). Queste sequenze vengono caratterizzate sia dal punto di vista chimico-fisico (DSC, NMR, CD) che dal punto di vista biologico tramite la produzione di chimere modificate nelle sequenze corrispondenti. Più recentemente abbiamo prodotto delle chimere per swapping di domini tra le isoforme umane del VDAC. Una di queste chimere ha mostrato importanti caratteristiche migliorative dell'attività, verificate sia in vitro che in cellula, in sistemi modello.
- 2) Caratterizzazione ed isolamento delle isoforme 2 e 3 del VDAC. Questo studio ha permesso di ottenere per la prima volta la purificazione di queste isoforme. In particolare sono state oggetto del nostro studio le cellule germinative sia di mammiferi (spermatozoo bovino) che di insetto (ovarii e spermatozoi di *Drosophila melanogaster*). In entrambi questi sistemi modello, sembra emergere un ruolo differenziato tra le isoforme di VDAC con probabili interazioni di esse con proteine cellulari extra-mitochondriali.
- 3) Purificazione e caratterizzazione della carnosinasi, l'enzima deputato alla degradazione della carnosina (beta-alanil-L-istidina), che a sua volta è un peptide con ruolo protettivo abbondantemente presente in molti tessuti.

*Risultati ottenuti*

- 1) Determinazione NMR della struttura dell'N-terminale del VDAC1 e caratterizzazione del suo ruolo cellulare che è risultato di rilievo per l'apoptosi. Questa struttura è stata poi confermata dal modello molecolare dell'intera proteina così come visualizzato dalla cristallografia a raggi X.
- 2) Purificazione della isoforma VDAC2 da spermatozoi di bovino. Questa è la prima volta che tale proteina è mai stata isolata e studiata al mondo. Questo studio ha mostrato come modificazioni post-traslazionali forniscono un pattern di fino a 5 differenti sotto-isoforme del VDAC2 la cui intrigante funzione è attualmente allo studio.
- 3) Definizione del ruolo fisiologico delle isoforme alternative di VDAC o porina in *D. melanogaster*: risulta evidente il coinvolgimento di questi geni nello sviluppo dei tessuti germinativi dell'insetto.

### **Pubblicazioni più significative nel periodo 2007-2010**

- 1) Simona Reina, Vanessa Palermo, Andrea Guarnera, Francesca Guarino, Angela Messina, Cristina Mazzoni, Vito De Pinto. Swapping of the N-terminus of VDAC1 with VDAC3 restores full activity of the channel and confers anti-aging features to the cell. *FEBS Letters* 2010 [In press]. doi:10.1016/j.febslet.2010.04.066
- 2) Shoshan-Barmatz V, De Pinto V, Zweckstetter M, Raviv Z, Keinan N, Arbel N. VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death. *Mol Aspects Med.* 2010 31, 227-85 PubMed PMID: 20346371.
- 3) De Pinto V, Messina A, Lane DJ, Lawen A. Voltage-dependent anion-selective channel (VDAC) in the plasma membrane. *FEBS Lett.* 2010 May 3;584(9):1793-9. Epub 2010 Feb 23. PubMed PMID: 20184885
- 4) De Pinto V, Guarino F, Guarnera A, Messina A, Reina S, Tomasello FM, Palermo V, Mazzoni C. Characterization of human VDAC isoforms: A peculiar function for VDAC3? *Biochim Biophys Acta.* 2010 Feb 6. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 20138821
- 5) Tomasello F, Messina A, Lartigue L, Schembri L, Medina C, Reina S, Thoraval D, Crouzet M, Ichas F, De Pinto V, De Giorgi F. Outer membrane VDAC1 controls permeability transition of the inner mitochondrial membrane in cellulo during stress-induced apoptosis. *Cell Res.* 2009 Dec;19(12):1363-76. Epub 2009 Aug 11. PubMed PMID: 19668262
- 6) Bellia F, Calabrese V, Guarino F, Cavallaro M, Cornelius C, De Pinto V, Rizzarelli E. Carnosinase levels in aging brain: redox state induction and cellular stress response. *Antioxid Redox Signal.* 2009 Nov;11(11):2759-75. PubMed PMID: 19583493
- 7) Perosa F, Favoino E, Vicenti C, Guarnera A, Racanelli V, De Pinto V, Dammacco F. Two structurally different rituximab-specific CD20 mimotope peptides reveal that rituximab recognizes two different CD20-associated epitopes. *J Immunol.* 2009 Jan 1;182(1):416-23. PubMed PMID: 19109173
- 8) Menzel VA, Cassarà MC, Benz R, de Pinto V, Messina A, Cunsolo V, Saletti R, Hinsch KD, Hinsch E. Molecular and functional characterization of VDAC2 purified from mammal spermatozoa. *Biosci Rep.* 2009 Jul 22;29(6):351-62. PubMed PMID: 18976238
- 9) Specchia V, Guarino F, Messina A, Bozzetti MP, De Pinto V. Porin isoform 2 has a different localization in *Drosophila melanogaster* ovaries than porin 1. *J Bioenerg Biomembr.* 2008 Jun;40(3):219-26. Epub 2008 Aug 7. PubMed PMID: 18686020
- 10) De Pinto V, Reina S, Guarino F, Messina A. Structure of the voltage dependent anion channel: state of the art. *J Bioenerg Biomembr.* 2008 Jun;40(3):139-47. Review. PubMed PMID: 18668358
- 11) Guarino F, Messina A, Guarnera A, Puglia G, Bellia F, Reina S, De Pinto V, Specchia V, Bozzetti MP. The voltage dependent anion selective channel family in *Drosophila melanogaster*. *Ital J Biochem.* 2007 Dec;56(4):279-84. PubMed PMID: 19192627
- 12) De Pinto V, Tomasello F, Messina A, Guarino F, Benz R, La Mendola D, Magri A, Milardi D, Pappalardo G. Determination of the conformation of the human VDAC1 N-terminal peptide, a protein moiety essential for the functional properties of the pore. *Chembiochem.* 2007 May 7;8(7):744-56. PubMed PMID: 17387661

### **Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni**

- 1) Cristallizzazione e modelling delle isoforme VDAC2 e 3. Studi di docking con farmaci.
- 2) Coinvolgimento della porina mitocondriale VDAC in patologie di interesse metabolico. Questo studio utilizza anche il lievito *S. cerevisiae* come sistema modello. In questo studio verranno progettate e create proteine chimeriche basate sui modelli umani e di esse verrà verificata la funzionalità sulla base di utilizzazione di ceppi di lievito privi delle porine endogene.
- 3) Analisi barcoding di sequenze marcatrici di specie di interesse alimentare. Questo studio è finalizzato alla realizzazione di dispositivi biosensoriali o a microchip da poter usare per applicazioni di tracciabilità e rintracciabilità molecolare di specie.

### **Collaborazioni internazionali in atto**

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

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

-Prof. Mathias Wintherhalter, Jacobs University, Bremen, Germany

### **Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca**

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

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

Real Time PCR Real Plex Eppendorf

### **Parole Chiave**

Proteine canale transmembrana VDAC; Mitocondrio; Metabolismo energetico; Stress ossidativo; DNA barcode

UNITA' DI RICERCA INBB  
Napoli

**Responsabile Scientifico**

Prof. Alberto Di Donato

**Linea di Ricerca**

- Studio di enzimi ad attività ossigenasica e di ceppi batterici per il biorisanamento di ambienti contaminati da inquinanti aromatici e la biosintesi di composti di interesse industriale o farmacologico.
- Studio dei meccanismi molecolari coinvolti nella formazione dei biofilm batterici e nella resistenza ai composti xenobiotici.

**Composizione del Gruppo**

**Aderenti INBB**

<i>Di Donato Alberto</i>	<i>PO</i>	<i>didonato@unina.it</i>
--------------------------	-----------	--------------------------

**Non Aderenti INBB**

<i>Scognamiglio Roberta</i>	<i>PT</i>	<i>robscogn@unina.it</i>
<i>Alfieri Fabiana</i>	<i>PT</i>	<i>falfieri@unina.it</i>
<i>Smith Ornella</i>	<i>PT</i>	<i>osmith@unina.it</i>
<i>Cafaro Valeria</i>	<i>RU</i>	<i>vcafar@unina.it</i>
<i>Notomista Eugenio</i>	<i>RU</i>	<i>notomist@unina.it</i>
<i>Izzo Viviana</i>	<i>RU</i>	<i>vizzo@unina.it</i>
<i>Troncone Luca</i>	<i>DR</i>	<i>luca.troncone@unina.it</i>

**Sede Unità di Ricerca**

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

*Complesso Universitario Monte S'Angelo - Edificio 7*

*Indirizzo via Cinthia 4 - 80126, Napoli*

*Telefono 081-679143*

*Fax 081-679233*

*E-mail didonato@unina.it*

**Sezione INBB di appartenenza**

Napoli

**Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni**

*Obiettivi*

Uno degli obiettivi principali dell'unità di ricerca è stato l'identificazione dei determinanti molecolari delle regioselettività e della specificità di substrato delle ossigenasi di *Pseudomonas sp.* OXI, un batterio in grado di mineralizzare composti aromatici monociclici, al fine di procedere con la costruzione di proteine mutanti con proprietà catalitiche alterate per l'impiego in procedure di biorisanamento e nella biosintesi di composti di interesse industriale o farmacologico (molecole antiossidanti, "radical scavengers", sintoni, ecc.).

L'unità di ricerca ha avuto inoltre come obiettivo quello di identificare le peculiarità strutturali della membrana esterna di *P. sp.* OX1 responsabili della resistenza del batterio ad ambienti inquinati. Tali conoscenze risultano fondamentali per la progettazione razionale di interventi di biorisanamento.

Infine, l'unità di ricerca si è dedicata all'isolamento e alla caratterizzazione microbiologica e molecolare di nuovi ceppi capaci di crescere in ambienti fortemente contaminati da idrocarburi e mineralizzare un ampio spettro di composti aromatici sia mono che policiclici.

*Risultati ottenuti*

1) Sono stati identificati i determinanti molecolari delle regioselettività e della specificità di substrato della toluene o-xilene monossigenasi (ToMO) ed è stato sviluppato un modello informatico che permette di prevedere quantitativamente le proprietà catalitiche dei mutanti della ToMO consentendo la progettazione di mutanti con specificità di substrato e regioselettività desiderate.

2) Il modello informatico è stato utilizzato per progettare mutanti della ToMO capaci di ossidare con elevata efficienza catalitica e regioselettività il 2-feniletanolo a tirosolo che, utilizzando la fenolo ossidrilasi di *P. sp.* OX1, è stato ulteriormente convertito ad idrossitirosolo, un potente antiossidante presente nell'olio d'oliva.

3) E' stato isolato e caratterizzato il ceppo *Novosphingobium* sp. PP1Y che è in grado di crescere in sistemi bifasici gasolio/acqua anche a rapporti superiori a 1. Il ceppo PP1Y è in grado di utilizzare più di 40 composti aromatici mono e policiclici come unica fonte di carbonio ed energia e di rimuovere fino al 30% degli idrocarburi monociclici, il 20% degli idrocarburi biciclici ed il 15% degli idrocarburi triciclici del gasolio.

#### **Pubblicazioni più significative nel periodo 2007-2010**

1) Lodato, A., Alfieri, F., Olivieri, G., Di Donato, A., Marzocchella, A. & Salatino, P.

Azo-dye conversion by means of *Pseudomonas* sp. OX1.

*Enzyme Microb Tech* (2007) 41, 646-652.

2) Newcomb, M., Lansakara-P, D.S., Kim, H.Y., Chandrasena, R.E., Lippard, S.J., Beauvais, L.G., Murray, L.J., Izzo, V., Hollenberg P.F., & Coon M.J.

Products from enzyme-catalyzed oxidations of norcarenes.

*J Org Chem.* (2007) 72, 1128-33.

3) Newcomb, M., Chandrasena, R.E., Lansakara-P, D.S., Kim, H.Y., Lippard, S.J., Beauvais, L.G., Murray, L.J., Izzo, V., Hollenberg P.F., & Coon M.J.

Desaturase reactions complicate the use of norcarane as a mechanistic probe. Unraveling the mixture of twenty-plus products formed in enzyme-catalyzed oxidations of norcarane.

*J Org Chem.* (2007) 72, 1121-7.

4) De Lorenzo, C., Troise, F., Cafaro, V., & D'Alessio, G.

Combinatorial experimental protocols for ErbB2-derived immunoagents and Herceptin.

*Br J Cancer.* (2007) 97, 1354-60.

5) Troise, F., Cafaro, V., Giancola, C., D'Alessio, G., & De Lorenzo, C.

Differential binding of human immunoagents and Herceptin to the ErbB2 receptor.

*FEBS J.* (2008) 275, 4967-79.

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

*Carbohydr Res.* (2008) 343, 674-684.

7) Notomista, E., Cafaro, V., Bozza, G., & Di Donato, A.

The Molecular Determinants of the Regioselectivity of Toluene, o-Xylene Monooxygenase from *Pseudomonas* sp. OX1.

*Appl. Environ. Microbiol.* (2009) 75, 823-836.

8) Olivieri, G., Di Donato, A., Marzocchella, A. & Salatino, P.

Bioreactors for Azo-dye conversion.

in *Biodegradation of Azo Dyes* (2010), H. Atacag Erkurt ed., pp. 101-131, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

9) Ruggiero, A., Squaglia, F., Izzo, V., Silipo, A., Vitagliano, L., Molinaro, A. & Berisio, R.

Expression, Purification, Crystallization and Preliminary X-Ray Crystallographic Analysis of the Peptidoglycan Binding Region of the Ser/Thr Kinase PrkC from *Staphylococcus aureus*.

*Protein Pept Lett.* (2010) Jul 1. [Epub ahead of print]

10) Zanfardino, A., Restaino, O.F., Notomista, E., Cimini, D., Schiraldi, C., De Rosa, M., De Felice, M., & Varcamonti, M.

Isolation of an *Escherichia coli* K4 kfoC mutant over-producing capsular chondroitin.

*Microb Cell Fact.* (2010) 79, 34.

11) Miele, A., Giardina, P., Notomista, E., Piscitelli, A., Sannita, G., & Faraco, V.

A semi-rational approach to engineering laccase enzymes.

*Mol Biotechnol.* (2010) 46, 149-56.

12) Spadaccini, R., D'Errico, G., D'Alessio, V., Notomista, E., Bianchi, A., Merola, M., & Picone, D.

Structural characterization of the transmembrane proximal region of the hepatitis C virus E1 glycoprotein.

*Biochim Biophys Acta.* (2010) 1798, 344-53.



### **Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni**

Verranno sviluppati catalizzatori cellulari esprimenti le monossigenasi mutate capaci di convertire efficientemente il 2-feniletanolo in idrossitirosole e sintetizzare altri antiossidanti potenziali.

Verrà completata la caratterizzazione di *N. sp. PPIY* con particolare attenzione ai meccanismi di formazione del biofilm all'interfaccia gasolio/acqua allo scopo di determinarne il ruolo sia nella protezione delle cellule che nell'acquisizione dei substrati di crescita.

La disponibilità del genoma completo, ormai nella fase di annotazione, permetterà di chiarire le basi molecolari della resistenza agli idrocarburi, delle ampie capacità degradative e fornirà ulteriori enzimi per applicazioni di biosintesi e biorisanamento da affiancare alle ossigenasi di *P. sp. OX1*.

### **Collaborazioni internazionali in atto**

- 1) Prof Steven J. Lippard, Massachusetts Institute of Technology, Boston, MA, USA.
- 2) Prof Matthew H. Sazinsky, Pomona College, Claremont, CA, USA.
- 3) Prof Manuel Rico, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), 28006 Madrid, Spain.

### **Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca**

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

### **Parole Chiave**

Biorisanamento; Ossigenasi; Ingegneria proteica, Biofilm, Idrocarburi Aromatici.

*UNITA' DI RICERCA INBB*  
**Bologna**

**Responsabile Scientifico**

Prof. Davide Maria Donati

**Linea di Ricerca**

Medicina Rigenerativa in ortopedia

**Composizione del Gruppo**

**Aderenti INBB**

<i>Davide Maria Donati</i>	<i>RU</i>	<i>davide.donati@ior.it</i>
<i>Enrico Lucarelli</i>	<i>A</i>	<i>enrico.lucarelli@ior.it</i>
<i>Barbara Dozza</i>	<i>A</i>	<i>barbara.dozza@ior.it</i>
<i>Michela Pierini</i>	<i>A</i>	<i>michela.pierini@ior.it</i>
<i>Elisa Martella</i>	<i>A</i>	<i>elisa.martella@ior.it</i>

**Sede Unità di Ricerca**

*Indirizzo S.S Laboratorio di Patologia Ortopedica e Rigenerazione Tissutale Osteoarticolare*

*Telefono 051-636.6595*

*Fax 051-636.6799*

*E-mail brl@ior.it*

**Sezione INBB di appartenenza**

Bologna

**Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni**

*Obiettivi*

La Struttura è dedicata alla chirurgia ortopedica ricostruttiva con finalità di ricerca in rigenerazione tissutale e comprende un'attività clinica associata all'attività di laboratorio. L'attività clinica si svolge presso la II Clinica ortopedico-traumatologica. La Struttura è dedicata al trattamento di pazienti che necessitano di ricostruzioni biologiche come per esempio nei pazienti affetti da necrosi della testa del femore, o in pazienti con ritardi di consolidazione. La Struttura per la particolare complessità di queste patologie ha sviluppato competenze professionali e tecnologiche realizzabili solo in una struttura altamente specializzata.

L'attività della Struttura si articola in ricerca, cura ed assistenza ed è finalizzata a:

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

*Risultati ottenuti*

La struttura negli ultimi tre anni ha attivato 4 studi clinici dove viene testata l'efficacia delle cellule staminali mesenchimali, comunemente abbreviate come MSC, nelle cisti ossee giovanili, nella necrosi della testa del femore, nelle cisti aneurismatiche e nella consolidazione degli innesti. In particolare nel protocollo per la consolidazione degli innesti ossei le MSC sono impiantate dopo espansione ex-vivo, tale espansione viene fatta in una struttura autorizzata. Il Laboratorio della struttura ha caratterizzato i prodotti che sono attualmente utilizzati nella sperimentazione clinica ed è stato coinvolto nello sviluppo di nuovi prodotti composti dalla associazione di MSC con proteine ricombinanti e biomateriali.

**Pubblicazioni più significative nel periodo 2007-2010**

1) Osteogenic protein-1 associated with mesenchymal stem cells promote bone allograft integration. Di Bella C, Aldini NN, Lucarelli E, Dozza B, Frisoni T, Martini L, Fini M, Donati D. Tissue Eng Part A. 2010 Sep;16(9):2967-76. [Epub ahead of print]

2) Injection of Demineralized Bone Matrix With Bone Marrow Concentrate Improves Healing in Unicameral Bone Cyst. Di Bella C, Dozza B, Frisoni T, Cevolani L, Donati D. Clin Orthop Relat Res. 2010 Jun 22.

3) Dose-dependent effect of adipose-derived adult stem cells on vertical bone regeneration in rabbit calvarium. Pieri F, Lucarelli E, Corinaldesi G, Aldini NN, Fini M, Parrilli A, Dozza B, Donati D, Marchetti C. Biomaterials. 2010 May;31(13):3527-35. Epub 2010 Feb 18.

- 4) A recently developed bifacial platelet-rich fibrin matrix. Lucarelli E, Beretta R, Dozza B, Tazzari PL, O'Connell SM, Ricci F, Pierini M, Squarzone S, Pagliaro PP, Oprita EI, Donati D. *Eur Cell Mater.* 2010 Jul 1;20:13-23.
- 5) Bone morphogenetic proteins and tissue engineering: future directions. Calori GM, Donati D, Di Bella C, Tagliabue L. *Injury.* 2009 Dec;40 Suppl 3:S67-76.
- 6) Surgical treatment of grade I central chondrosarcoma. Donati D, Colangeli S, Colangeli M, Di Bella C, Bertoni F. *Clin Orthop Relat Res.* 2010 Feb;468(2):581-9. Epub 2009 Aug 29.
- 7) Effect of mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma on the healing of standardized bone defects in the alveolar ridge: a comparative histomorphometric study in minipigs. Pieri F, Lucarelli E, Corinaldesi G, Fini M, Aldini NN, Giardino R, Donati D, Marchetti C. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009 Feb;67(2):265-72.
- 8) The use of unicondylar osteoarticular allografts in reconstructions around the knee. Bianchi G, Staals EL, Donati D, Mercuri M. *Knee.* 2009 Jan;16(1):1-5. Epub 2008 Oct 26.
- 9) OP-1 application in bone allograft integration: preliminary results in sheep experimental surgery. Donati D, Di Bella C, Lucarelli E, Dozza B, Frisoni T, Aldini NN, Giardino R. *Injury.* 2008 Sep;39 Suppl 2:S65-72.
- 10) Historical review of bone prefabrication. Di Bella C, Lucarelli E, Donati D. *Chir Organi Mov.* 2008 Sep;92(2):73-8. Epub 2008 Aug 30.
- 11) The use of fluoride cement: preliminary experimental study and clinical application. Di Bella C, Lucarelli E, Fini M, Giardino R, Mercuri M, Donati D. *Chir Organi Mov.* 2008 Apr;91(3):141-6. Epub 2008 May 21.
- 12) Mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma enhance bone formation in sinus grafting: a histomorphometric study in minipigs. Pieri F, Lucarelli E, Corinaldesi G, Iezzi G, Piattelli A, Giardino R, Bassi M, Donati D, Marchetti C. *J Clin Periodontol.* 2008 Jun;35(6):539-46. Epub 2008 Apr 15.

#### **Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni**

- Ricerca di base: identificare nuovi marcatori fluorescenti che possano aiutare a studiare le cellule staminali mesenchimali
- Ricerca pre-clinica: determinare l'efficacia della associazione di cellule staminali mesenchimali e di carrier a base di collagene e fibrina per migliorare la stabilità primaria delle protesi d'anca.
- Ricerca clinica: determinare l'efficacia clinica di un prodotto a base di cellule staminali mesenchimali per i ritardi di consolidazione

#### **Collaborazioni internazionali in atto**

National Institute R&D for Biological Sciences, Bucharest Romani

#### **Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca**

2 Cappe a flusso laminare

1 centrifuga refrigerata

4 Incubatori

1 bidone di azoto liquido

1 Microscopio ottico e a fluorescenza

1 Lettore di micropiastre colorimetrico, in fluorescenza e in chemiluminescenza

#### **Parole Chiave**

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

UNITA' DI RICERCA INBB  
Napoli

**Responsabile Scientifico**

Prof. Faraone-Mennella Maria Rosaria

**Linea di Ricerca**

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

**Composizione del Gruppo**

**Aderenti INBB**

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

**Non Aderenti INBB**

Natale Emiliana	DR	emiliana81@alice.it
Porzio Elena	DR	e.porzio@alice.it
Mistretta Carmela		carmela.mistretta@unina.it

**Sede Unità di Ricerca**

Dipartimento di Biologia Strutturale e Funzionale

Indirizzo via Cinthi, a Edificio 7 Monte Sant'angelo, 80126 Napoli

Telefono ...081679131-132-136

Fax 081679233E-mail [farina@unina.it](mailto:farina@unina.it), [faraone@unina.it](mailto:faraone@unina.it), [andemaio@unina.it](mailto:andemaio@unina.it)

**Sezione INBB di appartenenza**

Napoli

**Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni**

**Obiettivi**

Gli obiettivi principali delle linee di ricerca sono stati:

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

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

- 1- Nei sieri dei pazienti affetti da LES è stato definito che il metodo immunochimico è altamente sensibile nel seguire lo stato di remissione della malattia, in seguito a trattamento terapeutico

- 2- Nel Sistema Nervoso di *O. vulgaris*, è stato isolato e caratterizzato l'accettore covalente di ADPR ( 240kDa). Esso è costituito da due componenti proteiche , vPARP ed actina, legate mediante un ponte di poliADPribosio. L'actina in forma libera rappresenta anche come accettore non covalente di poliADPR.
- 3- La determinazione del NAD, substrato specifico della PARP, ha rappresentato un marcatore specifico per individuare situazioni di stress cellulare in cellule linfocitarie di agricoltori sani esposti a pesticidi
- 4- La PARP1 ha rappresentato un utile marcatore nel seguire il processo apoptotico, indotto in cellule di melanoma trattate con il peptide sintetico. Quest'ultimo è in grado di inibire l'attività del fattore trascrizionale NF.kB.
- 5- L'equilibrio tra sintesi e degradazione del poliADPR e la sua degradazione, assicura il mantenimento del processo apoptotico indotto dal peptide NBD nelle cellule di melanoma.
- 6- La PARP2 sembra rappresentare un nuovo agente diagnostico utile ad individuare uno stato disomogeneità delle piante in una fase precoce
- 7- Il danneggiamento di proteine solforate provoca la formazione di specie radicaliche centrate all'atomo di zolfo, ovvero tiil radicali RS\*.

#### **Pubblicazioni più significative nel periodo 2007-2010 (\* Affiliazione INBB)**

Ferreri C, Manco I, Faraone-Mennella Mr, Torreggiani A, Tamba M, Manara S, Chatgililoglu C. *The Reaction Of Hydrogen Atoms With Methionine Residues: A Model Of Reductive Radical Stress Causing Tandem Protein-Lipid Damage*. Chembiochem. 2006 Nov;7(11):1738-44. (\*)

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

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

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

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

A. Torreggiani, M. Di foggia, I. Manco, De Maio A., S.A. Markarian, S. Bonora (2008). *Effect of sulfoxides on the thermal denaturation of hen lysozyme: a calorimetric and raman study*. Journal of molecular structure, vol. 891; p. 115-122,

Di Maro A, De Maio A., Castellano S, Parente A, Farina B, MR. Faraone-Mennella. (2009). *the adp-ribosylating thermozyyme from sulfolobus solfataricus is a ding protein*. biological chemistry; p. 1-4.

Ianaro A, Tersigni M, Belardo G, Martino Sd, Napolitano M, Palmieri G, Sini M., De Maio A., Ombra M, Gentilcore G, Capone M, Ascierio M, Satriano Ra, Farina B, mr. Faraone mennella, Ascierio Pa, Ialenti A.. (2009). *Nemo-binding domain peptide inhibits proliferation of human melanoma cells*. Cancer lett.;274(2):331-336.

Di Maro A, De Maio A, Castellano S, Parente A, Farina B, Faraone-Mennella Mr. (2009) *the adp-ribosylating thermozyyme from sulfolobus solfataricus is a ding protein*. Biol chem.;390(1):27-30.

Faraone-Mennella Mr, Scarpa R, Petrella A, Manguso F, Peluso R, Farina B. (2009). *Detecting clinical activity in systemic lupus erythematosus with an archaeal poly(adp-ribose) polymerase-like thermozyyme: a pivotal study*. Biomarkers;14(6):381-7.

Castellano S, Farina B, Faraone-Mennella Mr. *The adp-ribosylation of sulfolobus solfataricus sso7 modulates protein/dna interactions in vitro*. (2009) febs lett.;583(7):1154-8.

Faraone-Mennella Mr, Ferone A, Marino L, Cardone A, Comitato R, Venditti P, Di Meo S, Farina B..(2009).*poly(adp-ribosylation) of proteins and germ cell development in hyperthyroid rat testes*. Mol cell biochem.; 323(1-2):119-29.

Anna De Maio, Elena Porzio, Ida Romano, Barbara Nicolaus, Maria Rosaria Faraone Mennella. *Purification of the poly-*adp*-ribose polymerase - like thermozyyme from the archaeon *sulfolobus solfataricus**. *Methods in molecular biology*. In press

#### **Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni**

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

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

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

Determinare lo stress ossidativo, studiare le alterazioni a livello lipidi di membrana e le alterazioni del sistema poliADPribosilante in pazienti affetti da patologie del digerente, da neoplasie.

Studiare la poliADPribosilazione e regolazione dell'omeostasi energetica nelle piante e nelle alghe

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

#### **Collaborazioni internazionali in atto**

Roy Jones. AFRC Badraham Institute Cambridge U.K

#### **Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca**

Sistema cromatografico FPLC Akta ( Amersham)

Scintillatore Beckman LS 6500

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

Centrifughe Beckman, Ultracentrifughe Beckman L-70

Fotomicroscopio ZEISS con sistema di analisi dell'immagine

Spettrofotometro Nanodrop (CellBio)

Centrifuga concentratrice Chrint mod.RVCZ-18

SONICATORE Branson S-250D

Apparecchio per PCR a gradiente (Thermocycler, Eppendorf)

MICROMULINO VIBRANTE FRITSCH MOD. PILVERISETTE (LevanChimica)

#### **Parole Chiave**

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

*UNITA' DI RICERCA INBB  
Sassari-Osilo*

**Responsabile Scientifico**

Prof.ssa Flavia Franconi

**Linea di Ricerca**

Biologia cellulare, farmacologia

**Composizione del Gruppo**

**Aderenti INBB**

Flavia FRanconi

PO

franconi@uniss.it

Ilaria Campesi

BC

ilacampesi79@yahoo.it

**Non Aderenti INBB**

Addis Roberta

BC

roby905@libero.it

Galistu Adriana

DR

a.galistu@inwind.it

Sanna Manuela

DR

m.sanna@yahoo.it

Fois Marco

DR

fois\_marco@hotmail.com

**Sede Unità di Ricerca**

Indirizzo Via Muroli 23 Sassari

Telefono 079228717

Fax 079228715

E-mail franconi@uniss.it

Indirizzo viale S. antonioOsilo

Telefono 0793441006

Fax 0793441006

E-mail

**Sezione INBB di appartenenza**

Genova

**Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni**

*Obiettivi*

L'Unità di Ricerca INBB di Sassari concentra la propria attività scientifica prevalentemente su 4 linee:

1. Stato redox e antiossidanti naturali e sintetici (estratti di olio extravergine di oliva e taurina)
2. La ricerca si è concentrata, partendo dal diabete gestazionale, sulle tematiche relative alle differenze di genere, rivolte alla differenza dello stato redox e del destino cellulare.
3. neonatal programming
4. Effetto dei contraccettivi orali sulle modificazioni epigenetiche e sull'espressione dei recettori degli estrogeni nei macrofagi in vitro

Ha esperienza sia nel campo della farmacologia, in particolare in farmacologia cardiovascolare e di farmacologia di genere, sia in biochimica clinica. E' anche caratterizzato da esperienze nei settori preclinica e clinica. Negli ultimi tempi il gruppo si propone di valutare i cambiamenti indotti dal genere del sistema redox cellulare, il cui controllo ha dimostrato di essere genere specifico ed estrogeno-dipendente. La metilazione del DNA svolge un ruolo speciale nella epigenetica ed è anche sotto il controllo, almeno in parte, di estrogeni ed il nostro gruppo si propone di analizzare la metilazione del DNA in sangue intero di soggetti.

*Risultati ottenuti*

Studio degli Effetti di antiossidanti naturali I composti polari minori presenti nell'olio d'oliva hanno un forte potere antiossidante inibendo l'ossidazione delle LDL e la potenza dell'effetto dipende dalla loro composizione. Importatamente, essi inibiscono NF-kB in maniera dose dipendente nei monociti e nei macrofagi umani, attenuando anche la liberazione di citochine.

Studio della Taurina in diversi modelli sperimentali

Ha evidenziato che i livelli di taurina sono ridotti nei pazienti con diabete di tipo 1 e che la supplementazione di taurina aumenta tali livelli migliorando anche la funzionalità piastrinica. Inoltre, i livelli plasmatici di taurina sembrano essere un marker dell'alterato metabolismo della pregressa gravidanza in donne con diabete gestazionale ed appare essere

correlata con la precedente e l'attuale secrezione insulinica. Inoltre la taurina in modelli sperimentali di diabete aumenta la sopravvivenza e riduce le alterazioni retiniche essendo più efficace della vitamina E e del selenio. Infine, la somministrazione neonatale di taurina riduce nel maschio adulto le alterazioni metaboliche ed elettrofisiologiche indotte dalla manipolazione neonatale avvenuta durante l'allattamento.

#### Neonatal programming

La somministrazione di un lieve stress dolorifico e di un stress psicologico di breve durata (allontanamento dalla madre) per tutto il periodo d'allattamento induce nel maschio adulto, ma non nelle femmine sovrappeso, iperglicemia, insulino resistenza, dislipidemia, un aumento del cortisterone ed una alterazione dell'asse HHPA.

#### Differenze di Genere e destino cellulare

L'influenza del genere sullo stress ossidativo è stata studiata sulle VSMC isolate dalla aorta di ottenuta animali maschi e femmine. Le cellule femminili producono meno ROS ed hanno maggiori difese sia in condizioni basali che dopo esposizione a UVB in confronto alle cellule maschili. Inoltre le cellule maschili vanno maggiormente incontro ad apoptosi, mentre quelle femminili vanno maggiormente incontro a senescenza. Queste differenze sembrano dipendere da una maggiore anoikis osservata nelle cellule femminili forse sostenuta dalle differenze presenti a livello dell'actina. Sono state osservate anche differenze nei processi autofagici

#### Effetto dei contraccettivi orali sulle modificazioni epigenetiche e sull'espressione dei recettori degli estrogeni nei macrofagi in vitro.

Nelle donne sane l'uso di contraccettivi orali (CO) è incoraggiato durante gli studi clinici. Abbiamo evidenziato che contraccettivi orali combinati con o senza progestinico androgenico influenzano alcuni parametri plasmatici tra cui volume corpuscolare medio, ematocrito, linfociti, glicemia a digiuno, e le HDL. La metilazione del DNA, i parametri di disfunzione endoteliale, l'omocisteina, e la cisteina sono più bassi in entrambi i tipi di CO rispetto ai controlli. Il TNF- $\alpha$  è rilasciato maggiormente dai macrofagi derivati da monociti (MDM) isolati da donne trattate con CO così come livelli dei recettori per gli estrogeni e il loro stato di attivazione. Queste variazioni indotte dai CO in base alla loro formulazione rischia di influenzare le risposte farmacologiche. Pertanto si consiglia di raccomandare l'uso di un solo tipo di CO in ogni singola sperimentazione clinica.

### **Pubblicazioni più significative nel periodo 2007-2010**

1. Malorni W, Campesi I, Straface E, Vella S, Franconi F. Redox features of the cell: a gender perspective. *Antioxid Redox Signal*. 2007 Nov;9(11):1779-801.
2. Franconi F, Seghieri G, Canu S, Straface E, Campesi I, Malorni W. Are the available experimental models of type 2 diabetes appropriate for a gender perspective? *Pharmacol Res*. 2007. *Pharmacol Res*. 2008 Jan;57(1):6-18.
3. Maselli A, Matarrese P, Straface E, Canu S, Franconi F, Malorni W. Cell sex: a new task for cell fate studies? *Faseb J* 23: 978-84. 2009
4. Zinellu A, Sotgia S, Scanu B, Chessa R, Gaspa L, Franconi F, Deiana L, Carru C. Taurine determination by capillary electrophoresis with laser induced fluorescence detection: From clinical field to quality food applications. *Amino Acid* 36:35-41. 2009
5. Straface E, Gambardella L, Vona R, Ascione B, Marino M, Bulzomi P, Coinu R, Canu S, Malorni W, Matarrese P, Malorni W, Franconi F. Cell sex determines anoikis resistance in vascular smooth muscle cells *FEBS Lett* 583, 3448-54, 2009
6. Pinna A, Zinellu A, Franconi F, Solinas G, Carru C. Plasma Cysteinylglycine and Taurine Levels are Reduced in Branch Retinal Vein Occlusion *Ophthalmic Res*. 43:26-32, 2010
7. D'Aquila PS, Canu S, Sardella M, Spanu C, Serra G, Franconi F. Dopamine is involved in the antidepressant-like effect of allopregnanolone in the forced swimming test in female rats. *Behav Pharmacol* 21, 21-8, 2010
8. Musino L, Rossi R, Partenza A, Mureddu G, Zinellu A, Pilo P, Maoddi I, Spazzafumo L, Franconi F, Deiana L, Carru C. Hemostatic gene polymorphisms in young Sardinian with non-fatal acute myocardial infarction. *Front Biosci (Elite Ed)* 2, 559-65. 2010
9. Brunelleschi S, Amoroso A, Bardelli C, Romani A, Ieri F, Franconi F. Minor Polar Compounds in olive oil and NF- $\kappa$ B translocation Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention, eds VR. Preedy, RR Watson, Elsevier -Amsterdam, 2010



10. Seghieri G, Tesi F, De Bellis A, Anichini R, Fabbri G, Franconi F. Long term predictors of post-partum glucose metabolism in women with gestational diabetes mellitus *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, in press , 2010
11. Loizzo S, Vella S, Fortuna A, Frajese GV, Agrapart V, Morales RR, Spampanato S, Campana G, Papasso A, Galletta G, Guarino I, Carta S, Carru C, Zinellu A, Ghirlanda G, Seghieri G, Renzi P, Franconi F Sexual dimorphic evolution of metabolic programming in non-genetic non-alimentary metabolic syndrome model in mice depends on HPA hormones *Peptides* in press
12. Straface E, Lista P, Gambardella L, Franconi F, Malorni W Gender specific features of plasmatic and circulating cell alterations as risk factors in cardiovascular disease *Fund Clin Pharmacol* in press

### **Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni**

Nei prossimi anni si continuerà ad esaminare l'effetto del determinante genere sia in ambito preclinico che a livello clinico. A questo proposito la nostra attenzione si concentrerà su tre modelli cellulari ed esattamente cellule muscolari lisce vasali, cellule endoteliali umane e macrofagi derivati da monociti umani. Sulle prime due linee cellulari, la ricerca andrà ad analizzare l'influenza del genere sul destino cellulare (apoptosi, autofagia) sia in condizioni basali che dopo diverse stimolazioni. In particolare si analizzerà se trattamenti farmacologici o approcci nutrizionali potranno avere effetti diversi nei due generi. A livello clinico, ci focalizzeremo nel valutare come alcuni processi patologici e trattamenti farmacologici possano influenzare la risposta delle cellule del sangue in maniera genere dipendente e se in queste possano essere presenti alterazioni epigenetiche.

