

**CONSORZIO INTERUNIVERSITARIO**

***Istituto Nazionale  
Biostrutture e Biosistemi***

**VI CONVEGNO NAZIONALE**

***NAPOLI, 4-6 NOVEMBRE 2004***

***CHIESA DELLA CROCE DI LUCCA  
NAPOLI***

## ***VI CONVEGNO NAZIONALE I.N.B.B.***

### ***Comitato Scientifico***

Alberto Cangiano

Gaetano Irace

Marco Mascini

Edon Melloni

Damiano Gustavo Mita

Riccardo Pierantoni

Vittorio Tomasi

### ***Comitato Organizzatore***

Gaetano Irace

Riccardo Pierantoni

Liberato Berrino

Paolo Occhialini

Lucia Occhioni

Cristiana Citton

### ***Segreteria Organizzativa***

I.N.B.B.

Viale delle Medaglie D'Oro, 305

00136 Roma

Tel 06/35340153 Fax. 06/35451637

[inbbamm@inbb.it](mailto:inbbamm@inbb.it)

[www.inbb.it](http://www.inbb.it)

## **ORGANI DEL CONSORZIO I.N.B.B.**

### **Presidente INBB**

Prof. Damiano Gustavo Mita

### **Direttore INBB**

Dott. Paolo Occhialini

### **Consiglio Direttivo INBB**

Prof. Antonio Cambria  
Prof. Alberto Cangiano  
Prof.ssa Rita Casadio  
Prof. Carlo Di Benedetto  
Prof. Carlo Frediani  
Prof. Leonardo Gaspa  
Prof. Gaetano Irace  
Prof. Giulio Magni  
Prof. Marco Mascini  
Prof. Edon Melloni  
Prof. Damiano Gustavo Mita  
Prof. Claudio Nicolini  
Dott. Paolo Occhialini  
Prof. Riccardo Pierantoni  
Prof. Adelio Rigo  
Prof. Luigi Rossi  
Prof. Giuseppe Rotilio  
Prof. Vittorio Tomasi  
Prof. Paolo Viglino

### **Giunta Esecutiva INBB**

Prof. Carlo Di Benedetto  
Prof. Marco Mascini  
Prof. Edon Melloni  
Prof. Damiano Gustavo Mita  
Dott. Paolo Occhialini  
Prof. Riccardo Pierantoni  
Prof. Vittorio Tomasi  
Prof. Paolo Viglino

### **Laboratorio Nazionale**

*Direttore*

Prof. Leonardo Gaspa

*Resp. Sez. Med. Sperimentale  
e Terapia Genica*

Prof. Paolo Madeddu

### **Collegio dei Revisori**

Dott.ssa Liana Meucci  
Dott.ssa Daniela Procaccia  
Dott.ssa Marina Tesauro

## *INDICE*

<i>Programma VI Convegno Nazionale</i>	<i>Pag. 5</i>
<i>Relazione introduttiva del Presidente Prof. D.G. Mita</i>	<i>Pag. 8</i>
<i>Abstract comunicazioni</i>	<i>Pag. 13</i>
<i>Abstract poster</i>	<i>Pag. 55</i>
<i>Unità di Ricerca INBB</i>	<i>Pag. 103</i>

Si ringrazia vivamente per il contributo alla realizzazione del Convegno:  
l'Assessorato all'Università, Ricerca ed Innovazione Tecnologica della Regione Campania, il Comune di Napoli,  
la Seconda Università di Napoli, il Centro Regionale di Competenza in Biotecnologie Industriali.

**VI CONVEGNO NAZIONALE I.N.B.B.**  
**Programma**

**GIOVEDÌ 4 NOVEMBRE**

- h. 9,30 Registrazione dei partecipanti
- h. 10,30 Apertura dei Lavori  
PROF. FRANCESCO ROSSI (*Preside Facoltà Medicina e Chirurgia II Università di Napoli*)  
PROF. ANTONIO GRELLA (*Rettore II Università di Napoli*)  
PROF. GUIDO TROMBETTI (*Rettore Università di Napoli "Federico II"*)  
PROF. LUIGI NICOLAIS (*Assessore Università e Ricerca della Regione Campania*)

- h. 11,00 Introduzione  
PROF. DAMIANO GUSTAVO MITA (*Presidente INBB*)

- h. 11,30 – 13,30 Tavola Rotonda  
“*Ricerca scientifica e sistema produttivo: priorità per il paese e scelte di investimento*”

**Coordina:**

DOTT. PAOLO OCCHIALINI (*Direttore INBB*)

**Intervengono:**

DOTT. PAOLO ANNUNZIATO (*Confindustria*)  
SEN. GIUGLIEMO CASTAGNETTI (*Resp. Ricerca FI*)  
DOTT. FABRIZIO COBIS (*Dirigente MIUR*)  
PROF. FRANCO CUCCURULLO (*Presidente CIVR*)  
PROF. ENRICO GARACI (*Presidente ISS*)  
PROF. ROBERTO GRADNIK (*Presidente Assobiotec*)  
PROF. MAURO MAGNANI (*Pres. Consorzio Interuniversitario Biotecnologie*)  
ON. WALTER TOCCI (*Resp. Ricerca ed Innovazione DS*)  
DOTT. FRANCESCO ZECCA (*Dirigente MIPAF*)

**Conclude:**

PROF. LUIGI NICOLAIS (*Ass. Ricerca Scientifica Reg. Campania*)

- h. 13,30 **Buffet**

- h. 15,30 – 17,00 **Sessione “Biostrumentazione e Bioelettronica”**  
Chairman: PROF. MARCO MASCINI

PROF. GENNARO MARINO - Università di Napoli “Federico II” - “*Mass spectrometry in structural proteomics*”;  
PROF. ROBERTO RAITERI – Università di Genova. - “*Array di biosensori basati su microtravi in silicio per applicazioni in genomica e proteomica*”;  
PROF.SSA DANILA MOSCONE – Università di Roma “Tor Vergata”. - “*Microdialysis and biosensors: the in vivo monitoring of glucose and lactate through the Glucoday®*”  
PROF. NERI NICCOLAI – Università di Siena - “*Post-genomic and advanced approaches to study protein structure and interactions*”;

- h. 17,00 Coffee Break

- h. 17,30 – 19,00 **Sessione “Biomolecole”**  
Chairman: PROF. EDON MELLONI

PROF. ALBERTO ABBRUZZESE SACCARDI – II Università di Napoli - “*Vie di trasduzione e fattori traduzionali come bersagli per il potenziamento dell'apoptosi: ruolo dell'IFN $\alpha$  e del'EIF-5A*”  
PROF.SSA LILIA CALABRESE – Università di Roma “La Sapienza” - “*Basi strutturali della funzione “moonlighting” della ceruloplasmina.*”  
PROF. FABIO DI LISA – Università di Padova - “*Mitochondrial contribution to cell death in the ischemic heart*”  
PROF.SSA ANNA MARIA GIUFFRIDA STELLA – Università di Catania - “*Redox regulation of cellular stress response in aging and neurodegenerative disorders*”  
PROF. SERGIO PAPA – Università di Bari - “*Respiratory complex I; nuclear encoded subunit involved in assembly, regulation and genetic pathological disorders*”;

- h. 19,00 Chiusura dei lavori della giornata

## **VENERDI' 5 NOVEMBRE**

h. 9,30 – 11,00 **Sessione “Biotecnologie”**

Chairman: PROF. RICCARDO PIERANTONI

PROF. SAVERIO BETTUZZI - Università di Parma.- “*Profiling of genes differentially expressed by clusterin over-expression in pc-3 human prostate cancer cells by dna microarray*”

PROF. FEDERICO BUSSOLINO - Università di Torino.- “*Use of phage display random peptide library to identify specific molecular targets in tumor progression*”

PROF. PAOLO GASPARINI – II Università di Napoli - “*Sviluppo di microchip elettronici per la diagnosi di sordità genetiche.*”

DOSS. PAOLO MAEDDU – Laboratorio Nazionale INBB di Osilo Sezione di Medicina Sperimentale e Terapia Genica – “*Terapia genica angiogenica e cellulare per la cura delle malattie ischemiche: promesse, limiti e nuove prospettive*”

PROF. CARLO VENTURA – Laboratorio INBB di Biologia Molecolare e Bioingegneria delle Cellule Staminali - “*Sviluppo di nuove molecole a logica differenziativa per l’induzione di cardiogenesi in cellule staminali*”

h. 11,00 Coffee break

h. 11,30 – 13,00 **Sessione “Unità funzionali biologiche supramolecolari”**

Chairman: PROF. GAETANO IRACE

PROF. PAOLO VIGLINO – Università di Udine - “*Amiloidosi da beta2microglobulina*”

PROF. FABRIZIO CHITI – Università di Firenze - “*Investigation of protein aggregation under conditions in which the protein is initially native*”

PROF. PIETRO PUCCI – Università di Napoli “Federico II” - “*Probing protein conformation by mass spectrometry*”

PROF. ADELIO RIGO – Università di Padova - “*Cinetica versus cristallografia nello studio delle relazioni struttura funzione di metallo-enzimi*”

PROF. ENRICO RIZZARELLI – Università di Catania - “*Copper(II) binding sites and coordination features in prion proteins*”

h. 13,00 Break

h. 15,30 – 16,30 Lettura Magistrale

PROF. GIUSEPPE ROTILIO “*Nuove Frontiere della ricerca biomedica*”

h. 16,30 Coffee Break

h. 17,00 - 18,30 Tavola Rotonda

“*Il cambiamento nell’università e della ricerca italiana: proposte legislative in discussione e risorse*”

*Coordina:*

PROF. DAMIANO GUSTAVO MITA (*Presidente INBB*)

*Intervengono:*

SEN. FRANCO ASCIUTTI (*VII Commissione Senato FI*)

PROF. LUIGI FRATI (*Presidente Conferenza Preside Facoltà di Medicina*)

SEN. LUCIANO MODICA (*VII Commissione Senato - DS*)

PROF. ALDO PINCHERA (*Vice Presidente CUN*)

PROF. FABIO PISTELLA (*Presidente CNR*)

PROF. ENRICO PREDAZZI (*Presidente Conferenza Preside Facoltà di Scienze*)

PROF. GUIDO TROMBETTI (*Rettore Univ. “Federico II” - Vicepresidente CRUI*)

*Conclude:*

ON. STEFANO CALDORO (*Sottosegretario MIUR*)

h. 18,30 Chiusura dei lavori della giornata

**SABATO 6 NOVEMBRE**

**h. 9,30 - 11,00     Sessione “Biosistemi e Bioregolazioni”**

Chairman: PROF. CARLO DI BENEDETTA

PROF. DARIO DI FRANCESCO - Università di Milano- “*The funny current: a key determinant of heart rate*”

PROF.SSA MARIA SVELTO. – Università di Bari

PROF. VANNI TAGLIETTI – Università di Pavia - “*Modifications of n-type calcium channel gating properties in caveolin-1 expressing cells*”

PROF. VITTORIO TOMASI - Università di Bologna - “*Spatial regulation of cell signalling: the case of prion protein bound to copper ions*”

PROF.SSA ANNA TRENTALANCE – Università di Roma Tre. - “*Ruolo della palmitoilazione nell’associazione del recettore alfa degli estrogeni (ER $\alpha$ ) alla caveolina-1*”

h. 11,00 Coffee Break

**h. 11,30-13,00     Sessione “Cellule”**

Chairman: PROF. ALBERTO CANGIANO

PROF. LUCIO ANNUNZIATO - Università di Napoli “Federico II” - “*Pharmacology of brain Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger (NCX): from molecular biology to therapeutic perspectives.*”

PROF. MARIO BUFFELLI - Università di Verona - “*Plasticità sinaptica attività-dipendente nella giunzione neuromuscolare*”

PROF. FIORENZO CONTI - Università Politecnica delle Marche - “*Taking up glutamate at cortical synapses*”

PROF. FILIPPO TEMPIA – Università di Perugia - “*Determinants of high frequency firing and discharge pattern modulation in cerebellar Purkinje cells*”

h. 13,00 Chiusura del Convegno

**RELAZIONE INTRODUTTIVA**  
**Prof. Damiano Gustavo Mita**

Sebbene il mondo politico riconosca l'importanza della Ricerca e dell'Innovazione Tecnologica per lo sviluppo economico della Nazione e nonostante che sia sentita la necessità di sostenere la Ricerca Scientifica per accrescere la competitività del Paese, questa convinzione, salvo qualche eccezione, resta solo una dichiarazione d'intenti e non riesce a far breccia sui dispositivi legislativi e sugli impegni finanziari, qualunque sia la maggioranza che ci governi.

A proposito di competitività è triste constatare come, nonostante l'affermazione che l'Italia sia la sesta o settima potenza industriale del mondo, cosa senz'altro vera e di cui siamo tutti orgogliosi, per quel che riguarda appunto la competitività ci troviamo ad essere stati declassati dal World Economic Forum dal 21° al 47° posto nel triennio 2001/2004, preceduti dal Botswana (45° posto) e dalla Cina (46° posto).

Visto che la ricerca e l'istruzione universitaria sono i motori necessari per lo sviluppo della competitività, occorrerebbe incrementare i fondi per queste attività ben al di là del 2% in più sulla spesa dell'anno precedente previsto dalla finanziaria 2005. Nell'audizione alla Commissione Bilancio della Camera del 8 ottobre il Prof Tosi, Presidente della CRUI, ha chiesto l'apertura di un nuovo piano d'investimenti, mirato a realizzare nei prossimi cinque anni un aumento annuale del 10 % sul fondo di finanziamento ordinario. Questo significa per il 2005 un aumento di 600 milioni di euro contro i 143 milioni di euro attualmente previsti dalla finanziaria 2005. Si dirà che bisogna aspettare il collegato alla finanziaria prima di essere critici. Non voglio essere critico, voglio solamente essere propositivo sperando che gli interlocutori politici che vorranno essere presenti a questo convegno vogliano, se non ascoltare, almeno riflettere su quanto proposto e, possibilmente, agire di conseguenza.

Prima di entrare nel merito di quanto accennato, a conclusione di un primo mandato quinquennale di Presidente del Consorzio Interuniversitario Istituto Nazionale Biostrutture e Biosistemi "INBB" ed all'inizio di un secondo mandato, esporrò brevemente alcuni dei risultati conseguiti e le linee programmatiche lungo le quali mi piacerebbe far sviluppare le attività future del Consorzio, in modo da illustrare brevemente, per quanti ancora non la conoscessero, la nostra struttura e organizzazione.

All'INBB, riconosciuto giuridicamente dal MURST in data 11/12/1995 e da esso vigilato, aderiscono 24 Università statali, uniformemente distribuite sul territorio nazionale. L'attività di ricerca dell'INBB, svolta da circa 400 aderenti e da un migliaio di unità di personale ricercatore non strutturato, è organizzata in unità di ricerca presso gli Atenei, a loro volta raggruppate in Sezioni territoriali. I settori di ricerca in cui operano i nostri aderenti sono: Biomolecole, Biostrumentazione e Bioelettronica, Biosistemi, Biotecnologie, Unità Strutturali e Funzionali Supramolecolari, Cellule

Inoltre l'INBB gestisce direttamente un Laboratorio Nazionale in Osilo (SS) dove vengono svolte attività di ricerca nel campo della Medicina Sperimentale e Terapia Genica ed un Laboratorio di Biologia Molecolare e Ingegneria delle Cellule Staminali in convenzione con la Asl di Bologna.

Le risorse finanziarie dell'INBB sono dovute in minima parte alla dotazione ordinaria del MIUR ed in gran parte a fondi esterni su progetti di ricerca. Il rapporto tra finanziamento ordinario e fondi esterni è di circa 1 a 10, il che sta a dimostrare l'ottima offerta e la qualità di ricerca sviluppata dall'INBB.

Lo Statuto e maggiori informazioni sull'INBB sono reperibili al sito [www.inbb.it](http://www.inbb.it).

Approfitto di questa occasione per segnalare alcuni dei risultati positivi raggiunti dall'I.N.B.B. in questo quinquennio:

- a) è stato modificato lo Statuto rendendolo più aderente alla realtà;
- b) è aumentato sia il numero di Università consorziate che quello degli aderenti;



- c) è stato consolidato il finanziamento ordinario del MIUR e sono stati gestiti finanziamenti aggiuntivi da parte di altri ministeri, differenti Enti di ricerca e da altre agenzie nazionali ed internazionali;
- d) è stato fatto uno sforzo per ciò che riguarda l'attività di formazione di giovani ricercatori tramite l'assegnazione di borse di studio per attività di ricerca e borse di studio per la partecipazione a Convegni e Workshop organizzati dall'I.N.B.B.;
- e) sono stati firmati accordi di programma con varie istituzioni pubbliche, tra le quali ci piace ricordare il CNR e l'ISPESL;
- f) sono state firmate convenzioni con organismi pubblici e privati, sia dell'Università che del mondo delle imprese;
- g) è stata potenziata la sede del Laboratorio Nazionale di Osilo che vanta un'ottima produttività scientifica, sia qualitativa che quantitativa;
- h) è stato proposto un raccordo istituzionale per iniziative congiunte fra i maggiori Consorzi Interuniversitari riconosciuti dal MIUR: l'iter di questa iniziativa sembra ben avviato e vede l'I.N.B.B. fra i protagonisti;
- i) sono stati organizzati, con successo, due Convegni Nazionali I.N.B.B. a Roma (novembre 2000) ed a Catania (ottobre 2002) con tavole rotonde politico-istituzionali sul genere di quelle previste per questo VI Convegno Nazionale di cui oggi apriamo i lavori;
- j) sono stati organizzati con successo a Bressanone tre workshop rispettivamente su "Biofisica del DNA" (1999), "Biotecnologie" (2001) e "Cellule Staminali" (2003);
- k) è continuato il nostro impegno per sostenere l'organizzazione annuale della Scuola Nazionale di Biofisica a Bressanone.

Per quel che riguarda le prospettive future è doveroso ricordare che parlare di esse è sempre difficile ed impegnativo, soprattutto quando si vuole che queste non rimangano sogni "nel cassetto", cosa sempre possibile quando la loro attuazione non dipende esclusivamente dalla volontà di chi le propone.

Tra le principali prospettive elenchiamo: a) la volontà di trasformare il Consorzio in Istituto Nazionale; b) la costituzione sul territorio di nuovi laboratori tematici del Laboratorio Nazionale; c) la formulazione di un piano triennale di sviluppo; d) la diversificazione dei servizi che il Consorzio intende offrire agli aderenti. Con riferimento a quest'ultimo punto sarebbe opportuno incoraggiare la creazione di spin-off, ossia società che nascono all'interno degli Atenei o dei Consorzi Interuniversitari e che hanno come obiettivo l'utilizzazione industriale dei risultati della ricerca, soprattutto per la produzione e commercializzazione di prodotti innovativi. La produzione degli spin-off rappresenta un sistema per attrarre capitali privati, visto che agli spin-off possono partecipare, oltre agli Enti di ricerca e ad Enti pubblici in genere, anche banche, intermediari finanziari, società di assicurazioni, imprese e consorzi di impresa.

\*\*\*\*\*

Mi sia consentito a questo punto esporre alcune considerazioni, del tutto personali, relative agli argomenti da trattare nelle due tavole rotonde.