### **Collaborazioni internazionali in atto**

Klinge I (Maastricht University, The Netherlands),  
Schenck-Gustafsson K (Karolinska Institut Sweden)  
Regitz-Zagrosek V Charité Berlino, Germany  
Costanza Emanuelli, Università di Bristol

### **Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca**

Cappe a flusso laminare  
Incubatori a CO<sub>2</sub>  
Apparecchi per western blot  
Microscopio a fluorescenza  
Lettore di piastre ELISA  
HPLC

### **Parole Chiave**

Determinante genere, stato redox, destino cellulare, epigenetica,

UNITA' DI RICERCA INBB  
Catania

**Responsabile Scientifico**

Prof.ssa Anna Maria Giuffrida Stella

**Linee di Ricerca**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

*Titolo*

Basi Molecolari Dei Processi Neurodegenerativi E Dell'invecchiamento

**Composizione del Gruppo**

**Aderenti INBB**

Anna Maria Giuffrida Stella

PO

amgsbioc@unict.it

Roberto Avola

PO

ravola@unict.it

Vincenza Barresi

PA

barregi@unict.it

Vittorio Calabrese

PO

calabres@unict.it

Maria Vincenza Catania

(RU - CNR)

mcatania@area.ct.cnr.it

Daniele Filippo Condorelli

PO

condorda@unict.it

Agata Copani

PA

acopani@katamail.com

Paola Dell'albani

(RU - CNR)

dealpa@area.ct.cnr.it

Vincenzo Giuseppe Nicoletti

PA

nicovigi@unict.it

Vittoria Spina-Purrello

RU

spinavitt@unict.it

**Non aderenti INBB**

Antonio Berretta

DR

antonioberretta@libero.it

Carmen Catalano

DR

carmencat@virgilio.it

Monia Cavallaro

DR

mariamonia.cavallaro@tin.it

Simona D'Antoni

DR

simonadantoni@yahoo.it

Rossana Greca

DR

rossana.greca@email.it

Gilberto Salvatrice

DR

s.gilberto@inwind.it

Eleonora Guagliano

DR

eleonoraguagliano@virgilio.it,

Davide Licciardello

DR

alsali@hotmail.it

Di Stefano Donatella

DR

distefanodonatella@virgilio.it,

Sonia Grasso

DR

gsoniat@inwind.it,

Manuela Pennisi

DR

manuelapennisi@libero.it,

Giuseppe Caruso

DR

g.caruso@ymail.com,

Gabriele Bonaventura

DR

gabriele.bonaventura@gmail.com,

Malfa Giuseppe

DR

etnaroots@virgilio.it,

Lucia Gravina

DR

lucia.gravina@libero.it,

Eugenia Ranno

DR

gearanno@yahoo.it,

## **Sede Unità di Ricerca**

*Dipartimento di Scienze Chimiche, Sezione di Biochimica e Biologia Molecolare*

*Università degli Studi di Catania*

*Indirizzo Via Andrea Doria, 6 – 95125 Catania*

*Telefono 0957384074*

*Fax 095336990.*

*E-mail amgsbioc@mbox.unict.it*

## **Sezione INBB di appartenenza**

Catania

## **Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni**

### *Obiettivi*

- regolazione dell'espressione genica di enzimi della catena respiratoria mitocondriale in patologie neurodegenerative e durante l'invecchiamento cerebrale; effetti dello stress ossidativo in vivo ed in vitro.
- ruolo protettivo delle stress protein (HSPs) nella neurotossicità .
- ruolo dell'ossido nitrico di origine gliale nella patogenesi della morte neuronale.
- ruolo della via di trasduzione del segnale JAK/STAT nell'espressione della iNOS.
- relazione tra la cNOS negli astrociti reattivi e il potenziamento della tossicità da attivazione dei recettori metabotropici del gruppo I in colture neuronali in presenza di glia.
- ruolo delle connesine nella patogenesi di diversi disordini neurodegenerativi.
- regolazione dell'espressione genica da parte di fattori di controllo della proliferazione cellulare in colture di astrociti e neuroni e ruolo di alcuni protooncogeni rapidamente indotti dopo attivazione recettoriale.

### *Risultati ottenuti*

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

Dopo induzione della NO sintasi in colture astrogliali mediante trattamento con LPS ed INFgamma è stato osservato: un incremento dell'espressione di enzimi della catena respiratoria mitocondriale (citocromo c ossidasi, ATP sintasi) sia a carico delle subunità proteiche che degli mRNA corrispondenti.

un incremento dell'espressione delle HSP70 e delle HSP32 (emeossigenasi).

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

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

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

## **Pubblicazioni più significative nel periodo 2007-2010**

- 1 - Bramanti V, Campisi A, Tomassoni D, Li Volti G, Caccamo D, Cannavò G, Currò M, Raciti G, Napoli M, Ientile R, Vanella A, Amenta F, Avola R. Effect of acetylcholine precursors on proliferation and differentiation of astroglial cells in primary cultures. *Neurochem Res.* 2008 Dec;33(12):2601-8
- 2 - Campisi A, Bramanti V, Caccamo D, Li Volti G, Cannavò G, Currò M, Raciti G, Galvano F, Amenta F, Vanella A, Ientile R, Avola R. Effect of growth factors and steroids on transglutaminase activity and expression in primary astroglial cell cultures. *J Neurosci Res.* 2008 May 1;86(6):1297-305.
- 3 - Mudò G, Trovato-Salinaro A, Barresi V, Belluardo N, Condorelli DF. Identification of calcium sensing receptor (CaSR) mRNA-expressing cells in normal and injured rat brain. *Brain Res.* 2009 Nov 17;1298:24-36.
- 4 - Barresi V, Ragusa A, Fichera M, Musso N, Castiglia L, Rappazzo G, Travali S, Mattina T, Romano C, Cocchi G, Condorelli DF. Decreased expression of GRAF1/OPHN-1-L in the X-linked alpha thalassemia mental retardation syndrome. *BMC Med Genomics.* 2010 Jul 6;3:28.
- 5 - Calabrese V, Cornelius C, Mancuso C, Ientile R, Giuffrida Stella AM, Butterfield DA. Redox homeostasis and cellular stress response in aging and neurodegeneration. *Methods Mol Biol.* 2010;610:285-308.
- 6 - Calabrese V, Cornelius C, Mancuso C, Pennisi G, Calafato S, Bellia F, Bates TE, Giuffrida Stella AM, Schapira T, Dinkova Kostova AT, Rizzarelli E. Cellular stress response: a novel target for chemoprevention and nutritional neuroprotection in aging, neurodegenerative disorders and longevity. *Neurochem Res.* 2008 Dec;33(12):2444-71.
- 7 - D'Antoni S, Berretta A, Bonaccorso CM, Bruno V, Aronica E, Nicoletti F, Catania MV. Metabotropic glutamate receptors in glial cells. *Neurochem Res.* 2008 Dec;33(12):2436-43.

- 8 - Bensaïd M, Melko M, Bechara EG, Davidovic L, Berretta A, Catania MV, Gecz J, Lalli E, Bardoni B. FRAXE-associated mental retardation protein (FMR2) is an RNA-binding protein with high affinity for G-quartet RNA forming structure. *Nucleic Acids Res.* 2009 Mar;37(4):1269-79
- 9 - Copani A, Caraci F, Hoozemans JJ, Calafiore M, Sortino MA, Nicoletti F. The nature of the cell cycle in neurons: focus on a "non-canonical" pathway of DNA replication causally related to death. *Biochim Biophys Acta.* 2007 Apr;1772(4):409-12.
- 10 - Dell'Albani P Stem cell markers in gliomas. *Neurochem Res.* 2008 Dec;33(12):2407-15 Attanasio F, Cataldo S, Fisichella S, Nicoletti S, Nicoletti VG, Pignataro B, Savarino A, Rizzarelli E. Protective effects of L- and D-carnosine on alpha-crystallin amyloid fibril formation: implications for cataract disease. *Biochemistry.* 2009 Jul 14;48(27):6522-31.
- 11 - Nicoletti VG, Santoro AM, Grasso G, Vagliasindi LI, Giuffrida ML, Cuppari C, Purrello VS, Stella AM, Rizzarelli E. Carnosine interaction with nitric oxide and astroglial cell protection. *J Neurosci Res.* 2007 Aug 1;85(10):2239-45.
- 12 - Spina-Purrello V, Patti D, Giuffrida-Stella AM, Nicoletti VG. Parp and cell death or protection in rat primary astroglial cell cultures under LPS/IFNgamma induced proinflammatory conditions. *Neurochem Res.* 2008 Dec;33(12):2583-92.

#### **Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni**

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

dei geni nucleari e mitocondriali che codificano per proteine della catena respiratoria mitocondriale;  
delle diverse proteine da stress (Heat-Shock Proteins) e in particolare delle HSP70, HPS32, HPS60;  
della Poli-ADP-ribosio polimerasi (PARP);  
delle connessine

#### **Collaborazioni internazionali in atto**

- Prof. Jean De Vellis, UCLA Mental Retardation Res. Center, Los Angeles, California (USA)
- Prof. Regino Perez Polo, Galveston Department of Biochemistry and Molecular Biology, UNIVERSITY OF TEXAS MEDICAL BRANCH, USA
- Prof. Alan Butterfield, Sanders-Brown Center on Aging,, University of Kentucky

#### **Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca**

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

#### **Parole Chiave**

HSPs  
PARP  
NOS  
CsSR (Calcium sensing receptor)  
Beta amiloid

*UNITA' DI RICERCA INBB  
Napoli*

**Responsabile Scientifico**

Prof. Gaetano Irace

**Linea di Ricerca**

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

**Composizione del Gruppo**

**Aderenti INBB**

*Gaetano Irace*

*PO*

*gaetano.irace@unina2.it*

*Ivana Sirangelo*

*RU*

*ivana.sirangelo@unina2.it*

**Non Aderenti INBB**

*Silvia Vilasi*

*DR*

*vilasi@fisica.unipg.it*

*Clara Iannuzzi*

*DR*

*clara.iannuzzi@unina2.it*

*Rosalba Sarcina*

*Rosa Maritato*

**Sede Unità di Ricerca**

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

*Indirizzo via L. De Crecchio 7 - 80138 Napoli*

*Telefono Fax. 081/5665863*

*E-mail gaetano.irace@unina2.it*

**Sezione INBB di appartenenza**

Napoli

**Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni**

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

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

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

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

Per quanto riguarda il secondo aspetto sembra ormai evidente che le specie realmente tossiche sono gli aggregati prefibrillari, mentre le fibrille mature sembrano rappresentare uno stadio finale stabile e non tossico dell'aggregazione.

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

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

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

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

### **Pubblicazioni più significative nel periodo 2007-2010**

1) Iannuzzi, C., Vilasi, S., Portaccio, M., Irace, G., Sirangelo, I. (2007) "Heme binding inhibits the fibrillization of amyloidogenic apomyoglobin and determines lack of aggregate cytotoxicity." *Protein Sci.* 16(3):507-16.

2) Vilasi, S., Iannuzzi, C., Portaccio, M., Irace, G., Sirangelo, I. (2008) "Effect of trehalose on W7FW14F apomyoglobin and insulin fibrillization: new insight into inhibition activity." *Biochemistry* 47(6): 1789-96.

3) Vilasi, S., Iannuzzi, C., Irace, G. & Sirangelo, I. (2008) "Amyloid aggregation of W7FW14F apomyoglobin mutant" (Review) *Current Topics in Biochemical Research* 10: 91-99

4) Sirangelo I, Iannuzzi C, Vilasi S, Irace G, Giuberti G, Misso G, D'Alessandro A, Abbruzzese A, Caraglia M. (2009) "W7FW14F apomyoglobin amyloid aggregates-mediated apoptosis is due to oxidative stress and AKT inactivation caused by Ras and Rac." *J. Cell Physiol.* 221(2):412-23.

5) Vilasi S, Sirangelo I, Irace G, Caputo I, Barone MV, Esposito C, Ragone R. (2010) Interaction of 'toxic' and 'immunogenic' A-gliadin peptides with a membrane-mimetic environment. *J Mol Recognit.* 23(3):322-8.

### **Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni**

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

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

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

### **Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca**

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

### **Parole Chiave**

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

*UNITA' DI RICERCA INBB  
Terni*

**Responsabile Scientifico**

Prof. Josè Maria Kenny

**Linea di Ricerca**

Nanocompositi polimerici a matrice polimerica biodegradabile

**Composizione del Gruppo**

***Aderenti INBB***

*Josè Maria Kenny*

*PO*

*jkenny@unipg.it*

*Luca Valentini*

*RU*

*mic@unipg.it*

***Non Aderenti INBB***

*Ilaria Armentano*

*BC*

*Ilaria.Armentano@unipg.it*

*Elena Fortunati*

*DR*

*Elena.fortunati@unipg.it*

*Samantha Mattioli*

*DR*

*samanthamattioli@gmail.com*

*Nicoletta Rescignano*

*DR*

*nicoresci@gmail.com*

**Sede Unità di Ricerca**

*Indirizzo: strada di Pentima 4,*

*Telefono: 0744-492939*

*Fax: 0744-492950*

*E-mail: jkenny@unipg.it*

**Sezione INBB di appartenenza**

Roma

**Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni**

***Obiettivi***

L'obiettivo principale della ricerca della sezione INBB è lo sviluppo di supporti artificiali per favorire l'adesione, la proliferazione e il differenziamento di cellule staminali. L'unità si propone di analizzare due aspetti fondamentali:

- Sviluppo nuovi nanocompositi polimerici multifunzionali per la realizzazione di scaffold porosi con porosità controllata e un buon grado di interconnessione.
- Modifica chimiche e topografiche della superficie dei biomateriali allo scopo di controllare l'adesione, la migrazione e il differenziamento cellulare, modulando i parametri del processo di deposizione.

***Risultati ottenuti***

Importanti risultati sono stati ottenuti in entrambe le tematiche.

Nanocompositi polimerici a base di polimeri biodegradabili (l'acido polilattico, PLA, il copolimero acido polilattico-co-glicolico, PLGA, policaprolattone, PCL) e nanostrutture organiche/inorganiche (nanotubi e nanofibre di carbonio, idrossiapatite e nanoparticelle d'argento) sono stati realizzati con diverse tecniche, in modo da realizzare sia film densi che scaffold porosi. La composizione e la morfologia dei nanocompositi è stata ottimizzata e messa in relazione alle proprietà termiche meccaniche ed elettriche. L'influenza delle nanostrutture sul comportamento e in particolare sul differenziamento cellulare è stato studiato in dettaglio.

Le modifiche superficiali topografiche sono state realizzate con la tecnica di deposizione chimica attivata da un plasma a radiofrequenza (rf-PECVD). Sono stati realizzati micropattern di carbonio amorfo di altezza nanometrica con geometria a canali e a griglie. Si è visto come la topografia a canali abbia un evidente effetto sull'allungamento e l'allineamento di cellule staminali umane. Inoltre è stata identificata una dimensione specifica dei canali che si è visto indurre il differenziamento cellulare anche senza agenti chimici.

### **Pubblicazioni più significative nel periodo 2007-2010**

1. Effects of Carbon Nanotubes (CNTs) on the Processing and In-Vitro Degradation of Poly(DL-Lactide-co-Glycolide)/CNT Films I. Armentano, MS. Dottori, D. Puglia and J.M. Kenny. *J Mater Sci: Mater Med* 19 (2008) 2377-2387. IF:1.5.
2. Analysis of the biomineralization process on SWNT-COOH and FSWNT films. I. Armentano, M. A. Alvarez-Perez, B. Carmona-Rodriguez, I. Gutierrez-Ospina, J. M. Kenny, H. Arzate. *Materials Science and Engineering C* 28 (2008) 1522-1529. IF: 1.8.
3. Electrospun Poly( $\epsilon$ -caprolactone)/Ca-deficient Hydroxyapatite Nanohybrids: Microstructure, Mechanical Properties and Cell Response by Murine Embryonic Stem Cells. A. Bianco, E. Di Federico, I. Moscatelli, A. Camaioni, I. Armentano, L. Campagnolo, M. Dottori, J.M. Kenny, G. Siracusa and G. Gusmano. *Materials Science & Engineering C* 29 (2009) 2063–2071. IF: 1.8.
4. Hydrogenated amorphous carbon nanopatterned film designs drive human bone marrow mesenchymal stem cell cytoskeleton architecture. S. Martino, F. D'Angelo, I. Armentano, R. Tiribuzi, M. Pennacchi, M. Dottori, S. Mattioli, A. Caraffa Auro, G.G. Cerulli, J.M. Kenny and A. Orlacchio. *Tissue Engineering Part A* 2009 5(10):3139-3149. IF: 4.7.
5. Processing and properties of poly( $\epsilon$ -caprolactone)/carbon nanofibre composite mats and films obtained by electrospinning and solvent casting. I. Armentano, C. Del Gaudio, A. Bianco, M. Dottori, F. Nanni, E. Fortunati and J. M. Kenny *J Mater Sci* (2009) 44:4789–4795. IF:1.2.
6. Role of PLLA Plasma Surface Modification in the Interaction with Human Marrow Stromal Cells. Ilaria Armentano, Gabriela Ciapetti, Manuela Pennacchi, Mariaserena Dottori, Valentina Devescovi, Donatella Granchi, Nicola Baldini, Beatriz Olalde, Maria Jesus Jurado, Jose Inaki Marquinez Alava, José M. Kenny. *Journal of Applied Polymer Science*, (2009) 114:3602–3611. IF: 1.2.
7. Novel Poly(L-lactide) PLLA/SWNTs Nanocomposite for Biomedical Applications: Material Characterization and Biocompatibility Evaluation. Novel Poly(L-lactide) PLLA/SWNTs Nanocomposite for Biomedical Applications: Material Characterization and Biocompatibility Evaluation. I. Armentano, L. Marinucci, M. Dottori, S. Balloni, E. Fortunati, M. Pennacchi, E. Becchetti, P. Locci, J. M. Kenny (Accepted) *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition* (2010) DOI:10.1163/092050610X487873. IF: 2.2.
8. E. Fortunati, I. Armentano, A. Iannoni, J.M. Kenny. Development and thermal behaviour of ternary PLA matrix composites. *Polymer Degradation and Stability* xxx (2010) 1-7. Accepted in press DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2010.02.034. IF:2.3.
9. A. Bianco, C Del Gaudio, S Baiguera, I. Armentano, C. Bertarelli, M. Dottori, G. Bultrini, , A. Lucotti, J.M. Kenny, and M. Folin. Microstructure and cytocompatibility of electrospun nanocomposites based on poly( $\epsilon$ -caprolactone) and carbon nanostructures. *Int J Artif Organs* 2010; 33 (5): 271-282. IF: 1.3.
10. I. Armentano, M. Dottori, E. Fortunati, S. Mattioli, J.M. Kenny. Biodegradable Polymer Matrix Nanocomposites For Tissue Engineering: A Review. *Polymer Degradation and Stability* xxx (2010) 1-21. Accepted in press. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2010.06.007. IF:2.3.
11. M. Dottori. I. Armentano, E. Fortunati, J.M. Kenny. Production and properties of solvent-cast poly( $\epsilon$ -caprolactone) composites with carbon nanostructures. *Journal of Applied Polymer Science*. Accepted 01/07/2010. IF: 1.2

### **Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni**

- Sviluppo di nanomateriali biodegradabili: micro-nano particelle, gusci, micelle per diagnosi e rilascio controllato di farmaci.
- Sviluppo di scaffold nanocompositi per il rilascio e mirato di farmaci.
- Studio dell'effetto della topografia sulle proprietà di adesione, allineamento, confinamento e differenziamento cellulare.

### **Collaborazioni internazionali in atto**

- Messico, Universidad Nacional Autónoma de México, Prof. Higinio Arzate;
- Svezia, KTH, Prof. Lars Berglund
- Spagna, CSIC, Madrid, Prof. Miguel Lopez Manchado, Prof. Carmen Mijangos



### **Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca**

I diversi laboratori disponibili per la produzione e caratterizzazione dei materiali sono:

- Laboratorio di analisi termica: calorimetro a scansione differenziale (DSC), bilancia termogravimetrica (TGA), analizzatore termomeccanico (TMA), analizzatore del rilassamento vetroso (DMTA), analizzatore della conducibilità termica.
- Laboratorio di caratterizzazione fisico-chimica: spettrofotometro ad infrarosso (FT-IR), spettrofotometro (UV-Vis), angolo di contatto (FTA), analizzatori di impedenza, elettrometro di precisione.
- Laboratorio di deposizione di film sottili: impianto di deposizione chimica attivato al plasma (PECVD) ed evaporatore termico.
- Laboratorio di caratterizzazione di film sottili e nanostrutturati: microscopio elettronico a scansione ad emissione di campo (FESEM) con microanalisi (EDS), microscopio a forza atomica (AFM) e dispositivo di nanoindentazione (NI).
- Laboratorio di biomateriali: essiccatore al punto critico (CPD), che permette la disidratazione campioni biologici per la successiva analisi con microscopia elettronica, incubatore, pH-metro e glove box.
- Laboratorio di caratterizzazione meccanica: dinamometro universale per prove di trazione, flessione, tenacità a frattura; analizzatore delle proprietà dinamo-meccaniche (DMA), durometro.
- Laboratorio tecnologico di lavorazione e riciclo di materiali plastici: impianto di microestrusione bi-vite per la filatura, filmatura dei polimeri e stampaggio per iniezione dei polimeri.

### **Parole Chiave**

Polimeri, Nanocompositi, scaffold, modifiche superficiali, nano particelle

*UNITA' DI RICERCA INBB  
Sassari*

**Responsabile Scientifico**  
Dott.ssa Margherita Maioli

**Linea di Ricerca**

Studio dell'espressione genica nel corso del differenziamento cellulare e di anomalie nella crescita miocardica

**titolo**

Analisi dei meccanismi molecolari responsabili della cardiogenesi in cellule staminali embrionali pluripotenti murine e staminali mesenchimali umane.

**Composizione del Gruppo**

**Aderenti INBB**

Maioli Margherita

RU

mmaioli@uniss.it

**Non Aderenti INBB**

Santaniello Sara

DR

sara.santaniello@gmail.com

Pigliaru Gianfranco

BC

gianfranco.pigliaru@tiscali.it

Gualini Sara

saragualini@gmail.com

**Sede Unità di Ricerca**

Laboratorio di Ricerche Cardiovascolari, Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Sassari

Dipartimento di Scienze Biomediche, Sezione di Biochimica, Viale San Pietro 43/B, 07100 Sassari

Telefono : 079-228277;

Fax : 079-228277

E-mail : mmaioli@uniss.it

**Sezione INBB di appartenenza**

Genova

**Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni**

*Obiettivi*

Lo sviluppo del cuore rappresenta uno dei primi eventi morfogenetici che si verificano nell'embrione, tuttavia i meccanismi molecolari che regolano tale fenomeno sono largamente sconosciuti. La cardiogenesi rappresenta inoltre un processo di per sé a bassissima resa differenziativa. Pertanto, i nostri obiettivi sono stati di identificare strategie nel contesto di una terapia cellulare del danno miocardico volte sia all'identificazione di meccanismi molecolari cardiogenetici e angiogenetici, sia lo sviluppo di nuove molecole capaci di trasformare la cardiogenesi in un processo ad elevata resa differenziativa. La Cardiomiopatia ipertrofica (CMI) è una malattia genetica causata da mutazioni a carico dei numerosi geni che codificano per le proteine del sarcomero. Indagini genético-molecolari hanno inequivocabilmente dimostrato che la CMI è una cardiopatia su base genetica trasmessa nella maggior parte dei casi con modalità autosomica dominante con un'elevato grado di eterogenità interlocus e allelica. I nostri obiettivi, nell'ambito dello studio genético-molecolare della CMI in Sardegna, condotti insieme alla Cattedra di Cardiologia dell'Università di Sassari sono stati di studiare l'associazione di alterazioni di profili di espressione genica con il "fenotipo ipertrofia" della CMI e con altri fenotipi clinicamente e , caratterizzare i meccanismi molecolari che sottendono al processo di anomalie di crescita e differenziamento cellulare in pazienti affetti da CMI.

*Risultati ottenuti*

Abbiamo studiato ed identificato proteine responsabili delle trasduzione del segnale coinvolte durante il differenziamento miocardico, sia in cellule GTR1, che in cellule staminali mesenchimali umane adulte. Tale differenziamento veniva indotto sia attraverso l'uso di una molecola, l'HBR, estere misto da noi realizzato per implementare il processo di cardiogenesi, sia attraverso trasduzione con un lentivirus in grado di sovra esprimere il gene regista del processo di cardiogenesi, la prodinorfina. Nell'ambito dello studio molecolare della CMI sono state identificate differenze significative tra pazienti affetti da CMI e soggetti normali, nell'espressione di alcuni geni identificati come possibili marcatori del rimodellamento molecolare tipico della patologia.

**Pubblicazioni più significative nel periodo 2007-2010 (\* affiliazione Inbb)**

Maioli M., Asara Y., Pintus A., Ninniri S., Bettuzzi S., Scaltriti M., Galimi F., Ventura C.  
Creating prodynorphin-expressing stem cells alerted for a high-throughput of cardiogenic commitment  
Regenerative Medicine, March 2007, Vol. 2, No. 2, Pages 193-202 (Impact factor 3,623) (\*)

Ventura C., Cantoni S., Bianchi F., Lionetti V., Cavallini C., Scarlata I., Foroni L., Maioli M., Bonsi L., Alviano F., Fossati V., Bagnara G.P., Pasquinelli G., Recchia F.A., and Perbellini A.

Hyaluronan mixed esters of butyric and retinoic acid drive cardiac and endothelial fate in term placenta human mesenchymal stem cells and enhance cardiac repair in infarcted rat hearts.  
J Biol Chem. May 11;282(19):14243-52. Epub 2007 Mar 15 (Impact factor 5.808) (\*)

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, Ventura C.

Hyaluronan mixed esters of butyric and retinoic acid affording myocardial survival and repair without stem cell transplantation.

J Biol Chem. 2010 Mar 26;285(13):9949-61. Epub 2010 Jan 22. (\*)

Madeddu R., Asara Y., Arena N., Maioli M., Pintus A., Tolu P., Marchal J.A., Montella A.

Cadmium And 5-Fluorouracil Effects In Mcf-7 Human Breast Carcinoma Cells.

Italian Journal of Anatomy and Embriology

Vol 112-Supplemento n.1 al Fasc.2-Aprile-Giugno 2007 (\*)

Maioli M., Asara Y., Pintus A., Gualini S., Marchesi I., Ventura C.

Butyric And Retinoic Mixed Ester Of Hyaluronan Induce Cardiogenesis In Es Cells: Recruitment Of A Smad Proteins Circuitry.

Italian Journal of Anatomy and Embriology

Vol 112-Supplemento n.1 al Fasc.2-Aprile-Giugno 2007 (\*)

Maioli M., Bandiera P., Ventura C., Sanna R., Pintus A., Gualini S., Montella A.  
Morphological Aspects Of Human Mesenchymal Stem Cells From Amniotic Fluid (Afs): Main Features Before And After Cardiac Differentiation

Italian Journal of Anatomy and Embriology

Vol 113-Supplemento n.1 al Fasc.2-Aprile-Giugno 2008 (\*)

### **Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni**

Le cellule staminali sono state recentemente proposte come strumento innovativo di terapia cellulare per il recupero di tessuti danneggiati. Sfortunatamente, il potenziale terapeutico di tali cellule è fortemente limitato dalla progressiva uscita dal ciclo cellulare degli elementi in fase differenziativa. Pertanto, lo sviluppo di strategie in grado di fornire un'elevata resa di specificazione fenotipica avrebbe ovvie ripercussioni biomediche. Attualmente, la sovraespressione di geni tessuto-specifici mediante trasduzione di cellule staminali con vettori virali offre notevoli vantaggi dal punto di vista sperimentale, che possono essere applicati su modelli animali, ma non sull'uomo. A tale proposito sono oramai disponibili diverse strategie molecolari che, utilizzando vettori lenti virali permettono di silenziare geni e valutarne così il loro ruolo all'interno di un particolare processo cellulare. Il mio gruppo di ricerca sta realizzando, in collaborazione con altri gruppi, e sperimentando questa strategia nello studio molecolare dei processi di differenziamento cellulare, verso la cardiogenesi per ora, ma in futuro anche verso altri fenotipi cellulari.

L'osservazione che il destino di cellule staminali può essere orchestrato da campi magnetici apre la nuova prospettiva di usare questo ed altri stimoli fisici per orientare i processi differenziativi di elementi pluripotenti senza dover ricorrere ad approcci di trasferimento genico. L'identificazione di stimoli fisici appropriati e la possibilità teorica di modulare l'esito dei diversi processi differenziativi cambiando le caratteristiche di un medesimo stimolo (es. ampiezza, durata, intensità e forma di un campo magnetico) introdurrebbero elementi di notevole semplificazione procedurale e risparmio di costi nell'ottica di una futura medicina rigenerativa.

### **Collaborazioni internazionali in atto**

1. **Prof. Edward G. Lakatta:** Laboratory of Cardiovascular Science, Gerontology Research Center, National Institute on Aging – National Institutes of Health, Baltimore, MD, U.S.A. La collaborazione è rivolta all'analisi della fluorescenza dinamica di indicatori per il  $Ca^{2+}$  e per il pH in singole cellule miocardiche e in cellule staminali. Questi studi utilizzano speciali apparecchiature videomicroscopiche che consentono la registrazione simultanea dei fenomeni contrattili e dei cambiamenti della fluorescenza endocellulare. Le ricerche prevedono anche l'uso di microscopi confocali dedicati alla risoluzione spazio-temporale della fluorescenza a livello subcellulare.
2. **Prof. Richard P. Harvey:** The Victor Chang Cardiac Research Institute, 384 Victoria Street, Darlinghurst NSW 2010, Australia. La collaborazione è incentrata sullo studio dei meccanismi molecolari responsabili della cardiogenesi in modelli sperimentali di cardiogenesi in vitro ed in vivo.
3. **Prof. James K. Gimzewski:** Department of Chemistry and Biochemistry, UCLA, Los Angeles, CA, U.S.A. La collaborazione è incentrata sull'integrazione di approcci di nanobiotecnologie del DNA, quali microSAGE e DNA chips, con tecniche di Microscopia a Forza Atomica (AFM) che utilizzano come sonde cantilevers equipaggiati con nanotubi al carbonio opportunamente funzionalizzati per l'interazione "quasi atomica" con strutture subcellulari. Obiettivo principale delle ricerche è delineare gli aspetti nanoarchitettonici che sottintendono ai riconoscimenti biomolecolari correlati alla regolazione dell'espressione genica.

4. **Prof. Carlo Ventura**, Laboratorio di Biologia Molecolare e Bioingegneria delle Cellule Staminali dell' Istituto Nazionale Biostrutture e Biosistemi, Università di Bologna . Ospedale S. Orsola - Malpighi, Istituto di Cardiologia, Padiglione 21 Via Massarenti N. 9 , Bologna. La Dott.ssa Maioli collabora strettamente con il Prof. Ventura ed il suo gruppo in particolare in studi molecolari inerenti cellule staminali mesenchimali umani e loro potenziale rigenerativo.

**Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca**

Cappa a flusso laminare, incubatore a CO<sub>2</sub>, microscopio ottico invertito, Gene-Amp PCR system, microscopio confocale, Real-Time PCR, centrifughe.

**Parole Chiave**

Differenziamento Cellulare, Cellule staminali, Endorfine, Espressione Genica, Fattori di Trascrizione, Recettori Nucleari, Epigenetica

UNITA' DI RICERCA INBB  
Sassari

**Responsabile Scientifico**

Prof. Quirico Migheli

**Linea di Ricerca**

Identificazione di fattori di virulenza e di patogenicità in funghi fitopatogeni e produttori di micotossine

**Composizione del Gruppo**

**Aderenti INBB**

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

**Non Aderenti INBB**

Virgilio Balmas	RU	balmas@uniss.it
Barbara Scherm	BC	scherm@uniss.it
Marcella Orrù	BC	orrum@uniss.it
Laura Cogotzi	BC	cogotzilaura@yahoo.it
Stefano Fiori	DR	stenof@hotmail.it
Francesca Spanu	DR	fspanu@uniss.it
Angela Marcello	PT	amarcell@uniss.it

**Sede Unità di Ricerca**

Dipartimento di Protezione delle Piante, Università di Sassari

Via Enrico de Nicola 9, 07100 Sassari

Telefono: ++ 39 079 229295

Telefax: ++ 39 079 229316

E-mail: qmigheli@uniss.it

**Sezione INBB di appartenenza**

Genova

**Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni**

Obiettivi della linea di ricerca sono:

1) Diagnosi molecolare ed epidemiologia dei funghi fitopatogeni e micotossigeni

Modelli: *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp.

2) Studio dei fattori di virulenza mediante transposon tagging e silenziamento genico

Modello: *Fusarium culmorum*/frumento duro

3) Valutazione dei rischi legati all'impiego di antagonisti microbici e meccanismi d'azione

Modelli: *Trichoderma* spp., *Pichia fermentans*, *Kloeckera africana*

I risultati ottenuti dal responsabile scientifico dell'unità e dai suoi collaboratori hanno riguardato la messa a punto di un sistema di marcatura genica mediante trasposoni in *F. culmorum*, con lo scopo di identificare le basi molecolari della virulenza e della produzione di micotossine in questo fungo. Inoltre, attraverso lo sviluppo di vettori di silenziamento genico, è stato possibile modulare l'espressione del gene *tri6*, implicato nella biosintesi dei tricoteceni, con una conseguente riduzione della virulenza su frumento duro. Le ricerche intraprese su *Aspergillus* e *Penicillium* spp. sono state focalizzate, da un lato, sulla messa a punto ed alla validazione di un biosensore a DNA per l'identificazione di *Aspergillus* spp. tossigeni (in collaborazione con l'UdR del Prof. Mascini) e, dall'altra, sullo studio dei meccanismi d'azione di lieviti antagonisti attivi nell'inibire l'espressione di geni coinvolti nel pathway biosintetico dell'ocratossina A. Le ricerche riguardanti *T. harzianum* hanno permesso di individuare alcuni geni marker dell'attività antagonistica nei confronti del fungo patogeno *Rhizoctonia solani*.