Relativamente alla prima tavola rotonda, quella sulla ricerca, c'è solo da ricordare come il mondo accademico e quello della ricerca del nostro Paese vivono ormai da anni in acque particolarmente agitate per l'adozione di scelte politiche con scarsa partecipazione e condivisione collettiva degli attori interessati, tutte in un contesto di costante e progressiva diminuzione delle risorse finanziarie. Ormai siamo notoriamente al di sotto dell'1% del PIL di risorse complessive per R&S, quando nel '93 eravamo all'1,3%. Inutile tentare paragoni con quanto investito in R&S dagli altri paesi industrialmente avanzati: ne usciremmo profondamente mortificati.

L'entità degli investimenti in ricerca è gradualmente diminuita nel tempo. Mentre sono di fatto scomparse alcune forme di Agenzia (leggi CNR, ENEA, ISPESL), il Governo ha introdotto nuovi meccanismi di finanziamento, come PRIN, FIRB, FISR, Centri di Eccellenza. Queste fonti finanziarie non si sono sempre bilanciate ed il settore biomedico è stato forse uno di quelli che ha maggiormente risentito di questo sbilanciamento. Investimenti di una certa consistenza sono stati stanziati nel settore della proteomica e della post genomica, ma questa non è “tutta” la ricerca biomedica.

Molto meritoria è la funzione di agenzia per ricerca finalizzata che stanno svolgendo, tra gli altri, il Ministero della Salute ed il Ministero delle Politiche Agricole.

Un occhio particolarmente vigile deve essere anche posto alla ricerca promossa dalle Regioni che stanno svolgendo sempre più un'attività di promozione di attività di ricerca offrendo un'ottima supplenza alle carenze dello Stato.

Bisogna stimolare di più gli imprenditori a credere nella ricerca, ad investire in joint-venture, a convincerli che la ricerca ha un ritorno indipendentemente dal fatto di essere effettuata o meno attraverso la legge 297.

Bisogna convincere il Governo che il mondo della ricerca non può essere governato contro il parere degli addetti ai lavori. Diamo solo un esempio. L'intera comunità scientifica, insieme alla CRUI ed alla Confindustria, all'epoca della istituzione dell'Istituto Italiano di Tecnologia di Genova, aveva avanzato dubbi sulla necessità della sua istituzione. Anche se il contesto di riferimento intorno a cui l'IIT è nato ora incomincia ad essere più chiaro, questi dubbi a volte ritornano, soprattutto quando si pensa che sempre maggiori tagli si addensano su Università e Ricerca, mentre il miliardo di euro di risorse spalmate in dieci anni per l'IIT sembra aver resistito ai tagli della nuova finanziaria. Anche una cosa buona, fatta per imposizione, può diventare quanto meno una cosa fastidiosa.

Per quel che riguarda la seconda tavola rotonda è evidente che al giorno d'oggi non si può parlare di Università e di leggi in discussione senza un riferimento al DdL sullo stato giuridico dei professori. Ignorare l'argomento significherebbe tradire una missione ed un mandato.

La precarizzazione della carriera iniziale universitaria, istituzionalizzata con la prevista abolizione del ruolo dei ricercatori, nei fatti contribuirà ad abbassare ulteriormente il livello di competitività della nostra Università e, qualora tale normativa fosse logicamente estesa agli Enti di ricerca, diminuirebbe la competitività anche di questi ultimi. Già ora i nostri laureati vanno all'estero e, se bravi, vi rimangono. L'abolizione del ruolo dei ricercatori incrementerà questa tendenza con la conseguenza che l'insufficiente accumulo di conoscenza e di capitale umano renderà insufficiente il tasso di crescita del nostro Paese, come ben sanno gli economisti che sostengono, non a caso, che la crescita di un paese dipende essenzialmente dall'accumulo delle conoscenze. Il nostro investimento in capitale umano e conoscenza è a livelli inferiori della media europea e l'Europa è molto al di sotto degli Stati Uniti. La percentuale di occupazione nell'high-tech è bassa rispetto all'intero sistema produttivo, come pure la capacità di trasferire conoscenze al sistema produttivo e la capacità di generare progetti e prodotti.

L'abolizione della distinzione tra tempo pieno e tempo parziale incentiverà i docenti a svolgere attività nel privato, fuori dagli Atenei, creando nel contempo conflitti di interesse, soprattutto quando il privato è l'Industria o la Sanità, e provocando un aggravio finanziario per lo Stato, dovendo esso corrispondere stipendi più alti a docenti che esercitano parte della loro attività all'esterno.

Il ritorno al sistema dei concorsi nazionali può rappresentare una sana correzione rispetto al sistema attuale, anche se occorre ancora sviluppare alcune riflessioni sulla “lunghezza” della lista degli idonei. E' discutibile la partecipazione di studiosi stranieri nelle commissioni, se una tale filosofia non diventa bidirezionale: gli stranieri in Italia, come gli Italiani all'estero. Senza questa reciprocità sarebbe ammettere una nostra inferiorità, scientifica e di discernimento, e, francamente, nessuno di noi si sente inferiore ai colleghi stranieri.

Coerentemente con quanto fino ad ora sottolineato, non si può non essere d'accordo con la stragrande maggioranza dei docenti universitari, con la CRUI e con la Confindustria, sulla necessità di un momento di riflessione e di una moratoria sul DdL sullo stato giuridico dei professori universitari. Questo non per una difesa corporativa, di cui nessuno di noi può sentirsi titolare e di cui nessuno di noi può aver bisogno, ma per effettiva necessità e per il bene della comunità scientifica e del Paese.

Per finire alcuni altri piccoli flash: a) occorre realizzare una reale presa di servizio e non solo la promessa di presa di servizio per coloro che hanno già vinto concorsi pubblici nelle Università e negli Enti di Ricerca; b) occorre abolire l'IRAP sui ricercatori, così come chiesto dalla Confindustria; c) occorre procedere ad una moratoria della legge di modifica degli ordinamenti didattici in attesa di una attenta valutazione della prima applicazione della laurea triennale. E' mistificatorio dire che in Italia è aumentato il numero dei laureati se in questo calcolo si sommano i laureati secondo i vecchi corsi di laurea a quelli delle nuove lauree triennali. E' solo un artificio matematico e, francamente, non si sa quale credibilità dare al valore della laurea triennale se la maggior parte di questi laureati automaticamente si iscrive poi alla laurea specialistica.

Concludo osservando che il discorso sull'Università non può non riguardare i Consorzi Interuniversitari, il loro ruolo e la loro missione. A periodi alterni i Consorzi Interuniversitari sembrano essere una priorità per lo sviluppo mirato delle attività di ricerca del Paese, altre volte sembrano invece delle istituzioni superflue. A nostro parere i Consorzi sono utili. Ci sono comunque, alcuni aspetti della loro funzionalità che sono migliorabili con leggi, senza alcun costo. Tra questi aspetti c'è il riconoscimento come soggetti ammissibili a fondi e a bandi che potrebbe equipararli alle Università (vedi legge 297 e bando dei PRIN), visto che non si capisce come mai alla somma dei diversi Atenei non corrisponderebbero gli stessi diritti che spettano al singolo Ateneo. Spero che i politici che avranno la pazienza di leggere o ascoltare queste riflessioni, possano valutarle positivamente e farle proprie.

Grato per l'attenzione, auguro successo a questo VI Convegno Nazionale INBB e ringrazio quanti avranno avuto la pazienza di ascoltarmi o di leggermi.

Prof. Damiano Gustavo Mita  
*Presidente INBB*

Napoli, 4 novembre 2004



ABSTRACT  
DELLE COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE



*Sessione di Biomolecole*

## VIE DI TRASDUZIONE E FATTORI TRADUZIONALI COME BERSAGLI PER IL POTENZIAMENTO DELL' APOPTOSI: RUOLO DELL' IFN $\alpha$ E DELL' EIF-5A

Abbruzzese A., Marra M., D'Alessandro A., Giuberti G., Caraglia M.

*Dipartimento di Biochimica e Biofisica, II Università di Napoli*

**Obiettivi.** La terapia medica tradizionale delle neoplasie è attualmente affidata all'impiego di agenti citotossici convenzionali il cui meccanismo d'azione principale è il danno irreversibile e letale al DNA delle cellule tumorali. Recentemente è stato rilevato che, accanto al danno letale al DNA, uno dei meccanismi d'azione della chemioterapia tradizionale è l'induzione nelle cellule neoplastiche di apoptosi. Quest'ultima, nei tessuti tumorali, appare essere attualmente un importante indice di risposta alla terapia anti-tumorale. L'Interferone- $\alpha$  (IFN $\alpha$ ) può indurre apoptosi, processo regolato da una serie di fattori cellulari, e tra questi il fattore eucariotico di inizio 5A (eIF-5A) è peculiare essendo la sua attività modulata dalla formazione post-traduzionale dell'inusuale aminoacido ipusina (1). In questo studio riportiamo gli effetti dell'IFN $\alpha$  e dell'epidermal growth factor (EGF) sull'apoptosi e sull'attività dell'eIF-5A in cellule di carcinoma epidermoide orofaringeo KB e di carcinoma polmonare H1355 (2).

**Metodi.** Saggio MTT, analisi degli isobologrammi, western blotting, analisi citofluorimetrica, saggio chinasi per l'attività delle MAPK, gel ladder e rivelazione attraverso silver staining, HPLC a scambio ionico sono riportati in (3).