**Pubblicazioni più significative nel periodo 2008-2010 (\* con affiliazione INBB)**

1. Demontis M.A., Cacciola S.O., Balmas V., Chessa V., Orrù M., Maserti B.E., Mascia L., Raudino F., Magnano Di San Lio G., Migheli Q. (2008) Development of real-time PCR systems based on SYBR<sup>®</sup> Green I and TaqMan<sup>®</sup> technologies for specific quantitative detection of *Phoma tracheiphila* in infected Citrus. European Journal of Plant Pathology 120: 339-351. (\*)

2. Schirra M., D'aquino S., Mulas M., Melis R.A.M., Giobbe S., Migheli Q., Garau A., Angioni A., Cabras P. (2008) Efficacy of heat treatments with water and fludioxonil for postharvest control of blue and gray molds on inoculated pears and fludioxonil residues in fruit. *Journal of Food Protection* 71: 697-792.
3. FIORI S., Fadda A., Giobbe S., Berardi E., Migheli Q. (2008) *Pichia angusta* is an effective biocontrol yeast against postharvest decay of apple fruit caused by *Botrytis cinerea* and *Monilia fructicola*. *FEMS Yeast Research* 8: 961-963. (\*)
4. Mariotti L., Casasoli M., Migheli Q., Balmas V., Caprari C., De Lorenzo G. (2008) Reclassification of *Fusarium verticillioides* (= moniliforme) strain FC-10 as *F. phyllophilum*. *Mycological Research* 112: 1009-1013. (\*)
5. Schirra m., D'aquino S., Migheli Q., Pirisi F.M., Angioni A. (2009) Influence of post-harvest treatments with fludioxonil and soy lecithin co-application in controlling blue and grey mould and fludioxonil residues in Coscia pears. *Food Additives and Contaminants* 26: 68-72. (\*)
6. Migheli Q., Balmas V., Komoń-Zelazowska M., Scherm B., Fiori S., Kopchinskiy A.G., Kubicek C.P., Druzhinina I. (2009) Soils of a Mediterranean hotspot of biodiversity and endemism (Sardinia, Tyrrhenian Islands) are inhabited by pan-European and likely invasive species of *Hypocrea/Trichoderma*. *Environmental Microbiology* 11: 35-46. (\*)
7. Scherm b., Schmoll M., Balmas V., Kubicek C.P., Migheli Q. (2009) Identification of potential marker genes for *Trichoderma harzianum* strains with high antagonistic potential against *Rhizoctonia solani* by a rapid subtraction hybridisation (RaSH) approach. *Current Genetics* 55: 81-91. (\*)
8. Tombelli S., Mascini M., Scherm B., Battaccone G., Migheli Q. (2009) DNA biosensors for the detection of aflatoxin producing *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly* 140: 901-907. (\*)
9. Migheli Q., Balmas V., Harak H., Sanna S., Scherm B., Aoki T., O'donnell K. (2010) Molecular phylogenetic diversity of dermatologic and other human pathogenic *Fusaria* from hospitals in Northern and Central Italy. *Journal of Clinical Microbiology* 48: 1076-1084. (\*)
10. Balmas V., Migheli Q., Scherm B., Garau P., O'donnell K., Ceccherelli G., Kang S., Geiser D.M. (2010) Multilocus phylogenetics shows high levels of endemic fusaria inhabiting Sardinian soils (Tyrrhenian Islands). *Mycologia* 102: 803-812. (\*)
11. Migheli Q., Cacciola S.O., Balmas V., Pane A., Ezra D., Magnano Di San Lio G. (2009) Mal secco disease caused by *Phoma tracheiphila*: a potential threat to lemon production worldwide. *Plant Disease* 93: 853-867. (\*)
12. Alabouvette C., Olivain C., Migheli Q., Steinberg C. (2009) Microbiological control of soil-borne diseases: capacities of non pathogenic strains of *Fusarium oxysporum* to control *Fusarium* wilts. *New Phytologist* 184: 529-544 (Tansley Review). (\*)

#### **Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni**

Verrà proseguita la caratterizzazione molecolare di *Fusarium* spp. e l'identificazione di geni coinvolti nel rapporto patogenetico e tossigenico di *F. culmorum*. E' in corso una indagine epidemiologica sulla distribuzione di specie di *Fusarium* agenti di micosi cutanee e profonde negli ambienti ospedalieri italiani. Sono in fase di presentazione progetti relativi all'ecologia dei *Fusarium*, con riferimento a specie emergenti o rare. Si intende proseguire la ricerca di sistemi di diagnosi e di lotta nei confronti *Trichoderma* spp. patogeni su funghi coltivati, nonché gli studi volti alla identificazione di lieviti antagonisti nei confronti di specie tossigene di *Penicillium*, *Aspergillus* e *Fusarium*.

#### **Collaborazioni internazionali in atto**

Dr. M Dufresne, Institut de Biotechnologie des Plantes, Université Paris Sud, Orsay, Francia.  
 Dr. Nancy Keller, University of Madison, Wisconsin, USA.  
 Professor Christian Kubicek, Technical University, Vienna, Austria.

#### **Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca**

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

#### **Parole Chiave**

Funghi fitopatogeni, micotossine, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*.

*UNITA' DI RICERCA INBB  
Napoli*

**Responsabile Scientifico**

Prof. Damiano Gustavo Mita

**Linea di Ricerca**

Macromolecole Biologiche Immobilizzate: Aspetti Fondamentali Ed Applicativi

**Composizione del Gruppo**

**Aderenti INBB**

<i>Damiano Gustavo Mita</i>	<i>PO</i>	<i>mita@igb.cnr.it</i> <i>mita@unina2.it</i>
<i>Maria Lepore</i>	<i>PA</i>	<i>maria.lepore@unina2.it</i>
<i>Marianna Portaccio</i>	<i>RU</i>	<i>marianna.portaccio@unina2.it</i>
<i>Nadia Diano</i>	<i>RU</i>	<i>diano@igb.cnr.it</i>

**Non Aderenti INBB**

<i>Umberto Bencivenga</i>	<i>PT - CNR</i>	<i>benciven@igb.cnr.it</i>
<i>Sergio Rossi</i>	<i>PT - CNR</i>	<i>rossi@igb.cnr.it</i>
<i>Carla Nicolucci</i>	<i>BC</i>	<i>nicolucci@igb.cnr.it</i>
<i>Luigi Mita</i>	<i>Ph.D</i>	<i>drluigi.mita@libero.it</i>
<i>Mariangela Bianco</i>	<i>BC</i>	<i>mariangelabianco@hotmail.com</i>
<i>Daniela Di Tuoro</i>	<i>BC</i>	<i>daniela.dituoro@libero.it</i>
<i>Ciro Menale</i>	<i>BC</i>	<i>menale@igb.cnr.it</i>

**Sede Unità di Ricerca**

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

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

Tel 081/5665822

Fax 081/5665822

E-mail [mita@unina2.it](mailto:mita@unina2.it) , [mita@igb.cnr.it](mailto:mita@igb.cnr.it)

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

Indirizzo: Via Pietro Castellino, 111 – 80131 - Napoli

Tel 081/6132608

Fax 081/6132608 – 5665822

E-mail [mita@igb.cnr.it](mailto:mita@igb.cnr.it), [mita@unina2.it](mailto:mita@unina2.it)

**Sezione INBB di appartenenza**

Napoli

**Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni**

*Obiettivi*

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

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

*Risultati ottenuti*

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

1.1) Bioreattori planari

Membrane planari di natura idrofobica (Nylon, Teflon, Polipropilene) sono state trattate chimicamente o mediante reattori plasmico-chimici allo scopo di attivarle con opportuni gruppi reattivi. Su questi supporti sono stati

successivamente immobilizzati gli enzimi di interesse, in presenza o in assenza di opportuni spaziatori. Una volta immobilizzati gli enzimi, le membrane, caratterizzate dal punto di vista biochimico (dipendenza dal pH, dalla temperatura e dalla concentrazione del substrato), dal punto di vista biofisico (permeabilità idraulica e termoosmotica), sono state impiegate in bioreattori operanti in condizioni isoterme o non isoterme in processi di interesse nel:

1.1.a) Settore ecologico:

*1.1.a.1) Trattamento di acque reflue inquinate enzimi immobilizzati: laccasi, tirosinasi e lipasi.*

Differenti tipi di membrane catalitiche idrofobiche sono state costruite immobilizzando laccasi o tirosinasi o lipasi da utilizzare in processi di biorisanamento e disinquinamento di acque inquinate da composti fenolici e/o da ftalati. Anche con questo tipo di membrane è stato dimostrato che quando sono utilizzate in bioreattori non isoterme, l'efficacia del processo di disinquinamento cresce in maniera proporzionale all'entità del gradiente di temperatura applicato.

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

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

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

1.1.b) Settore clinico.

Durante la circolazione extracorporea, ed in particolare durante l'emodialisi e/o le operazioni di bypass cardiopolmonare, vengono rilasciate delle proteasi in seguito alla degranolazione dei granulociti polimorfonucleati. Le proteasi in circolo producono danni infiammatori e/o gravi disfunzioni renali e/o polmonari. Sfruttando le interazioni proteasi/antiproteasi abbiamo immobilizzato su membrane planari l'inibitore di proteasi  $\alpha_1$ -antitripsina che, legando elastasi e/o catepsina, ha ridotto la concentrazione di queste proteasi nella soluzione in circolo, ponendo le basi per la riduzione del danno proteolitico da esse indotto. Quando impiegate con il plasma di pazienti sottoposti a bypass cardiopolmonare o a emodialisi queste trappole per proteasi hanno dimostrato una notevole capacità di abbattimento delle concentrazioni delle proteasi di interesse, anche in presenza di una miscela complessa come il plasma sanguigno. Questa attività di ricerca è stata svolta nell'ambito di un PRIN che ha visto il coordinamento da parte di questa unità operativa rispetto ad altre unità operanti a Genova (unità di Biochimica), Bologna (Unità di Bioinformatica) e nella Seconda Università di Napoli (Unità di Cardiochirurgia e di Nefrologia).

1.2) Bioreattori a letto impaccato.

*Produzione di succhi di frutta limpidi.*

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

2) Studio degli effetti di interferenti endocrini in vitro ed in vivo.

2.1) Si è studiato l'effetto di differenti concentrazioni di Bisfenolo A e di altri composti fenolici dotati di attività estrogenica, enzimaticamente degradati e non, sulla proliferazione cellulare, sull'indice di vitalità e sul ciclo cellulare. Si è trovato che dopo il trattamento enzimatico queste sostanze perdono le loro proprietà estrogeniche.

2.2) Si è studiata la concentrazione di bisfenolo A in pesci a largo consumo pescati nel golfo di Napoli e lungo le coste laziali. Organi esaminati sono stati il muscolo, il fegato ed il cervello.

2.3) Si sono studiate le concentrazioni di octilfenolo nelle differenti aree del cervello in ratti esposti per 20 giorni ad octilfenolo mediante iniezioni sottocutanee di questo interferente endocrino.

2.4) Si è studiata l'eventuale correlazione tra esposizione a Bisfenolo A ed insorgenza di endometriosi. Gli esperimenti sono stati effettuati sulla prole di topi Balb/c esposti sin dall'inizio della fecondazione a due differenti dosi di interferente endocrino. I risultati hanno confermato: a) la presenza di una correlazione positiva tra esposizione a Bisfenolo A ed insorgenza di endometriosi; e b) una differente concentrazione di Bisfenolo A nel fegato, nel cervello e nel muscolo dipendente dal genere della prole.

3) Progettazione, costruzione ed impiego di nuovi biosensori.

3.1) Biosensori amperometrici



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

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

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

### 3.2) Biosensori ottici

Sono stati progettati e realizzati biosensori di tipo ottico che utilizzino segnali di fluorescenza stazionari e risolti temporalmente per applicazioni in ambito clinico ed ambientale. In particolare si sono studiate le varie fasi di immobilizzazione in sol-gel degli enzimi al fine di ottimizzare le condizioni di lavoro su fibra ottica.

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

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

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

### 5) Spettroscopia Raman e FT-IR.

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

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

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

Finanziamenti ottenuti presso l'INBB nel periodo 2005-2009

ISPESL  
REGIONE CAMPANIA  
MIUR

### **Publicazioni più significative nel periodo 2007-2010 (\* affiliazione INBB)**

- 1) N. Diano, V. Grano, L. Fraconte, P. Caputo, A. Ricupito, A. Attanasio, M. Bianco, U. Bencivenga, S. Rossi, I. Manco, L. Mita, G. Del Pozzo, D.G. Mita.  
Nonisothermal bioreactors in enzymatic remediation of waters polluted by endocrine disruptors: the BPA as model of pollutant.  
Applied Catalysis B: Environmental. 69 (2007) 252-261 (\*)
- 2) Diano N, Ettari G, Grano V, Gaeta FS, Rossi S, Bencivenga U, D'Alterio C, Ruocco G, Mita L, De Santo NG, Canciglia P, Mita DG.  
Nonisothermal reactors for the production of pure water from peritoneal dialysis waste waters.  
Int J Artif Organs. 30 (2007) 53-63. (\*)
- 3) Bartoli L, Calabrese R, Fariselli P, Mita DG, Casadio R.  
A computational approach for detecting peptidases and their specific inhibitors at the menoma level.

- 4) M. Portaccio, D. Durante, A. Viggiano, S. Di Martino, P. Maiuri, P. De Luca, D. Di Tuoro, U. Bencivenga, S. Rossi, A. P. Canciglia, B. De Luca, D.G. Mita.  
Amperometric glucose determination by means of glucose oxidase immobilized on cellulose acetate film: dependence on the immobilization procedures  
Electroanalysis 19, 2007, N° 17, 1787-1793 (\*)
- 5) Mita DG, Attanasio A, Arduini F, Diano N, Grano V, Bencivenga U, Rossi S, Amine A, Moscone D.  
Enzymatic determination of BPA by means of tyrosinase immobilized on different carbon carriers.  
Biosens Bioelectron. 23 (2007) 60-65. (\*)
- 6) Camerlingo C, Zenone F, Delfino I, Diano N, Mita DG, Lepore M.  
Investigation on clarified fruit juice composition by using visible light micro-Raman spectroscopy.  
Sensors, 7 (2007) 2049-2061. (\*)
- 7) P. De Luca, M. Lepore, M. Portaccio, R. Esposito, S. Rossi, U. Bencivenga, D.G. Mita.  
Glucose Determination by Means of Steady-state and Time-course UV Fluorescence in Free or Immobilized Glucose Oxidase  
Sensors 2007, 7, 2612-2625 (\*)
- 8) C. Iannuzzi, S. Vilasi, M. Portaccio, G. Irace, I. Sirangelo  
Heme binding inhibits the fibrillization of amyloidogenic apomyoglobin and determines lack of aggregate cytotoxicity  
Protein Science, 16, 507-516 (2007)
- 9) S. Vilasi, C. Iannuzzi, M. Portaccio, G. Irace, I. Sirangelo  
Effect of trehalose on w7fw14f apomyoglobin and insulin fibrillization: new insight into inhibition activity  
Biochemistry, 47, 1789-1796 (2008).
- 10) Gabrovska K, Marinov I, Godjevargova T, Portaccio M, Lepore M, Grano V, Diano N, Mita DG.  
The influence of the support nature on the kinetics parameters, inhibition constants and reactivation of immobilized acetylcholinesterase.  
Int J Biol Macromol. 2008, 43(4): 339-345
- 11) Bolli A, Galluzzo P, Ascenzi P, Del Pozzo G, Manco I, Vietri MT, Mita L, Altucci L, Mita DG, Marino M.  
Laccase treatment impairs bisphenol A-induced cancer cell proliferation affecting estrogen receptor alpha-dependent rapid signals.  
IUBMB Life. 60 (2008) 843-852 (\*)
- 12) N Diano, T Grimaldi, M Bianco, S Rossi, K Gabrovska, G Yordanova, T Godjevargova, V Grano, C Nicolucci, L Mita, U Bencivenga, P Canciglia, D G Mita,  
Apple juice clarification by immobilized pectolytic enzymes in packed or fluidized bed reactors.  
J. Agricul. Food Chem., 2008, 56 (23) 1147-11477. (\*)
- 13) S. Georgieva, T. Godjevargova, M. Portaccio, M. Lepore, D.G. Mita  
Advantages in using non-isothermal bioreactors in bioremediation of water polluted by phenol by means of immobilized laccase from *Rhus vernicifera*,  
J. Molecular Catalysis B: Enzymatic 55 (2008) 177-184.
- 14) Ricupito, A.; Del Pozzo, G.; Diano, N.; Grano, V.; Portaccio, M.; Marino, M.; Bolli, A.; Galluzzo, P.; Bontempo, P.; Mita, L.; Altucci, L.; Mita, D. G.  
Effect of bisphenol A with or without enzyme treatment on the proliferation and viability of MCF-7 cells.  
Environ. Int. 2009, 35, 21-26. (\*)
- 15) D.G. Mita, N. Diano, V. Grano, M. Portaccio, S. Rossi, U. Bencivenga, I. Manco, C. Nicolucci, M. Bianco, T. Grimaldi, L. Mita, S. Georgieva, T. Godjevargova  
The process of thermodialysis in bioremediation of waters polluted by endocrine disruptors.  
J. Mol Catal. B: Enzym. 2009, 58 (1-4), 199-207. (\*)
- 16) M. Ignatova, O. Stoilova, N. Manolova, D. G. Mita, N. Diano, C. Nicolucci, I. Rashkov.-

Electrospun microfibrinous poly(styrene-alt-maleic anhydride)/poly(styrene-co-maleic anhydride) mats tailored for enzymatic remediation of waters polluted by endocrine disruptors.  
European Polymer Journal 45 (2009) 2494-2504. (\*)

- 17) P. Bontempo, L. Mita, A. Doto, M. Miceli, A. Nebbioso, I. Lepore, G. Franci, R. Menafra, V. Carafa, M. Conte, F. De Bellis, F. Manzo, V. Di Cerbo, R. Benedetti, L. D'Amato, M. Marino, A. Bolli, G. Del Pozzo, N. Diano, M. Portaccio, G.D. Mita, M.T. Vietri, M. Cioffi, E. Nola, C. Dell'aversana, V. Sica, A.M. Molinari, L. Altucci. Molecular analysis of the apoptotic effects of BPA in acute myeloid leukemia cells.  
J Transl Med. 7 (2009) 48. (\*)
- 18) L. Mita, V. Sica, M. Guida, C. Nicolucci, T. Grimaldi, L. Caputo, M. Bianco, S. Rossi, U. Bencivenga, M.S. Mohy Eldin, M.A. Tufano, D.G. Mita, N. Diano. Employment of immobilised lipase from *Candida rugosa* for the bioremediation of waters polluted by dimethylphthalate, as a model of endocrine disruptors.  
J. Mol. Catal. B: Enzym. 62 (2010) 133-141. (\*)
- 19) M. Portaccio, D. Di Tuoro, F. Arduini, M. Lepore, D.G. Mita, N. Diano, L. Mita, D. Moscone. A thionine-modified carbon paste amperometric biosensor for catechol and bisphenol A determination  
Biosensors and Bioelectronics 25 (2010) 2003-2008 (\*)

### **Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni**

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

### **Collaborazioni internazionali in atto**

- 1) Dr. Mohamed Mohy Eldin: The Polymers Research Department - Mubarak City for Scientific Research and Technology Applications (MuCSAT) - Alexandria - Egipt
- 2) Prof. J. Tramper: Food and Bioprocess Engineering Group – Agricultural University – Wageningen – The Netherlands
- 3) Prof. Nevenka Manolova, Iliya Rashkof e Olya Stoilova – Institute of Polymer – Bulgarian Academy of Sciences – Sofia – Bulgaria
- 4) Prof. Tzonka Gojegargova – Chair of Biotechnologies – Faculty of Sciences – Burgas – Bulgaria
- 5) Prof. Adnane Abdelgani – Tunisia
- 6) Prof. Mohy Mansour El-Masry - Department of Polymers and Pigments – National Research Council – Dokki – Cairo - Egitto

### **Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca**

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

### **Parole Chiave**

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

*UNITA' DI RICERCA INBB  
Parma*

**Responsabile Scientifico**

Prof. Andrea Mozzarelli

**Linea di Ricerca:**

Struttura-dinamica-funzione di emo-proteine e di enzimi dipendenti dalla vitamina B6

**Composizione del Gruppo**

**Aderenti INBB**

<i>Andrea Mozzarelli</i>	<i>PO</i>	<i>andrea.mozzarelli@unipr.it</i>
--------------------------	-----------	-----------------------------------

**Non Aderenti INBB**

<i>Bruno Stefano</i>	<i>RU</i>	<i>stefano.bruno@unipr.it</i>
<i>Campanini Barbara</i>	<i>RU</i>	<i>barbara.campanini@unipr.it</i>
<i>Ronda Luca</i>	<i>BC</i>	<i>luca.ronda@nemo.unipr.it</i>
<i>Raboni Samanta</i>	<i>BC</i>	<i>raboni@nemo.unipr.it</i>
<i>Spyrakis Francesca</i>	<i>BC</i>	<i>francesca.spyrakis@nemo.unipr.it</i>
<i>Salsi Enea</i>	<i>BC</i>	<i>enea.salsi@nemo.unipr.it</i>
<i>Passera Elisabetta</i>	<i>DR</i>	<i>elisabetta.passera@nemo.unipr.it</i>
<i>Paredi Gianluca</i>	<i>DR</i>	<i>gianluca.paredi@nemo.unipr.it</i>

**Sede Unità di Ricerca**

*Indirizzo Dipartimento di Biochimica e Biologia Molecolare, Viale GP Usberti 23/A , 43100 Parma*

*Telefono 39-0521905138*

*Fax 39-0521905151*

*E-mail andrea.mozzarelli@unipr.it*

**Sezione INBB di appartenenza**

Milano

**Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni**

*Obiettivi*

- i) comprensione delle proprietà funzionali e dinamiche di emoglobina umana e da piante;
- ii) sviluppo di sostituti del sangue a base emoglobinica
- iii) caratterizzazione della catalisi e della regolazione di O-acetilserina sulfidrilasi e sviluppo di inibitori
- iv) caratterizzazione delle proprietà funzionali di proteine immobilizzate
- iv) utilizzo di metodi computazionali nello studio delle proteine

*Risultati ottenuti*

- i) Sono state condotti esperimenti su emoglobina incapsulata in gel di silice che supportano il Tertiary Two State model, recentemente proposto per spiegare la variabilità delle proprietà funzionali dell'emoglobina allo stato quaternario T ed R. Si sono correlate le proprietà dinamiche di emoglobine vegetali, determinate mediante dinamica molecolare, con informazioni strutturali ottenute mediante analisi di spettroscopia Raman e funzionali ottenute con studi cinetici con stopped-flow e flash photolysis.
- ii) E' stato messo a punto una piattaforma tecnologica per la caratterizzazione delle proprietà funzionali di emoglobine modificate chimicamente con polietilene glicole o geneticamente ingegnerizzate.
- iii) Si sono studiate e confrontate la struttura, le proprietà spettroscopiche e la catalisi degli isomeri OASS-A e OASS-B. Si è caratterizzata l'interazione tra OASS-A e la serina acetiltransferasi. Sono stati sviluppati mediante un approccio complementare sperimentale e computazionale inibitori pentapetidici dell'OASS-A.
- iv) E' stata studiata la reattività di enzimi allo stato cristallino e immobilizzati mediante incapsulazione in gel di silice.
- v) Sono stati sviluppati metodi computazionali per la predizione dell'energia di interazione proteina-ligandi, proteina-acqua, proteina-acidi nucleici.

### **Pubblicazioni più significative nel periodo 2007-2010 (\* affiliazione INBB)**

\*Abbruzzetti S, Grandi E, Bruno S, Faggiano S, Spyrakis F, Mozzarelli A, Cacciatori E, Dominici P, Viappiani C. (2007). Ligand Migration in Nonsymbiotic Hemoglobin AHb1 from *Arabidopsis thaliana*. *J Phys Chem B* 111 12582-12590.

\*Marabotti A, Spyrakis F, Facchiano A, Cozzini P, Alberti S, Kellogg GE, Mozzarelli A. (2008). Energy-based prediction of amino acid-nucleotide base recognition. *J. Comput. Chem.* 29 1955-1969.

\*Moniot S, Bruno S, Vonrhein C, Didierjean C, Boschi-Muller S, Vas M, Bricogne G, Branlant G, Mozzarelli A, Corbier C. (2008). Trapping of the thioacyl-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase intermediate from *Bacillus stearothermophilus*: direct evidence for a flip-flop mechanism. *J. Biol. Chem.* 283 21693-21702.

\*Amadasi A, Surface JA, Spyrakis F, Cozzini P, Mozzarelli A, Kellogg GE (2008). Robust Classification of "Relevant" Water Molecules in Putative Protein Binding Sites. *J. Med. Chem.* 51 1063-1067.

\*Bettati S, Viappiani C, Mozzarelli A. (2009). Hemoglobin: an "evergreen" red protein. *Biochim. Biophys. Acta.* 1794 1317-1324

\*Abbruzzetti S, Faggiano S, Bruno S, Spyrakis F, Mozzarelli A, Dewilde S, Moens L, Viappiani C (2009). Ligand migration through the internal hydrophobic cavities in human neuroglobin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 18984-18989.

\*Amadasi A, Mozzarelli A, Meda C, Maggi A, Cozzini P. (2009). Identification of xenoestrogens in food additives by an integrated in silico and in vitro approach. *Chem. Res. Toxicol.* 22 52-63

\*Caccia D, Ronda L, Frassi R, Perrella M, Del Favero E, Bruno S, Pioselli B, Abbruzzetti S, Viappiani C, Mozzarelli A. (2009). PEGylation promotes hemoglobin tetramer dissociation. *Bioconjug. Chem.* 20 1356-1366.

\*Raboni S, Bettati S, Mozzarelli A. (2009). Tryptophan synthase: a mine for enzymologists. *Cellular and Molecular Life Science* 66 2391- 2403.

\*Salsi E, Campanini B, Bettati S, Raboni S, Roderick SL, Cook PF, Mozzarelli A (2010). A two-step process controls the formation of the bienzyme cysteine synthase complex. *J Biol Chem* 285 12813-22.

\*Salsi E, Bayden A, Spyrakis F, Amadasi A, Campanini B, Bettati S, Cozzini P, Kellogg GE, Cook PF, Dodatko T, Roderick SL, Mozzarelli A. (2010). Design of O-acetylserine sulfhydrylase inhibitors by mimicking Nature. *J. Med. Chem.* 53 345-356.

\*Tian H, Guan R, Salsi E, Campanini B, Bettati S, Kumar VP, Karsten WE, Mozzarelli A, Cook PF (2010). Identification of the Structural Determinants for the Stability of Substrate and Aminoacrylate External Schiff Bases in O-Acetylserine Sulfhydrylase-A. *Biochemistry* 49 6093-6103

### **Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni**

- i) Studio della reattività di emoglobine bloccate in stato R per la validazione completa del Tertiary Two State model e caratterizzazione di emoglobine da pesce in stato cristallino per la comprensione dell'effetto Root.
- ii) Studio degli effetti di sostituti del sangue in modelli animali mediante analisi biochimico-cliniche e proteomiche
- iii) Caratterizzazione di enzimi dipendenti dalla vitamina B6 ed identificazioni di inibitori di OASS-A, OASS-B e di altri enzimi dipendenti dalla vitamina B6 mediante metodi sperimentali e computazionali
- iv) Applicazione della proteomica alla caratterizzazione di liquidi biologici e alimenti

### **Collaborazioni internazionali in atto**

William A. Eaton, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA

Paul F. Cook, University of Oklahoma, Norman, Oklahoma, USA

Glen E. Kellogg, Virginia Commonwealth University, Richmond, Virginia, USA

### **Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca (max 6)**

Spettrofotometri Cary da ricerca, spettrofluorimetro da ricerca, rapid-scanning stopped flow, microspettrofotometro uv-vis, analizzatori parametri biochimico-clinici ed ematici, strumentazione per elettroforesi bidimensionale.

### **Parole Chiave (**

Emo-proteine, vitamina B6, enzimi, computer-based drug design, sostituti del sangue, proteine mmobilizzate

UNITA' DI RICERCA INBB  
Milano

**Responsabile Scientifico**

Prof. Paola Negri-Cesi

**Linea di Ricerca**

Effetti genetici ed epigenetici di interferenti endocrini a livello centrale e periferico

*titolo*

Esiti di un'esposizione a PCB durante la differenziazione perinatale del ratto su alcuni bersagli neuroendocrini importanti per la differenziazione del SNC, per il controllo centrale della riproduzione e per l'attivazione di comportamenti riproduttivi e non riproduttivi, nonché sul profilo epigenetico in aree e organi centrali e periferici

**Composizione del Gruppo**

**Aderenti INBB**

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

**Non Aderenti INBB**

Casati Lavinia	A (assegnista ricerca)	lavinia.casati@unimi.it
Mornati Ornella	PT	ornella.mornati@unimi.it

**Sede Unità di Ricerca**

Dipartimento di Endocrinologia, Fisiopatologia e Biologia applicata, Università degli Studi di Milano

Indirizzo via Balzaretti 9, 20133 Milano

Telefono +39 02 503 18243

Fax +39 02 503 18204

E-mail endomi@unimi.it

**Sezione INBB di appartenenza**

Milano

**Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni**

*Obiettivi e risultati*

I bifenili policlorurati (PCB) sono prodotti industriali organoclorurati che persistono nell'ambiente nonostante il loro uso sia vietato da più di 30 anni. Sono considerati dei distruttori endocrini in quanto interferiscono con la sintesi, il metabolismo e l'azione degli ormoni tiroidei e gonadici. Questi ultimi sono cruciali sia per la corretta differenziazione del SNC, sia per lo sviluppo dimorfico del sistema neuroendocrino durante l'epoca neonatale e puberale, sia per l'acquisizione e mantenimento di alcune funzioni comportamentali nell'adulto. Poiché i PCB si accumulano nel tessuto adiposo e nel latte, influenzando l'intero periodo dello sviluppo pre- e postnatale, obiettivo delle ricerche di questa unità è stato quello di valutare se e quanto l'esposizione attraverso la placenta e l'allattamento materno inducesse anomalie dello sviluppo cerebrale, del controllo neuroendocrino della pubertà e della riproduzione, nonché deficit psicomotori, cognitivi e del comportamento sociale.

Nel nostro laboratorio, che studia da molti anni l'importanza della formazione locale di steroidi sessuali nello sviluppo dimorfico del SNC, abbiamo dimostrato che il profilo di espressione degli enzimi aromatasi e 5alfa-riduttasi (che convertono il testosterone nei suoi mediatori attivi estradiolo e DHT) è tempo- e sesso-dipendente (Colciago et al. 2005). Gli studi sull'impatto dell'esposizione neonatale ai PCB su tali meccanismi sono stati realizzati nel ratto utilizzando prima una miscela commerciale (aroclor 1254) (Pravettoni et al. 2005; Colciago et al. 2006) e poi di una miscela ricostituita dei PCB presenti nel latte materno in maggior quantità (Colciago et al. 2009; Cocchi et al. 2009). Nel loro insieme tali studi hanno mostrato **a)** che il recettore degli arilidrocarburi (AhR), attivato dai PCB diossino-simili, è presente nell'ipotalamo in via di sviluppo e che la sua espressione viene stimolata dagli stessi PCB; **b)** che i PCB si accumulano nel SNC della prole e che sono ancora presenti nell'adulto; **c)** che l'esposizione prenatale causa, già nell'animale neonato, modificazioni sesso-specifiche alcuni dei parametri studiati; **d)** che tali modificazioni permangono anche nell'animale adulto, in alcuni casi abolendo e in altri amplificando il loro normale profilo dimorfico. Infine, recenti studi, condotti in collaborazione con il Dr. Esteller (manoscritto in preparazione), hanno evidenziato che l'esposizione in utero è in grado di alterare, nel fegato della giovane prole esposta, alcuni meccanismi epigenetici (modificazioni post-traduzionali degli istoni), influenzando il profilo trascrittomico. Anche in questo caso, sembra che l'azione più subdola dei PCB sia quella di agire sull'epigenoma in modo in modo differente nel maschio e nella femmina, annullandone il dimorfismo fisiologico.

### **Prospettive e obiettivi per i prossimi tre anni** (max 600 caratteri)

1. Approfondire i meccanismi neuroendocrini che innescano la pubertà, analizzando in particolare sia in vitro (neuroni GnRH-secernenti) sia in vivo, se i PCB siano in grado di influenzare il sistema di kisspeptin.
2. Valutare gli effetti avversi dei PCB **a)** sulla sinaptogenesi (espressione genica/proteica di RC3/Neurogranina, spinofillina e delle diverse forme del recettore della rianodina) e sulla dendritogenesi (analisi morfologica) di alcune aree del SNC coinvolte nel controllo dell'asse riproduttivo e nei comportamenti sociali e comunicativo-emozionali (ipotalamo, ippocampo, cervelletto, corteccia frontale); **b)** sull'espressione genica/proteica di fattori importanti nelle funzioni comportamentali (Reelina, BDNF, sistema vasopressina-ossitocina e rispettivi recettori, recettore per i glucocorticoidi, ecc.); **c)** su alcuni parametri comportamentali (funzioni comunicative/emozionali quali ad esempio le vocalizzazioni ultrasoniche in seguito a separazione e ricongiungimento con la madre, lo sviluppo delle competenze sociali, le funzioni di apprendimento e memoria spaziale, ecc.)
3. Proseguire lo studio sugli effetti epigenetici dell'esposizione prenatale ai PCB valutandone anche i possibili risvolti trans generazionali e definire meglio il significato funzionale del dimorfismo dell'epigenoma.

Obiettivo globale è quello di approfondire e ampliare le conoscenze sugli effetti pleiotropici dei PCB sia a livello del SNC sia in organi e tessuti periferici.

### **Pubblicazioni più significative nel periodo 2007-2010 (\* affiliazione INBB)**

- Colciago, F. Celotti, A. Pravettoni, O. Mornati, L. Martini, P. Negri-Cesi. *Develop. Brain Res* 155:107-116, 2005 (\*)
- A. Pravettoni, A. Colciago, P. Negri-Cesi, S. Villa, F. Celotti. *Reprod Toxicol* 20: 521-530, 2005 (\*)
- A. Colciago, P. Negri-Cesi, A. Pravettoni, O. Mornati, L. Casati, F. Celotti. *Reprod Toxicol* 22: 738-745, 2006 (\*)
- P. Negri-Cesi, A. Colciago, F. Celotti. In "The Endocrine disruptors" (M. Marino e DG Mita Eds), Research Signpost/Transworld Research Network, Trivandrum, Kerala, India, pp. 67-93, 2007
- P. Negri-Cesi, A. Colciago, A. Pravettoni, L. Casati, L. Conti, F. Celotti. *J Steroid Biochem & Mol Biol* 109: 294-299, 2008
- A. Colciago, L. Casati, O. Mornati, A.V. Vergoni, A. Santagostino, F. Celotti, P. Negri-Cesi. *Toxicol & Applied Pharmacol*, 239:46-54 (2009)
- D. Cocchi D, G. Tulipano, A. Colciago, V. Sibilìa, F. Pagani, D. Viganò, T. Rubino, D. Parolaro, P. Bonfanti, A. Colombo, F. Celotti. *Toxicol & Applied Pharmacol* 237: 127-136, 2009.
- A. Pravettoni, O. Mornati, P.G.V. Martini, M. Marino, A. Colciago, F. Celotti, M. Motta, P. Negri-Cesi. Estrogen receptor beta (ERbeta) and inhibition of prostate cancer cell proliferation: studies on the possible mechanism of action in DU145 cells. *Mol Cell Endocrinol* 263:46-54, 2007
- P. Negri-Cesi, A. Colciago, A. Pravettoni, L. Casati, L. Conti, F. Celotti: Sexual differentiation of the rodent hypothalamus: Hormonal and environmental influences. *J Steroid Biochem Mol Biol* 109: 294-299, 2008
- A. Colciago, L. Casati, O. Mornati, A.V. Vergoni, A. Santagostino, F. Celotti, P. Negri-Cesi. *Toxicol & Applied Pharmacol*, 239:46-54, 2009
- D. Cocchi D, G. Tulipano, A. Colciago, V. Sibilìa, F. Pagani, D. Viganò, T. Rubino, D. Parolaro, P. Bonfanti, A. Colombo, F. Celotti. *Toxicol & Applied Pharmacol* 237: 127-136, 2009.
- A. Colciago, F. Celotti, L. Casati, R. Giancola, S. M. Castano, G. Antonini, M. C. Sacchi, P. Negri-Cesi In Vitro Effects of PDGF Isoforms (AA, BB, AB and CC) on migration and proliferation of SaOS-2 osteoblasts and on migration of human osteoblasts. *International Journal of Biomedical Science* 5(4):380-389, 2010

### **Collaborazioni nazionali e internazionali in atto**

- *Studi di tossicologia neurocomportamentale*: Dr. Gemma Calamandrei, Istituto Superiore di Sanità, Roma
- *Effetti epigenetici in vivo e in vitro dei PCB*: Dr. Manel Esteller, Institut Català d'Oncologia, Direttore del Programma PEBC, Hospital Duran i Reynals, Barcellona, Spagna.

### **Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca**

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

- 1) attrezzature per studi di biologia cellulare, biologia molecolare e biochimica
  - apparecchiature per RT-PCR, Real-time PCR, sequenziamento DNA, elettroforesi mono e bi-dimensionale, fornetti per ibridazione, transilluminatori UV;
  - liofilizzatore, spettrofotometro, centrifughe e ultracentrifughe;
  - apparecchiature per cromatografia (HPLC, strato sottile, gas-massa per analisi di proteomica, sistema HPLC-chip);
  - luminometro Microbeta e fluorimetro Victor;
- 2) attrezzature per studi su colture cellulari:
  - cappe sterili, incubatori

- microscopi a luce normale e in fluorescenza, analizzatore di immagini computerizzato, strumentazione per analisi time-lapse in microscopia (microscopio invertito a fluorescenza, telecamera CCD, software per acquisizione delle immagini in fluorescenza).

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

**Parole Chiave**

- Esposizione perinatale a PCB
- Sviluppo cerebrale
- Neurotossicologia comportamentale
- Pubertà
- Epigenetica
- Effetti transgenerazionali



*UNITA' DI RICERCA INBB  
Perugia*

**Responsabile Scientifico**

Prof. Aldo Orlacchio

**Linea di Ricerca**

Enzimi lisosomiali in condizioni normali e patologiche (malattie neurodegenerative). Approcci di terapia genica e con cellule staminali per malattie da accumulo lisosomiale, ingegneria tissutale con cellule staminali.

*titolo*

BIOCHIMICA E BIOLOGIA MOLECOLARE

**Composizione del Gruppo**

**Aderenti INBB**

*Aldo Orlacchio*

*PO- BIO/10*

*orly@unipg.it*

**Non Aderenti INBB**

*Giuseppe Arienti*

*PO-BIO/10*

*Carlo Alberto Palmerini*

*PO- BIO/10*

*Carmelo Tassi*

*PA-MED/46*

*Sabata Martino*

*RU-BIO/11*

*martinos@unipg.it*

*Serena Porcellati*

*RU-BIO/10*

*Alessandro Datti*

*RU\*-BIO/10*

*Carla Saccardi*

*RU-BIO/12*

*Cristina Aisa Maria*

*PT Cat EP*

*Rodolfo Bova*

*PT Cat D*

*Maria Pia Chiuchiù*

*PT Cat D*

*Piergiuseppe Moroni*

*PT Cat D*

*Paolo Tancini*

*PT Cat D*

*Roberto Tiribuzi*

*BC*

*robertotiribuzi@yahoo.it*

*Francesco D'Angelo*

*BC*

*francescodangelo@hotmail.it*

*Ilaria di Girolamo*

*BC*

*iladigi@yahoo.it*

*Lucia Crispoltoni*

*DR*

*lucibio1983@libero.it*

*Simona Montesano*

*DR*

*simona.montesano82@gmail.com*

*Filippo Mattoli*

*DR*

*Federica Tarquini*

*DR*

*Francesco Tartacca*

*DR*

*Francesca Tatò*

*DR*

*Andrea Tortori*

*DR*

**Sede Unità di Ricerca**

*Dipartimento di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche, Sezione di Biochimica e Biologia Molecolare,*

*Università degli Studi di Perugia*

*Indirizzo: via del Giochetto, 06123 Perugia*

*Telefono 075/585-2187*

*Fax 075/585-2185*

*E-mail orly@unipg.it*

**Sezione INBB di appartenenza**

Roma

**Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni**

*Obiettivi*

-Espressione, targeting, caratterizzazione molecolare di enzimi lisosomiali in condizioni normali e patologiche e di approcci di terapia genica e/o cellule staminali per alcune malattie da accumulo lisosomiali.

-Sviluppo di modelli di ingegneria tissutale con particolare attenzione all'interazione fra cellule staminali e biomateriali.

- studio molecolare di base delle cellule staminali.

*Risultati ottenuti*

L'Unità di ricerca ha sviluppato protocolli di terapia cellulare/genica per le malattie di Tay-Sachs e di Sandhoff. Studi condotti mediante il modello murino di Tay-Sachs hanno dimostrato che la somministrazione stereotassica di un vettore erpetico contenente il cDNA HEXA (gene responsabile della malattia) è sufficiente a ristabilire l'attività enzimatica e a rimuovere l'accumulo metabolico nel sistema nervoso centrale.

Sono state avviate linee di ricerca atte all'individuazione del tipo di cellula staminale ideale per la terapia di malattie neurodegenerative. In particolare, sono state vagliate le potenzialità terapeutiche delle cellule staminali mesenchimali di midollo osseo (BMSCs) capaci di differenziare in cellule della linea neurale.

Studi di caratterizzazione molecolare di alcuni enzimi lisosomiali sono stati effettuati su fibroblasti da pazienti affetti da malattia di Alzheimer al fine di identificare marker prognostici.

Nell'ambito della medicina regenerativa cellule staminali mesenchimali sono state coltivate su particolari biomateriali. Abbiamo focalizzato la nostra attenzione sull'interazione tra cellule staminali e biomateriali in particolare studiando gli effetti delle micro e nano-topografie di carbonio amorfo idrogenato (a-C:H) sul differenziamento neurale delle cellule staminali mesenchimali di midollo osseo umane (hBM-MSCs).

E' stato dimostrato che i canali di a-C:H inducono nelle hBM-MSCs specifiche modifiche di organizzazione dei microtubuli, in particolare, esercitano un effetto dinamico, allineando e allungando le BM-MSCs.

Al fine di investigare l'effetto delle nanotopografie nell'induzione del fenotipo neurale, è stato esplorato l'effetto della combinazione di due diversi tipi di stimoli, come induttori chimici che si legano a recettori specifici, o stress fisici, trasmessi dalla tensione del citoscheletro (mechanotransduction), possano influire sul processo di neurodifferenziamento delle hBM-MSCs. Il BDNF è stato utilizzato come modello di legante chimico, mentre come stimolo fisico è stato studiato l'effetto delle nanotopografie superficiali con la forma di canali di a-C:H.

I risultati ottenuti hanno dimostrato un effetto diretto della nanostruttura sul differenziamento neurale delle cellule staminali. Questo effetto era tuttavia maggiore quando le hBM-MSCs venivano messe a contatto con i due stimoli.

#### **Publicazioni più significative nel periodo 2007-2010 (\*affiliazione INBB)**

1. D'angelo F., Armentano I., Reale U., Tiribuzi R., Mattioli S., Cerulli G.G., Ronzoni F., Quattrocchi M., Sampaolesi M., Kenny J.M., Martino S., Orlacchio A. (2010). Human bone marrow mesenchymal stem cell guidance by a-C:H surface designs. *Journal Of Applied Biomaterials & Biomechanics*, vol. vol 8 no 2; p. 108, ISSN: 1722-6899. (\*)
2. Orlacchio A., Bernardi G., Orlacchio A., Martino S. Stem cells and neurological diseases. *Discov Med.* 2010 (49):546-53.
3. Visigalli I., Ungari S., Martino S., Park H., Cesani M., Gentner B., Sergi Sergi L., Orlacchio A, Naldini L, Biffi A. The galactocerebrosidase enzyme contributes to the maintenance of a functional hematopoietic stem cell niche. *Blood.* 2010 May 28
4. Lattanzi A, Neri M, Maderna C, Di Girolamo I, Martino S, Orlacchio A., Amendola M, Naldini L, Gritti A (2010). Widespread enzymatic correction of CNS tissues by a single intracerebral injection of therapeutic lentiviral vector in leukodystrophy mouse models. *Human Molecular Genetics*, vol. 19; p. 2208-2227, ISSN: 0964-6906
5. Orlacchio A., Bernardi G, Orlacchio A., Martino S. Stem cells: an overview of the current status of therapies for central and peripheral nervous system diseases. *Curr Med Chem.* 2010;17(7):595-608. Review.
6. Persichetti E., Chuzhanova N.A., Dardis A., Tappino A., Pohl S., Thomas N.S.T., Rosano C., Balducci C., Paciotti S., Dominissini S., Montalvo A.L., Sibilio M., Parini R., Rigoldi M., Di Rocco M., Parenti G., Orlacchio A., Bembi B., Cooper D.N., Filocamo M. And Beccari T. (2009). Identification and molecular characterization of six novel mutations in the UDP-N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase gamma subunit (GNPTG) gene in patients with mucopolisidosis III gamma. *Human Mutation*, vol. 30; p. 1-7, ISSN: 1059-7794
7. Martino S, D'angelo F, Armentano I, Tiribuzi R, Pennacchi M, Dottori M, Mattioli S, Caraffa A, Cerulli Gg, Kenny Jm, Orlacchio A. (2009). Hydrogenated amorphous carbon nanopatterned film designs drive human bone marrow mesenchymal stem cell cytoskeleton architecture. *Tissue Engineering, Part A*, vol. 10; p. 3139-3149, ISSN: 1937-3341 (\*)
8. Martino S, Di Girolamo I, Cavazzin C, Tiribuzi R, Galli R, Rivaroli A, Valsecchi M, Sandhoff K, Sonnino S, Vescovi A, Orlacchio A. (2009). Neural precursor cell cultures from GM2-gangliosidosis animal models recapitulate the biochemical and molecular hallmarks of the brain pathology. *Journal Of Neurochemistry*, vol. 109; p. 135-147, ISSN: 0022-3042 (\*)
9. Martino S, Di Girolamo I, Orlacchio A, Datti A, Orlacchio A. (2009). MicroRNA implications across neurodevelopment and neuropathology. *Journal Of Biomedicine And Biotechnology*, vol. 2009:654346, ISSN: 1110-7243 (\*)
10. Martino S, Tiribuzi R, Tortori A, Conti D, Visigalli I, Lattanzi A, Biffi A, Gritti A, Orlacchio A. (2009). Specific determination of beta-galactocerebrosidase activity via AgNO3 total inhibition of beta-galactosidase. *Clinical Chemistry*, vol. 55; p. 541-548, ISSN: 0009-9147 (\*)
11. Martino S., Di Girolamo I., Tiribuzi R., D'angelo F., Datti A., Orlacchio A. (2009). Efficient siRNA Delivery by the Cationic Liposome DOTAP in Human Hematopoietic Stem Cells Differentiating into Dendritic Cells. *Journal Of Biomedicine And Biotechnology*, ISSN: 1110-7243. (\*)

12. Costanzi E, Martino S, Persichetti E, Tiribuzi R, Massini C, Bernardi G, Orlacchio A, Orlacchio A. Effects of vitamin C on fibroblasts from sporadic Alzheimer's disease patients. *Neurochem Res.* 2008 Dec;33(12):2510-5.

### **Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni**

Il lavoro prosegue secondo le linee sopra:

- 1 Enzimi lisosomiali e malattie neurodegenerative ( GM2 gangliosidosi, malattia di Krabbe, Leucodistrofia Metacromatica; malattia di Alzheimer).
- 2 Sviluppo di strategie terapeutiche combinate fra terapia genica e terapia cellulare per le malattie neurodegenerative
- 3 Cellule staminali, biopolimeri per ingegneria tissutale.

### **Collaborazioni internazionali in atto**

Prof. K. Sandhoff, Kekule-Institut für Organische Chemie und Biochemie, Universität Bonn, Bonn 53121.

Prof. Rakesh Chibber, The James Black Centre, Kings College London

Prof. M. Sampaolesi, Stem Cell Institute, Katholieke Universiteit Leuven, Belgium.

### **Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca**

Elettroforesi monodimensionale, 2D e software per l'analisi del proteoma (Amersham Biosciences)

Spettrofotofluorimetro, (Perkin Elmer LS50B)

Fluorimetro a piastre Biotek FLx800

Spettrofotometro UV-160A(Shimadzu)

Spettrofotometro BioPhotometer Eppendorf

Lettore Elisa GDV (DV990BV6).

PCR Primus MWG Biotech

High Performance Liquid Chromatography (Beckman).

Ultracentrifuga Optima Max (Beckman Coulter)

Centrifuga Hettich Rotofix 32A

Centrifuga Eppendorf 5804R (Refrigerata).

Microcentrifuga refrigerata Eppendorf 5415 (N2).

Microscopio ottico Nikon Eclipse TS100 dotato di videocamera Nikon Digital sight DS-L

Microscopio a fluorescenza, (Nikon TE 2000S) e Multizoom Motorizzato Nikon AZ-100M

Congelatore orizzontale (-80°C) Angelantoni Scientifica

Cappa flusso laminare per colture cellulari (Aqualia).

### **Parole Chiave**

Enzimi lisosomiali, espressione genica, terapia genica e cellulare, Tay-Sachs, Sandhoff, Alzheimer, Parkinson, Ingegneria tissutale, cellule staminali, biopolimeri.

UNITA' DI RICERCA INBB  
Roma

**Responsabile Scientifico:**

Prof. Giuseppe Palleschi

**Linea di Ricerca:**

Chimica bioelettroanalitica

**Composizione del Gruppo**

**Aderenti INBB**

Moscone Danila	PO	moscone@uniroma2.it
----------------	----	---------------------

**Non aderenti INBB**

Micheli Laura	RU	laura.micheli@uniroma2.it
Ricci Francesco	RU	francesco.ricci@uniroma2.it
Arduini Fabiana	RU	fabiana.arduini@uniroma2.it
Valentini Federica	RU	federica.valentini@uniroma2.it
Volpe Giulia	PT	giulia.volpe@uniroma2.it
Piermarini Silvia	PT	silvia.piermarini@uniroma2.it

**Sede Unità di Ricerca:**

Università di Roma Tor Vergata

Indirizzo via della Ricerca Scientifica

Telefono 0672594423

Fax 06 2024342

E-mail palleschi@uniroma2.it

**Sezione INBB di appartenenza:**

Roma

**Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni**

*Obiettivi*

L'attività di ricerca degli ultimi tre anni ha riguardato l'applicazione di nuovi metodi di screening per il controllo di parametri di qualità e di contaminanti chimici negli alimenti, basati. In particolare:

- Biosensori per la misura delle ammine biogene nel controllo della qualità dei prodotti ittici
- Biosensori per il controllo della fermentazione alcolica e malo-lattica
- Sensori e biosensori per la misura di tossine algali (palitossina e acido okadaico) nei frutti di mare
- Biosensori per la caratterizzazione (polifenoli e trigliceridi) dell'olio
- Biosensori per l'analisi del piombo nel latte
- Biosensore ed immunosensori per l'analisi dell'aflatossina B<sub>1</sub> nei cereali e nell'olio
- Sensori a DNA per l'analisi di molecole target di interesse alimentare ed ambientale

*Risultati ottenuti*

I risultati relativi agli obiettivi di cui sopra sono stati in gran parte raggiunti.

Attualmente si stanno ottimizzando le misure per la determinazione di antibiotici e di tossine algali.

**Pubblicazioni più significative nel periodo 2007-2010 (\* Affiliazioni INBB)**

1. I. Ben Rejeb, F. Arduini, A. Arvinte, A. Amine, M. Gargouri, L. Micheli, C. Bala, D. Moscone, G. Palleschi (2009). Development of a bio-electrochemical assay for AFB<sub>1</sub> detection in olive oil. *Biosensors & Bioelectronics*, 24; 1962-1968. (\*)
2. M. Portaccio, D. Di Tuoro, F. Arduini, M. Lepore, D.G. Mita, N. Diano, L. Mita, D. Moscone (2010). A thionine-modified carbon paste amperometric biosensor for catechol and Bisphenol A determination. *Biosensors & Bioelectronics*, 25: 2003-2008. (\*)
3. F. Arduini, A. Amine, C. Majorani, F. Di Giorgio, D. De Felicis, F. Cataldo, D. Moscone, G. Palleschi (2010). High performance electrochemical sensor based on modified screen-printed electrodes with cost-effective dispersion of nanostructured carbon black. *Electrochemistry Communications*, 12; 346-350. (\*)

4. F. Ricci, G. Adornetto, D. Moscone, G. Palleschi (2010). Quantitative, reagentless, single-step electrochemical detection of anti-DNA antibodies directly in blood serum. *Chemical Communications*, 46, 1742-1744.
5. E. Delibato, G. Volpe, D. Romanazzo, D. De Medici, L. Toti, G. Palleschi (2009). Development and application of an electrochemical plate coupled with immunomagnetic beads (ELIME) array for *Salmonella enterica* detection in meat samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 7200-7204.
6. G. Volpe, E. Cotroneo, D. Moscone, L. Croci, L. Cozzi, G. Ciccaglioni, et al. (2009). A bienzyme electrochemical probe for flow injection analysis of okadaic acid based on protein phosphatase-2a inhibition: an optimization study. *Analytical Biochemistry*, 385(1), 50-56.
7. F. Ricci, N. Zari, F. Caprio, S. Recine, A. Amine, D. Moscone, G. Palleschi, K.W. Plaxco (2009). Surface chemistry effects on the performance of an electrochemical DNA sensor. *Bioelectrochemistry*, 76(1-2), 1567-5394.
8. S. Piermarini, G. Volpe, R. Federico, D. Moscone, G. Palleschi (2010). Detection of biogenic amines in human saliva using a screen-printed biosensor. *Analytical Letters*, 43: 1310-1346.
9. F. Valentini, A. Diamanti, G. Palleschi (2010). New bio-cleaning strategies on porous building materials affected by biodeterioration event. *Applied Surface Science* 256: 6550-6553.
10. F. Arduini, A. Cassisi, A. Amine, F. Ricci, D. Moscone, G. Palleschi (2009). Electrocatalytic oxidation of thiocholine at chemically modified cobalt hexacyanoferrate screen-printed electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 626: 66-74.
11. D. Romanazzo, F. Ricci, G. Volpe, C. T. Elliott, S. Vesco, K. Kroeger, D. Moscone, J. Strokac, H. Van Egmond, M. Vehniäinen, G. Palleschi (2010). Development of a recombinant Fab-fragment based electrochemical immunosensor for deoxynivalenol detection in food samples. *Biosensors & Bioelectronics*, 25: 2615-2621.
12. Antonelli M.L, Arduini F., Lagana' A, Moscone D, Siliprandi V (2009). Construction, Assembling and Application of A Trehalase-God Enzyme Electrode System. *Biosensors & Bioelectronics*, 24: 1382-1388.

#### **Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni**

Gli obiettivi per l'attività di ricerca dei prossimi tre anni riguarderanno lo sviluppo di immunosensori e sensori peptidici per la determinazione rapida ed accurata della celiachia e sensori a DNA per la diagnosi di malattie autoimmuni.

In particolare, per la diagnosi di celiachia, ci si propone di realizzare un nuovo test rapido, sensibile ed economico, e adatto per analisi decentrate capace di rivelare le IgA anti-transglutaminasi in siero, saliva ed in sangue intero.

Per quanto riguarda i sensori a DNA l'obiettivo è utilizzare tali sensori elettrochimici per l'analisi di fattori di trascrizione e di specifici anticorpi per la diagnosi di malattie autoimmuni, quali lupus eritematoso, in campioni clinici.

#### **Collaborazioni internazionali in atto**

Università di Mohammadia, Marocco

Università di Santa Barbara, USA

Università di Oulu, Finlandia

#### **Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca**

HPLC, strumentazione elettrochimica, spettrofotometri, GC-MS, SEM/EDX, spettrofluorimetri

#### **Parole Chiave**

Sensori chimici, biosensori, Immunosensori, sensori a DNA, enzimi

*UNITA' DI RICERCA INBB  
Napoli*

**Responsabile Scientifico**

Prof. Giuseppe Paolisso

**Linea di Ricerca**

Studio relazione tra la lunghezza dei telomeri (leukocyte telomere length -LTL), livelli plasmatici di IGF1, insulino resistenza e la longevità

Identificazione del fenotipo longevo: ruolo dei geni coinvolti nel dispendio energetico e nel metabolismo dei carboidrati.

**Composizione del Gruppo**

**Aderenti INBB**

Giuseppe Paolisso

PO

giuseppe.paolisso@unina2.it

**Sede Unità di Ricerca**

*Dipartimento di Gerontologia, Geriatria e Malattie del Metabolismo, Seconda Università di Napoli*

*Indirizzo piazza Miraglia 2, 80138, Napoli*

*Telefono 0815665135*

*Fax 0815665303*

*E-mail Giuseppe.paolisso@unina2.it*

**Sezione INBB di appartenenza**

Napoli

**Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni**

*Obiettivi*

- Valutare l'associazione tra la lunghezza dei telomeri (leukocyte telomere length -LTL), i livelli plasmatici di IGF1, insulino resistenza e la longevità
- valutare il ruolo delle varianti alleliche dei geni UCP2, IRS2, IGF1R nel determinismo della longevità umana.
- valutare il loro effetto sul dispendio energetico, sullo stress ossidativo, sul grado di insulino resistenza sulla funzione beta cellulare e sui livelli plasmatici di insulina.
- valutare l'effetto della loro interazione dato il ruolo svolto da tali geni sul metabolismo energetico, attraverso la regolazione del metabolismo lipidico e glucidico.

*Risultati ottenuti*

Lo studio condotto sulla lunghezza dei telomeri ha dimostrato che i soggetti longevi hanno una aumentata percentuale di "ultra-short telomeres" rispetto ai soggetti più giovani e che la riduzione età dipendente dei livelli plasmatici di IGF1 si associa ad una riduzione della lunghezza dei telomeri. Lo studio sulla relazione tra longevità e varianti alleliche dei geni coinvolti nel metabolismo del glucosio e nel dispendio energetico ha dimostrato che la presenza del genotipo Asp/Asp della variante Gly1057Asp del gene IRS2 si associa ad una aumentata probabilità di diventare longevo.

**Pubblicazioni più significative nel periodo 2007-2010**

1. Marfella R, Siniscalchi M, Portoghese M, Di Filippo C, Ferraraccio F, Schiattarella C, Crescenzi B, Sangiuolo P, Ferraro G, Siciliano S, Cinone F, Mazzeo G, Martis S, Verza M, Coppola L, Rossi F, D'Amico M, Paolisso G. Morning blood pressure surge as a destabilizing factor of atherosclerotic plaque: role of ubiquitin-proteasome activity. Hypertension. 2007 Apr;49(4):784-91. Epub 2007 Feb 19. PubMed PMID: 17309948
2. Kimura M, Barbieri M, Gardner JP, Skurnick J, Cao X, van Riel N, Rizzo MR, Paolisso G, Aviv A. Leukocytes of exceptionally old persons display ultra-short telomeres. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2007 Dec;293(6):R2210-7. Epub 2007 Sep 26.
3. Barbieri M, Gambardella A, Paolisso G, Varricchio M. Metabolic aspects of the extreme longevity. Exp Gerontol. 2008 Feb;43(2):74-8. Epub 2007 Jun 30. Review.

4. Marfella R, Di Filippo C, Portoghese M, Ferraraccio F, Crescenzi B, Siniscalchi M, Barbieri M, Bologna C, Rizzo MR, Rossi F, D'Amico M, Paolisso G. Proteasome activity as a target of hormone replacement therapy-dependent plaquestabilization in postmenopausal women. *Hypertension*. 2008 Apr;51(4):1135-41.
5. Freathy RM, Timpson NJ, Lawlor DA, Pouta A, Ben-Shlomo Y, Ruokonen A, Ebrahim S, Shields B, Zeggini E, Weedon MN, Lindgren CM, Lango H, Melzer D, Ferrucci L, Paolisso G, Neville MJ, Karpe F, Palmer CN, Morris AD, Elliott P, Jarvelin MR, Smith GD, McCarthy MI, Hattersley AT, Frayling TM. Common variation in the FTO gene alters diabetes-related metabolic traits to the extent expected given its effect on BMI. *Diabetes*. 2008 May;57(5):1419-26
6. Melzer D, Perry JR, Hernandez D, Corsi AM, Stevens K, Rafferty I, Lauretani F, Murray A, Gibbs JR, Paolisso G, Rafiq S, Simon-Sanchez J, Lango H, Scholz S, Weedon MN, Arepalli S, Rice N, Washecka N, Hurst A, Britton A, Henley W, van de Leemput J, Li R, Newman AB, Tranah G, Harris T, Panicker V, Dayan C, Bennett A, McCarthy MI, Ruokonen A, Jarvelin MR, Guralnik J, Bandinelli S, Frayling TM, Singleton A, Ferrucci L. A genome-wide association study identifies protein quantitative trait loci (pQTLs). *PLoS Genet*. 2008 May 9;4(5):e1000072.
7. Rizzo MR, Abbatecola AM, Barbieri M, Vietri MT, Cioffi M, Grella R, Molinari A, Forsey R, Powell J, Paolisso G. Evidence for anti-inflammatory effects of combined administration of vitamin E and C in older persons with impaired fasting glucose: impact on insulin action. *J Am Coll Nutr*. 2008 Aug;27(4):505-11.
8. Barbieri M, Marfella R, Rizzo MR, Boccardi V, Siniscalchi M, Schiattarella C, Siciliano S, Lemme P, Paolisso G. The -8 UTR C/G polymorphism of PSMA6 gene is associated with susceptibility to myocardial infarction in type 2 diabetic patients. *Atherosclerosis*. 2008 Nov;201(1):117-23. Epub 2008 Mar 20. PubMed PMID:18358479.
9. Marfella R, Di Filippo C, Portoghese M, Ferraraccio F, Rizzo MR, Siniscalchi M, Musacchio E, D'Amico M, Rossi F, Paolisso G. Tight glycemic control reduces heart inflammation and remodeling during acute myocardial infarction in hyperglycemic patients. *J Am Coll Cardiol*. 2009 Apr 21;53(16):1425-36. PubMed PMID: 19371826.
10. Barbieri M, Paolisso G, Kimura M, Gardner JP, Boccardi V, Papa M, Hjelmborg JV, Christensen K, Brimacombe M, Nawrot TS, Staessen JA, Pollak MN, Aviv A. Higher circulating levels of IGF-1 are associated with longer leukocyte telomere length in healthy subjects. *Mech Ageing Dev*. 2009 Nov-Dec;130(11-12):771-6. Epub . PubMed PMID: 19913048.
11. Dupuis J, Langenberg C, Prokopenko I, Saxena R, Soranzo N, Jackson AU, Wheeler E, Glazer NL, Bouatia-Naji N, Gloyn AL, Lindgren CM, Mägi R, Morris AP, Randall J, Johnson T, Elliott P, Rybin D, Thorleifsson G, Steinthorsdottir V, Henneman P, Grallert H, Dehghan A, Hottenga JJ, Franklin CS, Navarro P, Song K, Goel A, Perry JR, Egan JM, Lajunen T, Grarup N, Sparsø T, Doney A, Voight BF, Stringham HM, Li M, Kanoni S, Shadrer P, Cavalcanti-Proença C, Kumari M, Qi L, Timpson NJ, Gieger C, Zabena C, Rocheleau G, Ingelsson E, An P, O'Connell J, Luan J, Elliott A, McCarroll SA, Payne F, Roccascella RM, Pattou F, Sethupathy P, Ardlie K, Ariyurek Y, Balkau B, Barter P, Beilby JP, Ben-Shlomo Y, Benediktsson R, Bennett AJ, Bergmann S, Bochud M, Boerwinkle E, Bonnefond A, Bonnycastle LL, Borch-Johnsen K, Böttcher Y, Brunner E, Bumpstead SJ, Charpentier G, Chen YD, Chines P, Clarke R, Coin LJ, Cooper MN, Cornelis M, Crawford G, Crisponi L, Day IN, de Geus EJ, Delplanque J, Dina C, Erdos MR, Fedson AC, Fischer-Rosinsky A, Forouhi NG, Fox CS, Frants R, Franzosi MG, Galan P, Goodarzi MO, Graessler J, Groves CJ, Grundy S, Gwilliam R, Gyllenstein U, Hadjadj S, Hallmans G, Hammond N, Han X, Hartikainen AL, Hassanali N, Hayward C, Heath SC, Herberg S, Herder C, Hicks AA, Hillman DR, Hingorani AD, Hofman A, Hui J, Hung J, Isomaa B, Johnson PR, Jørgensen T, Jula A, Kaakinen M, Kaprio J, Kesaniemi YA, Kivimäki M, Knight B, Koskinen S, Kovacs P, Kyvik KO, Lathrop GM, Lawlor DA, Le Bacquer O, Lecoeur C, Li Y, Lyssenko V, Mahley R, Mangino M, Manning AK, Martínez-Larrad MT, McAteer JB, McCulloch LJ, McPherson R, Meisinger C, Melzer D, Meyre D, Mitchell BD, Morken MA, Mukherjee S, Naitza S, Narisu N, Neville MJ, Oostra BA, Orrù M, Pakyz R, Palmer CN, Paolisso G, Pattaro C, Pearson D, Peden JF, Pedersen NL, Perola M, Pfeiffer AF, Pichler I, Polasek O, Posthuma D, Potter SC, Pouta A, Province MA, Psaty BM, Rathmann W, Rayner NW, Rice K, Ripatti S, Rivadeneira F, Roden M, Rolandsson O, Sandbaek A, Sandhu M, Sanna S, Sayer AA, Scheet P, Scott LJ, Seedorf U, Sharp SJ, Shields B, Sigurdsson G, Sijbrands EJ, Silveira A, Simpson L, Singleton A, Smith NL, Sovio U, Swift A, Syddall H, Syvänen AC, Tanaka T, Thorand B, Tichet J, Tönjes A, Tuomi T, Uitterlinden AG, van Dijk KW, van Hoek M, Varma D, Visvikis-Siest S, Vitart V, Vogelzang N, Waeber G, Wagner PJ, Walley A, Walters GB, Ward KL, Watkins H, Weedon MN, Wild SH, Willemsen G, Witteman JC, Yarnell JW, Zeggini E, Zelenika D, Zethelius B, Zhai G, Zhao JH, Zillikens MC; DIAGRAM Consortium; GIANT Consortium; Global BPgen Consortium, Borecki IB, Loos RJ, Meneton P, Magnusson PK, Nathan DM, Williams GH, Hattersley AT, Silander K, Salomaa V, Smith GD, Bornstein SR, Schwarz P, Spranger J, Karpe F, Shuldiner AR, Cooper C, Dedoussis GV, Serrano-Ríos M, Morris AD, Lind L, Palmer LJ, Hu FB, Franks PW, Ebrahim S, Marmot M, Kao WH, Pankow JS, Sampson MJ, Kuusisto J, Laakso M, Hansen T, Pedersen O, Pramstaller PP, Wichmann HE, Illig T, Rudan I, Wright AF, Stumvoll M, Campbell H, Wilson JF; Anders Hamsten on behalf of Procardis Consortium; MAGIC investigators, Bergman RN, Buchanan TA, Collins FS, Mohlke KL, Tuomilehto J, Valle TT, Altshuler D, Rotter JI, Siscovick DS, Penninx BW, Boomsma DI, Deloukas P, Spector

12. Perry JR, Weedon MN, Langenberg C, Jackson AU, Lyssenko V, Sparso T, Thorleifsson G, Grallert H, Ferrucci L, Maggio M, Paolisso G, Walker M, Palmer CN, Payne F, Young E, Herder C, Narisu N, Morken MA, Bonnycastle LL, Owen KR, Shields B, Knight B, Bennett A, Groves CJ, Ruukonen A, Jarvelin MR, Pearson E, Pascoe L, Ferrannini E, Bornstein SR, Stringham HM, Scott LJ, Kuusisto J, Nilsson P, Neptin M, Gjesing AP, Pisinger C, Lauritzen T, Sandbaek A, Sampson M, Zeggini ME, Lindgren CM, Steinthorsdottir V, Thorsteinsdottir U, Hansen T, Schwarz P, Illig T, Laakso M, Stefansson K, Morris AD, Groop L, Pedersen O, Boehnke M, Barroso I, Wareham NJ, Hattersley AT, McCarthy MI, Frayling TM. Genetic evidence that raised sex hormone binding globulin (SHBG) levels reduce the risk of type 2 diabetes. *Hum Mol Genet.* 2010 Feb 1;19(3):535-44. Epub 2009 Nov 18. PubMed PMID: 19933169; PubMed Central PMCID: PMC2798726.

### **Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni**

Ampliare la casistica di soggetti ultracentenari e completare la tipizzazione genetica e fenotipica dei soggetti longevi

### **Collaborazioni internazionali in atto**

- Baltimore Longitudinal Study of Ageing - National Institute of Ageing-Baltimore –USA (Dir. Harris T.) (Dir. Ferrucci L)
- The Center of Human Development and Aging, University of Medicine and Dentistry of New Jersey, Newark, NJ, United States (Dir. Abraham Aviv)
- Howard Hughes Medical Institute, Division of Endocrinology, Children's Hospital Boston, Harvard Medical School, Boston, USA. (Dir. Morris F. White)

### **Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca**

Real Time PCR  
Ultracentrifughe  
Apparati per blotting (Western, .....)  
Gel documentation system (UV-VIS) – Image Quant 300 GE  
GeneQuant 1300 Spectrophotometer

### **Parole Chiave**

Longevità, polimorfismi genetici, telomeri, metabolismo glicidico



*UNITA' DI RICERCA INBB  
Napoli*

**Responsabile Scientifico**

Prof.ssa Renata Piccoli

**Linea di Ricerca**

Proteine amiloidogeniche. Analisi del meccanismo d'azione del dominio fibrillogenico della Apolipoproteina A-I e di Atassina-3.

**Composizione del Gruppo**

**Aderenti INBB**

<i>Piccoli Renata</i>	<i>PO</i>	<i>piccoli@unina.it</i>
<i>Arciello Angela</i>	<i>RU</i>	<i>anarciel@unina.it</i>
<i>Monti Daria Maria</i>	<i>RU</i>	<i>mdmonti@unina.it</i>

**Non Aderenti INBB**

<i>Rita Del Giudice</i>	<i>DR</i>	<i>rita.delgiudice@unina.it</i>
-------------------------	-----------	---------------------------------

**Sede Unità di Ricerca**

*Dip di Biologia Strutturale e Funzionale, Università di Napoli Federico II  
Complesso Universitario di Monte S. Angelo, via Cinthia, 80126 Napoli  
Tel. 081 679156  
Fax 081 679233  
E-mail: [piccoli@unina.it](mailto:piccoli@unina.it)*

**Sezione INBB di appartenenza**

Napoli

**Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni**

*Obiettivi*

I nostri studi sono incentrati sul dominio fibrillogenico di ApoA-I, un polipeptide altamente destrutturato di 93 residui responsabile della formazione di fibrille amiloidi in vivo. L'ottenimento del polipeptide ricombinante in forma pura ha consentito la sua caratterizzazione strutturale e funzionale. L'obiettivo della ricerca è volto alla descrizione del meccanismo molecolare della patogenicità di tale polipeptide.

La proteina fibrillogenica Atassina-3 e il suo dominio N-terminale, denominato Josephine, sono stati oggetto di studio in collaborazione con il gruppo della Dott.ssa Annalisa Pastore. Sono in corso studi volti all'analisi del potenziale citotossico di tali proteine e del loro effetto su cellule neuronali trasformate stabilmente con le rispettive sequenze geniche.

*Risultati ottenuti*

1. Produzione del dominio fibrillogenico di ApoA-I in forma ricombinante.

E' stato messo a punto un efficiente sistema di espressione per produrre una versione ricombinante di [1-93]ApoA-I, seguendo una strategia volta a mascherare l'instabilità del polipeptide fibrillogenico durante la produzione intracellulare. La proteina ricombinante è stata isolata in forma omogenea. L'analisi conformazionale di [1-93]ApoA-I ha indicato che [1-93]ApoA-I è intrinsecamente fibrillogenico con caratteristiche molto simili a quelle descritte per la sua controparte naturale. E' quindi disponibile un sistema sperimentale in vitro funzionalmente analogo a quello in vivo.

2. Produzione delle varianti di [1-93]ApoA-I associate a patologie amiloidi.

Sono state espresse in forma ricombinante le 13 varianti di [1-93]ApoA-I descritte in pazienti affetti da amiloidosi da ApoA-I. Tale sistema sperimentale ha consentito uno studio sui determinanti molecolari dell'aggregazione proteica e sulla propensione dei polipeptidi omologhi al generare depositi amiloidi.

3. Mediante saggi di legame e analisi in fluorescenza, è in corso di definizione il percorso intracellulare del polipeptide fibrillogenico in cellule bersaglio. Analisi di interattomica mediante spettrometria di massa in collaborazione con il gruppo del Prof. P. Pucci hanno consentito di definire l'identità di potenziali interattori del polipeptide fibrillogenico di ApoA-I.

4. Sono stati analizzati gli effetti di lipidi sullo stato conformazionale del polipeptide fibrillogenico di ApoA-I e sulla sua propensione all'aggregazione.

5. Sfruttando la capacità di aggregazione del polipeptide fibrillogenico di ApoA-I, sono state ottenute fibrille amiloidi cataliticamente attive. Le fibrille sono state infatti generate a partire da un prodotto chimerico ottenuto dalla fusione del polipeptide con un enzima di interesse biotecnologico. Le fibrille catalitiche, analizzate strutturalmente e funzionalmente, rappresentano di un nanobiomateriale di potenziale interesse biotecnologico.

6. E' stata ottenuta una pianta transgenica di tabacco, esprimente ApoA-I umana.

#### **Pubblicazioni più significative nel periodo 2007-2010**

Tedesco A., D'Agostino D., Soriente I., Amato P., Piccoli R., Sabatini P.

A new strategy for the early diagnosis of rheumatoid arthritis: A combined approach. *Autoimmun Rev.* (2009) 8, 233-237.

Guglielmi F., Monti D.M., Arciello A., Torrassa S., Cozzolino F., Pucci P., Relini A., Piccoli R.

Enzymatically active fibrils generated by self-assembly of the ApoA-I fibrillogenic domain functionalized with a catalytic moiety. *Biomaterials* (2009) 30, 829-835. IF: 7.365. **Affiliazione Consorzio**

Merlino A., Avella G., Di Gaetano S., Arciello A., Piccoli R., Mazzarella L. and Sica F.

Structural features for the mechanism of antitumor action of a dimeric human pancreatic ribonuclease variant. *Protein Sci.* (2009) 18, 50-57. **Affiliazione Consorzio**

Monti D.M., Yu W., Pizzo E., Shima K., Hu M.G., Di Malta C., Piccoli R., D'Alessio G., Hu G.F.

Characterization of the angiogenic activity of zebrafish ribonucleases. *FEBS J.* (2009) 276, 4077-90.

Monti D.M., Guglielmi F., Monti M., Cozzolino F., Torrassa S., Relini A., Pucci P., Arciello A., Piccoli R.