**Risultati.** Abbiamo trovato che 48h di esposizione a 1000 e 2500 IU/ml di IFN $\alpha$  induceva circa il 50% di inibizione della crescita e di apoptosi in cellule H1355 e KB, e l'aggiunta di EGF antagonizzava completamente questo effetto. Quando l'IFN $\alpha$  induceva apoptosi, si registrava una iperattivazione del signalling di MEK-1 ed ERK (proteine coinvolte nei meccanismi di trasduzione del segnale EGF-dipendente) e un decremento dell'attività dell'eIF-5A. Anche quest'ultimo effetto veniva antagonizzato dall'aggiunta di EGF alle cellule pretrattate con IFN $\alpha$  attraverso l'attivazione del pathway EGF->ERK-dipendente; l'aggiunta di uno specifico inibitore di MEK-1, PD098059, abrogava il ripristino del contenuto intracellulare di ipusina indotto da EGF in cellule tumorali pretrattate con IFN $\alpha$ . Successivamente, abbiamo valutato se l'inibitore della sintesi di ipusina (e inattivatore di eIF-5A) N1-guanyl-1,7-diaminoheptane (GC7) sinergizzava con l'IFN $\alpha$  nell'induzione dell'inibizione proliferativa e dell'apoptosi. L'analisi dell'isobologramma di IFN $\alpha$  e GC7 dimostrava un forte sinergismo tra i due farmaci sia nell'induzione dell'inibizione proliferativa che sull'apoptosi.

**Conclusioni.** Questi risultati suggeriscono un ruolo rilevante dell'eIF5A nei meccanismi molecolari alla base di processi di difesa dall'apoptosi indotta dall'IFN $\alpha$  e più in generale per il potenziamento dell'efficacia terapeutica di agenti anti-tumorali.

1) A. Abbruzzese, M.H. Park and J.E. Folk *J. Biol. Chem.* 261, 3085-3089, 1996.

2) C. Esposito, M. Marra, G. Giuberti, A.M. D'Alessandro, R. Porta, M. Caraglia and A. Abbruzzese *Biochem. J.* 370, 205-212, 2003

3) M. Caraglia, A.M. D'alessandro, M. Marra, G. Giuberti, P. Tagliaferri, A. Budillon, S. Venuta and A. Abbruzzese *Oncogene*, 23, 6900-6913, 2004



## **BASI STRUTTURALI DELLA FUNZIONE “MOONLIGHTING” DELLA CERULOPLASMINA**

**Lilia Calabrese**

*Dipartimento di Scienze Biochimiche- Università di Roma “La Sapienza”*

Un nuovo e recente campo di ricerca sta attualmente tentando di chiarire le basi strutturali del fenomeno del “moonlighting”, termine che si riferisce alla capacità di alcune proteine di intervenire ed esercitare un ruolo inaspettato, la funzione “moonlighting”, in diversi processi metabolici.

Le proteine “moonlighting” sono proteine multifunzionali, ad espressione tessuto-specifica, in grado di cambiare la propria funzione a seguito di modificazioni della loro concentrazione o localizzazione o in risposta a variazioni della concentrazione di substrati/ligandi. Sono in genere enzimi che aggiungono alla capacità di funzionare da catalizzatori quella di esplicare in alternativa un ruolo di proteina strutturale o di recettore o di trasportatore.

La ceruloplasmina è una di queste proteine, coinvolta in svariate patologie tra cui cancro e diabete, con un ruolo, a seconda del contesto, di proteina della fase acuta o enzima della classe delle ossidasi blu o trasportatore di rame o proteina modulatrice di diversi sistemi attraverso specifiche interazioni proteina/proteina.

I risultati di una serie di indagini da noi effettuate con diversi approcci metodologici, di mutagenesi sito-specifica sulla ceruloplasmina umana, di modellistica molecolare sulla proteina Fet3, o di biochimica cellulare, allo scopo di chiarire il rapporto struttura-funzione della ceruloplasmina hanno permesso anche di chiarire alcuni aspetti del meccanismo del “moonlighting” di questa proteina.

Da questi studi sono emerse indicazioni sulle diversità dei siti del rame blu, che possono spiegare il meccanismo d’azione della ceruloplasmina nel trasporto del rame e di un suo possibile coinvolgimento nella modulazione dell’attività della eNOS. Questi studi hanno anche indicato un possibile meccanismo di switch per le funzioni antiossidante/proossidante della ceruloplasmina nel plasma.

## MITOCHONDRIAL CONTRIBUTION TO CELL DEATH IN THE ISCHEMIC HEART

**Fabio Di Lisa**

*Dipartimento di Chimica Biologica, Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Padova, Via G. Colombo, 3, I35121, Padova, Italy. dilisa@civ.bio.unipd.it*

Although no doubt exists that the maintenance of tissue viability requires optimal mitochondrial function, the ensuing of cell death is often determined by mitochondria. This concept is made dramatically clear by the sequence of events which characterizes the ischemic damage in the heart. Three major phases can be described (1, 2). The first is associated with the onset of ischemia, and changes mitochondria from ATP producers into powerful ATP utilizers. During this phase, the inverse operation of FoF1 ATPase maintains the mitochondrial membrane potential by using the ATP made available by glycolysis. The second phase can be identified from the functional and structural alterations of mitochondria caused by prolongation of ischemia, such as decreased utilization of NAD-linked substrates, release of cytochrome c and involvement of mitochondrial channels. These events indicate that the relationship between ischemic damage and mitochondria is not limited to the failure in ATP production. Finally, the third phase links mitochondria to the destiny of the myocytes upon post-ischemic reperfusion. Indeed, depending on the duration and the severity of ischemia, not only is mitochondrial function necessary for cell recovery, but it can also exacerbate cell injury. Indeed, it is generally accepted that the rupture of sarcolemma results from an uncontrolled activation of contraction in cells lacking the possibility of relaxation. Such a condition results from a sub optimal recovery of mitochondrial function because reduced contents of ATP coexist with elevated concentrations of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ .

A relevant link between intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  overload and mitochondrial dysfunction is represented by the opening of the mitochondrial permeability transition pore (3). The permeability transition is a regulated permeability increase of the mitochondrial inner membrane to solutes with molecular masses up to 1,500 Da mediated by opening of a high-conductance channel, the permeability transition pore (PTP), whose molecular nature remains debated. The PTP is modulated by a variety of effectors of cell death, including calcium, lipid mediators and reactive oxygen species (3, 4, 5). We have recently elucidated the role of PTP in the reperfusion damage by investigating  $\text{NAD}^+$  metabolism (6, 7). In fact, mitochondrial  $\text{NAD}^+$  content, which is hardly affected during ischemia, becomes almost depleted when coronary flow is restored after a prolonged period of ischemia. The inhibition of mitochondrial  $\text{NAD}^+$  depletion exerted by CsA suggests that upon reperfusion the rise in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ , along with the recovery of neutral pH and the boosting of oxyradical generation, promotes PTP opening causing the release of intramitochondrial  $\text{NAD}^+$  and its subsequent hydrolysis. Not only is the decrease of mitochondrial  $\text{NAD}^+$  prevented when PTP is inhibited, but also tissue viability is significantly protected (6). Besides affecting energy metabolism, the mitochondrial release of  $\text{NAD}^+$  is likely to modify several intracellular processes triggered by ischemia or other pathological conditions. Indeed, once released out of the mitochondrial matrix,  $\text{NAD}^+$  could be transformed into cyclic ADP-ribose which promoting  $\text{Ca}^{2+}$  release from intracellular stores may amplify and extend the effects exerted by an initial rise in intracellular  $[\text{Ca}^{2+}]$ . Thus, the release of  $\text{NAD}^+$  from mitochondria and its subsequent utilization within other cell compartments could be part of the mechanisms through which mitochondria transduce and amplify an initial trigger provided by reperfusion (7). We have recently demonstrated that PTP opening and mitochondrial  $\text{NAD}^+$  depletion are crucial also to cell death caused by agents causing DNA damage and previously attributed to PARP1 activation (8).

Besides the involvement in necrosis, alterations of mitochondrial structure and function appear pivotal in the commitment of cells to apoptosis. Indeed, a severe reduction of the mitochondrial membrane potential, the opening of the permeability transition pore and/or the release of proapoptotic proteins often precede the appearance of other characteristic signs of apoptosis, such as phosphatidylserine or DNA fragmentation (4, 9). The causal relationships between these processes are still debated (3). A key issue is to assess whether, and when, PTP opening occurs in

the course of apoptosis and what are its consequences *in situ*. We investigated the relationship between PTP opening, mitochondrial depolarization, cytochrome *c* release and occurrence of cell death (4). Using a technique developed in our laboratory (10), we could detect both transient and long lasting PTP openings. While cell viability is hardly affected by PTP openings of short duration, longer PTP openings cause mitochondrial depolarization followed by release of cytochrome *c* and apoptosis. Thus, modulation of PTP open time appears to be the key element in determining the outcome of stimuli that converge on the PTP.

Finally, more recent work in our laboratory is aimed at characterizing the relationship between mitochondrial dysfunction and ROS formation (11) as possible mechanisms underlying the contractile alterations resulting from the oxidation of myofibrillar proteins (12).