Effects of a lipid environment on the fibrillogenic pathway of the N-terminal polypeptide of human apolipoprotein A-I, responsible for in vivo amyloid fibril formation. *Eur. Biophys J.* (2010) 39, 1289-99. PMID: 20182709. DOI 10.1007/s00249-010-0582-2 - IF: 2.4 **Affiliazione Consorzio**

Esposito V., Guglielmi F., Martin S.R., Pauwels K., Pastore A., Piccoli R., Temussi P.A. Aggregation mechanisms of cystatins: a comparative study of monellin and orzacystatin. *Biochemistry* (2010) 49, 2805-10. DOI: 10.1021/bi902039s **Affiliazione Consorzio**

P. Chiaiese, M. Minutolo, A. Arciello, F. Guglielmi, R. Piccoli and E. Filippone. Expression of human apolipoprotein A-I in *Nicotiana tabacum*. *Biotechnology Lett.* (2010), in press. **Affiliazione Consorzio**

#### **Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni**

- Analisi del meccanismo molecolare della patogenicità di [1-93]ApoA-I
- Definizione degli interattori molecolari del polipeptide fibrillogenico
- Analisi del legame di [1-93]ApoA-I alla matrice extracellulare di cellule eucariotiche
- Analisi dell'effetto di Atassina-3 e del dominio Josephine sulla vitalità cellulare

#### **Collaborazioni internazionali in atto**

- National Institute for Medical Research, London NW7 1AA, UK, Dott.ssa Annalisa Pastore
- University of Cambridge, Department of Chemistry, Cambridge CB2 1EW, United Kingdom, Dr. C. Dobson

#### **Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca**

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

#### **Parole Chiave**

- Fibrillogenesi
- Proteine amiloidogeniche
- Aggregazione proteica
- Citotossicità

UNITA' DI RICERCA INBB  
Napoli

**Responsabile Scientifico:**

Prof. Riccardo Pierantoni

**Linee di Ricerca:**

Controllo dell'attività gonadica nei vertebrati  
Mesotelioma e biomarkers precoci

**Composizione del Gruppo**

**Aderenti INBB**

Silvia Fasano	PO.	<i>silvia.fasano@unina2.it</i>
Gilda Cobellis	PA (idonea)	<i>gilda.cobellis@unina2.it</i>
Rosaria Meccariello	PA (idonea)	<i>meccariello@uniparthenope.it</i>

**Non Aderenti INBB**

Rosanna Chianese	A	<i>rosanna.chianese@unina2.it</i>
Cacciola Giovanna	A	<i>giovanna.cacciola@unina2.it</i>
Chioccarelli Teresa	A	<i>teresa.chioccarelli@unina2.it</i>
Vincenza Ciaramella	DR	<i>vincenza.ciaramella@unina2.it</i>

**Sede Unità di Ricerca**

Indirizzo Dipartimento di Medicina Sperimentale, Seconda Università di Napoli, Via Costantinopoli 16, 80138 Napoli  
Telefono 0815667617  
Fax 0815667500/7617  
E-mail *riccardo.pierantoni@unina2.it*

**Sezione INBB di appartenenza**

Napoli

**Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni**

*Obiettivi*

Determinare il ruolo degli endocannabinoidi nella riproduzione; individuare biomarkers per la diagnosi precoce di mesotelioma.

*Risultati ottenuti*

Gli endocannabinoidi regolano l'attività dell'asse ipotalamo-ipofisi gonadi, la motilità degli spermatozoi e il parto, nonché svolgono un ruolo fondamentale nell'aborto spontaneo. La metalloproteinasi 14 viene espressa nel mesotelioma

**Pubblicazioni più significative nel periodo 2007-2010**

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

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

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

Cobellis G., Cacciola G., Chioccarelli T., Izzo G., Meccariello R., Pierantoni R. and Fasano S. (2008). Estrogen regulation of the male reproductive tract in the frog, *Rana esculenta*: a role in Fra-1 activation in peritubular myoid cells and in sperm release. Gen. Comp. Endocrinol. 155: 838-846

- Meccariello R., Berruti G., Chianese R., De Santis R., Di Cunto F., Scarpa D., Cobellis G., Zucchetti I., Pierantoni R., Altruda F. and Fasano S. (2008). Structure of msj-1 gene in mice and humans: a possibile role in male reproduction. *Gen. Comp. Endocrinol.* 156: 91-103
- Meccariello R., Franzoni M.F., Chianese R., Cottone E., Scarpa D., Donna D., Cobellis G., Guastalla A., Pierantoni R. and Fasano S. (2008). Interplay between the endocannabinoid system and GnRH-I in the forebrain of the anuran amphibian *Rana esculenta*. *Endocrinology*, 149: 2149-2158
- Cacciola G., Chioccarelli T., Ricci G., Meccariello R., Fasano S., Pierantoni R. and Cobellis G. (2008). The endocannabinoid system in vertebrate male reproduction: a comparative overview. *Mol. Cell. Endocrinol.* 286S: 24-30
- Chianese R., Cobellis G., Pierantoni R., Fasano S., and Meccariello R. (2008). Non mammalian vertebrate models and endocannabinid system: relationship with gonadotropin-releasing hormone. *Mol. Cell. Endocrinol.* 286S: 46-51
- Cacciola G., Chioccarelli T., Macie K., Meccariello R., Ledent C., Fasano S., Pierantoni R. and Cobellis G. (2008). Expression of type 1 cannabinoid receptor durino rat postnatal testicular development: possibile involvement in adult Leydig cell proliferation. *Biol. Reprod.* 79: 758-765
- Acone G., Trabucco E., Cacciola G., Chioccarelli T., Colacurci N., Cobellis L., Macie K., Meccariello R., Fasano S., R. Pierantoni and Cobellis G. (2009). Low type 1 cannabinoid receptor levels characterize placental villous in labouring delivery. *Placenta* 30:203-205
- Pierantoni R., Cobellis G., Meccariello R., Cacciola G., Chianese R., Chioccarelli T. and Fasano S. (2009) "Testicular GnRH" Activity, Progression of Spermatogenesis and Sperm Transport in Vertebrates. *Ann. NY Acad Sci (USA)* 1163: 279-291
- Pierantoni R., Cobellis G., Meccariello R., Cacciola G., Chianese R., Chioccarelli T. and Fasano S. (2009) CB1 activity in male reproduction: mamalian and non-mammalian animal models. *Vitamins and hormones* 81: 367-387
- Fasano S., Meccariello R., Cobellis G., Chianese R., Cacciola G., Chioccarelli T. and Pierantoni R (2009). The endocannabinoid system: an ancient signaling involved in the control of male fertility. *Ann. NY Acad Sci (USA)* 1163:112-124
- Trabucco E., Acone G., Marenga AM., Pierantoni R., Cacciola G., Chioccarelli T., Mackie K., Fasano S., Colacurci N., Meccariello R., Cobellis G., Cobellis L. (2009). Endocannabinoid system in first trimestre placenta: low FAAH and high CB1 expression characterize spontaneous miscarriage. *Placenta* 30: 516-522
- Crispi S., Calogero R.A., Santini M., Mellone P., Vincenti B., Citro G., Vicidomini G., Fasano S., Meccariello R., Cobellis G., Menegozzo S., Pierantoni R., Facciolo F., Baldi S., Menegozzo. (2009). Global gene expression profiling of human pleural mesotheliomas: identification of matrix metalloproteinase 14 (MMP-14) as potential tumor target. *PloS ONE* 4:1-13
- Cobellis G., Ricci G., Cacciola G., Orlando P., Petrosino S., Cascio M.G., Bisogno T., De Petrocellis L., Chioccarelli T., Altucci L., Fasano S., Meccariello R., Pierantoni R., Ledent C., Di Marzo V. (2010). A gradient of 2-arachidonoylglycerol regulates epididymal sperm cell start-up. *Biol. Reprod.* 82: 451-458
- Chianese R., Scarpa D., Berruti G., Cobellis G., Pierantoni R., Fasano S., Mecariello R. (2010). Expression and localization of the deubiquitinating enzyme mUBPy in wobbler mouse testis durino spermiogenesis. *Gen. Comp. Endocrinol.* 166: 289-295
- Signorile P.G., Spugnino E.P., Mita L., Mellone P., D'Avino A., Bianco M., Diano N., Caputo L., Rea F., Viceconte R., Portaccio M., Viaggiano E., Citro G., Pierantoni R., Sica V., Vincenti V., Mita D.G., Baldi F., Baldi A. (2010) Prenatal exposure of mice to bisphenol A elicits an endometriosis-like phenotype in female offspring. *Gen. Comp. Endocrinol.* 168: 318-325
- Chioccarelli T., Cacciola G., Altucci L., Lewis S.E.M., Simon L., Ricci G., Ledent C., Meccariello R., Fasano S., Pierantoni R., Cobellis G. (2010) Cannabinoid receptor 1 influences chromatin remodeling in mouse spermatids by affecting content of transition protein 2 mRNA and histone displacement. *Endocrinology*: in press

### Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni

Definire il ruolo degli endocannabinoidi nel remodeling della cromatina  
Defire il rapporto fra kisspeptine, GnRH ed endocannabinoidi nell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi  
Definire il ruolo degli endocannabinoidi nell'insorgenza del mesotelioma  
Metilazione del gene per la mesotelina ed insorgenza di mesotelioma

**Collaborazioni internazionali in atto**

Ken Mackie, Indiana University  
Sheena Lewis, Belfast University  
Mauro Maccarrone, Università di Teramo

**Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca**

Real Time PCR, Microscopio a fluorescenza, Laboratori di Biologia Molecolare, Laboratori di Istologia ed Immunoistochimica

**Parole Chiave**

Gonadi, Riproduzione, Ormoni, Recettori, Mesotelioma

UNITA' DI RICERCA INBB  
Napoli

**Responsabile Scientifico**

Prof. Pietro Pucci

**Linea di Ricerca**

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

**Composizione del Gruppo**

**Aderenti INBB**

<i>Leila Birolo</i>	<i>PA</i>	<i>birolo@unina.it</i>
<i>Angela Amoresano</i>	<i>RU</i>	<i>angamor@unina.it</i>
<i>Maria Monti</i>	<i>RU</i>	<i>montimar@unina.it</i>
<i>Marianna Cozzolino</i>	<i>DR</i>	<i>cozzolinom@ceinge.unina.it</i>

**Non Aderenti INBB**

<i>Andrea Carpentieri</i>	<i>Borsista Post-Doc BC</i>	<i>acarpent@unina.it</i>
<i>Chiara Giangrande</i>	<i>Dottoranda DR</i>	<i>Chiara.giangrande@unina.it</i>
<i>Angelo Chianese</i>	<i>Dottorando DR</i>	<i>Angelo.chianese@unina.it</i>
<i>Carla Iannone</i>	<i>Borsista BC</i>	<i>Iannone.carla@libero.it</i>
<i>Lucia Colarusso</i>	<i>Borsista BC</i>	<i>lucia.colarusso@yahoo.it</i>

**Sede Unità di Ricerca**

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

**Sezione INBB di appartenenza**

Napoli

**Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni**

*Obiettivi*

**Fibrillogenesi**

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

**Proteomica funzionale**

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

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

*Risultati ottenuti*

**Fibrillogenesi**

**1. Analisi conformazionale dell' Acilfosfatasi 2 da *Drosophila melanogaster***

L'acilfosfatasi 2 da *Drosophila Melanogaster* (AcPDro2) mostra un comportamento fibrillogenico già in presenza di basse concentrazioni (5%) di 2,2,2-trifluoroetantolo (TFE). In tali condizioni, infatti, la proteina forma fibrille dalle proprietà morfologiche e dimensionali caratteristiche delle fibrille amiloidi. Tali aggregati, a differenza di quelli generati da altre proteine fibrillogeniche, conservano gran parte dell'attività catalitica mostrata dalla proteina nello stato nativo. I profili di idrolisi ottenuti a seguito di esperimenti di proteolisi limitata condotti in assenza ed in presenza di 5% TFE sono risultati pressoché identici avvalorando l'ipotesi che il meccanismo di aggregazione di tale acilfosfatasi non prevede una destrutturazione rilevante della proteina.

## **2. Influenza dell'ambiente lipidico sulla conformazione e la aggregazione della proteina ApoA-I [1-93]**

Usando un approccio multidisciplinare che ha incluso Dicroismo Circolare (CD), Fluorescenza, Microscopia a Forza Atomica (AFM), è stata studiata l'influenza che il microambiente lipidico esercita sulla conformazione e sulla propensione all'aggregazione del frammento ApoA-I [1-93]. In presenza di un detergente quale il Triton X-100 il frammento presenta una strutturazione in  $\alpha$ -elica sia a pH 8 che a 6.4. Questi conformeri sono stabili e non generano aggregati, come visto mediante AFM anche a distanza di molti giorni. Analoghi studi ed analoghi risultati sono stati trovati anche in presenza di colesterolo, un ligando naturale dell' ApoA-I e di liposomi carichi sia positivamente che negativamente.

## **Proteomica funzionale**

### **1. Identificazione dei componenti del complesso cap in *Drosophila***

Il complesso legato all'inizio della traduzione in *Drosophila* è stato isolato mediante cromatografia di affinità ed i singoli componenti identificati in collaborazione con il Prof. Verrotti (CEINGE, Napoli). Tra gli interattori identificati, è stata approfondita geneticamente e biochimicamente l'interazione dello chaperone Hsp83 con il repressore trascrizionale Cup

### **2. Studio degli interattori della proteina CBX7**

CBX7 è un fattore trascrizionale che svolge un importante ruolo di oncosoppressore. Infatti la riduzione di CBX7 correla con l'aumento della malignità di alcuni tumori. Per comprendere come CBX7 svolga tale ruolo è stato effettuato uno studio di proteomica funzionale per isolare ed identificare i complessi molecolari a cui la proteina prende parte. Tra gli interattori trovati, è stata approfondita l'interazione con HDAC2. È stato dimostrato che HDAC2 interagisce sia in vitro che in vivo con CBX7, inibendone l'attività. Inoltre quando tale interazione ha luogo a livello del promotore di E-Cadherin ne induce la repressione, fenomeno che caratterizza le forme tumorali con prognosi più maligna.

### **3. Studio dell'interazione di TRAP1 con Sorcin**

TRAP1 è uno chaperone molecolare mitocondriale con proprietà antiossidanti ed antiapoptotiche, coinvolto in processi di chemoresistenza. TRAP1 è stato espresso con tag HA ed immunoprecipitato per l'identificazione mediante approcci di proteomica funzionale di interattori capaci di chiarire il suo ruolo nei processi in cui è coinvolto. Tra i tanti interattori identificati è stata approfondita l'interazione con Sorcin, una proteina coinvolta nell'omeostasi del  $Ca^{2+}$ . Esperimenti funzionali hanno dimostrato che questa interazione è necessaria sia per la localizzazione mitocondriale di Sorcin che per la stabilità di TRAP1. Infine è stata dimostrata la loro partecipazione a fenomeni di chemoresistenza in casi di carcinomi coloretali.

## **Pubblicazioni più significative nel periodo 2009-2010**

1. Pagnozzi D, Birolo L, Leo G, Contessi S, Lippe G, Pucci P, Mavelli I.  
Stoichiometry and Topology of the Complex of the Endogenous ATP Synthase Inhibitor Protein IF-1 with Calmodulin.  
Biochemistry. 2010 49:7542-52.
2. Zanca C, Cozzolino F, Quintavalle C, Di Costanzo S, Ricci-Vitiani L, Santoriello M, Monti M, Pucci P, Condorelli G.  
PED interacts with Rac1 and regulates cell migration/invasion processes in human non-small cell lung cancer cells.  
J Cell Physiol. 2010, 225:63-72.
3. Landriscina M, Laudiero G, Maddalena F, Amoroso MR, Piscazzi A, Cozzolino F, Monti M, Garbi C, Fersini A, Pucci P, Esposito F.  
Mitochondrial chaperone Trap1 and the calcium binding protein Sorcin interact and protect cells against apoptosis induced by antitubercular agents.  
Cancer Res. 2010, 70:6577-86
4. Monti DM, Guglielmi F, Monti M, Cozzolino F, Torrassa S, Relini A, Pucci P, Arciello A, Piccoli R.  
Effects of a lipid environment on the fibrillogenic pathway of the N-terminal polypeptide of human apolipoprotein A-I, responsible for in vivo amyloid fibril formation.  
Eur Biophys J. 2010, 39:1289-99
- 5 Russo A, Siciliano G, Catillo M, Giangrande C, Amoresano A, Pucci P, Pietropaolo C, Russo G.  
hnRNP H1 and intronic G runs in the splicing control of the human rpL3 gene.

Biochim Biophys Acta. 2010, 1799:419-28.

6. Fontanella B, Birolo L, Infusini G, Cirulli C, Marzullo L, Pucci P, Turco MC, Tosco A.  
The co-chaperone BAG3 interacts with the cytosolic chaperonin CCT: new hints for actin folding.  
Int J Biochem Cell Biol. 2010, 42:641-50.

7. Leo G, Cartechini L, Pucci P, Sgamellotti A, Marino G, Birolo L.  
Proteomic strategies for the identification of proteinaceous binders in paintings.  
Anal Bioanal Chem. 2009, 395:2269-80.

8. Federico A, Pallante P, Bianco M, Ferraro A, Esposito F, Monti M, Cozzolino M, Keller S, Fedele M, Leone V, Troncone G, Chiariotti L, Pucci P, Fusco A.  
Chromobox protein homologue 7 protein, with decreased expression in human carcinomas, positively regulates E-cadherin expression by interacting with the histone deacetylase 2 protein.  
Cancer Res. 2009, 69:7079-87.

9. Amoresano A, Carpentieri A, Giangrande C, Palmese A, Chiappetta G, Marino G, Pucci P.  
Technical advances in proteomics mass spectrometry: identification of post-translational modifications.  
Clin Chem Lab Med. 2009, 47:647-65.

10. Monti M, Cozzolino M, Cozzolino F, Vitiello G, Tedesco R, Flagiello A, Pucci P.  
Puzzle of protein complexes in vivo: a present and future challenge for functional proteomics.  
Expert Rev Proteomics. 2009, 6:159-69.

11. Magherini F, Carpentieri A, Amoresano A, Gamberi T, De Filippo C, Rizzetto L, Biagini M, Pucci P, Modesti A.  
Different carbon sources affect lifespan and protein redox state during *Saccharomyces cerevisiae* chronological ageing.  
Cell Mol Life Sci. 2009, 66:933-47.

12. Pisa V, Cozzolino M, Gargiulo S, Ottone C, Piccioni F, Monti M, Gigliotti S, Talamo F, Graziani F, Pucci P, Verrotti AC.  
The molecular chaperone Hsp90 is a component of the cap-binding complex and interacts with the translational repressor Cup during *Drosophila* oogenesis.  
Gene. 2009, 432:67-74.

### **Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni**

#### *1. Analisi degli interattori del frammento fibrillogenico Apo A-I [1-93]*

Il frammento ApoA-I [1-93] è stato prodotto in forma ricombinante fuso alla proteina GST. Questa chimera è stata utilizzata in un esperimento di pull down per isolare eventuali partners molecolari presenti in un estratto di proteine di membrana di cardiomiociti, in quanto il tessuto cardiaco è uno dei più frequenti target per l'aggregazione di Apo AI [1-93] mutanti. I partners molecolari specificatamente ritenuti durante l'interazione sono stati identificati mediante classico approccio proteomico. I prossimi passi prevedono un approfondimento mediante studi di letteratura per tentare una clusterizzazione ed una razionalizzazione dei risultati ottenuti e la realizzazione di esperimenti biochimici e funzionali di conferma di alcune delle interazioni trovate.

#### *2. Analisi molecolare dei processi correlati al traffico intracellulare*

In collaborazione con la dr.ssa D. Corda (CNR, Napoli) si stanno analizzando i processi molecolari in cui è coinvolta la proteina BARs. Tale proteina riveste un ruolo essenziale in tutti i processi che richiedono la frammentazione del Golgi, dalla secrezione di proteine alla divisione mitotica. Attualmente sono in corso diversi esperimenti di proteomica funzionale basati sull'immuprecipitazione di BARs e dei suoi specifici interattori, per approfondire il ruolo di tale proteina sia nelle varie fasi del ciclo cellulare che nei processi di traffico intracellulare.

#### *3. Ricerca di nuovi elementi di regolazione di geni coinvolti nell'insorgenza della Fibrosi Cistica*

In collaborazione con il Prof. G. Castaldo (CEINGE, Napoli) si stanno studiando i fattori proteici che si legano specificamente a sequenze geniche che regolano l'espressione del gene CFTR, quale il promotore e alcune Sequenze Altamente Conservate (CSTs) presenti nel primo introne. Inoltre in collaborazione con il Dr. Cabrini (Verona) si stanno analizzando al livello molecolare quali sono i fattori trascrizionali che inducono l'attivazione del gene IL-8 a livello del tessuto epiteliale bronchiale in risposta ad infezione da *Pseudomonas A.*, il principale agente infettivo responsabile di infezioni gravi in pazienti (CF).



**Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca**

1. Spettrometro di Massa LC-MS/MS Q-TOF Premier con nano-UPLC (Waters).
2. Spettrometro di Massa LC-MS/MS CHIP-MS basato su cromatografia su CHIP con HPLC capillare e analizzatore Ion Trap (Agilent).
3. Spettrometro di Massa LC-MS/MS CHIP-MS basato su cromatografia su CHIP con HPLC capillare e analizzatore Q-ToF (Agilent)
4. Spettrometro di Massa LC-MS/MS 4000 Q-TRAP (AB Sciex) con HPLC capillare e analizzatore a trappola lineare
5. Spettrometro di Massa MALDI TOFTOF 4800 (AB Sciex)
6. Spettrometro di Massa MALDI STR (AB Sciex).

**Parole Chiave**

1. Proteomica Funzionale
2. Fibrillogenesi
3. Modifiche post traduzionali
4. Proteolisi limitata
5. Spettrometria di Massa Biomolecolare.

UNITA' DI RICERCA INBB  
Genova

**Responsabile Scientifico**

Dott.ssa Annalisa Relini

**Linea di Ricerca**

Biomolecole

*Titolo:* Studio del processo di aggregazione amiloide mediante microscopia a forza atomica

**Composizione del Gruppo**

**Aderenti INBB**

Cavalleri Ornella

RU

cavalleri@fisica.unige.it

Relini Annalisa

RU

relini@fisica.unige.it

**Non Aderenti INBB**

Gliozzi Alessandra

PO

gliozzi@fisica.unige.it

Rolandi Ranieri

PO

rolandi@fisica.unige.it

Robello Mauro

PO

robello@fisica.unige.it

Pesce Alessandra

RU

pesce@ge.infm.it

Penco Amanda

BC

pencoamanda@gmail.com

Gatta Elena

BC

gatta@fisica.unige.it

**Sede Unità di Ricerca**

*Indirizzo* Dipartimento di Fisica, Via Dodecaneso 33, 16146 Genova

*Telefono* 010 3536267

*Fax* 010 314218

*E-mail* relini@fisica.unige.it

**Sezione INBB di appartenenza:**

Genova

**Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni**

*Obiettivi*

L'obiettivo dell'attività di ricerca è la comprensione dei meccanismi molecolari del processo di aggregazione amiloide e lo studio dei fattori che lo influenzano.

*Risultati ottenuti*

Utilizzando il microscopio a forza atomica, sono stati caratterizzati gli aggregati prefibrillari e fibrillari formati in condizioni diverse dalle proteine acilfosfatasi, HypF-N, beta2-microglobulina, apolipoproteina A-I e dominio N-terminale di p53. Dall'analisi delle immagini AFM di protofibrille di HypF-N, attraverso la teoria dei polimeri si sono ottenute informazioni sulle proprietà meccaniche degli aggregati prefibrillari. Si inoltre è studiato l'effetto di cofattori, come glicosaminoglicani o membrane lipidiche, sul processo di aggregazione. In particolare, si è mostrato che l'eparina, un farmaco comunemente impiegato come anticoagulante nella terapia dei pazienti emodializzati, accelera il processo di aggregazione della beta2-microglobulina in condizioni vicine a quelle fisio-patologiche. Infine si è studiata l'interazione degli aggregati proteici con membrane naturali e artificiali e cellule; quest'ultimo studio ha messo in luce la capacità degli aggregati prefibrillari di interagire con i recettori glutamatergici di membrana.

I risultati sopra menzionati sono stati ottenuti nell'ambito di collaborazioni con i gruppi di Vittorio Bellotti (Pavia), Massimo Stefani (Firenze), Fabrizio Chiti (Firenze), Renata Piccoli (Napoli), Piero Pucci (Napoli), Rino Esposito (Udine).

**Pubblicazioni più significative nel periodo 2007-2010 (\* affiliazione INBB)**

1. A. Relini, S. De Stefano, S. Torrassa, O. Cavalleri, R. Rolandi, A. Gliozzi, S. Giorgetti, S. Raimondi, L. Marchese, L. Verga, A. Rossi, M. Stoppini, V. Bellotti (2008) Heparin strongly enhances the formation of  $\beta_2$ -microglobulin amyloid fibrils in the presence of type I collagen. *J. Biol. Chem.* 283, 4912-4920. (\*)
2. S. Rigacci, M. Bucciantini, A. Relini, A. Pesce, A. Gliozzi, A. Berti, M. Stefani (2008) The (1-63) region of the p53 transactivation domain aggregates in vitro into cytotoxic amyloid assemblies. *Biophys. J.* 94, 3635-3646. (\*)
3. G. Calloni, C. Lendel, S. Campioni, S. Giannini, A. Gliozzi, A. Relini, M. Vendruscolo, C. M. Dobson, X. Salvatella, F. Chiti. (2008) Structure and dynamics of a partially folded protein are decoupled from its mechanism of aggregation. *J. Am. Chem Soc.* 130, 13040-13050. (\*)

4. F. Pellistri, M. Bucciantini, A. Relini, D. Nosi, A. Gliozzi, M. Robello, M. Stefani (2008) Non-specific interaction of pre-fibrillar amyloid aggregates with glutamatergic receptors results in Ca<sup>2+</sup> increase in primary neuronal cells. *J. Biol. Chem.* 283, 29950-29960. (\*)
5. F. Guglielmi, D. M. Monti, A. Arciello, S. Torrassa, F. Cozzolino, P. Pucci, A. Relini, R. Piccoli (2009) Enzymatically active fibrils generated by the self-assembly of the ApoA-I fibrillogenic domain functionalized with a catalytic moiety. *Biomaterials* 30, 829-835. (\*)
6. A. Relini, O. Cavalleri, R. Rolandi, A. Gliozzi (2009) The two-fold aspect of the interplay of amyloidogenic proteins with lipid membranes. *Chem. Phys. Lipids*, 158, 1-9. (\*)
7. A. Sicorello, S. Torrassa, S. Gianni, C. Travaglini-Allocatelli, N. Taddei, A. Relini, F. Chiti (2009) Agitation and high ionic strength induce amyloidogenesis of a folded PDZ domain in native conditions. *Biophys. J.* 96, 2289-2298. (\*)
8. C. Cecchi, D. Nichino, M. Zampagni, C. Bernacchioni, E. Evangelisti, A. Pensalfini, G. Liguri, A. Gliozzi, M. Stefani, A. Relini (2009). A protective role for lipid raft cholesterol against amyloid-induced membrane damage in human neuroblastoma cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1788, 2204–2216. (\*)
9. N. Motamedi-Shad, E. Monsellier, S. Torrassa, A. Relini, F. Chiti (2009) Kinetic analysis of amyloid formation in the presence of heparan sulfate. Faster unfolding and change of pathway. *J. Biol. Chem.* 284, 29921-29934.
10. S. Campioni, B. Mannini, M. Zampagni, A. Pensalfini, C. Parrini, E. Evangelisti, A. Relini, M. Stefani, C. M. Dobson, C. Cecchi, F. Chiti (2010) A causative link between the structure of aberrant protein oligomers and their toxicity. *Nature Chem. Biol.* 6, 140-147. (\*)
11. A. Relini, S. Torrassa, R. Ferrando, R. Rolandi, S. Campioni, F. Chiti, A. Gliozzi (2010) Detection of populations of amyloid-like protofibrils with different physical properties. *Biophys. J.* 98, 1277-1284.
12. D. M. Monti, F. Guglielmi, M. Monti, F. Cozzolino, S. Torrassa, A. Relini, P. Pucci, A. Arciello, R. Piccoli (2010). Effects of a lipid environment on the fibrillogenic pathway of the N-terminal polypeptide of human Apolipoprotein A-I, responsible for in vivo amyloid fibril formation. *Eur. Biophys. J* 39, 1289-1299.

#### **Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni**

Si intende proseguire lo studio del processo di aggregazione amiloide, anche in presenza di cofattori come agenti di crowding macromolecolare o fattori della matrice extracellulare. Saranno anche studiati gli effetti di potenziali inibitori del processo di aggregazione. Infine lo studio dell'interazione tra aggregati e membrane sarà esteso a proteine con espansioni di poliglutamine come atassina 1 e atassina 3.

#### **Collaborazioni internazionali in atto**

Thomas Hauss, Helmholtz-Zentrum Berlin für Materialien und Energie.

#### **Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca**

Microscopio a forza atomica Multimode Picoforce con stazione di controllo Nanoscope IV (Veeco-Digital Instruments)

Microscopio a forza atomica Dimension 3000 con stazione di controllo Nanoscope IIIa (Veeco-Digital Instruments)

Apparecchiatura per misure di light scattering e potenziale zeta Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments)

Spettrofluorimetro Fluorolog (Horiba Jobin-Yvon)

Laboratorio dotato di strumentazione per la preparazione e caratterizzazione di membrane modello (riflettometro X, bilance di Langmuir NIMA e R&K, spettrofotometro, sonicatore, sistema di dialisi Dianorm, estrusore,...)

#### **Parole Chiave**

microscopia a forza atomica - aggregazione proteica - fibrille amiloidi - membrane biomimetiche

*UNITA' DI RICERCA INBB  
Padova*

**Responsabile Scientifico**

Prof Adelio Rigo

**Linea di Ricerca:**

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

**Composizione del Gruppo**

**Aderenti INBB**

<i>Rigo Adelio</i>	<i>PO</i>	<i>adelio.rigo@unipd.it</i>
<i>Di Paolo Maria Luisa</i>	<i>RU</i>	<i>marialuisa.dipaolo@unipd.it</i>
<i>Zennaro Lucio</i>	<i>RU</i>	<i>lucio.zennaro@unipd.it</i>
<i>Rossetto Monica</i>	<i>BT</i>	<i>monica.rossetto@unipd.it</i>
<i>Vanzani Paola.</i>	<i>BC (Assegno di ricerca)</i>	<i>paola.vanzani@unipd.it</i>

**Non Aderenti INBB**

<i>Bonaiuto Emanuela</i>	<i>BC</i>	<i>Emanuela.bonaiuto@unipd.it</i>
--------------------------	-----------	-----------------------------------

**Sede Unità di Ricerca**

*Università di Padova  
Dipartimento...di Chimica Biologia  
Indirizzo...Via G. Colombo 3.....  
Telefono .....049-8276107..  
Fax ...049-8073310.....  
E-mail *adelio.rigo@unipd.it*.....*

**Sezione INBB di appartenenza**

Padova

**Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni**

*Obiettivi*

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

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

*Risultati ottenuti*

I risultati ottenuti sono suddivisi in base ai settori in cui si è articolata l'attività di ricerca.

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

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

- Sistemi di trasduzione, amplificazione dell'informazione. Fra i vari sistemi sviluppati e messi a punto in questo periodo sono da menzionare biosensori basati sulla formazione di strati mono-molecolari di enzimi che permettono di determinare la presenza di tracce di inquinanti nelle acque reflue e nell'atmosfera e lo sviluppo di sonde nucleari ed elettroniche di varia natura per lo studio di biosistemi da impiegare nel campo ambientale (monitoraggio di inquinanti), nel campo della bioelettronica e della biomedicina (trapianto d'organo etc.).

### **Publicazioni più significative nel periodo 2007-2010 (\* affiliazione INBB)**

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

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

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

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

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

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

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

A method to evaluate capacity and efficiency of water soluble antioxidants as peroxy radical scavengers. *Archives Biochem. Biophys.* 462, 38-46. (\*)

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

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

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

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

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

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

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

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

Sacchetti L, Vanzani P, Rossetto M, De Marco V, Gomiero T, Rigo A, Paoletti MG (2009)

Antioxidant Properties of Wild Plants Used as Food in the Mediterranean Basin  
*J Nutrigenetics and nutrigenomics*, 2 (4-5): 219-219

Froner E, Baschera F, Tessarolo F, Bettotti P, Pavese L, Rossi B, Scarpa M, Mariotto G, Rigo A (2009)

Hybrid nanostructured supports for surface enhanced Raman scattering  
*Applied Surface Science*, 255 (17): 7652-7656

Rigo A, Magro M, Vianello F, Zennaro L, Scarpa M, Tognon G (2009)

Method for preparing aqueous solutions of single titanium oxide nanotubes and aqueous solutions obtained with such method  
PCT/IB2009/053866

Bonaiuto E, Lunelli M, Scarpa M, Vettor R, Milan G, Di Paolo ML (2010)

A structure-activity study to identify novel and efficient substrates of the human semicarbazide-sensitive amine oxidase/VAP1 enzyme  
*Biochimie*, 92 (7): 858-868

### **Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni**

1. Studiare l'effetto di molecole di sintesi e naturali sulla funzione e sull'espressione cellulare di ammino ossidasi umane, con l'obiettivo di individuare nuovi inibitori con potenziale applicazione farmacologica.  
Le ammino ossidasi sono infatti coinvolte in diversi processi patologici (dalla neuro degenerazione ai processi infiammatori)
2. Studiare la bioattività di alcune classi di antiossidanti, con particolare riguardo al loro coinvolgimento nei

- meccanismi redox.
- 3 Progettare nuovi dispositivi per la trasduzione, amplificazione dell'informazione e per la creazione di nuovi sistemi per la conversione dell'energia.

**Collaborazioni internazionali in atto**

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

Prof. D. Rauhut Geisenheim Research Center (Germany)

**Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca**

NMR300 MHz (Bruker)

NMR a campo variabile

Microscopio STM AFM (Park)

EPR ED 200 Bruker

FTIR

HPLC con Coularray detection

**Parole Chiave**

Antiossidanti

Biosensori

Nanodispositivi

Proteine contenenti rame

Radicali liberi

*UNITA' DI RICERCA INBB*  
*Bologna*

**Responsabile Scientifico**

Prof. Aldo Roda

**Linea di Ricerca**

Biotecnologie

**Composizione del Gruppo**

**Aderenti INBB**

<i>Aldo Roda</i>	<i>PO</i>	<i>aldo.roda@unibo.it</i>
<i>Guardigli Massimo</i>	<i>PA</i>	<i>massimo.guardigli@unibo.it</i>
<i>Mirasoli Mara</i>	<i>RU</i>	<i>mara.mirasoli@unibo.it</i>
<i>Michelini Elisa</i>	<i>RU</i>	<i>elisa.michelini8@unibo.it</i>

**Non Aderenti INBB**

<i>Simoni Patrizia</i>	<i>RU</i>	<i>patrizia.simoni@unibo.it</i>
<i>Dolci Luisa Stella</i>	<i>BC</i>	<i>luisastella.dolci2@unibo.it</i>
<i>Buragina Angela</i>	<i>BC</i>	<i>angela.buragina@studio.unibo.it</i>
<i>Mezzanotte Laura</i>	<i>DR</i>	<i>laura.mezzanotte@unibo.it</i>
<i>Cevenini Luca</i>	<i>BC</i>	<i>luca.cevenini5@unibo.it</i>
<i>Colliva Carolina</i>	<i>DR</i>	<i>carolina.colliva2@unibo.it</i>
<i>Vecchiotti Stefania</i>	<i>BC</i>	<i>Stefania.vecchiotti@studio.unibo.it</i>

**Sede Unità di Ricerca**

*Indirizzo* Via Belmeloro 6, 40126 Bologna

*Telefono* 051 6364166

*Fax* 051 6364166

*E-mail* aldo.roda@unibo.it

**Sezione INBB di appartenenza**

Bologna

**Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni**

*Obiettivi*

- Analisi d'immagine luminescente ultrasensibile (bio- chemiluminescenza e fluorescenza risolta nel tempo) per la localizzazione quantitativa di analiti in tessuti e singole cellule usando tecniche di immunocitochimica e ibridizzazione "in situ": applicazioni in biochimica, immunologia e "screening" di farmaci
- Clonaggio e applicazioni analitiche di nuovi geni reporter bioluminescenti per lo sviluppo di biosensori cellulari, imaging molecolare in vivo e altre tecniche bioanalitiche multiple basate sul riconoscimento biomolecolare
- Sviluppo di nuove strumentazioni miniaturizzate per analisi fuori dal laboratorio tipo POCT o lab-on-a-chip utilizzando principi di luminescenza e tecniche di microfabbricazione e microfluidica
- Studio dell'espressione proteica in diversi organismi e cellule (proteomica) mediante gel elettroforesi bidimensionale, FFF ed identificazione delle proteine mediante spettrometria di massa (MALDI-TOF e Q-TOF)

*Risultati ottenuti*

- Nuovi geni reporter bioluminescenti con emissione a diverse lunghezze d'onda sono stati utilizzati per lo sviluppo di nuovi biosensori cellulari per lo studio dell'attività di enzimi della famiglia CytP450 e per la determinazione di interferenti endocrini (2,3, 10). Sono stati inoltre sviluppati modelli animali di imaging bioluminescente per lo studio dello svuotamento gastrico (1) e processi tumorali (4).
- Sono state messe a punto tecniche di imaging microscopico in chemiluminescenza per la colocalizzazione di marcatori di neoplasie e per l'identificazione di leganti proteici in sezioni di opere pittoriche (5,11) ed è stata dimostrata l'applicabilità dell'elettrochemiluminescenza come tecnica di rivelazione in imaging microscopico (8)
- E' stato utilizzato un sensore CCD portatile raffreddato per effettuare misure di bio-chemiluminescenza su sistemi immobilizzati (es. cellule, anticorpi, sonde geniche) nell'ottica di ottenere dispositivi analitici portatili e miniaturizzati.

### **Pubblicazioni più significative nel periodo 2007-2010**

1. Roda A, Mezzanotte L, Aldini R, Michelini E, Cevenini L. A new gastric-emptying mouse model based on in vivo non-invasive bioluminescence imaging. *Neurogastroenterol Motil.* 2010 Jun 11. in stampa (AFFILIAZIONE INBB)
2. Michelini E, Cevenini L, Mezzanotte L, Coppa A, Roda A. Cell-based assays: fuelling drug discovery. *Anal Bioanal Chem.* 2010 Sep;398(1):227-38. (AFFILIAZIONE INBB)
3. Michelini E, Cevenini L, Mezzanotte L, Ablamsky D, Southworth T, Branchini B, Roda A. Spectral-resolved gene technology for multiplexed bioluminescence and high-content screening. *Anal Chem.* 2008 Jan 1;80(1):260-7.
4. Mezzanotte L, Fazzina R, Michelini E, Tonelli R, Pession A, Branchini B, Roda A. In vivo bioluminescence imaging of murine xenograft cancer models with a red-shifted thermostable luciferase. *Mol Imaging Biol.* 2010 Aug;12(4):406-14. (AFFILIAZIONE INBB)
5. Mirasoli M, Guardigli M, Simoni P, Venturoli S, Ambretti S, Musiani M, Roda A. Multiplex chemiluminescence microscope imaging of P16(INK4A) and HPV DNA as biomarker of cervical neoplasia. *Anal Bioanal Chem.* 2009 Jun;394(4):981-7. (AFFILIAZIONE INBB)
6. Roda B, Casolari S, Reschiglian P, Mirasoli M, Simoni P, Roda A. Hybrid gravitational field-flow fractionation using immunofunctionalized walls for integrated bioanalytical devices. *Anal Bioanal Chem.* 2009 Jun;394(4):953-61. (AFFILIAZIONE INBB)
7. Roda B, Zattoni A, Reschiglian P, Moon MH, Mirasoli M, Michelini E, Roda A. Field-flow fractionation in bioanalysis: A review of recent trends. *Anal Chim Acta.* 2009 Mar 9;635(2):132-43. (AFFILIAZIONE INBB)
8. Dolci LS, Zanarini S, Della Ciana L, Paolucci F, Roda A. Development of a new device for ultrasensitive electrochemiluminescence microscopy imaging. *Anal Chem.* 2009 Aug 1;81(15):6234-41. (AFFILIAZIONE INBB)
9. Roda G, Caponi A, Benevento M, Nanni P, Mezzanotte L, Belluzzi A, Mayer L, Roda A. New proteomic approaches for biomarker discovery in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2010 Jul;16(7):1239-46
10. Michelini E, Cevenini L, Mezzanotte L, Leskinen P, Virta M, Karp M, Roda A. A sensitive recombinant cell-based bioluminescent assay for detection of androgen-like compounds. *Nat Protoc.* 2008;3(12):1895-902.
11. Dolci LS, Sciutto G, Guardigli M, Rizzoli M, Prati S, Mazzeo R, Roda A. Ultrasensitive chemiluminescent immunochemical identification and localization of protein components in painting cross-sections by microscope low-light imaging. *Anal Bioanal Chem.* 2008 Sep;392(1-2):29-35.
12. Magliulo M, Simoni P, Guardigli M, Michelini E, Luciani M, Lelli R, Roda A. A rapid multiplexed chemiluminescent immunoassay for the detection of Escherichia coli O157:H7, Yersinia enterocolitica, Salmonella typhimurium, and Listeria monocytogenes pathogen bacteria. *J Agric Food Chem.* 2007 Jun 27;55(13):4933-9.

### **Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni**

Saranno sviluppati sistemi analitici portatili miniaturizzati di tipo Point-of-Care (POC) per applicazioni nel settore diagnostico, ambientale e alimentare basati su misure di bio-chemiluminescenza e principi di riconoscimento biomolecolare. Tali sistemi implementeranno anche dispositivi in grado di effettuare il trattamento pre-analitico del campione basati su tecniche innovative quali il frazionamento in campo flusso (FFF). Saranno inoltre ottenuti nuovi geni reporter bioluminescenti con caratteristiche spettrali ottimizzate per applicazioni multianalta e verranno sviluppati nuovi modelli animali bioluminescenti per monitorare simultaneamente più eventi fisio-patologici nello stesso animale.

### **Collaborazioni internazionali in atto**

- Prof. Bruce Branchini, Department of Chemistry, Connecticut College, New London, CT, USA (Cloning and bioanalytical applications of new luciferases)
- Prof. Sylvia Daunert, Department of Chemistry, University of Kentucky, Lexington, KY, USA (obtainment of aequorin mutants, characterized by improved spectral and emission kinetics characteristics)
- Prof. Jenny Schultze Clinical Pharmacology, Karolinska Institutet, 14186 Stockholm, Sweden (applicazione di biosensori cellulari bioluminescenti per anti-doping e diagnostica)

### **Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca**

- Lettore di micropiastre multimodale (spettrofotometrico, spettrofluorimetrico e bio-chemiluminescente) Thermo Scientific Varioskan Flash - Luminografo LB 981 EG&G Berthold -Microscopio ad epifluorescenza collegato a camera CCD ultrasensibile raffreddata con azoto liquido -Spettrometro di massa triplo quadrupolo equipaggiato con interfaccia elettrospray e APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation) - Spettrometro di massa ibrido quadrupolo/tempo di volo (Q-TOF) equipaggiato con interfaccia elettrospray e nanospray - MJ Mini Thermal Cycler

### **Parole Chiave**

Bio-chemiluminescenza; Imaging bioluminescente in vivo; Metodi immunometrici e genici; Biosensori cellulari; Spettrometria di massa



UNITA' DI RICERCA INBB  
Roma

**Responsabile Scientifico**

Prof. Giuseppe Rotilio

**Linea di Ricerca**

Biomolecole

*titolo*

Biomolecole dello stress ossidativo

**Composizione del Gruppo**

**Aderenti INBB**

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

**Non Aderenti INBB**

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

**Sede Unità di Ricerca**

*Dipartimento di Biologia, Università di Roma Tor Vergata*

*Indirizzo Via della Ricerca Scientifica 00133 Roma*

*Telefono 06 72594373*

*Fax 0672594311*

*E-mail rotilio@uniroma2.it*

**Sezione INBB di appartenenza**

Roma

**Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni**

*Obiettivi*

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

*Risultati ottenuti*

Nel triennio in oggetto, l'UR ha studiato i meccanismi implicati nel danno al mitocondrio che si osserva nella sclerosi laterale amiotrofica familiare (SLAf), in cui i mutanti della SOD1 si accumulano selettivamente in questo distretto e potrebbero competere con la citocromo c ossidasi (Cytoc) per il pool di rame, inattivandola. Per verificare questa ipotesi, abbiamo utilizzato cellule motoneuroni murine NSC-34 trasfettate stabilmente per l'espressione inducibile di diversi mutanti di SOD1 umana. Abbiamo dimostrato che l'inattivazione della Cytoc non dipende dalla diminuita disponibilità del rame nel mitocondrio, ma dalla produzione ossido nitrico (NO). Infatti, la presenza nel sistema sperimentale di scavenger dell'NO o l'inibizione delle sintasi dell'NO prevengono l'inattivazione della Cytoc.

L'UR ha inoltre approfondito gli effetti biologici molecole di sintesi contenenti rame [Cu(isaepy)<sub>2</sub>], caratterizzando i meccanismi molecolari alla base della loro tossicità e possibile impiego in chemioterapia. E' inoltre stato studiato il meccanismo citotossico del disolfuro di allile (DADS) e caratterizzato il ruolo pro-autofagico del polifenolo kaempferolo (KF), dimostrando che il DADS determina un'inibizione della crescita, mentre il KF produce un'alterazione metabolica che sfocia nel processo di autofagia, il che rende il KF proponibile sia per la cura del cancro, sia per la terapia dei disordini neurodegenerativi. Inoltre, si sono studiate le vie di trasduzione del segnale apoptotico alla base dei processi neurotossici del cofattore della NO sintasi, la tetraidrobiopterina (BH4), dimostrando che la BH4 determina produzione di ROS, danno ossidativo a carico del DNA e ossidazione delle proteine, specialmente quelle del plasmalemma. Questo sbilancio redox si traduce quindi in un'alterazione dell'uptake di glucosio e nell'induzione dell'apoptosi via AMPK/p38<sup>MAPK</sup>/p53. Le alterazioni redox di p53 si sono anche dimostrate responsabili della tossicità

del donatore di NO, nitroprussiato di sodio (SNP), mentre quelle di Nrf2, altro fattore redox-sensibile, sono implicate nella sopravvivenza di cellule di carcinoma gastrico.

Sono inoltre proseguiti gli studi sul ruolo e la struttura delle Cu,ZnSOD batteriche. Sono state caratterizzate alcune proprietà di due varianti peculiari, quali l'enzima da *M. tuberculosis*, unico esempio noto di superossido dismutasi a rame priva di zinco nel sito attivo e quello da *H. ducreyi*, capace di legare eme all'interfaccia del dimerico. Parallelemente il ruolo della Cu,ZnSOD nell'interazione ospite-patogeno è stato indagato sia in *Salmonella enterica* che in *E. coli* O157H7. Infine, è stata dimostrata l'importanza centrale del trasportatore di zinco ZnuABC nelle infezioni batteriche ed è stato identificato un nuovo componente di questo sistema di importo, ZinT, capace di formare un complesso stabile con la componente periplasmatica ZnuA.

#### **Pubblicazioni più significative nel periodo 2007-2010 (\* affiliazione INBB)**

1. Rossi L., Mazzitelli S., Arciello M., Capo C.R., Rotilio G.(2008) Benefits from diet polyphenols for brain aging and Alzheimer's disease. *Neurochem. Res.* 33, 2390-2400.
2. Cardaci S., Filomeni G., Rotilio G., and Ciriolo M.R. (2008) Reactive oxygen species mediates p53 activation and apoptosis induced by sodium nitroprusside in SH-SY5Y cells. *Mol. Pharmacol.* 74, 1234-1245.
3. Ammendola, S., Pasquali, P., Pacello, F., Rotilio, G., Castor, M., Libby, SJ, Figueroa-Bossi, N., Bossi, L., Fang F.C., and Battistoni, A. (2008) Regulatory and Structural Differences in the Cu,Zn-Superoxide Dismutases of *Salmonella enterica* and their Significance for Virulence. *J. Biol Chem* 283, 13688-13699 (\*)
4. D'Orazio M, Scotti R, Nicolini L, Cervoni L, Rotilio G, Battistoni A and Gabbianelli R. (2008) Regulatory and structural properties differentiating the chromosomal and the bacteriophage-associated *Escherichia coli* O157:H7 Cu,Zn superoxide dismutases. *BMC Microbiology*. *BMC Microbiol.* 8:166. (\*)
5. Piccirillo S., Filomeni G., Brune B., Rotilio G., and Ciriolo M.R. (2009) Redox mechanisms involved in the selective activation of Nrf2-mediated resistance versus p53-dependent apoptosis in adenocarcinoma gastric cells. *J. Biol. Chem.* 284, 27721-27733.
6. Törő I, Petruz C, Pacello F, D'Orazio M, Battistoni A, and Djinović-Carugo K. (2009) Structural Basis of Heme Binding in the Cu,Zn Superoxide Dismutase from *Haemophilus ducreyi*. *J Mol.Biol.* 386, 406-418 (\*)
7. D'Orazio M, Cervoni L, Giartosio A, Rotilio G, and Battistoni A. (2009) Thermal stability and redox properties of *M. tuberculosis* Cu-superoxide dismutase. Insights into the role of the zinc ion in Cu,Zn superoxide dismutases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 486, 119-124 (\*)
8. Filomeni G., Desideri, E., Cardaci, S., Graziani, I., Piccirillo S., Rotilio G., and Ciriolo M.R. (2010) Carcinoma cells activate AMP-activated protein kinase-dependent autophagy as survival response to kaempferol-mediated energetic impairment. *Autophagy* 6, 202-216.
9. Arciello M., Capo C. R., Cozzolino M., Ferri A., Nencini M., Carri M. T., Rossi L. (2010) Inactivation of cytochrome c oxidase by mutant SOD1s in mouse motoneuronal NSC-34 cells is independent from copper availability but is because of nitric oxide. *J. Neurochem.* 112, 183-192.
10. Aquilano K., Vigilanza P., Filomeni G., Rotilio G., and Ciriolo M.R. (2010) Tau dephosphorylation and microfilaments disruption are upstream events of the anti-proliferative effects of DADS in SH-SY5Y cells. *J. Cell. Mol. Med.* 14, 564-577.
11. Cardaci, S., Filomeni, G., Rotilio, G., and Ciriolo, M.R. (2010) p38<sup>MAPK</sup>/p53 signaling axis mediates neuronal apoptosis in response to tetrahydrobiopterin-induced oxidative stress and glucose uptake inhibition: implication for neurodegeneration. *Biochem J.* 430, 439-451.
12. Petrarca P, Ammendola S, Pasquali P, Battistoni A. (2010) The Zur-regulated ZinT protein is an auxiliary component of the high affinity ZnuABC zinc transporter that facilitates metal recruitment during severe zinc shortage. *J. Bacteriol* 192: 1553-1564 (\*)

#### **Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni**

I nostri principali obiettivi sono: a) caratterizzare il ruolo delle alterazioni redox nei processi autofagici; b) contribuire a delineare i meccanismi attraverso i quali il kaempferolo o la disregolazione redox indotta da alterazioni dell'omeostasi del rame sono implicati nella modulazione dei processi neurodegenerativi o tumorali, mediante studi in modelli animali o cellulari c) approfondire il ruolo della competizione per i metalli di transizione nell'interazione ospite-patogeno e valutare nuove strategie antimicrobiche capaci di interferire con l'omeostasi dei metalli nei batteri patogeni.

#### **Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca**

Spettrometro NMR Bruker Avance 700 MHz

Spettrometro per assorbimento atomico Perkin Elmer

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

Strumentazione completa per Colture cellulari

#### **Parole Chiave**

Superossido dismutasi, nutraceutici, p53, AMPK, stress ossidativo, rame, neurodegenerazione, tumori, ossido nitrico, infezioni batteriche, trasportatori di zinco

*UNITA' DI RICERCA INBB*  
*Ancona*

**Responsabile Scientifico**

Prof. Franco Rustichelli

**Linea di Ricerca**

L'attività di ricerca riguarda la caratterizzazione delle proprietà microstrutturali di biomateriali caricati con cellule staminali, mediante tecniche non distruttive, quali la microtomografia computerizzata, l'olotomografia, la diffrazione di raggi X, la microscopia elettronica a scansione e la microscopia a forza atomica, per la rigenerazione dei tessuti (tessuto osseo, muscolare, cardiaco, etc.).

**Composizione del Gruppo**

**Aderenti INBB**

<i>Franco Rustichelli</i>	<i>PO</i>	<i>f.rustichelli@univpm.it</i>
<i>Paolo Mariani</i>	<i>PA</i>	<i>p.mariani@univpm.it</i>
<i>Fabrizio Fiori</i>	<i>RU</i>	<i>f.fiori@univpm.it</i>
<i>Chiara Renghini</i>	<i>BC</i>	<i>renghini@alisf1.univpm.it</i>

**Non Aderenti INBB**

<i>Giuliani Alessandra</i>	<i>RU</i>	<i>a.giuliani@univpm.it</i>
<i>Adrian Manescu</i>	<i>BC</i>	<i>a.manescu@alisf1.univpm.it</i>
<i>Katia Marozzi</i>	<i>DR</i>	<i>k.marozzi@alisf1.univpm.it</i>
<i>Serena Mazzoni</i>	<i>DR</i>	<i>mazzoni@alisf1.univpm.it</i>

**Sede Unità di Ricerca**

*Sezione Scienze Fisiche- Dipartimento SAIFET - Università Politecnica delle Marche –*

*Via Breccie Bianche 1*

*60131 Ancona*

*Italy*

*Tel.: +39-071-22046-01/02*

*FAX.: +39-071-2204605*

*e-mail: f.rustichelli@univpm.it*

**Sezione INBB di appartenenza**

Roma

**Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni**

*Obiettivi*

L'Unità di ricerca, coordinata dal Prof. Franco Rustichelli, è attiva in differenti campi:

- Analisi, mediante le tecniche di microtomografia, olotomografia e microdiffrazione, delle proprietà microstrutturali di tessuti rigenerati;
- caratterizzazione microstrutturale di materiali di interesse tecnologico mediante tecniche di scattering dei raggi X e dei neutroni;
- studio, mediante diffrazione neutronica e di raggi X, delle tensioni residue indotte da varie classi di processi termomeccanici (ad es. saldatura);
- studio, mediante l'applicazione di metodiche sperimentali (raggi X ad alta energia, luce di Sincrotrone, radiazione neutronica), per l'identificazione e la caratterizzazione di tecniche di produzioni antiche;
- analisi, mediante tecniche di scattering dei raggi X e dei neutroni, delle proprietà microstrutturali di cristalli liquidi eliotropici e termotropici, con particolare riguardo alle proprietà strutturali e alle transizioni di fase in sistemi lipidici.

*Risultati ottenuti*

I risultati delle ricerche sono documentati dagli oltre 270 articoli pubblicati su riviste internazionali.

La presente Unità ha partecipato a più di 35 progetti europei, in alcuni dei quali come coordinatore, offrendo le sue conoscenze nell'utilizzo dello small angle scattering, della microtomografia e di altre tecniche fisiche presenti presso le grandi sorgenti europee per lo studio delle proprietà microstrutturali dei materiali per diverse applicazioni (industriali, biomediche, etc).

### **Publicazioni più significative nel periodo 2007-2010 (\* affiliazione INBB)**

1. R.Cancedda, A.Cedola, A.Giuliani, V.Komlev, S.Lagomarsino, M. Mastrogiacomo, F.Peyrin, F.Rustichelli. Bulk and interface investigations of scaffolds and tissue-engineered bones by X-ray microtomography and X-ray microdiffraction. *Biomaterials*, 28, 2505-2524, 2007.
2. A. Cedola, M. Mastrogiacomo, S. Lagomarsino, R. Cancedda, C. Giannini, A. Guagliardi, m. Ladisa, m. Burghammer, f. Rustichelli, v. Komlev. Orientation of mineral crystals by collagen fibers during in vivo bone engineering: an X-ray diffraction study. *Spettrochimica Acta*, B 62, 642-647, 2007.
3. A.Papadimitropoulos, M.Mastrogiacomo, F.Peyrin, E.Molinari, V.S.Komlev, F.Rustichelli, R.Cancedda. Kinetics of *in vivo* bone deposition by bone marrow stromal cell within a resorbable porous calcium phosphate scaffolds: a X-ray computed microtomography study. *Biotechnology & Bioengineering*, vol. 98, 1, 271-281, 2007.
4. L. Neumann, F. Spinozzi, R. Sinibaldi, F. Rustichelli, M. Potter, A. Steinbuechel. Binding of the major phasin PhaP1 from *Ralstonia eutropha* H16 to poly(3-hydroxybutyrate) granules. *J. Bacteriol.*, Vol. 180 n. 8 (2008), pp. 2911-2919.
5. F. Fiori, V. Calbucci, V. Casalegno, M. Ferraris, M. Salvo, A. Giuliani, A. Manescu, F. Rustichelli. Neutron diffraction measurement of residual stresses in CFC/Cu/CuCrZr joints for nuclear fusion technology. *J. Phys., Condens. Matter* 20 (2008) 104260 (6pp).
6. A. Giuliani, F. Fiori, J. Gysens, A. Manescu, F. Rustichelli. Analysis of neutron diffraction profiles in bronze archaeological statuettes produced by solid lost wax casting. *J. Phys., Condens. Matter* 20 (2008) 104251.
7. S. Scheiner, R. Sinibaldi, B. Pichler, V. Komlev, C. Renghini, C. Vitale-brovarone, F. Rustichelli, C. Hellmich. Micromechanics of bone tissue-engineering scaffolds, based on resolution error-cleared computed tomography. *Biomaterials*, 30, (2009), 2411-2419. (\*)
8. G. Albertini, A. Giuliani, V. Komlev, F. Moroncini, A. Pugnali, G. Pennesi, M. Belicchi, C. Rubini, F. Rustichelli, R. Tasso, Y. Torrente. Organization of extracellular matrix fibers within PGA/PLLA scaffolds analyzed by X-ray synchrotron radiation phase contrast microtomography. *Tissue Engineering, Part C, Volume 15(3):403-11*, 2009.
9. D. Blottner, N. Serradj, M. Salanova, C. Touma, R. Palme, M. Silva, Jm. Aerts, D. Berckmans, L. Vico, Y. Liu, A. Giuliani, F. Rustichelli, R. Cancedda, M. Jamon. Morphological, physiological and behavioural evaluation of a 'Mice in Space' housing system. *Journal of Comparative Physiology B, Biochemical, Systems, and Environmental Physiology*. Published online: 08 January 2009.
10. V. S. Komlev, M.Mastrogiacomo, F. Peyrin, R. Cancedda, F. Rustichelli. X-Ray Synchrotron Radiation Pseudo-Holotomography as a New Imaging Technique to Investigate Angio- and Microvasculogenesis with No Usage of Contrast Agents. *TISSUE ENGINEERING, Part C, Volume 15, Number 00*, 2009. (\*)
11. M. Belicchi, R. Cancedda, A. Cedola, F. Fiori, M. Gavina, A. Giuliani, V.S. Komlev, S. Lagomarsino, M. Mastrogiacomo, renghini C., F. Rustichelli, E. Syková, Y. Torrente. Some applications of nanotechnologies in stem cells research. *Materials Science And Engineering B*, 165 (2009) 139-147. (\*)
12. V. S. Komlev, M.Mastrogiacomo, R.C. Pereira, F. Peyrin, F. Rustichelli, R. Cancedda. Biodegradation of porous calcium phosphate scaffolds in an ectopic bone formation model studied by X-ray computed microtomography. *European Cells and Materials* 19 (2010), 136-146. (\*)

### **Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni**

Sviluppo di tecniche fisiche non distruttive basate sull'utilizzo della luce di sincrotrone, con particolare attenzione alla tecnica di microtomografia computerizzata, applicabili a nuovi biomateriali per la rigenerazione tissutale.

### **Collaborazioni internazionali in atto**

1. RESERACH FOR SMEs "Innovative simulation tool for bone and bone biomaterials, based on enhanced CT-data exploitation" - BIO-CT-EXPLOIT – Coordinator: Technische Universitaet Wien (Austria).
2. COLLABORATIVE PROJECT "Micro and Nanocrystalline Functionally Graded Materials for Transport Applications" - MATRANS – Coordinator: European Virtual Institute on Knowledge-based Multifunctional Materials AISBL (Belgium).
3. Institute of Physical Chemistry of the Russian Academy of Science (RU) – Prof. Barinov.

### **Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca**

La Sezione di Scienze Fisiche dispone presso il suo laboratorio delle seguenti attrezzature:

1. diffrattometro a raggi X (generatore Rigaku Denki RU300 ad anodo rotante, fornito di un diffrattometro e di un contatore a scintillazione);
2. microscopio a forza atomica (versatile microscopio modulare sviluppato dal Centro Nazionale Ricerche CNR di Frascati, in collaborazione con il Dipartimento di Fisica dell'Università "La Sapienza" - Roma);
3. microscopio elettronico a scansione (Supra<sup>tm</sup>40-Zeiss);
4. microscopio elettronico a scansione (Philips XL20 dotato di microanalisi);
5. microscopio elettronico in trasmissione (Philips CM200 dotato di microanalisi).

### **Parole Chiave**

Ingegneria tissutale

Tecniche fisiche non distruttive

Microtomografia

Scaffold

Cellule staminali

*UNITA' DI RICERCA INBB  
Bologna*

**Responsabile Scientifico**

Prof. Bruno Samori

**Linea di Ricerca**

- 1) Nanoscienza di proteine : sviluppo e applicazioni di metodologie a singola molecola per lo studio del folding proteico e dei processi aggregativi associati a malattie neurodegenerative
- 2) Sviluppo di Biosensori elettronici/elettrochimici a DNA e Proteine per la diagnosi precoce di patologie tumorali e di bio-inquinamento ambientale
- 3) Nanotecnologie basate sul DNA

**Composizione del Gruppo**

**Aderenti INBB**

<i>Bruno Samori</i>	<i>PO</i>	<i>bruno.samori@unibo.it</i>
---------------------	-----------	------------------------------

**Non Aderenti INBB**

<i>Zuccheri Giampaolo</i>	<i>RU</i>	<i>giampaolo.zuccheri@unibo.it</i>
<i>Brucale Marco</i>	<i>BC</i>	<i>marco.brucale@unibo.it</i>

**Sede Unità di Ricerca**

*Laboratorio di Nanoscienza e NanoBiotechnologie del Dipartimento di Biochimica "G. Moruzzi"  
Via Irnerio 48, 40126 Bologna  
Telefono 051 2084387/88  
E-mail [bruno.samori@unibo.it](mailto:bruno.samori@unibo.it)*

**Sezione INBB di appartenenza**

Bologna

**Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni**

Sviluppi ed applicazioni di metodologie nano tecnologiche sulle tre linee di ricerca evidenziate  
I risultati ottenuti sono stati riportati nelle pubblicazioni seguenti

**Pubblicazioni più significative nel periodo 2007-2010**

- 1) Sandal M., Valle F., Tessari I., Mammi S., Bergantino E., Musiani F., Brucale M., Bubacco L., and Samori B.  
Conformational Equilibria in Monomeric alpha-Synuclein at the Single Molecule Level  
PLOS BIOLOGY 2008, 6, 999-1008
- 2) Brucale M., Sandal M., Di Maio S., Rampioni A., Tessari I., Tosatto L., Bisaglia M., Bubacco L., and Samori B.  
Pathogenic mutations shift the equilibria of alpha-synuclein single molecules towards structured conformers  
CHEMBIOCHEM 2009, 10, 176-183
- 3) Tessari I., Bisaglia M., Valle F., Samori B., Bergantino E., Mammi S. and Bubacco L.,  
The reaction of alpha-synuclein with tyrosinase: possible implications for Parkinson disease  
JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 2008, 24, 16808-16817
- 4) Materassi D, Baschieri P, Tiribilli B, Zuccheri G, Samori B  
An Open Source/Real-Time AFM Architecture to Perform Customizable Force Spectroscopy Experiments..  
REVIEW OF SCIENTIFIC INSTRUMENTS 2009, 80, 084301
- 5) Massimo Sandal, Fabrizio Benedetti, Marco Brucale, Alberto Gomez-Casado and Bruno Samori  
Hooke: an open software platform for force spectroscopy  
BIOINFORMATICS 2009, 25(11),1428-1430
- 6) Valle F., Zuccheri G., Bergia A., Ayres L., Rowan AE., Nolte RJM., Samori B.  
A Polymeric Molecular "Handle" for Multiple AFM-Based Single-Molecule Force Measurements  
ANGEWANDTE CHEMIE INT. 2008, 47, 2431-2434

7) Valle F., Sandal M., Samori B.

"The interplay between chemistry and mechanics in the transduction of a mechanical signal into a biochemical function"

PHYSICS OF LIFE REVIEW 2007, 4, 157-188

8) B. Samorì

Plenty of room for biology at the bottom.

ANGEWANDTE CHEM INT. ED. 2008, 47, 236

9) Karl-Heinz Altmann, Johannes Buchner, Horst Kessler, François Diederich, Bernhard Krutler, Stephen Lippard, Rob Liskamp, Klaus Müller, Elizabeth M. Nolan, Bruno Samori, Gisbert Schneider, Stuart L. Schreiber, Harald Schwalbe, Claudio Toniolo, Constant A. A. van Boeckel, Herbert Waldmann, and Christopher T. Walsh

The State of the Art of Chemical Biology

CHEMBIOCHEM 2009, 10, 16-29

10) Carrara S., Benini L., Bhalla V., Stagni C., Ferretti A., Cavallini A., Riccò B., Samori, B.

"New insights for using self-assembly materials to improve the detection stability in label-free DNA-chip and immunosensors".

BIOSENSORS & BIOELECTRONICS, 2009, 24 (12), 3425-3429

11) Carrara S., Cavallini A., Leblebici Y, DeMicheli G., Benini L., Bhalla V., Valle F., Samori, B., Benini L., Riccò B., Vikholm-Lundin., Munter T

"Capacitance DNA-bio-chips improved by new probe immobilization strategies"

MICROELECTRONICS JOURNAL (doi:10.1016/j.mejo.2010.01.007)

12) Kolaric B, Sliwa M, Brucale M, Vallée RAL, Zuccheri G, Samorì B, Hofkens J, DeSchryver FC

Single molecule fluorescence spectroscopy of pH sensitive oligonucleotide switches

PHOTOCHEM. PHOTOBIOLOG. SCI. 2007, 6, 614

#### **Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni**

Potenziare l'attività di ricerca nel settore delle malattie neurodegenerative da aggregazione proteica (linea 1) sviluppando nuove applicazioni di tecniche single molecule alla progettazione di nuove terapie farmacologiche

#### **Collaborazioni internazionali in atto**

Carlos Bustamante (U.C. Berkeley); DeSchryver FC (Leuven); Hon Bin Li (Vancouver)

#### **Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca**

3 Microscopi AFM, microscopi ottici, tecnologie per bio-funzionalizzazione superfici, stazione elettrochimica,

#### **Parole Chiave**

Neurodegenerative diseases; Protein Folding; Intrinsically Unstructured Proteins; Single molecule methodologies; Electrochemical biosensors,

### Responsabile Scientifico

Prof.ssa Mariastella Scandola

### Linea di Ricerca

Le seguenti linee di ricerca sono al momento attive:

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

### Composizione del Gruppo

#### Aderenti INBB

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

#### Non Aderenti INBB

Gualandi Chiara	BC	c.gualandi@unibo.it
Cortecchia Elisa	DR	elisa.cortecchia2@unibo.it

### Sede Unità di Ricerca

Dipartimento di Chimica "G. Ciamician" Università di Bologna

Indirizzo via Selmi 2

Telefono: 051-2099577

Fax: 051-2099456

E-mail: mariastella.scandola@unibo.it

### Sezione INBB di appartenenza

Bologna

### Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni

#### Obiettivi

- 1) Produzione e caratterizzazione di **scaffold polimerici porosi** bio-riassorbibili per l'ingegneria dei tessuti da polimeri sintetici e/o naturali. La ricerca verte sulla produzione di scaffold in forma di tessuto-non-tessuto (mat) di fibre nanometriche, da elettrofilatura, bio-mimetici della matrice extracellulare e di scaffold microporosi ottenuti mediante schiumatura usando la tecnica della CO<sub>2</sub> supercritica.
- 2) Sviluppo di **'coating' radiopachi** di facile deposizione su dispositivi biomedicali.
- 3) Sviluppo di **polimeri e compositi polimerici a tempo di vita modulabile** per applicazioni nell'ambito delle biotecnologie ambientali. Studio di nuovi polimeri sintetizzati mediante catalisi enzimatica.

#### Risultati ottenuti

- 1) E' stata progettata e costruita una apparecchiatura per l'elettrofilatura di soluzioni polimeriche in condizioni controllate (umidità e temperatura). Sono state ottimizzate le condizioni di elettrofilatura di varie categorie di polimeri, sia sintetici (commerciali o sintetizzati 'ad hoc') che naturali, ottenendo fibre di dimensione mirata (micronanometrica), con morfologia modulabile. Sono state valutate sia la biocompatibilità degli scaffolds, che la vitalità e proliferazione di cellule staminali mesenchimali e cellule di linea.
- 2) Si sono sintetizzati in modo semplice e riproducibile ibridi organico inorganici (oggetto di un Brevetto) con ottime proprietà di schermo alla radiazione UV, trasparenza alla radiazione visibile e opacità ai Raggi-X, oltre ad una buona adesione su substrati di varia natura (vetro, metalli, plastica, ecc.). E' stato inoltre sviluppato un 'coating' a due strati con elevata radiopacità e ottima flessibilità.
- 3) Si sono caratterizzate varie serie di nuovi copolimeri derivanti da sintesi enzimatica con interessanti proprietà fisico-meccaniche. Sono inoltre stati messi a punto bio-compositi, materiali di nuova generazione costituiti da matrice polimerica biodegradabile e rinforzo in fibre naturali.



### **Pubblicazioni più significative nel periodo 2007-2010**

1. C. Gualandi, L. J. White, L. Chen, R. A. Gross, K. M. Shakesheff, S. M. Howdle, M. Scandola "Scaffold for tissue engineering from non-isothermal supercritical carbon dioxide foaming of a highly crystalline polyester", 2010, *Acta Biomaterialia*, *6*, 130-136.
2. E. Cortecchia, A. Pacilli, G. Pasquinelli, M. Scandola "Biocompatible two-layer tantalum/titania-polymer-hybrid coating", 2010, *Biomacromolecules*, DOI 10.1021/bm100619t
3. L. Foroni, G. Dirani, C. Gualandi, M.L. Focarete, G. Pasquinelli "Paraffin Embedding allows effective analysis of proliferation, survival and immunophenotyping of cells cultured on poly(L-lactic acid) electrospun nanofiber scaffolds", 2010, *Tissue Engineering part C: Methods*, *16 (4)*, 751-760
4. M.L. Focarete, C. Gualandi, M. Scandola, M. Govoni, E. Giordano, L. Foroni, S. Valente, G. Pasquinelli, W. Gao, R.A. Gross "Electrospun scaffolds of a polyhydroxyalkanoate consisting of w-hydroxypentadecanoate repeat units: fabrication and in vitro biocompatibility studies", 2010, *Journal of Biomaterials Science*, *21*, 1283-1296
5. L. Mazzocchetti, E. Cortecchia, M. Scandola "Organic-inorganic hybrids as transparent coatings for UV and X-Ray shielding", 2009, *ACS Applied Materials & Interfaces*, *1*, 726-734.
6. E. Cortecchia, L. Mazzocchetti, M. Scandola "Organic-inorganic interactions in poly(trimethylene carbonate) - titania hybrids", 2009, *Macromol. Chem. Phys.*, *210*, 1834-1843
7. L. Mazzocchetti, M. Scandola, Z. Jiang "Enzymatic synthesis, structural and thermal properties of poly( $\omega$ -pentadecalactone-*co*-butylene-*co*-succinate)", 2009, *Macromolecules*, *42*, 7811-7819.
8. E. Patrucco, S. Ouasti, C. D. Vo, P. De Leonardis, A. Pollicino, S. P. Armes, M. Scandola, N. Tirelli "Surface-ATRP (SI-ATRP) modification of tissue culture substrates. Poly(glycerol methacrylate) as an anti-fouling surface", 2009, *Biomacromolecules*, *10*, 3130-3140.
9. A. Zucchelli, D. Fabiani, C. Gualandi, M.L. Focarete "An innovative and versatile approach to design highly porous, patterned, nanofibrous polymeric materials", 2009, *Journal of Materials Science*, *44*, 4969-4975.
10. C. Gualandi, P. Wilczek, M.L. Focarete, G. Pasquinelli, M. Kawalek, M. Scandola "Bioresorbable electrospun nanofibrous scaffolds loaded with bioactive molecules", 2009, *e-Polymers*, No 60.
11. E. Zini, M. Scandola, P. Dobrzynski, J. Kasperczyk, M. Bero "Shape Memory Behavior of Novel (L-Lactide-Glycolide-Trimethylene Carbonate) Terpolymers", 2007, *Biomacromolecules*, *8*, 3661-3667
12. E. Zini, M.L. Focarete, I. Noda, M. Scandola "Bio-Composite of Bacterial poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyhexanoate) reinforced with vegetable fibers", 2007, *Comp. Sci. Tech*, *67*, 2085-2094

### **Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni**

Nell'ambito dei materiali porosi per l'ingegneria dei tessuti si intende implementare la funzionalità degli 'scaffold' polimerici sia tramite l'introduzione di molecole bio-attive all'interno dello scaffold per un loro successivo rilascio, che mediante funzionalizzazione superficiale con bio-molecole specifiche. Tali scaffold saranno utilizzati nello studio del differenziamento di cellule staminali. Sempre nell'ambito dell'ingegneria dei tessuti si svilupperanno inoltre scaffold polimerici con proprietà elastomeriche per l'ingegneria del tessuto cardiaco, in grado di superare le limitazioni imposte dall'elevata rigidità dei prodotti attualmente disponibili.

Nel campo dei materiali radiopachi ibridi si studierà l'effetto di diversi componenti inorganici sulle proprietà di 'coatings' finalizzati ad applicazioni in campo endoprotesico.

L'attività in ambito biotecnologico si incentrerà sulla razionalizzazione delle correlazioni tra struttura e proprietà in polimeri sia da fonti rinnovabili che da sintesi biocatalizzata.