## References

1. DiLisa F, Menabo R, Canton M, Petronilli V. 1998. The role of mitochondria in the salvage and the injury of the ischemic myocardium. *Biochim. Biophys. Acta* 1366:69-78
2. Di Lisa F, Canton M, Menabò R, Dodoni G, Bernardi P. 2003. Mitochondria and reperfusion injury. The role of permeability transition. *Basic. Res. Cardiol.* 98:235-41
3. Bernardi P, Petronilli V, Di Lisa F, Forte M. 2001. A mitochondrial perspective on cell death. *Trends Biochem. Sci.* 26:112-7
4. Petronilli V, Penzo D, Scorrano L, Bernardi P, Di Lisa F. 2001. The mitochondrial permeability transition, release of cytochrome *c* and cell death. Correlation with the duration of pore openings *in situ*. *J. Biol. Chem.* 276:12030-4
5. Penzo D, Petronilli V, Angelin A, Cusan C, Colonna R, Scorrano L, Pagano F, Prato M, Di Lisa F, Bernardi P. 2004. Arachidonic acid released by phospholipase A(2) activation triggers Ca(2+)-dependent apoptosis through the mitochondrial pathway. *J. Biol. Chem.* 279:25219-25
6. Di Lisa F, Menabò R, Canton M, Barile M, Bernardi P. 2001. Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes depletion of mitochondrial and cytosolic NAD<sup>+</sup> and is a causative event in the death of myocytes in post-ischemic reperfusion of the heart. *J. Biol. Chem.* 276:2571-5
7. Di Lisa F, Ziegler M. 2001. Pathophysiological relevance of mitochondria in NAD<sup>+</sup> metabolism. *FEBS Lett.* 492:4-8
8. Dodoni G, Canton M, Petronilli V, Bernardi P, Di Lisa F. 2004. Induction of the mitochondrial permeability transition by the DNA alkylating agent N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. Sorting cause and consequence of mitochondrial dysfunction. *Biochim. Biophys. Acta* 1658:58-63
9. Bernardi P, Scorrano L, Colonna R, Petronilli V, Di Lisa F. 1999. Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues. *Eur. J. Biochem.* 264:687-701
10. Petronilli V, Miotto G, Canton M, Brini M, Colonna R, Bernardi P, Di Lisa F. 1999. Transient and long-lasting openings of the mitochondrial permeability transition pore can be monitored directly in intact cells by changes in mitochondrial calcein fluorescence. *Biophys. J.* 76:725-34
11. Dodoni G, Alexandre A, Di Lisa F. 2004. Formation of reactive oxygen species (ROS), mitochondrial dysfunction and cell death in H9c2 cardiomyoblasts. *Biochim. Biophys. Acta* 1658:220 (abstract)
12. Canton M, Neverova I, Menabo R, Van Eyk J, Di Lisa F. 2004. Evidence of myofibrillar protein oxidation induced by postischemic reperfusion in isolated rat hearts. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 286:H870-H877

## REDOX REGULATION OF CELLULAR STRESS RESPONSE IN AGING AND NEURODEGENERATIVE DISORDERS

V. Calabrese<sup>1</sup>, D. Allan Butterfield<sup>2</sup>, AM Giuffrida Stella<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Section of Biochemistry and Molecular Biology, Department of Chemistry, Faculty of Medicine, University of Catania, Viale A. Doria 6, Catania, Italy.*

<sup>2</sup>*Department of Chemistry, University of Kentucky, Lexington, KY 40506-0055 USA*

Reduction of cellular expression and activity of antioxidant proteins and the resulting increase of oxidative stress are fundamental causes in the aging processes as well as in neurodegenerative diseases (Carri M.T. et al., 1997, Mattson et al., 2002, Butterfield, 2004). Numerous theories have been suggested, however, no single theory is entirely satisfactory, rather, it is agreed that aging is a combination of several factors, the free radicals production and mitochondrial dysfunction being the most important (Cimino et al., 1997, Lenaz et al., 1998, Biesalski et al., 2002).

A decreases in respiratory chain complex activities in Parkinson's disease, Alzheimer's disease (AD), Huntington's disease and genetic diseases (Carelli et al., 2004, Papa et al., 2004) has been observed. Such defects in respiratory complex activities, possibly associated with oxidant/antioxidant balance perturbation, are thought to underlie defects in energy metabolism and induce cellular degeneration.

Mitochondria make two rather contradictory contributions to cell survival. The classically recognized function is the synthesis of ATP for energizing endergonic reactions, the other is the generation of reactive oxygen species which may compromise the long-term survival of cells and constitute a major cause of the aging process. Indeed, these two rather conflicting functions are part of the same process, namely mitochondrial respiration.

Oxidative damage to key intracellular targets, such as DNA or proteins, is an important feature of the normal cellular aging process in the brain, and several studies have shown that oxidative damage to DNA or protein in brain increases with age (Kalyuzhny, 2002).

It has been proposed that accumulation of mtDNA damage during life is a major cause of age-related disease and this is because of its high mutagenic propensity. The lack of introns and protective histones, limited nucleotide excision and recombination DNA repair mechanisms, location in proximity of the inner mitochondrial membrane which expose it to an enriched free radical milieu, are all factors contributing to a 10-fold higher mutation rate occurring in the mtDNA than in the nDNA. A large body of evidence indicates that mtDNA mutations increase as a function of age reaching the highest levels in brain and muscle.

A major feature of mtDNA disease in humans is the presence of cells with low cytochrome c oxidase activity and evidences exist which indicate that the mechanism for these changes is likely to be clonal expansion of individual mtDNA deletions within single cells (Schapira, 1998, Rafique et al., 2004). Cytochrome c oxidase-negative neurons have been demonstrated to exist in abundance in the CNS of patients with mitochondrial disorders (Cottrell et al., 2001). These findings establish the relationship between age-associated accumulation of mtDNA mutations and bioenergy degradation as a key feature of the aging process, at least in tissues predominantly composed by postmitotic cells, such as CNS and skeletal muscle.

Efficient functioning and maintenance of repair process seems to be crucial for both survival and physical quality of life. This is accomplished by a complex network of the so-called longevity assurance processes, which are composed of several genes termed vitagenes (Calabrese et al., 2004a e b). Among these, chaperones are highly conserved proteins responsible for the preservation and repair of the correct conformation of cellular macromolecules, such as proteins, RNAs and DNA. Recently, the involvement of the heme oxygenase (HO) pathway in anti-degenerative mechanisms operating in AD has received considerable attention, as it has been demonstrated that the expression of HO is closely related to that of amyloid precursor protein (APP) (Dore, 2002; Perry et al., 2003, Calabrese et al, 2004,c). HO induction, which occurs together with the induction of other HSPs during various physiopathological conditions, by generating the vasoactive molecule carbon monoxide and the potent antioxidant bilirubin, represents a protective system potentially active against brain oxidative injury.

Heme oxygenase-1 is rapidly upregulated by oxidative and nitrosative stresses, as well as by glutathione depletion. Recent studies have shown that the heat shock response contributes to establishing a cytoprotective state in a wide variety of human diseases, including ischemia and reperfusion damage, aging and neurodegenerative disorders. The major neurodegenerative diseases, Alzheimer disease (AD), Parkinson's Disease (PD), amyotrophic lateral sclerosis (ALS), Huntington's disease (HD) and Friedreich's ataxia (FA) are all associated with the presence of abnormal proteins. Given the broad cytoprotective properties of the heat shock response there is now strong interest in discovering and developing pharmacological agents capable of inducing it. Modifications of endogenous cellular defense mechanisms, through nutritional or pharmacological antioxidants compounds, may represent an innovative approach to therapeutic intervention in many neurodegenerative diseases. Recently (Nicoletti et al., 2004) the effect of antioxidant diet on mitochondrial gene expression in rat brain regions during aging has been demonstrated. Moreover by maintaining or recovering the activity of vitagenes it would be possible to delay the aging process and decrease the occurrence of age-related diseases with resulting prolongation of a healthy life span.

#### References

- Biesalski, H.K. 2002. Free radical theory of aging. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 5: 5-10.
- Bohr, V.A., and Dianov, G.L. 1999. Oxidative DNA damage processing in nuclear and mitochondrial DNA. *Biochimie* 81: 155-160.
- Butterfield, D.A. 2004. Proteomics: a new approach to investigate oxidative stress in Alzheimer's disease brain. *Brain Res.* 1000: 1-7.
- Calabrese, V., Scapagnini, G., Ravagna, A., Colombrita, C., Spadaro, F., Butterfield, D.A., and Giuffrida Stella, A.M. 2004a. Increased expression of heat shock proteins in rat brain during aging: relationship with mitochondrial function and glutathione redox state. *Mech. Age Dev.* 125: 325-335.
- Calabrese V., Boyd-Kimball D., Scapagnini G., Butterfield D.A. 2004b. Nitric oxide and cellular stress response in brain aging and neurodegenerative disorders: the role of vitagenes. *In Vivo.* 18, 245-267.
- Calabrese V., Giuffrida Stella A.M., Butterfield D.A., Scapagnini G. 2004c Redox Regulation in Neurodegeneration and Longevity: Role of the Heme Oxygenase and HSP70 Systems in Brain Stress Tolerance. *Antioxid Redox Signal.* 6, 895-913.
- Carelli V, Rugolo M, Sgarbi G, Ghelli A, Zanna C, Baracca A, Lenaz G, Napoli E, Martinuzzi A, Solaini G. 2004. Bioenergetics shapes cellular death pathways in Leber's hereditary optic neuropathy: a model of mitochondrial neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta.* 1658:172-179.
- Carri M.T., Ferri A., Battistoni A., Famhy L., Gabbianelli R., Poccia F. and Rotilio G.. Expression of a Cu,Zn superoxide dismutase typical of familial amyotrophic lateral sclerosis induces mitochondrial alteration and increase of cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration in transfected neuroblastoma Sh-Sy5y Cells". *FEBS Lett.* 414, 365-368, 1997;
- Cimino F, Esposito F., Ammendola R. and Russo T. (1997). Gene regulation by reactive oxygen species. *Curr. Top. Cell Regul.* 35: 123-1478.
- Cottrell, D.A., Blakely, E.L., Johnson, M.A., Ince, P.G., Borthwick, G.M., and Turnbull, D.M. 2001. Cytochrome c oxidase deficient cells accumulate in the hippocampus and choroid plexus with age. *Neurobiol. Aging* 22: 265-272.
- Dore, S. 2002. Decreased activity of the antioxidant heme oxygenase enzyme: implications in ischemia and in Alzheimer's disease. *Free Radic. Biol. Med.* 32: 1276-1282.
- Kalyuzhny, A.E. 2002. Simultaneous in situ detection of DNA fragmentation and RNA/DNA oxidative damage using tunel assay and immunohistochemical labeling for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG). *Methods Mol. Biol.* 203: 219-234.
- Lenaz G. (1998). Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. *Biochim Biophys Acta* 1366:53- 67.
- Mattson, M.P., Duan, W., Chan, S.L., Cheng, A., Haughey, N., Gary, D.S., Guo, Z., Lee, J., and Furukawa, K. 2002. Neuroprotective and neurorestorative signal transduction mechanisms in brain aging: modification by genes, diet and behavior. *Neurobiol. Aging* 23: 695-705.
- V.G. Nicoletti, C. Cuppari, V. Marino, D. Licciardello and A.M. Giuffrida Stella. "Effect of antioxidant diet on mitochondrial gene expression in rat brain regions during aging". *Journal of Neurochemistry*, 2004, 90,34, (BP1 -01).
- Papa S.; Petruzzella V.; Scacco S.; Vergari R.; Panelli D.; Tamborra R.; Corsi P.; Picciariello M.; Lambo R.; Bertini E.; Santorelli F.M. (2004) M. Respiratory complex I in brain development and genetic disease. *Neurochemical Research* 29 (3): 547-560.
- Perry, G., Taddeo, M.A., Petersen, R.B., Castellani, R.J., Harris, P.L., Siedlak, S.L., Cash, A.D., Liu, Q., Nunomura, A., Atwood, C.S., and Smith, M.A. 2003. Adventitiously-bound redox active iron and copper are at the center of oxidative damage in Alzheimer disease. *Biometals* 16: 77-81.
- Rafique R, Schapira AH, Coper JM. 2004. Mitochondrial respiratory chain dysfunction in ageing; influence of vitamin E deficiency. *Free Radic. Res.* 38:157-165.
- Schapira, A.H. 1998. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative disorders. *Biochim. Biophys. Acta* 1366: 225-233.

## **RESPIRATORY COMPLEX I; NUCLEAR ENCODED SUBUNIT INVOLVED IN ASSEMBLY, REGULATION AND GENETIC PATHOLOGICAL DISORDERS**

### **Papa Sergio**

*Department of Medical Biochemistry and Biology, University of Bari and Institute of Biomembranes and Bioenergetics, Italian Research Council, Bari, Italy.*

### *Objectives*

Bovine complex I has 46 subunits, seven encoded by the mitochondrial genome, the others by nuclear genes (Papa et al. 2004, *Neurochem. Res.* 29, 547-60). The nuclear NDUF54 gene encodes for an 18 kDa subunit with a conserved phosphorylation site which is reversibly phosphorylated in murine and human cells by PKA. Phosphorylation is associated with stimulation of complex I activity (Scacco et al. 2000, *J. Biol. Chem.* 275,17578-82). There are differences in the level of the mRNA of NDUF54 gene in human and murine tissues. The study presented here was aimed to characterize the role of the NDUF54 gene in the physiopathology of complex I and respiratory chain.

### *Methods*

Antibodies against the N-terminus and the non-phosphorylated and phosphorylated C-terminus reveal that the human protein is about 1500 daltons heavier than the mouse and bovine proteins. Cleavage of the presequence closer to the N-terminus could explain the heavier human protein. In human cells the antibody against the non phosphorylated C-terminus reveals a protein of lower M.W. not assembled in complex I. Another protein of 18 kDa (ESSS) of the bovine complex is phosphorylated by PKA in isolated mitochondria and purified complex I. The phosphorylation site of ESSS is not conserved in the human and murine protein. In some severe forms of encephalomyopathies, mutations affecting the expression of the NDUF54 gene prevent the assembly of a normal functional complex and produce the appearance of defective sub-complexes. Investigations on the pathogenic mechanisms of three different homozygous NDUF54 mutations have revealed that each mutation, although in the same gene, may act by a different mechanism. The presence of a nonsense mutation, in one patient, elicited a mechanism of mRNA degradation known as Nonsense Mediated Decay (NMD), whereas in the other two patients the steady-state amount of the transcript was normal.

### *Conclusions*

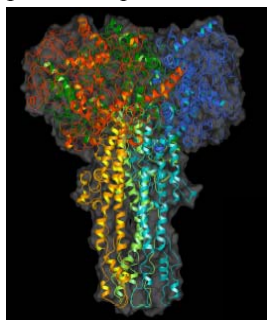
Our results are consistent with the occurrence of a multi-step quality control system at post-transcriptional and/or at post translational level, to avoid the presence in the cell of abnormal polypeptides resulting from mutations in the NDUF54 gene. NMD can be also involved in regulating the expression of natural proteins and eliminating transcripts that are generated in error by alternative splicing. Translation of such transcripts might, in fact, generate aberrant and potential harmful proteins.

*Sessione di Biostrumentazione e Bioelettronica*

## POST-GENOMIC AND ADVANCED APPROACHES TO STUDY PROTEIN STRUCTURE AND INTERACTIONS

Andrea Bernini, Ottavia Spiga, Arianna Ciutti, Stefano Chiellini, Vincenzo Venditti and Neri Niccolai  
Biomolecular Structure Research Center, Department of Molecular Biology, University of Siena, I-53100 Siena;  
SienaBioGrafix Srl, 53100 Siena.

Nowadays genomic studies are offering an impressive amount of information on protein sequences. Structure prediction methodologies can take advantage from all the entries which are available in protein sequences data bank and the structural information which can be retrieved from PDB.



Peplomer structure of  
SARS coronavirus

In our laboratory we have obtained the structures of viral proteins with sequence homology, direct and relayed fold threading procedures to predict surface regions relevant for designing diagnostic kits and/or antiviral drugs for SARS coronavirus (1) and to explore the possible use of commercial anti-influenza virus drugs in the presence of jumps of the latter virus from other species to humans.

The interaction of protein surfaces with the outer environment has been also studied in model systems by using a nuclear magnetic resonance (NMR) paramagnetic probe approach. Thus, some aspects of the complex dynamics occurring at the protein-solvent interface have been revealed, suggesting that the formation of surface hot spots, *i.e.* relevant sites for molecular interactions, derive not only from suitable charge and

hydrophobicity potentials or local conformations, but also from the overall molecular shape (2-4).

A combined analysis of NMR and surface plasmon resonance (SPR) has been carried out to investigate on protein-peptide binding and fine details of the interaction process have been found (5). Entropic contributions to the protein-peptide complex formation have been delineated and successfully taken into account to predict protein ligands with improved affinity (6). Then, by synthesising cyclic analogs of minimum active determinants, ligands exhibiting longer life-time in the bound state have been obtained.



ACh receptor mimotope  
interacting with  $\alpha$ -bungarotoxin

- a) Ottavia Spiga, Andrea Bernini, Arianna Ciutti, Stefano Chiellini, Nicola Menciassi, Francesca Finetti, Vincenza Causarano, Francesca Anselmi, Filippo Prischi, and Neri Niccolai: Molecular modelling of S1 and S2 subunits of SARS coronavirus spike glycoprotein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2003) 310, 78-83.
- b) Niccolai N., Ciutti A., Spiga O., Scarselli M., Bernini A., Bracci L., Di Maro D., Dalvit C., Molinari H., Esposito G. and Temussi Piero A.: NMR studies of protein surface accessibility *Journal of Biological Chemistry* 276, 42455-42461 (2001).
- c) Niccolai N., Spadaccini R., Scarselli M., Bernini A., Crescenzi O., Spiga O., Ciutti A., Di Maro D., Bracci L., Dalvit C. and Temussi P.A.: Probing the surface of a sweet protein: NMR study of MNEI with a paramagnetic probe *Protein Science* 10, 1498-1507 (2001).
- d) Neri Niccolai, Ottavia Spiga, Andrea Bernini, Maria Scarselli, Arianna Ciutti, Stefano Chiellini, Irene Fiaschi, Henriette Molinari and Piero A. Temussi: NMR studies of protein hydration and TEMPOL accessibility. *Journal Molecular Biology* (2003) 332, 437-447.
- e) Scarselli M., Spiga O., Ciutti A., Bracci L., Lelli B., Lozzi L., Calamandrei D., Bernini A., Di Maro D., Klein S. and Niccolai N.: NMR structure of  $\alpha$ -bungarotoxin free and bound to a mimotope of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochemistry*, 2002; 41(5):1457-1463.
- f) Andrea Bernini, Arianna Ciutti, Ottavia Spiga, Maria Scarselli, Samuel Klein, Stefano Vannetti, Luisa Bracci, Luisa Lozzi, Barbara Lelli, Chiara Falciani, Paolo Neri and Neri Niccolai: NMR and MD studies on the interaction between ligand peptides and  $\alpha$ -bungarotoxin. *Journal Molecular Biology* (2004) 339, 1169-1177.



## MASS SPECTROMETRY IN STRUCTURAL PROTEOMICS

### Gennaro Marino

*Dipartimento di Chimica Organica e Biochimica, Università di Napoli Federico II – Napoli (Italy)*  
*e-mail: gmarino@unina.it*

Mass spectrometry (MS) is nowadays the core-methodology in expression and functional proteomics (1). Moreover MS plays a noteworthy role in highly intensive projects aimed at giving a “form” to the mono-dimensional inputs of genome sequencing (structural genomics). MS, with its unsurpassed sensitivity and dynamic range of analysis, may actually provide direct answers in fields such as: i) Validating protein models; ii) Probing structures; iii) Probing interactions; iv) Providing structural constraints data.

Basically, focal points of the protein “form” may be zoomed-out by integrating protein chemistry and MS advanced tools and locked on 3-D template by the judicious use of molecular modelling and dynamics. Structural proteomics actually combine the use of traditional protein chemistry tools (i.e.: limited proteolysis and chemical reagents) duly revisited, with modern mass spectrometry armoury. The re-visitation essentially consists in spotting only single chemical events occurring on the protein-substrate. In order to finely tune the specified reaction to this end, an array of experiments can be monitored by electrospray (ES)-MS (2). At difference with the previous classical approach of protein chemistry, one can now make use of both specific and a-specific reagents and proteases, without taking in great care the total extent of the reaction (3).