### **Collaborazioni internazionali in atto**

- Prof. Richard A. Gross, Center for Biocatalysis and Bioprocessing of Macromolecules della National Science Foundation, Polytechnic University, Brooklyn-Long Island, New York (USA)
- Prof. Seeram Ramakrishna, NUS Nanoscience and Nanotechnology Initiative, National University of Singapore
- Prof. Nicola Tirelli, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences University of Manchester (UK)

### **Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca**

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

**Parole Chiave** Ingegneria dei tessuti, scaffold polimerici, coating radiopachi, polimeri biodegradabili, biopolimeri

*UNITA' DI RICERCA INBB  
Trento*

**Responsabile Scientifico**

Prof. Marina Scarpa

**Linea di Ricerca**

Bio-nanotecnologie

**Composizione del Gruppo**

**Aderenti INBB**

Marina Scarpa *PO* *e-mail: marina.scarpa@unitn.it*

**Non Aderenti INBB**

Elena Froner *BC* *efroner@science.unitn.it*

Elvira D'Amato *PT* *damato@science.unitn.it*

**Sede Unità di Ricerca**

*Indirizzo: Via Sommarive 14, Povo (Trento)*

*Telefono: 39.0461.882029*

*Fax 39.0461.881696*

*E-mail marina.scarpa@unitn.it*

**Sezione INBB di appartenenza**

Padova

**Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni**

*Obiettivi*

L'idea di base consiste nel ritenere che la biofisica, che tradizionalmente opera al confine tra la fisica e la biologia, stia indirizzandosi verso lo sviluppo di nuovi approcci per comprendere sistemi dinamici complessi e sviluppare nuove strategie sperimentali per informazioni quantitative. In questo senso, tutti gli aspetti connessi alle interfacce nano-biologiche (che sono strutture dove la co-esistenza di principi fisici e molecole biologiche è evidente) costituiscono una interessante sfida per la ricerca. Inoltre lo sviluppo di metodologie quantitative basate su principi fisici rigorosi e strumentazione non convenzionale, sta avendo un grande impatto nel campo biomedico. Il gruppo coinvolto nella ricerca opera in stretta collaborazione con un gruppo che si occupa di fotonica. Sono attive anche collaborazioni con Dipartimenti di Biologia e istituzioni mediche, rese necessarie dalla forte interdisciplinarietà della ricerca. La principale linea di ricerca riguarda la progettazione, la sintesi e lo studio del comportamento dinamico delle bio-interfacce nano-strutturate. Più specificamente il gruppo è attivo su tre linee di ricerca: sviluppo di interfacce a base di silicio per i sistemi sensoristici, progettazione di piattaforme per i sensori SERS, comportamento degli antiossidanti nei sistemi micellari. L'obiettivo che accomuna queste linee di ricerca è l'ottenere informazioni quantitative e sviluppare metodologie alternative.

*Risultati ottenuti*

Quantum dots di silicio

Quantum dots di silicio luminescenti hanno grandi potenzialità di utilizzo nell'imaging biologico e nei sistemi per la diagnostica. Tuttavia, per essere utilizzati nell'ambiente biologico i nanocristalli devono rimanere luminescenti e formare sospensioni stabili in acqua e nei fluidi biologici. Uno dei principali problemi è invece l'instabilità della fotoluminescenza dovuta in parte alla veloce ossidazione dei nanocristalli in ambiente acquoso. Nel nostro laboratorio sono state ottenute soluzioni acquose di nano cristalli di silicio fabbricati da silicio poroso che mostrano una fotoluminescenza dipendente dall'invecchiamento. Questi cambiamenti sono correlati alle dimensioni del core cristallino del nano cristallo, che dipende dall'ossidazione del nano cristallo. La crescita controllata del rivestimento di ossido di silicio può aiutare a solubilizzare e stabilizzare i quantum dots in ambiente acquoso. La ricerca attuale (ancora in corso di svolgimento) riguarda la progettazione di rivestimenti superficiali innovativi per favorire l'uptake cellulare dei nano cristalli.

Piattaforme per sensori SERS

Sono state progettati e preparati supporti di silicio poroso con diametro dei pori 0.5–1  $\mu\text{m}$ , infiltrati con nano strutture di argento da utilizzare per amplificazione di biosegnali mediante surface enhanced Raman scattering (SERS). Per ottenere questi supporti sono state seguite due procedure: 1) riduzione spontanea dello ione  $\text{Ag}^+$  sulla superficie di silicio poroso appena preparato e immerso in una soluzione di  $\text{Ag}^+$ ; 2) ancoraggio di nano particelle colloidali di Ag sulla superficie in precedenza funzionalizzata con ammino silano. Negli esperimenti in cui è stata utilizzata la

Rhodamine 6G come esempio di analita, abbiamo ottenuto limiti di rivelazione dell'ordine di 20 µM e 20 nM, se la metallizzazione ha seguito la prima o la seconda procedura, rispettivamente. Questo aumento di sensibilità riscontrato nel secondo caso, nonostante sia stata misurata una densità superficiale di rodamina inferiore al primo caso, è stata spiegata in termini di un aumento dell'efficienza degli hot spot e un ridotto legame aspecifico al di fuori degli hot spot ottenuti depositando i colloidali sulla superficie funzionalizzata con l'amminosilano. Un forte aumento dell'intensità del segnale è stata osservata anche quando l'analita da rivelare è una proteina (l'horseradish perossidasi).

Comportamento degli antiossidanti nelle micelle.

È stato messo a punto un metodo ossigrafico basato sulla perossidazione degli acidi grassi nelle micelle, metodo che permette la valutazione della capacità di interrompere catene di reazioni radicaliche in cui si producono radicali perossidici, da parte di alcune sostanze. Il metodo è stato applicato con successo alla valutazione delle caratteristiche di bloccare le catene di reazioni radicaliche di alcuni antiossidanti presenti negli alimenti.

Sono stati studiati nel dettaglio alcuni esempi di alimenti, potendo così dimostrare la validità generale del metodo per quanto riguarda la valutazione, in modo veloce e semplice, di alcune caratteristiche fondamentali degli antiossidanti presenti negli alimenti.

### **Pubblicazioni più significative nel periodo 2007-2010**

- Di Paolo M. L., Pesce C., Lunelli M., Scarpa M., Rigo A., (2007) "N-alkanamines as substrates to probe the hydrophobic region of bovine serum amine oxidase active site: a kinetic and spectroscopic study". *Archives of biochemistry and biophysics*, 465 (1), 50-60.

- Rossetto M., Vanzani P., Lunelli M., Scarpa M., Mattivi F., Rigo A. (2007) "Peroxyl radical trapping activity of anthocyanins and generation of free radical intermediates". *Free radical research*, 41 (7), 854-859.

- Zennaro L., Rossetto M., Vanzani P., De Marco V., Scarpa M., Battistin L., Rigo A. (2007) "A method to evaluate capacity and efficiency of water soluble antioxidants as peroxyl radical scavengers". *Archives of biochemistry and biophysics*, 462, 38-46.

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

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

- F. Giorgis, E. Descrovi, A. Chiodoni, E. Froner, M. Scarpa, A. Venturello, F. Geobaldo "Porous silicon as efficient surface enhanced Raman scattering (SERS) substrate" *Appl. Surf. Sci.* 254(22), 7494-7497 (2008).

- R. Adamo, A. Anopchenko, P. Bettotti, M. Cazzanelli, E. D'Amato, N. Daldosso, L. Ferraioli, E. Froner, Z. Gaburro, R. Guider, S. M. Hossain, D. Navarro-Urrios, A. Pitanti, S. Prezioso, M. Scarpa, R. Spano, M. Wang, L. Pavesi "Low dimensional silicon structures for photonic and sensor applications." *Appl. Surf. Sci.* 255, 624-627 (2008).

- Froner E., Baschera F., Tessarolo F., Bettotti P., Pavesi L., Rossi B., Scarpa M., Mariotto G. and Rigo A. (2009) "Hybrid nanostructured supports for surface enhanced Raman scattering" *Appl. Surf. Sci.* 225 (15), 7652-7656.

- Bonaiuto E., Lunelli M., Scarpa M., Vettor R., Milan G., Di Paolo M.L. A structure-activity study to identify novel and efficient substrates of the human semicarbazide-sensitive amine oxidase/VAP1 enzyme. (2010) *Biochimie* 92, 858-868.

### **Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni**

Le linee di ricerca descritte verranno sviluppate dando particolare enfasi alla progettazione e caratterizzazione di sistemi ibridi inorganici/organici per la rivelazione di biomolecole e il monitoraggio di eventi intracellulari.

### **Collaborazioni internazionali in atto**

Monika Fuxreiter-University of Budapest

Luca Dal Negro- University of Boston

### **Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca**

Microscopio IR; Fluorimetro; AFM-SNOM

### **Parole Chiave**

Silicon quantum dot, Silicon surface, SERS, antioxidant.

*UNITA' DI RICERCA INBB  
Napoli*

**Responsabile Scientifico:**

Prof.ssa Lorella Severino

**Linea di Ricerca**

- 1) Effetti immunomodulatori di differenti micotossine, da sole e in associazione, in vari modelli cellulari (cellule Jurkat, linfociti di suino, macrofagi murini J774A1, cellule dendritiche, ecc...).
- 2) Determinazione quali-quantitativa di contaminanti ambientali negli alimenti di origine animale e valutazione dei rischi per il consumatore.
- 3) Studio della tossicità e/o dei possibili impieghi terapeutici negli animali domestici di composti naturali di origine vegetale.

**Composizione del Gruppo**

**Aderenti INBB**

Severino Lorella	PA	lorella.severino@unina.it
------------------	----	---------------------------

**Non Aderenti INBB**

Ciarcia Roberto	RU	roberto.ciarcia@unina.it
Russo Rosario	DR	rosario.russo2@unina.it
Serpe Francesco Paolo	DR	francesco.serpe@izsmportici.it
Luongo Diomira	BC	mluongo@isa.cnr.it
De Simone Alessandra	BC	desimonealessandra@libero.it

**Sede Unità di Ricerca**

*Indirizzo: Facoltà di Medicina Veterinaria, via F. Delpino 1, 80137, Napoli, Italia.*

*Telefono: +390812536272; +393288249078*

*Fax: +390812536274*

*E-mail: lorella.severino@unina.it*

**Sezione INBB di appartenenza:**

Napoli

**Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni**

L'Unità di Ricerca coordinata dalla Prof.ssa Severino, negli ultimi tre anni, si è dedicata principalmente allo studio dell'attività immunomodulante di differenti micotossine (FB1, ZEA, NIV, DON, AFM1, AFM2, AFB1 e AFB2), singolarmente e in combinazione, in diversi modelli di cellule immunocompetenti quali linfociti di suino, linfoblasti umani (cellule Jurkat), macrofagi murini (cellule J774A.1), ecc...

Inoltre, l'Unità di Ricerca si interessa di problematiche di contaminazione chimica degli alimenti di origine animale, determinando mediante tecniche cromatografiche e/o spettrofotometriche in assorbimento atomico contaminanti quali composti organoalogenati e metalli pesanti.

Infine, negli ultimi anni, l'Unità di Ricerca si è occupata dello studio dell'attività biologica di principi naturali di origine vegetale.

**Obiettivi**

1. Valutazione *in vitro* dell'attività immunomodulatoria di diverse micotossine.
2. Monitoraggio di contaminanti ambientali in alimenti di origine animale e valutazione del rischio tossicologico per il consumatore.
3. Studio della tossicità e dei possibili impieghi terapeutici di principi attivi di origine vegetale negli animali domestici.

**Risultati ottenuti**

Come si evince dalla letteratura allegata, le micotossine studiate sono dotate di proprietà immunomodulanti.

I livelli di contaminanti ambientali nelle differenti matrici alimentari analizzate risultano relativamente bassi e quasi sempre al di sotto dei limiti normativi, ove fissati.

E' stata valutata l'attività biologica di estratti vegetali e composti isolati da piante spontanee che entrano nell'alimentazione del bestiame; sono attualmente in corso studi di campo atti a valutare la relazione tra l'assunzione di piante e fenomeni tossici gravi nei ruminanti al pascolo.

### **Pubblicazioni più significative nel periodo 2007-2010 (\* affiliazione INBB)**

- 1) Russo R., Bianco G., Marzocco S., De Simone A., Autore G., Severino L., "Effects of aflatoxin M<sub>1</sub> and aflatoxin M<sub>2</sub> on J774A.1 murine macrophage cell line" Toxicology Letters, 2010, S196: S201.
- 2) D. Luongo, L. Severino, R. D'Arienzo, P. Bergamo, M. Rossi, "Trichothecenes NIV and DON modulate the maturation of murine dendritic cells." Toxicon, 2010, 55(1):73-80. (\*)
- 3) Marzocco S., Russo R., Bianco G., Autore G., Severino L., "Pro-apoptotic effects of nivalenol and deoxynivalenol trichothecenes in J774A.1 murine macrophages"; Toxicology Letters, 2009, 189:21-26.
- 4) Russo R., Autore G., Severino L., "Pharmaco-Toxicological Aspects of Herbal Drugs Used in Domestic Animals". Nat. Prod. Comm. 2009, 4(12):1777-1784. (\*)
- 5) Russo R., Restucci B., Malafrente N., De Tommasi N., Severino L., "Toxicity of Crepis vesicaria L. in ruminants: preliminary results", J. Vet. Pharm. Ther., 2009, 32(1):256.
- 6) Piccinelli A.L, Lotti C., Severino L., Luongo D., Rastrelli L., "Unusual cytotoxic sulfated cadinene-type sesquiterpene glycosides from Cottonseed (*Gossypium hirsutum*)". Tetrahedron 64:5449-5453, 2008. (\*)
- 7) Luongo D., De Luna R., Russo R., Severino L., "Effects of four Fusarium toxins (fumonisin B1,  $\alpha$ -zearalenol, nivalenol, deoxynivalenol) on porcine whole blood cellular proliferation", Toxicon, 2008, 52:156-162. (\*)
- 8) Severino L., Russo R., Luongo D, De Luna R, Ciarcia R, Rossi M., "Immune effects of four Fusarium-toxins (FB<sub>1</sub>, ZEA, NIV, DON) on the proliferation of Jurkat cells and porcine lymphocytes: in vitro study". Vet. Res. Com., 2008, 32:311-313. (\*)
- 9) Cioffi G., Pesca M.S., De Caprariis P., Braca A., Severino L., De Tommasi N., "Phenolic compounds in olive oil and olive pomace from Cilento (Campania, Italy) and their antioxidant activity." Food Chemistry, 2010. 121, I: 1, 105-111 (\*)
- 10) Varriale A., Staiano M., Iozzino L., Severino L., Anastasio A., Cortesi M.L., D'Auria S., "FCS-based sensing for the detection of ochratoxin and neomycin in food." Protein and Peptide Letters, 2009, 16 (12):1425-8.

### **Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni**

- 1) Continuare lo studio dell'attività delle micotossine sulle funzioni immunitarie dei mammiferi, in particolare attraverso la valutazione degli effetti provocati da miscele di diverse micotossine, situazione che molto frequentemente si riscontra in condizioni di campo.
- 2) Continuare il monitoraggio dei livelli di differenti xenobiotici (metalli pesanti, micotossine, composti organoalogenati, ecc..) negli alimenti destinati all'uomo al fine di valutare il rischio tossicologico per il consumatore esposto attraverso gli alimenti di origine animale.
- 3) Intraprendere studi circa la tossicocinetica e la tossicodinamica di nuovi contaminanti ambientali; in particolare, si cercherà di evidenziare gli effetti che tali xenobiotici sono in grado di provocare sul sistema immunitario attraverso l'utilizzo sia dei modelli cellulari routinariamente adoperati dai componenti dell'Unità di Ricerca sia attraverso linee primarie derivate da mammiferi domestici e selvatici.
- 4) Studi *in vitro* e *in vivo* della tossicità o dei possibili impieghi terapeutici negli animali domestici di principi attivi isolati da specie vegetali autoctone.
- 5) Intraprendere studi relativi all'individuazione di biomarker precoci di esposizione a contaminanti ambientali

### **Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca**

- Digestore a microonde Stard D Milestone
- HPLC Shimadzu
- Gas-cromatografo Carlo Erba
- Cappa a flusso laminare
- Incubatore per colture cellulari
- Microscopi

### **Parole Chiave**

Micotossine; immunotossicità; macrofagi; contaminanti ambientali; composti naturali.

UNITA' DI RICERCA INBB  
Parma

**Responsabile Scientifico**

Prof. Alberto Spisni

**Linea di Ricerca**

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

**Composizione del Gruppo**

**Aderenti INBB**

Franzoni Lorella

PA

[lfranz@unipr.it](mailto:lfranz@unipr.it)

Sartor Giorgio

PA

[giorgio.sartor@unibo.it](mailto:giorgio.sartor@unibo.it)

**Non Aderenti INBB**

Casali Emanuela

RU

[emanuela.casali@unipr.it](mailto:emanuela.casali@unipr.it)

Ferrari Elena

RU

[elena.ferrari@unipr.it](mailto:elena.ferrari@unipr.it)

De Aguiar Pertinhez Thelma

A

[thelma@unipr.it](mailto:thelma@unipr.it)

**Sede Unità di Ricerca**

Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università di Parma.

Indirizzo: Via Volturno, 39

Telefono: 0521 033801/7

Fax: 0521 0033802

E-mail: [alberto.spisni@unipr.it](mailto:alberto.spisni@unipr.it)

**Sezione INBB di appartenenza**

Milano

**Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni**

*Obiettivi*

Determinare la struttura tridimensionale in soluzione di peptidi e proteine e correlazione alla loro funzione. I sistemi attualmente allo studio sono peptidi caratterizzati di attività antimicrobica, proteine appartenenti alla super-famiglia delle lipocaline quali una proteina appartenente alla famiglia delle Major Urinary Proteins (MUP) e la cellular Retinol Binding Protein (cRBP) entrambe appartenenti alla famiglia delle FABP. Sono oggetto di studio tossine come la crotamina, presente nel veleno di serpente (crotalo) ed altre tossine attive sui canali del K e presenti nel veleno di scorpione. Infine si studiano le strutture di proteine di funzione ancora sconosciuta derivate dal genoma di parassiti delle arance e di alberi quali i platani e gli olmi. Le tecniche utilizzate sono la spettrometria NMR multinucleare e multidimensionale, il CD e la fluorescenza. I peptidi sono sintetici, le proteine di MW superiore ai 5Kd sono ricombinanti e sono clonate ed espresse nel nostro laboratorio in forma nativa e modificate sito-specificamente. Per proteine di MW inferiore ai 5Kd si usano proteine native. Sia l'estrazione che la purificazione sono condotte in laboratorio. Infine si usano metodiche di calcolo di simulazione di dinamica molecolare per rappresentare la struttura 3D di questi polipeptidi e per descriverne le caratteristiche di flessibilità molecolare.

*Risultati ottenuti*

Sono state risolte le strutture di peptidi ad attività antimicrobica. Sono state risolte le strutture di due proteine derivate dal genoma di parassiti delle arance. Inoltre stata risolta la struttura di una tossina prodotta da un fungo che risulta tossico per i platani. Tutto ciò è stato realizzato combinando la biologia molecolare per produrre le proteine con la spettrometria NMR multinucleare e multidimensionale e la spettroscopia CD.

**Pubblicazioni più significative nel periodo 2007-2010**

- 1) Cicero D.O., Contessa G.M., Pertinhez T.A., Gallo M., Katsuyama A.M., Paci M., Farah C.S., Spisni. A. "Solution structure of ApaG from *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* reveals a fibronectin-3 fold" Proteins: Struc., Func. Bioinf. (2007) **67**, 490-500 (IF 2007: 3.354)
- 2) Machado A., Sforça M.L., Miranda A., Daffre S., Pertinhez T.A., Spisni A., Miranda M.T.M. "Truncation of amidated fragment 33-61 of bovine  $\alpha$ -hemoglobin: effects on the structure and anticandidal activity" Biopolymers: Peptide Science (2007) **88**, 413-426 (IF 2007: 2.389)
- 3) Vanini M.M.T., Pertinhez T.A., Sforça M.L., Spisni A., Benedetti C.E.

- "The solution structure of the outer membrane lipoprotein OmlA from Xanthomonas axonopodis pv. citri reveals a protein fold implicated in protein-protein interaction"*  
 Proteins: Struct., Func. Bioinf. (2008) **71**, 2051-2064 (IF 2008: 3.419)
- 4) Stehling E.G., da Silveira W.D., Campos T.A., Brocchi M., Pertinhez T.A., Spisni A.  
*"Development of a bacterial cloning vector for expression of scorpion toxins for biotechnological studies"*  
 Protein Express. Purif. (2008) **57**, 88-94 (IF 2008: 1.621)
  - 5) Borja-Oliveira C.R., Pertinhez T.A., Rodrigues-Simioni L., Spisni A.  
*"Positive inotropic effects of Tityus cambridgei and T. serrulatus scorpion venoms on skeletal muscle"*  
 Comparative Biochem. Phys. Part C (2009) **149**, 404-408 (IF 2007: 2.345)
  - 6) Cervellati C., Franzoni L., Squerzanti M., Bergamini C.M., Spinozzi F., Mariani P., Lanzara V., Spisni A.  
*"Unfolding studies of tissue transglutaminase"*  
 Amino Acids (2009) **36**, 633-641 (IF 2007: 2.780)
  - 7) Ramos C.R.R., Spisni A., Oyama Jr. S., Sforça M.L., Ramos H.R., Vilar M.M., Alves A.C., Figueredo R.C.R., Tendler M., Zanchin N.I.T., Pertinhez T.A., Ho P.L.  
*"Stability improvement of the fatty acid binding protein Sm14 from S. mansoni by Cys replacement: structural and functional characterization of a vaccine candidate"*  
 Biochim. Biophys. Acta- Proteins and Proteomics (2009) **1794**, 655-662 (IF 2007: 3.078)
  - 8) Pertinhez T.A., Conti S., Ferrari E., Magliani W., Spisni A., Polonelli L.  
*"Reversible self-assembly: A key feature for a new class of autodelivering therapeutic peptides"*  
 Mol. Pharmaceutics (2009) **6**, 1036-1039 (IF 2007: 3.500)
  - 9) Nicastro G., Orsomando G., Ferrari E., Manconi L., Desario F., Amici A., Naso A., Carpaneto A., Pertinhez T.A., Ruggieri S., Spisni A.  
*"Solution structure of the phytotoxic protein PcF: the first characterized member of the Phytophthora PcF toxin family"*  
 Protein Sci. (2009) **18**, 1786-1791 (IF 2007: 3.135)
  - 10) Yount N. Y., Kupferwasser D., Spisni A., Dutz S.M., Ramjan Z.H., Sharma S., Waring A.J, and Yeaman M.R.  
*"Selective Reciprocity In Antimicrobial Activity Versus Cytotoxicity Of Hbd-2 And Crotonamine"*  
 Proc. Natl. Acad. Sci USA (2009) **106**, 14972-14977 (IF 2008: 9.380)
  - 11) Pertinhez T.A., Ferrari E., Casali E., Patel J.A., Spisni A. and Smith L.J.  
*"The binding cavity of mouse major urinary protein is optimised for a variety of ligand binding modes"*  
 Biochem. Biophys. Res. Comm. (2009) **390**, 1266-71 (IF: 2.648)
  - 12) Gallo M., Ferrari E., Eliese T., Amata I., Pertinhez T.A., Katsuyama A.M., Paci M., Farah C.S., Spisni A. and Cicero D.O.  
*"A new member of the ribbon-helix-helix transcription factor superfamily from the plant pathogen Xanthomonas axonopodis pv. citri"*  
 J Struct Biol. (2010) **17**, 21-31 (IF: 4.059)

#### **Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni**

Continuare gli studi sul meccanismo di entrata ed uscita del retinolo nella cRBP, studiare alcuni aspetti del processo di unfolding e refolding della rMUP, proseguire lo studio delle tossine di veleno di scorpione attive sui canali del K e di tossine presenti in funghi filamentosi. Proseguire lo studio sul rapporto struttura funzione di peptidi ad attività antibatterica. Clonare ed esprimere mutanti sito specifici della MUP per modularne la funzione biologica, in particolare l'azione allergenica.

#### **Collaborazioni internazionali in atto**

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

#### **Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca**

- Spettrofotometro per dicroismo circolare Jasco J715
- NMR Varian Inova 600
- Sistema per purificazione di proteine Akta Purifier
- Workstation Silicon Graphics O2 e Octane
- Spettrometri di Massa 1) MALDI-TOF Micromas e 2) Orbitrap
- Microcalorimetro per misure ICT

#### **Parole Chiave**

NMR, CD, proteine, struttura, dinamica molecolare.

UNITA' DI RICERCA INBB  
Verona

**Responsabile Scientifico:**

Prof. Hisanori Suzuki

**Linea di Ricerca**

1. Evaluation of the possible clinical use of  $\alpha$ -bisabolol, an unique pro-apoptotic sesquiterpene.
2. Study of the molecular mechanism of pro-apoptotic action of  $\alpha$ -bisabolol: identification of molecular target(s) and computer modelling analysis of the interaction between  $\alpha$ -bisabolol and identified molecular target(s)
3. Study of the molecular mechanism of anti-STAT3 action of custunolide and dehydrocuctus lactone and of its anti-tumour action
4. Study of the interaction between STAT1 and phytochemicals capable to inhibit specifically STAT1 activation: valuation of the possible clinical use of these compounds in inflammation-related diseases
5. Evaluation of the importance of the regulation of the production of neuronal/endothelial nitric oxide synthase (NOS)-derived NO in the heart ischemia/reperfusion injury.
6. Identification of phytochemicals with strong and specific anti-STAT1/3 activity

**Composizione del Gruppo**

**Aderenti INBB**

Hisanori Suzuki	PO	hisanori.suzuki@univr.it
-----------------	----	--------------------------

**Non Aderenti INBB**

Marta Menegazzi	PA	marta.menegazzi@univr.it
Alessandra Carcereri de Prati	PT	alessandra.carcererideprati@univr.it
Sofia Mariotto	RU	sofia.mariotto@univr.it
Elisabetta Cavalieri	A	elisabetta.cavalieri@univr.it
Elena Darra	A	elena.darra@univr.it
Elena Butturini	A	elena.butturini@alice.it

**Sede Unità di Ricerca**

Indirizzo: Strada Le Grazie 8, 37134 Verona

Telefono : 045 8027167

Fax : 045 8027170

E-mai: hisanori.suzuki@univr.it

**Sezione INBB di appartenenza:**

Udine

**Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni**

*Obiettivi*

1. Study of the effect of  $\alpha$ -bisabolol on the viability of human leukemic cells
2. Study of the molecular mechanism of pro-apoptotic action of  $\alpha$ -bisabolol
3. Study of the molecular mechanism of anti-STAT1 action of some polyphenols
4. Evaluation of anti-STAT1 phytochemicals in animal model of inflammation-related disease
5. Evaluation of the protective action of NO-albumin against ischemia/reperfusion damage in the heart

*Risultati ottenuti*

1.  $\alpha$ -bisabolol, at the range of 10  $\mu$ M, exerts a striking pro-apoptotic action towards a various type of human leukemic cells, including those denominated as Philadelphia leukemic cells, without killing normal cells present in the blood.
2. The selective action of  $\alpha$ -bisabolol towards malignant tumour cells seems to be guaranteed through its selective absorption to the lipid rafts where it promptly interacts with one of bcl2 proteins, Bid.  $\alpha$ -bisabolol, transported to mitochondria by Bid, destroys the structure and function of mitochondria, leading to apoptosis.
3. Polyphenols with three hydroxyl groups on the B ring exert a strong inhibitory action on STAT1 activation. These compounds are able to directly interact with STAT1 protein, but not with STAT1 protein, thus impeding the tyrosine 701-phosphorylation of STAT1. Binding constant of these polyphenols are very low (20 nM), suggesting that, despite their scarce bioavailability, these compounds may exert in vivo effect. Indeed, *ex vivo* study showed that these compounds protect the heart from ischemia/reperfusion injury by inhibiting ischemia/reperfusion-elicited STAT1-dependent apoptosis of cardiomyocytes.
4. In animal model of spinal cord injury, intestine ischemia/reperfusion injury and pleurisy compounds with anti-STAT1 activity showed a remarkable protecting effect on the tissue damage.



5. The administration of NO-albumin to rats protects the heart from ischemia/reperfusion damage due to the release of NO acting as anti-inflammatory drug. These results are in line with "NO hypothesis" proposed by Colasanti and Suzuki (TIPS, 2000).

#### **Pubblicazioni più significative nel periodo 2007-2010 (\*affiliazione INBB)**

1. Conti A, Miscusi M, Cardali S, Germano A, Suzuki H, Cuzzocrea S, Tomasello F. (2007) "Nitric oxide in the injured spinal cord: synthases cross-talk, oxidative stress and inflammation". *Brain Res Rev.* 54, 205-18
2. Di Paola R, Mazzon E, Muia C, Crisafulli C, Genovese T, Di Bella P, Esposito E, Menegazzi M, Meli R, Suzuki H, Cuzzocrea S. (2007) "Protective effect of Hypericum perforatum in zymosan-induced multiple organ dysfunction syndrome: relationship to its inhibitory effect on nitric oxide production and its peroxynitrite scavenging activity". *Nitric Oxide Biology and Chemistry* 16, 118-30.
3. Mariotto S, Suzuki Y, Persichini T, Colasanti M, Suzuki H, Cantoni O. (2007) Cross-talk between NO and arachidonic acid in inflammation. *Curr Med Chem.* 14:1940-4.
4. Darra E, Abdel-Azeim S, Manara A, Shoji K, Maréchal JD, Mariotto S, Cavalieri E, Perbellini L, Pizza C, Perahia D, Crimi M, Suzuki H.(2008) Insight into the apoptosis-inducing action of alpha-bisabolol towards malignant tumor cells: Involvement of lipid rafts and Bid. *Arch Biochem Biophys.* 476:113-23
5. Menegazzi M, Novelli M, Beffy P, D'Aleo V, Tedeschi E, Lupi R, Zoratti E, Marchetti P, Suzuki H, Masiello P. (2008) Protective effects of St. John's wort extract and its component hyperforin against cytokine-induced cytotoxicity in a pancreatic beta-cell line. *Int J Biochem Cell Biol.* 40:1509-21
6. Mariotto S, Ciampa AR, de Prati AC, et al (2008) Aqueous extract of *Arbutus unedo* inhibits STAT1 activation in human breast cancer cell line MDA-MB-231 and human fibroblasts through SHP2 activation. *Medicinal Chemistry* 4: 219-228
7. Scarabelli TM, Mariotto S, Abdel-Azeim S, et al. (2009) Targeting STAT1 by myricetin and delphinidin provides efficient protection of the heart from ischemia/reperfusion-induced injury *FEBS LETTERS* 583 531-41
8. Cavalieri E, Bergamini C, Mariotto S, et al. (2009) Involvement of mitochondrial permeability transition pore opening in alpha-bisabolol induced apoptosis *FEBS JOURNAL* 276: 3990-4000
9. Mariotto S, de Prati AC, Cavalieri E, et al.(2009) Extracorporeal Shock Wave Therapy in Inflammatory Diseases: Molecular Mechanism that Triggers Anti-Inflammatory Action. : *Current Medicinal Chemistry* 16: 2366-2372 (\*)
10. Darra E, Rungatscher A, de Prati AC, et al. (2010) Dual modulation of nitric oxide production in the heart during ischaemia/reperfusion injury and inflammation. *Thrombosis And Haemostasis* 104: 200-206 (\*)

#### **Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni**

The group will focus the attention on the study of  $\alpha$ -bisabolol to envisage the molecular mechanism of its unique pro-apoptotic action and evaluate its clinical use. Results obtained by current study strongly indicate the possible involvement of bcl-2 protein in its action. Kinetic study of the interaction between  $\alpha$ -bisabolol and bcl-2 protein and successive computer modelling analysis may lead to the development/design of new compounds with higher activity. Another objective of the group will be the study of the molecular mechanism of anti-STAT3 action of some phytochemicals. STAT3 plays a critical role in the survival of tumours and its inhibition may represent a new strategy to treat tumours.

#### **Collaborazioni internazionali in atto**

1. Dr. David Perahia, University of Paris
2. Prof. Yukihiko Yokoyama, Nagoya University
3. Prof. Tiziano Scarabelli, St John Hospital/ Wayne State University

#### **Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca**

1. RT-PCR
2. Chemidock
3. HPLC
4. FPLC
5. SPR
6. CD

#### **Parole Chiave**

$\alpha$ -bisabolol, epigallocatechin, STAT1/3, apoptosis, tumour

UNITA' DI RICERCA INBB  
Firenze

**Responsabile Scientifico**

Prof. Massimo Stefani

**Composizione del Gruppo**

**Aderenti INBB**

Massimo Stefani	P.O.	stefani@scibio.unifi.it
-----------------	------	-------------------------

**Non Aderenti INBB**

Berti Andrea	P.O.	andrea.berti@unifi.it
Bucciantini Monica	R.U.	monica.bucciantini@unifi.it
Cecchi Cristina	R.U.	cristina.cecchi@unifi.it
Rigacci Stefania	B.C.	stefania.rigacci@unifi.it

**Sede Unità di Ricerca**

Indirizzo Firenze Viale Morgagni 50

Telefono 055.4598307

Fax 055.4598905

E-mail stefanicibio.unifi.it

**Sezione INBB di appartenenza**

Bologna

**Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni**

*Obiettivi*

Ottenere maggiori informazioni sui processi molecolari alla base dell'aggregazione amiloide delle proteine e dei fattori intra ed extracellulari che la modulano. Ottenere informazioni sui meccanismi molecolari della citotossicità di aggregati amiloidi e sui fattori cellulari che la influenzano.

*Risultati ottenuti*

Utilizzando alcuni peptide e proteine modello sono stati ottenuti risultati significativi sui meccanismi di aggregazione di amilina, peptide Abeta, beta2-microglobulina, Ure2p e HypF-N e sulla citotossicità di tali aggregati, amiloid e non. Sono stati anche ottenuti significativi risultati sull'uso potenziale dell'oleuropeina aglicone come agente capace di inibire la crescita di oligomeri tossici durante l'aggregazione amiloide dell'amilina e, più recentemente, del peptide Abeta.

**Pubblicazioni più significative nel periodo 2007-2010**

1. Generic cell dysfunction in neurodegenerative disorders: role of surfaces in early protein misfolding, aggregation and aggregate cytotoxicity (M. Stefani) *The Neuroscientist* (2007) 13: 519-31.
2. Protein folding and misfolding. relevance to disease and to biological function (M. Stefani). In "Protein Misfolding in Neurodegenerative Diseases: Mechanisms and Therapeutic strategies" (H. John Smith, Claire Simons and Robert D.E. Sewell Eds.) CRC Press, Taylor & Francis Books, Boca Raton, Florida (2007), pp 1-66.
3. Replicating neuroblastoma cells in different cell-cycle phases display different vulnerability to amyloid toxicity (C. Cecchi, A. Pensalfini, M. Stefani, S. Baglioni, C. Fiorillo, S. Cappadona, R. Caporale, D. Nosi, M. Ruggiero & G. Liguri) *J. Mol. Med.* (2008) 86: 197-209.
4. Seladin-1/dhcr24 protects neuroblastoma cells against  $\alpha\beta$  toxicity by increasing membrane cholesterol content (C. Cecchi, F. Rosati, A. Pensalfini, L. Formigli, D. Nosi, G. Liguri, F. Dichiaro, M. Morello, G. Danza, G. Pieraccini, A. Peri, M. Serio & M. Stefani) *J. Cell. Mol. Med.* (2008) 12: 1990-2002.
5. The (1-63) region of the p53 transactivation domain aggregates *in vitro* into cytotoxic amyloid assemblies (S. Rigacci, M. Bucciantini, A. Relini, A. Pesci, A. Gliozzi, A. Berti & M. Stefani) *Biophys. J.* (2008) 94: 3635-46.
6. Differentiation increases the resistance of neuronal cells to amyloid toxicity (C. Cecchi, A. Pensalfini, G. Liguri, S. Baglioni, C. Fiorillo, S. Guadagna, L. Formigli, D. Nosi & M. Stefani) *Neurochem. Res.* (2008) 33: 2516-2531.