As a result of “complementary” proteolysis experiments, the exact molecular mass of the two complementary (poly-)peptides, determined by ES often in trace-amount, immediately spot the most exposed/flexible peptide bond in the selected conditions. By using the extensive armoury of available proteases is then possible to get a sufficiently detailed picture of the exposed protein backbone. Differential forms can be highlighted when unbound protein structures and their complex(es) with molecular effector(s), either of low and high molecular weight, are compared using identical proteolytic conditions.

In the case of side-chain(s) reactions, the ES-MS allows to control the 1:1 stoichiometry., while peptide mapping, using MALDI-MS or HPLC-ES-MS/MS, allows the identification of the spotted residue (3). Again by iterating the process with other specific and/or aspecific reagents, the probing of protein interacting structures can be depicted. As a corollary, cross-linking reagents, in conditions to give a single molecular derivative, may be of paramount importance in providing structural constraints information, including orientation, of secondary structures elements (4).

By extending the above concepts, D<sub>2</sub>O can be viewed as an aspecific chemical reagent in establishing, either globally and locally, the exposition of peptide back-bones. It is worth considering that even transient folding states can be conveniently studied (5).

Some examples, taken from recent work (6, 7) of my laboratory, will be presented with the aim of showing how modern proteomics strategies can be integrated in structural genomic projects.

1. Domon, B., Broder, S. *J Proteome Res.* 2004 3:253-260.
2. Zappacosta, F.; Pessi, A.; Bianchi, E.; Venturini, S.; Sollazzo, M.; Tramontano, A.; Marino, G.; Pucci, P. *Protein Sci.* 1996, 5, 802-813.
3. Zappacosta, F; Ingallinella, P.; Scaloni, A.; Pessi, A.; Bianchi, E.; Sollazzo, M.; Tramontano, A.; Marino, G.; Pucci, P. *Protein Sci.* 1997, 6, 1901-1909.
4. Scaloni, A.; Miraglia, N.; Orru, S.; Amodeo, P.; Motta, A.; Marino, G.; Pucci, P. *J. Mol. Biol.* 1998, 277, 945-948.
5. Birolo; L.; Dal Piaz, F.; Pucci, P.; Marino, G. *J. Biol. Chem.* 2002, 277:17428-17437.
6. Sirangelo I, Dal Piaz F, Malmo C, Casillo M, Birolo L, Pucci P, Marino G, Irace G. *Biochemistry.* 2003, 42:312-319.
7. Casbarra A, Birolo L, Infusini G, Dal Piaz F, Svensson M, Pucci P, Svanborg C, Marino G. *Protein Sci.* 2004, 13:1322-1330

## MICRODIALYSIS AND BIOSENSORS: THE IN VIVO MONITORING OF GLUCOSE AND LACTATE THROUGH THE GLUCODAY®

### Moscone Danila

*Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche, Università di Roma "Tor Vergata",  
Via della Ricerca Scientifica 00133 Roma, Italy. E-mail: [Danila.Moscone@uniroma2.it](mailto:Danila.Moscone@uniroma2.it)*

The clinical importance of the glucose measurements in diabetic patients and the commercial potentialities of a system able to continuously monitor this metabolite have continued to stimulate efforts by many scientists to develop such a device; however, the problem is quite difficult to solve. Few technologies have this potentiality: non invasive techniques, as Near-Infrared Spectroscopy or Light Scattering approach, still shows many problems to be solved.

The so-called minimally invasive methods measure the glucose concentration in the interstitial fluid of the skin. The most successful technique couples the microdialysis sampling technique to an electrochemical glucose "biosensor". The microdialysis samples soluble molecules from the interstitial space fluid by means of a thin hollow fibre perfused by a physiological medium. Molecules present in the interstitial fluid diffuse across the membrane and are measured by the glucose biosensor coupled on line immediately outside the body.

Based on these principles, a portable device is now commercially available, the GlucoDay® (A. Menarini I. F.R. Florence, Italy). This device is composed of a linear subcutaneous probe that is connected to a wearable unit about the size of a walkman. The latter is comprised of a programmable micropump providing flow rates from 10 to 100  $\mu\text{l}/\text{min}$ ; a wall-jet cell with a glucose biosensor; a disposable fluid line which includes a pressure sensor; a microcontroller for pump speed programming, signal acquisition and data storage; a LC display which shows glucose values every second; a keyboard; a RS232 interface, and a 9 V battery. Data can also be visualised continuously on a computer through an infrared communicating port. The system takes a glucose value every second and stores an averaged value every 3 minutes, for a total of 480 measurements per day. Two plastic bags, one for the buffer reservoir and one for the waste complete the apparatus for a total weigh of about 250 g. Alarms are also present to warn of hypo- or hyperglycaemia.

Experiments of subcutaneous continuous glucose monitoring up to 24 and 48 hours on healthy and diabetic volunteers have been carried out. Results show as the continuous glucose monitoring can allow an appropriate metabolic control of diabetes, in order to avoid both the long-term consequences of diabetes and the immediate danger of hypoglycaemia.

Moreover, the instrument has been modified substituting the glucose biosensor with a lactate biosensor and in vivo continuous experiments have been carried out on healthy rabbits, demonstrating the good accuracy of the system. This opportunity opens a wide range of new applications in clinical and sport medicine.

## ARRAY DI BIOSENSORI BASATI SU MICROTRAVI IN SILICIO PER APPLICAZIONI IN GENOMICA E PROTEOMICA

Elisabetta Macis\*, Lorena Tedeschi<sup>o</sup>, Lorenzo Citti<sup>o</sup>, Roberto Raiteri\*

*\*Dipartimento di Ingegneria Biofisica ed Elettronica, Università di Genova, Via Opera Pia 11° 16145 Genova*

*<sup>o</sup>Istituto di Fisiologia Clinica, Via Moruzzi 1, 56100 Pisa*

Travi lunghe e sottili (cantilevers), libere di muoversi ad una estremità e vincolate ad un supporto all'estremità opposta, fabbricate in silicio, ossido di silicio o nitruro di silicio, sono commercialmente disponibili come trasduttori di forza per microscopia a forza atomica. Con esse si possono misurare forze applicate dell'ordine delle decine di piconewton. L'alta sensibilità di tali trasduttori è data dalle favorevoli proprietà meccaniche dei materiali utilizzati e dalle dimensioni microscopiche dei cantilever: comportamento elastico con costanti elastiche dell'ordine del mN/m e frequenze di risonanza dell'ordine delle decine di KHz. Inoltre le tecniche di microlavorazione del silicio usate permettono di fabbricare centinaia di cantilevers in parallelo da un singolo wafer (batch processing) con il conseguente abbattimento dei costi di produzione del singolo cantilever.

Negli ultimi anni si è pensato di sfruttare le proprietà dei microcantilevers per trasdurre una serie di grandezze fisico-chimiche (calore, massa, stress superficiale) in una deformazione meccanica misurabile. Un utilizzo particolarmente interessante di tali trasduttori è come biosensori: in questo caso sulla superficie del cantilever è immobilizzato uno strato di recettori (per es. anticorpi o acidi nucleici) selettivo per l'analita di interesse. Il riconoscimento molecolare può essere rilevato come una variazione di massa (e quindi una variazione di frequenza di risonanza) oppure come una variazione dello sforzo di taglio (stress superficiale) causato dal legame analita-recettore. Una variazione di stress superficiale, se non bilanciata dalla superficie opposta del cantilever, causa una deflessione di tutta la trave che può essere facilmente misurabile con diverse tecniche.

La possibilità di sviluppare biosensori in grado di eseguire misure dirette (label free) di interazioni antigene ed anticorpo o di sequenze di complementari di acidi nucleici è già stata dimostrata con successo. Misurando le variazioni di stress superficiale si è in grado di rilevare l'adsorbimento di singoli monostrati molecolari.

Un'applicazione particolarmente attraente ed ambiziosa riguarda lo sviluppo di un biosensore in grado di misurare concentrazioni di RNA messaggero (mRNA) che codificano geni diversi direttamente da lisato cellulare. La quantità di mRNA presente in una cellula è infatti direttamente correlata al livello di espressione del gene corrispondente. Una "mappatura" dei livelli di espressione di geni diversi su una popolazione cellulare od una biopsia sarebbe di grande interesse diagnostico. Con questo obiettivo sono state sviluppate tecniche per la sintesi ed immobilizzazione di sonde per mRNA su un array di cantilevers: misurando in parallelo la deflessione di ciascun cantilever (fino a 20 cantilevers), su cui può essere immobilizzata una sonda differente, è possibile fare un'analisi diretta, rapida e quantitativa del livello di espressione di geni diversi.

I vantaggi di questo nuovo approccio si basano sulla alta sensibilità del principio di trasduzione, sulle dimensioni microscopiche dei trasduttori (possibilità di realizzare array di sensori e sistemi miniaturizzati, con conseguente necessità di piccoli volumi di campione) e sui processi di fabbricazione dei cantilever (produzione su larga scala a bassi costi e quindi possibilità di realizzare sensori usa e getta, integrabilità con elettronica e microfluidica su silicio).

I biosensori basati su microtravi sono un esempio di come l'unione di conoscenze sviluppate in settori diversi: tecniche di microlavorazione del silicio da un lato e tecniche biochimiche per la funzionalizzazione di superfici dall'altro, possono offrire nuove opportunità in numerosi settori nella sensoristica fisica e bio-chimica.

La relazione affronterà questi temi presentando diversi esempi di misure effettuate.