7. Biological function in a non-native partially folded state of a protein. (F. Bemporad, J. Gsponer, H.I. Hopearuoho, G. Plakoutsi, G. Stati, M. Stefani, N. Taddei, M. Vendruscolo & F. Chiti) *EMBO J.* (2008) 27: 1525-35.
8. Generic interaction of pre-fibrillar amyloid aggregates with NMDA and AMPA receptors results in free Ca<sup>2+</sup> increase in primary neuronal cells. (F. Pellistri, M. Bucciantini, A. Relini, A. Gliozzi, M. Robello & M. Stefani) *J. Biol. Chem.* (2008) 283: 29950-29960.
9. Protein folding, misfolding and aggregation on surfaces (M. Stefani) *Int. J. Mol. Sci.* (2008) 9: 2515-2542.
10.  $\beta$ 2-microglobulin is potentially neurotoxic, but the blood brain barrier is likely to protect the brain from its toxicity (S. Giorgetti, S. Raimondi, S. Cassinelli, M. Bucciantini, M. Stefani, G. Gregorini, G. Albonico, R. Moratti, G. Montagna, M. Stoppini & V. Bellotti) *Nephrol. Dial. Transplant.* (2009) 24: 1176-81.
11. Cholesterol in Alzheimer's disease: unresolved questions (M. Stefani & G. Liguri) *Curr. Alz. Res.* (2009) 6: 15-29.
12. Synthetic lipid vesicles recruit native-like aggregates and affect the aggregation process of the prion ure2p; insights on vesicle permeabilization and charge selectivity (L. Pieri, M. Bucciantini, P. Guasti, J. Savistchenko, R. Melki & M. Stefani) *Biophys. J.* (2009) 96:3319-3330.
13. Proteomic analysis of cells exposed to pre-fibrillar aggregates of HypF-N (F. Magherini, L. Pieri, F. Guidi, C. Giangrande, A. Amoresano, M. Bucciantini, M. Stefani & A. Modesti) *Biochim. Biophys. Acta* (2009) 1794:1243-1250.
14. A protective role for lipid raft cholesterol against amyloid-induced membrane damage in human neuroblastoma cells (C. Cecchi, D. Nichino, C. Bernacchioni, A. Pensalfini, M. Zampagni, G. Liguri, A. Gliozzi, M. Stefani & A. Relini) *Biochim. Biophys. Acta* (2009) 1788:2204-2216.
15. Special Issue on Protein Folding and Aggregation. Editorial (M. Stefani) *The Open Biol. J.* (2009) 2:161-162.
16. Oleuropein aglycon prevents cytotoxic amyloid aggregation of human amylin (S. Rigacci, V. Guidotti, M. Bucciantini, M. Parri, C. Nediani, E. Cerbai, M. Stefani & A. Berti) *J. Nutr. Biochem.* (2009) Epub ahead of print.
17. Aberrant protein oligomer structures are causatively linked to cellular dysfunction (S. Campioni, B. Mannini, A. Pensalfini, M. Zampagni, C. Parrini, E. Evangelisti, A. Relini, M. Stefani, C.M. Dobson, C. Cecchi & F. Chiti) *Nat. Chem. Biol.* (2010) 6:140-147.
18. Structural polymorphism of amyloid oligomers and fibrils underlies different fibrillization pathways, immunogenicity and cytotoxicity (M. Stefani) *Curr. Prot. Peptide Sci.* (2010) 11: 343-354.
19. Toxicity in amyloid diseases (M. Stefani). In "Protein misfolding diseases: Current and emerging principles and therapies" (Chris M. Dobson, Jeffery W. Kelly and Marina Ramirez-Alvarado Eds) John Wiley and Sons Inc. (2010) 93-112.
20. Protein aggregation diseases: toxicity of soluble pre-fibrillar aggregates and their clinical significance (M. Stefani) in "METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY Protein Misfolding and cellular Stress in diseases and Ageing" (P. Bross Ed.) Humana Press. (2010) In press.
21. Amyloid polymorphisms: structural basis and significance in biology and molecular medicine (M. Stefani) in "Lipids and Membranes in Amyloid Diseases" (R. Jelinek Ed.) Wiley-VCH Verlag (2010) In press.
22. Amyloid cytotoxicity is contributed by both oligomer/fibril and cell membrane biochemical and biophysical features (M. Stefani) *FEBS J.* (2010) Accepted.

#### **Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni**

Sviluppare le ricerche pubblicate, con particolare riguardo all'effetto di superfici e membrane su folding, misfolding e aggregazione di proteine e utilizzare topi transgenici modello di Alzheimer per verificare l'effettiva efficacia dell'oleuropeina aglicone come sostanze capace di combattere l'insorgere e il progredire della malattia.

#### **Collaborazioni internazionali in atto**

Chris M. Dobson, University of Cambridge  
 Ronald Melki, CNRS, Paris

#### **Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca**

Apparecchiature per spettroscopia proteina (CD, FT-IR, fluorimetro, stopped flow apparatus, DLS)  
 Attrezzature per colture cellulari  
 Microscopio confocale  
 Citofluorimetro a flusso

#### **Parole Chiave**

Folding proteine; Aggregazione proteine; Amiloide; Amiloidosi; Citotossicità

*UNITA' DI RICERCA INBB*  
**Bologna**

**Responsabile Scientifico**

Prof. Vittorio Tomasi

**Linea di Ricerca**

Silenziamento genico mediante impiego di microRNA

*titolo*

Silenziamento del gene cox-2 in tumori del colon

**Composizione del Gruppo**

**Aderenti INBB**

<i>Vittorio Tomasi</i>	<i>PO</i>	<i>Vittorio.tomasi@unibo.it</i>
------------------------	-----------	---------------------------------

**Non Aderenti INBB**

<i>Spisni Enzo</i>	<i>RU</i>	<i>enzo.spisni@unibo.it</i>
<i>Strillacci Antonio</i>	<i>BC</i>	<i>Antonio.strillacci@unibo.it</i>
<i>Lazzarini Giorgia</i>	<i>DR</i>	<i>Giorgia.lazzarini@unibo.it</i>

**Sede Unità di Ricerca**

*Dipartimento di Biologia Sperimentale*

*Indirizzo via selmi 3 40126 Bologna*

*Telefono 0512094147*

*Fax 0512094286*

*E-mail vittorio.tomasi@unibo.it*

**Sezione INBB di appartenenza**

Bologna

**Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni**

*Obiettivi*

*Interferenti endocrini attivi sul recettore degli estrogeni (er-alfa) e ruolo dei microdomini di membrana sulla regolazione della trasduzione del segnale attivata da ligandi cellulari*

In precedenti ricerche presso il laboratorio di Fisiologia del Dipartimento di biologia dell'Università di Bologna, è stato confermato il dato della letteratura riguardante la presenza del recettore degli estrogeni (ER-alfa) a livello di caveole di cellule endoteliali. Questo dato ci ha permesso di determinare, mediante tecniche di polarizzazione della fluorescenza, la costante di affinità per un gruppo di policlorobifenili (PCB) abbondanti nel sangue di individui sani. Inoltre è stato possibile stabilire se un PCB tende ad essere un agonista o un antagonista recettoriale (Guarnieri et al 2006). Queste ricerche stanno proseguendo alla luce di un progetto multicentrico e multidisciplinare rivolto a determinare non solo il proteoma di caveole, ma anche la variazione del proteoma in seguito ad attivazione del sistema caveolare. A questo proposito gli esperimenti saranno effettuati secondo le seguenti linee:

- a) Identificazione dei partners di ER-alfa mediante tecniche di interazione proteina-proteina utilizzando sistemi del tipo BIA-core.
- b) Definizione delle proteine che vengono reclutate a livello caveolare in seguito ad attivazione di ER-alfa e loro possibile purificazione mediante ProteomeLab.
- c) Effetto del knock-down di ER-alfa mediante impiego della tecnologia siRNA o microRNA utilizzando vettori virali specifici (Strillacci et al., Br J Cancer 2006, J Pathol. Submitted). Questo approccio consente di valutare l'effetto della soppressione di un componente del sistema di trasduzione del segnale sul reclutamento di proteine citosoliche.

Silenziamento del gene cox-2 i tumori del colon

In seguito alla identificazione di un microRNA (mir101) selettivo per il gene cox-2 sono stati iniziati esperimenti volti a chiarire i seguenti punti:

- A) Esiste una correlazione fra il silenziamento del gene e la progressione tumorale?
- B) La super espressione della cicloossigenasi 2 di cellule di tumore del colon è dovuta ad una soppressione del mir101?
- C) La somministrazione di mir101 può essere ottimizzata utilizzando cellule di E. Coli ingegnerizzate?

*Risultati ottenuti*

In un lavoro del 2006 (Strillacci et all. Br J Cancer) era stato dimostrato che l'utilizzo di siRNA era una strategia efficace per provocare una riduzione nella super espressione di cox-2 in cellule di tumore al colon. Questi studi sono proseguiti e nel 2009 (Strillacci et all. EXP Cell Res) è stato individuato un microRNA (mir101) molto efficace nel normalizzare la super espressione di cox-2 in cellule di tumore del colon. L'effetto sembra esercitarsi non tanto sulla proliferazione cellulare ma soprattutto sull'invasività delle cellule. Abbiamo quindi proposto che il mir101 potrebbe

essere un buon inibitore della metastatizzazione dei tumori del colon. Nel 2010 è stato pubblicato un lavoro su Br J Cancer in cui è stato dimostrato che l'impiego di cellule ingegnerizzate di E. Coli contenenti il vettore mir101 è in grado di produrre in vitro effetti anti metastatico delle cellule dei tumori del colon. Sono in corso esperimenti per valutare l'effetto di questa strategia in vivo su animali portatori di tumore.

#### **Pubblicazioni più significative nel periodo 207-2010**

1) Selective cyclooxygenase-2 silencing mediated by engineered E. coli and RNA interference induces anti-tumour effects in human colon cancer cells.

Strillacci A, Griffoni C, Lazzarini G, Valerii MC, Di Molfetta S, Rizzello F, Campieri M, Moyer MP, Tomasi V, Spisni E.

Br J Cancer. 2010 Aug 17. [Epub ahead of print]PMID: 20717114

2) RNAi-based strategies for cyclooxygenase-2 inhibition in cancer.

Strillacci A, Griffoni C, Valerii MC, Lazzarini G, Tomasi V, Spisni E.

J Biomed Biotechnol. 2010;2010:828045. Epub 2010 Jun 13.

3) Effect of copper on extracellular levels of key pro-inflammatory molecules in hypothalamic GN11 and primary neurons.

Spisni E, Valerii MC, Manerba M, Strillacci A, Polazzi E, Mattia T, Griffoni C, Tomasi V.

Neurotoxicology. 2009 Jul;30(4):605-12. Epub 2009 Apr 1.PMID: 19635393

4) MiR-101 downregulation is involved in cyclooxygenase-2 overexpression in human colon cancer cells.

Strillacci A, Griffoni C, Sansone P, Paterini P, Piazzini G, Lazzarini G, Spisni E, Pantaleo MA, Biasco G, Tomasi V.

Exp Cell Res. 2009 May 1;315(8):1439-47. Epub 2008 Dec 24.PMID: 19133256

6) Licofelone, a dual COX/5-LOX inhibitor, induces apoptosis in HCA-7 colon cancer cells through the mitochondrial pathway independently from its ability to affect the arachidonic acid cascade.

Tavolari S, Bonafè M, Marini M, Ferreri C, Bartolini G, Brighenti E, Manara S, Tomasi V, Laufer S, Guarnieri T.

Carcinogenesis. 2008 Feb;29(2):371-80. Epub 2007 Nov 21.PMID:

7) Cellular prion protein and caveolin-1 interaction in a neuronal cell line precedes Fyn/Erk 1/2 signal transduction.

Toni M, Spisni E, Griffoni C, Santi S, Riccio M, Lenaz P, Tomasi V.

J Biomed Biotechnol. 2006;2006(5):1-13.

8) Selective inhibition of prostacyclin synthase activity by rofecoxib.

Griffoni C, Spisni E, Strillacci A, Toni M, Bachschmid MM, Tomasi V.

J Cell Mol Med. 2007 Mar-Apr;11(2):327-38.PMID: 17488481

#### **Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni**

Le ricerche sono dirette a utilizzare l' E. Coli ingegnerizzato o altri vettori in vivo per verificare l'effetto del silenziamento del gene cox-2 sulla metastatizzazione dei tumori del colon.

#### **Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca**

Presso il Dipartimento di Biologia dell'Università di Bologna è stato creato un laboratorio di proteomica dotato dei seguenti strumenti:

a) Pharos a laser per DIGE BIO-RAD.

b) Spot Cutter BIO-RAD.

c) ProteomeLab della Beckman.

d) Bio-Plex BIO-RAD.

e) RT-PCR

f) Attrezzature per le colture cellulari

Inoltre il laboratorio è connesso con il centro CRB, che gestisce un sistema PROTEON e due spettrometri di massa. Questa strumentazione ci permette di effettuare studi nel campo della proteomica di membrana e preparativa secondo il protocollo allegato (proteome discovery).

#### **Parole Chiave**

Cicloossigenasi 2 ; Proteomica; Tumori del colon; Silenziamento genico

UNITA' DI RICERCA INBB:  
*Laboratorio di Biologia Molecolare e Bioingegneria delle Cellule Staminali*  
BOLOGNA

**Responsabile Scientifico:**

Prof. Carlo Ventura

**Linea di Ricerca:** cellule staminali nelle malattie cardiovascolari, rimodellamento del tessuto cardiaco, studio molecolare dell'ipertensione arteriosa polmonare.

**Composizione del Gruppo**

**Aderenti INBB**

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

**Sede Unità di Ricerca**

Indirizzo: Via Massarenti 9, 40138, Bologna, presso Dipartimento Cardiovascolare dell'Università di Bologna

Telefono: 051-340339

Fax: 051-340339

E-mail: cvent@libero.it

**Sezione INBB di appartenenza:**

Bologna

**Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni**

**Obiettivi**

Diverse problematiche legate all'isolamento, alla manipolazione e al differenziamento delle cellule staminali adulte, comportano un ritardo rilevante nel trapianto di questi elementi rispetto all'insorgenza del danno miocardico. A seguito di ciò, si è cercato di capire se molecole a logica differenziativa (esteri misti dell'acido ialuronico, butirrico e retinoico, **HBR**) siano in grado di migliorare la sopravvivenza del miocardio infartuato *in vivo*. Abbiamo, inoltre, isolato cellule staminali mesenchimali da una fonte alternativa quale il tessuto adiposo (**ADSC**).

**Risultati ottenuti**

**HBR-** Mediante analisi funzionali (PET e MR) e di immunistochemical, abbiamo dimostrato come in seguito ad iniezione diretta di HBR nel miocardio di ratti sottoposti ad infarto sperimentale, la molecola era in grado di attivare risposte angiogenetiche ed antiapoptotiche intrinseche al tessuto. L'ambiente ostile del tessuto ischemico veniva trasformato da HBR in un "contesto" più incline al reclutamento di cellule staminali endogene (Stro-1+), aumentando la densità capillare, ripristinando un normale assetto metabolico e diminuendo il numero di cardiomiociti apoptotici. In cardiomiociti isolati e in cellule Stro-1+, HBR aumentava la trascrizione di VEGF, HGF, KDR, Akt e Pim-1, assieme alla secrezione di VEGF e HGF. Un incremento della capillarogenesi era indotto *in vitro* con un mezzo di coltura ottenuto da cellule esposte ad HBR. Un'efficiente riparazione cardiovascolare può essere, quindi, ottenuta con HBR senza dover ricorrere ad un immediato trapianto di cellule staminali.

**ADSC-** Cellule mesenchimali isolate da tessuto adiposo, dopo la caratterizzazione, sono state trattate con HBR. Le cellule dopo 7 e 14 giorni, mostrano un'aumentata espressione dei geni cardio-vascolari GATA-4, VEGF e KDR. L'analisi immunofluorescenza mostrava che le cellule esprimono sia Cx-43 e  $\alpha$ -SMA, marker di differenziamento cardiaco, sia vWF e CD31, marker endoteliali. L'analisi con multiplex dei surnatanti delle ADSC trattate mostra un'aumentata espressione di numerose citochine coinvolte nell'angiogenesi e nel riparo tissutale. HBR è inoltre in grado di indurre vasculogenesi in Matrigel.

## **Pubblicazioni più significative nel periodo 2007-2010**

### Tutte con affiliazione al consorzio

1- 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, Ventura C. J Biol Chem. 2010 Mar 26;285(13):9949-9961.

2- Cardiomyocyte proliferation: paving the way for cardiac regenerative medicine without stem cell transplantation. Ventura C. Cardiovasc Res. 2010 Mar 1;85(4):643-644.

3- Future perspectives for the treatment of pulmonary arterial hypertension. Ghofrani HA, Barst RJ, Benza RL, Champion HC, Fagan KA, Grimminger F, Humbert M, Simonneau G, Stewart DJ, Ventura C, Rubin LJ. J Am Coll Cardiol. 2009 Jun 30;54(1 Suppl):S108-17.

4- Stem cells and cardiovascular repair: a role for natural and synthetic molecules harboring differentiating and paracrine logics. Ventura C, Cavallini C, Bianchi F, Cantoni S. Cardiovasc Hematol Agents Med Chem. 2008 Jan;6(1):60-68.

5- Creating prodynorphin-expressing stem cells alerted for a high-throughput of cardiogenic commitment. Maioli M, Asara Y, Pintus A, Ninniri S, Bettuzzi S, Scaltriti M, Galimi F, Ventura C. Regen Med. 2007 Mar;2(2):193-202.

6- Hyaluronan mixed esters of butyric and retinoic Acid drive cardiac and endothelial fate in term placenta human mesenchymal stem cells and enhance cardiac repair in infarcted rat hearts. Ventura C, Cantoni S, Bianchi F, Lionetti V, Cavallini C, Scarlata I, Foroni L, Maioli M, Bonsi L, Alviano F, Fossati V, Bagnara GP, Pasquinelli G, Recchia FA, Perbellini A. J Biol Chem. 2007 May 11;282(19):14243-14252.

7- Term Amniotic membrane is a high throughput source for multipotent Mesenchymal Stem Cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro. Alviano F, Fossati V, Marchionni C, Arpinati M, Bonsi L, Franchina M, Lanzoni G, Cantoni S, Cavallini C, Bianchi F, Tazzari PL, Pasquinelli G, Foroni L, Ventura C, Grossi A, Bagnara GP. BMC Dev Biol. 2007 Feb 21;7:11.

### **Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni**

Abbiamo mostrato come molecole di sintesi quali HBR possano migliorare la funzionalità cardiaca attraverso un'umentata sopravvivenza cellulare, favorendo l'attecchimento di cellule staminali, sia endogene sia esogene. Obiettivi futuri sono sia l'analisi della qualità delle cellule staminali isolate da fonti alternative, sia migliorare la capacità differenziativa di queste, mediante l'uso di molecole di sintesi. Inoltre l'analisi molecolare delle dinamiche innescate dall'HBR potrà anche essere utilizzata per migliorare la comprensione dei meccanismi di trasduzione molecolare del segnale che sottendono ad un orientamento differenziativo e paracrino delle cellule staminali.

### **Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca**

- 1 Real time PCR (LightCycler Roche) e 1 PCR
- 2 Cappe a flusso laminare per colture cellulari
- 2 incubatori a CO<sub>2</sub>
- 1 Microscopio dritto e 1 rovesciato equipaggiati anche con fluorescenza
- 1 Fotocamera digitale

### **Parole Chiave**

Cellule staminali mesenchimali  
Riparo cardiovascolare  
Molecole a logica differenziativa

*UNITA' DI RICERCA INBB  
Udine*

**Responsabile Scientifico**

Prof. Paolo Viglino

**Linea di Ricerca**

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

**Composizione del Gruppo**

**Aderenti INBB**

<i>Viglino Paolo</i>	<i>PO</i>	<i>paolo.viglino@uniud.it</i>
<i>Esposito Gennaro</i>	<i>PA</i>	<i>gennaro.esposito@uniud.it</i>
<i>Fogolari Federico</i>	<i>PA</i>	<i>federico.fogolari@uniud.it</i>
<i>Corazza Alessandra</i>	<i>RU</i>	<i>alessandra.corazza@uniud.it</i>

**Non Aderenti INBB**

<i>Codutti Luca</i>	<i>BC</i>	<i>luca.codutti@uniud.it</i>
<i>Renella Enrico</i>	<i>BC</i>	<i>enrico.renella@uniud.it</i>
<i>Cinzia Barbato</i>	<i>DR</i>	<i>cinzia.barbato@uniud.it</i>
<i>Haritha Haridas</i>	<i>DR</i>	<i>haritha.haridas@uniud.it</i>
<i>Matteo Rotter</i>	<i>DR</i>	<i>matteo.rotter@uniud.it</i>
<i>Polano Maurizio</i>	<i>BC</i>	<i>maurizio.polano@uniud.it</i>

**Sede Unità di Ricerca**

*Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche*

*Indirizzo Piazzale Kolbe 4*

*Telefono ...0432-494302*

*Fax ...0432-494301*

*E-mail paolo.viglino@uniud.it*

**Sezione INBB di appartenenza**

Udine

**Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni**

*Obiettivi*

***Studi di proteine amiloidogeniche***

Ad Udine, da più di dieci anni, effettuiamo esperimenti su proteine amiloidogene. In particolare abbiamo focalizzato i nostri studi sulla  $\beta 2$ -microglobulina umana ( $\beta 2m$ ), una proteina di 99 residui amminoacidici responsabile dell'amiloidosi da dialisi (DRA), patologia progressiva che si presenta in pazienti sottoposti a dialisi per lunghi periodi di tempo. La DRA si verifica come una conseguenza dell'aumentata concentrazione di  $\beta 2m$  nel siero e porta all'accumulo di depositi fibrillari nel sistema muscolo-scheletrico, in particolare nelle giunture la cui funzionalità risulta seriamente compromessa.

I nostri studi sono partiti dalla caratterizzazione strutturale della proteina nella forma monomeric, composta da 99 residui amminoacidici organizzati spazialmente in un fold immunoglobulinico composto da sette foglietti beta ordinati in due fogli uniti da un ponte disolfuro, e si sono sviluppati nel tentativo di comprendere i meccanismi biochimici e biofisici dei processi di folding e di aggregazione della  $\beta 2m$ .

***Studi di fattori di trascrizione***

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



*Risultati ottenuti*

### **Proteine amiloidogeniche**

Il nostro gruppo, utilizzando le tecniche di risonanza magnetica, ha studiato a fondo le proprietà strutturali della  $\beta_2$ -microglobulina ( $\beta_2m$ ) e dei loro derivati troncati o mutati individuando le zone della molecola maggiormente coinvolte nel processo di formazione della fibrilla e fornendo un possibile meccanismo di aggregazione di tipo. Oltre a studi prettamente strutturali sono in corso una ricerca che ci ha permesso di ottenere informazioni sulla dinamica della  $\beta_2m$  e di alcuni mutanti con differenti caratteristiche dal punto di vista della amiloidogenicità. Inoltre abbiamo anche realizzato lo studio degli intermedi di refolding con tecniche bidimensionali SOFAST che ci ha permesso di individuare un nuovo intermedio finora ignoto.

Altri studi stanno procedendo su aggregazione e fibrillogenesi di  $\beta_2m$  in funzione di  $\alpha$ -cristallina e di piccoli ligandi tetraciclinici, rispettivamente, mentre nuovi ed interessanti aspetti derivano dall'interazione di  $\beta_2m$  con minianticorpi da camelidi (nanobody) che potrebbero fornire un mezzo di controllo della proteina di estrema sofisticazione. Aumentare la complessità del sistema per esplorare le conseguenze di alte concentrazioni di polisaccaridi, proteine ed ambienti idrofobici appare lo sviluppo logico del lavoro pregresso

### **Fattori di trascrizione**

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

### **Pubblicazioni più significative nel periodo 2007-2010**

1. Fogolari F, Corazza A, Viglino P, Zuccato P, Pieri L, Faccioli P, Bellotti V, Esposito G. "Molecular dynamics simulation suggests possible interaction patterns at early steps of beta2- microglobulin aggregation" (2007) *Biophys. J.* 92, 1673-81.
2. Gümral D, Nadalin L, Corazza A, Fogolari F, Damante G, Viglino P, Esposito G. "Helix mobility and recognition function of the rat thyroid transcription factor 1 homeodomain - hints from (15)N-NMR relaxation studies." (2008) *FEBS J.* 275, 435-48.
3. Esposito G, Ricagno S, Corazza A, Rennella E, Gümral D, Mimmi MC, Betto E, Pucillo CE, Fogolari F, Viglino P, Raimondi S, Giorgetti S, Bolognesi B, Merlini G, Stoppini M, Bolognesi M, Bellotti V. (2008) *J Mol Biol.* 378, 885-95.
4. Verdone G, Doliana R, Corazza A, Colebrooke SA, Spessotto P, Bot S, Bucciotti F, Capuano A, Silvestri A, Viglino P, Campbell ID, Colombatti A, Esposito G. "The solution structure of EMILIN1 globular C1q domain reveals a disordered insertion necessary for interaction with the alpha4beta1 integrin." (2008) *J Biol Chem.* 283, 18947-56.
5. Codutti L, van Ingen H, Vascotto C, Fogolari F, Corazza A, Tell G, Quadrioglio F, Viglino P, Boelens R and Esposito G. "Solution Structure of Human Pax-8 Paired Box Domain: predefined HTH motifs in the unbound state" (2008) *J. Biol. Chem.* J. Biol. Chem. 283, 33321-33328.
6. Rennella E, Corazza A, Fogolari F, Viglino P, Giorgetti S, Stoppini M, Bellotti V and Esposito G. "Analysis of the equilibrium unfolding thermodynamics of b2-microglobulin through native-state H/D exchange" (2009) *Biophys. J.* 96, 1, 169-179.
7. Verdone G, Corazza A, Colebrooke SA, Cicero D, Eliseo T, Boyd J, Doliana R, Fogolari F, Viglino P, Colombattia A, Campbell ID, and Esposito G. "NMR-based homology model for the solution structure of the C-terminal globular domain of EMILIN1" (2009) *J. Biomol NMR* 43, 79-96.
8. Codutti L, Picotti P, Marin O, Dewilde S, Fogolari F, Corazza A, Viglino P, Moens L, Esposito G, Fontana A. "Conformational stability of neuroglobin helix F - possible effects on the folding pathway within the globin family." (2009) *FEBS J.* 276, 5177-90.
9. Fogolari F, Haridas H, Corazza A, Viglino P, Corà D, Caselle M, Esposito G, Xodo LE. "Molecular models for intrastrand DNA G-quadruplexes." (2009) *BMC Struct Biol.* 9:64.
10. Corazza A, Rennella E, P. Schanda, M.C. Mimmi, T. Cutuil, S. Raimondi, S. Giorgetti, F. Fogolari, P. Viglino, L. Frydman, M. Gal, V. Bellotti, B. Brutscher & G. Esposito "Native-unlike long-lived intermediates along the folding pathway of the amyloidogenic protein  $\beta_2$ -microglobulin revealed by real time 2D NMR" (2010) *J Biol Chem.* 285, 5827-35.

11. Pagano K, Bemporad F, Fogolari F, Esposito G, Viglino P, Chiti F and Corazza A “Structural and dynamics characteristics of Acylphosphatase from *Sulfolobus solfataricus* in the monomeric state and in the initial native-like aggregates” (2010) *J Biol Chem.* 285, 14689-700.
12. Rennella E, Corazza A, Giorgetti S, Fogolari F, Viglino P, Porcari R, Stoppini M, Bellotti V and Esposito G “Folding and fibrillogenesis: clues from  $\beta$ 2-microglobulin” (2010) *J Mol Biol* Jun 15. [Epub ahead of print]

### **Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni**

#### ***Proteine amiloidogeniche***

Sarà affrontato il ruolo del crowding molecolare nei fenomeni di aggregazione e la formazione di amiloide. L'affollamento molecolare può rivestire un ruolo particolarmente importante nel caso di  $\beta$ 2m, rispetto ad altre proteine amiloidogeniche in quanto la proteina è stabile a valori neutri di pH e non sono necessarie modificazioni chimiche, quali mutazioni o troncamenti della proteina per indurre la formazione di fibrille

#### ***Fattori di trascrizione***

Pax 8, la cui struttura in soluzione è stata determinata dal nostro gruppo, è formata da due domini denominati Pai e Red collegati da una regione di 20 amminoacidi non strutturata. Il ruolo del due domini e della regione centrale nel legame al DNA sarà ulteriormente studiato per via NMR andando ad esprimere marcatori al  $^{15}\text{N}$  e  $^{13}\text{C}$  separatamente i due domini (Pai e linker-Red) separatamente.

### **Collaborazioni internazionali in atto**

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

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

### **Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca**

Spettrometro NMR Bruker operante a 500 MHz sul  $^1\text{H}$  dotato di probe con gradienti di campo.  
Spettrometro di massa Applied Biosystem Q-star  
Sistema per micro HPLC Agilent  
3 stazioni grafiche Sgi per l'analisi dei dati NMR e per calcoli di meccanica e dinamica molecolare:  
1) Octane, 2) O<sub>2</sub>, 3) Indigo  
rete di PC Linux per un totale di oltre 64 processori.

### **Parole Chiave**

Amiloidosi,  $\beta$ 2-microglobulina, acilfosfatasi, NMR, struttura di proteine, folding proteico, misfolding proteico, fattori di trascrizione

*UNITA' DI RICERCA INBB  
Milano-Napoli*

**Responsabile Scientifico**

Prof. Giovanni Vitale

**Linea di Ricerca**

Ruolo dei PPAR- $\gamma$  agonisti nel potenziamento dell'attività antitumorale dell'interferone (IFN)- $\beta$

**Composizione del Gruppo**

**Aderenti INBB**

<i>Michele Caraglia</i>	<i>RU</i>	<i>Michele.caraglia@unina2.it</i>
<i>Abbruzzese Alberto</i>	<i>PO</i>	<i>Alberto.abbruzzese@unina2.it</i>

**Non Aderenti INBB**

<i>Dicitore Alessandra</i>	<i>BC</i>	<i>dicitore@libero.it</i>
<i>Castiglioni Sara</i>	<i>BC</i>	<i>Castiglioni@libero.it</i>
<i>Marra Monica</i>	<i>BC</i>	<i>mncmarra@yahoo.it</i>
<i>Zappavigna Silvia</i>	<i>BC</i>	<i>Silvia.zappa@libero.it</i>
<i>Misso Gabriella</i>	<i>DR</i>	<i>Gabriella.misso@unina2.it</i>
<i>Gaia Giuberti</i>	<i>BC</i>	<i>Gaia.giuberti@unina2.it</i>
<i>Lombardi Angela</i>	<i>DR</i>	<i>Angela.lombardi@unina2.it</i>

**Sede Unità di Ricerca**

*Indirizzo*

- Istituto Auxologico Italiano – Università degli Studi di Milano. Via Zucchi 18 Cusano Milanino (MI) 20095 Italy

- Dipartimento di Biochimica e Biofisica, Seconda Università di Napoli, Via Costantinopoli, 16 80138 Napoli

*Telefono* 02619112023

*Fax* 02619113033

*E-mail* giovanni.vitale@unimi.it

**Sezione INBB di appartenenza**

Milano

**Riassunto dell'attività svolta negli ultimi tre anni**

*Obiettivi*

Valutare in linee cellulari di adenocarcinoma del pancreas e tumori neuroendocrini:

1. La tipizzazione per i recettori degli IFNi di tipo I e per il PPAR- $\gamma$ .
2. L'effetto antitumorale degli IFNi di tipo I e PPAR- $\gamma$  agonisti.
3. Un potenziamento dell'attività antitumorale dell'IFN- $\beta$  da parte dei PPAR- $\gamma$  agonisti.
4. I meccanismi molecolari alla base dell'interazione sinergica tra IFN- $\beta$  e PPAR- $\gamma$  agonisti.

*Risultati ottenuti*

1. Sono state caratterizzate numerose linee di adenocarcinoma del pancreas (BxPC-3, MiaPaCa-2 e Panc-1) e tumori neuroendocrini (BON, TT, colture primarie di adenomi ipofisari e tumori del surrene) per l'espressione del recettore per gli interferoni (IFNi) di tipo I e del PPAR- $\gamma$ .
2. Abbiamo identificato un notevole effetto antitumorale da parte dell'IFN- $\beta$  e dei PPAR- $\gamma$  agonisti (troglitazone e rosiglitazone).
3. Nelle BxPC3 l'analisi dei dati con il software dedicato Calculusyn ha evidenziato un effetto sinergico antiproliferativo usando dosi equitossiche di IFN- $\beta$  e troglitazone. L'attività sinergica dei due farmaci è mediata dall'arresto del ciclo cellulare (blocco della transizione G1-S), come risulta dall'analisi del ciclo cellulare mediante FACS dopo marcatura con ioduro di propidio.

### **Pubblicazioni più significative nel periodo 2007-2010**

1. Delhanty PJD, van Koetsveld PM, Gauna C, van de Zande B, Vitale G, Hofland LJ, van der Lely AJ. Ghrelin and its unacylated isoform stimulate the growth of adrenocortical tumor cells via an anti-apoptotic pathway. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 2007 293(1):E302-9. [IF 2008: 3.855]
2. Vitale G, van Eijck CH, van Koetsveld PM, Erdmann J, Speel EJ, van der Wansem K, Mooij DM, Colao A, Lombardi G, Croze E, Lamberts SWJ, Hofland LJ. Type I Interferons in the Treatment of Pancreatic Cancer. Mechanisms of Action and Role of Related Receptors. *Annals of Surgery* 2007;246:259-68. [IF 2008: 8.460]
3. Vitale G, Galderisi M, Colao A, Innelli P, Guerra G, Guerra E, Dini FL, Orio F Jr, Soscia A, de Divitiis O, Lombardi G. Circulating insulin-like growth factor-I levels are associated with increased biventricular contractility in top level rowers. *Clinical Endocrinology* 2008;69(2):231-6. [IF 2008: 3.398]
4. Colao A, Di Somma C, Cascella T, Pivonello R, Vitale G, Grasso L, Lombardi G, Savastano S. Relationships between serum insulin-like growth factor-I levels, blood pressure and glucose tolerance: an observational, exploratory study in 404 subjects. *European Journal of Endocrinology* 2008; 159:389-97. [IF 2008: 3.791]
5. Marra M, Lombardi A, Agostinelli E, Giuberti G, Zappavigna S, Tempera G, Vitale G, Bifulco M, Abbruzzese A, Caraglia M. Bovine serum amine oxidase and spm potentiate docetaxel and interferon- $\alpha$  effects in inducing apoptosis on human cancer cells through the generation of oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Cell Research* 2008; 1783:2269-2278. [IF 2008: 4.893]
6. Vitale G, Caraglia M, van Koetsveld PM, Maroni P, Marra M, Colao A, Lamberts SW, Cavagnini F, Hofland LJ. Potential role of type I interferons in the treatment of pituitary adenomas. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders* 2009; 10:125-133 [Epub ahead of print, 2008 Jul 6] [IF 2008: 4.719]
7. Vitale G, van Koetsveld PM, de Herder WW, van der Wansem K, Janssen JA, Colao A, Lombardi G, Lamberts SW, Hofland LJ. Effects of type I interferons on IGF-mediated autocrine/paracrine growth of human neuroendocrine tumor cells. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 2009; 296(3):E559-66. [IF 2008: 3.855]
8. Vitale G, Gentilini D, Abbruzzese A, Caraglia M. Pyk2 and Cyr61 at the cross-road of cAMP-dependent signalling in invasiveness and neuroendocrine differentiation of prostate cancer. *Cancer Biology & Therapy* 2009; 8(3):243-244. [IF 2008: 2.761]
9. Vitale G, Abbruzzese A, Tonini G, Santini D. Chemo-immunotherapy: A new option for non-small cell lung cancer. *Cancer Biology & Therapy* 2009; 8(6):503-504. [IF 2008: 2.761]
10. Caraglia M, Marra M, Tagliaferri P, Lamberts SWJ, Zappavigna S, Misso G, Cavagnini F, Facchini G, Abbruzzese A, Hofland LJ, Vitale G. Emerging strategies to strengthen the anti-tumour activity of type I IFNs: overcoming survival pathways. *Current Cancer Drug Targets* 2009; 9(5):690-704. [IF 2008: 4.316]
11. Vitale G, Dicitore A, Mari D, Cavagnini F. A new therapeutic strategy against cancer: cAMP elevating drugs and leptin. *Cancer Biology & Therapy* 2009; 8:1191-3. [IF 2008: 2.761]
12. Marra M, Giudice A, Arra C, Vitale G, Castiglioni S, Nasti G, Lombardi A, Ottaiano A, Facchini G, Iaffaioli RV, Abbruzzese A, Caraglia M. Target-based agents in neo-adjuvant treatment of liver metastases from colo-rectal cancer: Secret weapons in anti-cancer war? *Cancer Biology & Therapy* 2009;8(18): 1709-18. [IF 2008: 2.761]

### **Prospettive ed obiettivi per i prossimi tre anni**

- Analisi dei meccanismi coinvolti nell'interazione sinergica antitumorale tra l'IFN- $\beta$  ed i PPAR- $\gamma$  agonisti
- Effetti dell'IFN- $\beta$  ed PPAR- $\gamma$  agonisti sul profilo di metilazione delle neoplasie endocrine ed adenocarcinoma del pancreas.
- Sviluppo preclinico di combinazioni farmacologiche tra PPAR- $\gamma$  agonisti e IFN- $\beta$ .

### **Collaborazioni internazionali in atto**

- Leo Hofland, Department of Internal Medicine, Division of Endocrinology, Erasmus Medical Center, Rotterdam, The Netherlands.

### **Principali attrezzature di cui dispone l'Unità di Ricerca**

- Appareti per elettroforesi e western blot – Cell culture facility – Citofluorimetro a tre fluorescenze (FACScan B&D)-
- Appareto per analisi del metiloma.

### **Parole Chiave**

Interferoni di tipo I - PPAR- $\gamma$  agonisti - Tumori neuroendocrini - Adenocarcinoma del pancreas