*Sessione di Biotecnologie*

## PROFILING OF GENES DIFFERENTIALLY EXPRESSED BY CLUSTERIN OVER-EXPRESSION IN PC-3 HUMAN PROSTATE CANCER CELLS BY DNA MICROARRAY

Scaltriti M, Caporali A, \*D'Arca D, Cacciamo AE, <sup>§</sup>Medico E, \*Corti A and Bettuzzi S.

University of Parma, Italy; \*University of Modena and Reggio Emilia, Italy; <sup>§</sup>University of Torino, Italy. E-mail: saverio.bettuzzi@unipr.it

*Objectives:* clusterin (CLU) is the most potently induced gene during rat prostate involution following castration. Many functions have been proposed for CLU *in vivo*, but its precise role has not been established yet, in particular with regard to cell proliferation and apoptosis, or its possible biological functions during prostate cancer (CaP) onset and progression. We previously found CLU down-regulated in human CaP. Transient overexpression caused inhibition of cell cycle progression. Our aim was to study gene regulation following CLU over-expression in isolated PC-3 surviving clones.

*Materials and methods:* full length CLU was cloned in pIRES-hyg1 vector (Clontech) and stably transfected colonies were isolated after selection with hygromycin B. Stable mock controls were isolated after transfection with the empty plasmid. Expression analysis was carried out by DNA microarray (Affimetrix, 21,000 genes). 10µg of total RNA of PC-3 clones (controls and over-expressing CLU) were used for each experiments. Experiments were performed in duplicate.

*Results:* stable over-expression of CLU caused severe clonogenic toxicity. Stable CLU over-expression cells showed slow proliferation rate in association to irreversible multinucleate phenotype, impaired mitosis and endoreduplication. Significant differences were found in transcripts involved in cell cycle regulation and apoptosis as compared to mock controls. In particular, Survivin, Ras and IAP gene were found up-regulated, suggesting the acquisition of a more aggressive phenotype with anti-apoptotic features that allowed the rare survivor clones to tolerate CLU over-expression. The altered phenotype of cell clones was also accompanied by significant changes in the expression of genes involved in G<sub>2</sub>/M phase modulation, such as mitogen inducible protein 2, M-phase phosphoprotein 1, mitotic centromere-associated kinase (all up-regulated) and mitotin (down-regulated).

*Conclusions:* taken together, these data confirm the anti-proliferative and pro-apoptotic properties of CLU, whose overexpression was capable of killing the vast majority of PC-3 cells, also suggesting that survival to CLU over-expression is indeed possible, but this involves the selection of tumor cell clones developing apoptosis-inhibitory properties. These data can also explain controversial findings and opposite hypothesis on CLU action, emphasizing the importance of CLU expression for the balance between cell death and viability in prostate cancer cells.

## USE OF PHAGE DISPLAY RANDOM PEPTIDE LIBRARY TO IDENTIFY SPECIFIC MOLECULAR TARGETS IN TUMOR PROGRESSION.

Serena Marchiò and Federico Bussolino

*Dipartimento di Scienze Oncologiche e Istituto per la Ricerca e la Cura del Cancro. Università di Torino. 10060 Candiolo (Torino)*

Angiogenesis is a complex multistep process that can occur in tumors or in response to various stimuli. In tumor progression, angiogenesis drives both the expansion of primary lesion and the metastasis diffusion. Angiogenic blood vessels and metastatic lesions express biochemical markers that are differentially expressed in tissues and whose functional importance has just begun to be uncovered. During these years we focused our efforts in finding new molecular determinants in experimental models of angiogenesis and in the features liver metastasis of colon carcinoma in humans. In animal models of tumor angiogenesis it is remarkable that several specific markers are cell membrane-associated proteinases. By using genetic elimination and biochemical inhibition, our results demonstrate a novel mechanistic role for aminopeptidase-A (APA) in pathological angiogenesis. In addition to probing the two mouse models in *APA*<sup>-/-</sup> mice, we screened a combinatorial peptide library to gain insights into the role of APA activity in angiogenesis. Given the molecular diversity of the vasculature, we reasoned that this approach would yield probes to study APA function in endothelium-derived cells, and possibly ligands to target tumor blood vessels in vivo. We selected APA-binding phage displaying specific sequences. The first two phage clones bound specifically to APA and their binding was specifically inhibited by the cognate synthetic peptide CPRECESIC. We found that the synthetic CPRECESIC peptide inhibited VEGF-induced migration and proliferation of endothelial cells. CPRECESIC peptide also inhibits cord/tube formation of microvascular endothelial cells in a Matrigel assay and angiogenesis in VEGF-stimulated chick chorion allantoic membrane. These results show (1) that the consensus motif CPRECESIC is an inhibitor of APA enzymatic activity and a suppressor of migration and proliferation of endothelial cells and (2) that inhibition of APA enzymatic activity leads to a dose-dependent decrease in cord/tube formation during angiogenesis (1).

A differential phage display screening random peptide has been also performed on liver metastasis of human colon carcinoma and the normal tissue coming from the same subjects. By this approach we isolated two phage clones that specifically recognize this kind of secondary lesions, while do not recognize liver metastasis of other adenocarcinomas and melanomas. Similarly the clones selectively bind cell lines of colon cancer liver metastasis, but not of other neoplastic lesions. Studies are in progress to verify the specificity of these phage on the metastases of colon cancer in other anatomical districts.

1. Marchiò et al. *Cancer Cell* 5:151-162, 2004

## SVILUPPO DI MICROCHIP ELETTRONICI PER LA DIAGNOSI DI SORDITÀ GENETICHE.

F. Del Vecchio Blanco<sup>1</sup>, V. Maddaloni<sup>1</sup>, L. Esposito<sup>1,2</sup>, MC. Patrosso<sup>3</sup>, G. Lando<sup>3</sup>, S. Penco<sup>3</sup>, A. Marocchi<sup>3</sup>, P. Primignani<sup>4</sup>, M. Travi<sup>4</sup> & P. Gasparini<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>Dipartimento di Patologia Generale, Seconda Università degli Studi Di Napoli, Via De Crecchio, 7 I-80138-Napoli

<sup>2</sup>TIGEM (Telethon Institute of Genetics and Medicine), Via P. Castellino 111 I-80131, Napoli

<sup>3</sup>Laboratorio analisi chimico cliniche patologia clinica Analisi Genetiche Osp. Niguarda Ca' Niguarda - Milano

<sup>4</sup>Laboratorio di Genetica Molecolare ICP - Milano

### *Introduzione ed Obiettivi*

La sordità genetica interessa circa il 4% della popolazione di età inferiore ai 45 anni e comprende un vasto spettro di manifestazioni cliniche. Nei paesi sviluppati, almeno il 60-70% dei casi sordità è dovuto a cause genetiche mentre la rimanente parte è dovuta a cause di natura differente quali infezioni durante la gravidanza, trauma, somministrazione di farmaci, etc. La sordità genetica può essere trasmessa come carattere dominante, recessivo, legato al cromosoma X e mitocondriale. Molti geni sono responsabili di sordità genetiche sindromiche e non sindromiche. Le sordità genetiche non sindromiche sono principalmente (80%) dovute a geni recessivi (o mutazioni). Sebbene più di 40 loci siano stati associati a forme di sordità non sindromiche recessive (DFNB), un unico locus, DFNB1, è responsabile della maggior parte dei casi. Il gene coinvolto in questo tipo di sordità è *GJB2* (Cx26) e la frequenza dei portatori sani per mutazioni di CX26 (in particolare comunissima 35delG) nel Bacino del mediterraneo è di circa 1/35. Questa situazione è particolarmente favorevole alla programmazione di screening genetici sia della popolazione a rischio (identificazione precoce dei malati) che dei portatori sani nella popolazione generale. Tali screening necessitano però di metodologie che li rendano rapidi, efficaci, in grado di analizzare un numero elevato di soggetti ed infine economici. La tecnologia microarray permette una rapida identificazione ed un'analisi precisa di molecole biologiche: l'ulteriore possibilità di applicare campi elettrici ha prodotto una nuova generazione di array elettronici che presentano maggiore accuratezza, maggiore velocità e flessibilità rispetto ad altre generazioni di microarray tuttora disponibili

### *Metodologia*

Le mutazioni selezionate sono la mutazione mitocondriale A1555G, e sette del gene CX26 (35delG, M34T, L90P, R184P, 167delT, 235delC, IVS1+1G-A) che comprendono la quasi totalità delle mutazioni più frequenti presenti nel gene CX26. Tali mutazioni sono state utilizzate per lo sviluppo di un chip per la diagnosi e lo screening delle sordità genetiche. A tale scopo è stata utilizzata la piattaforma NanoChip® della Nanogene, che è in grado di combinare un'ibridazione mediante applicazione di un campo elettrico con un sistema di microfluidica.

Allo scopo di validare l'accuratezza e la riproducibilità di questo microchip sono stati selezionati 150 campioni, precedentemente analizzati mediante sequenziamento automatico. La validazione dell'array è stata condotta utilizzando il metodo del doppio cieco. I risultati ottenuti mostrano una totale corrispondenza tra le diagnosi effettuate con il metodo della sequenza diretta e la diagnosi effettuata con il nuovo chip elettronico.

### *Risultati e Conclusioni*

I dati ottenuti hanno permesso di dimostrare che la piattaforma NanoChip® della Nanogene fornisce uno strumento ad alta tecnologia e ad alto rendimento, relativamente a basso costo, utilizzabile per diagnosi e lo screening nella popolazione delle sordità genetiche.



## **TERAPIA GENICA ANGIOGENICA E CELLULARE PER LA CURA DELLE MALATTIE ISCHEMICHE: PROMESSE, LIMITI E NUOVE PROSPETTIVE**

**Paolo Madeddu, Costanza Emanuelli**

*Laboratorio Nazionale INBB, Sezione di Medicina Cardiovascolare e Terapia Genica, Osilo e Porto Conte Ricerche.*

Le malattie ischemiche rappresentano la epidemia del nuovo millennio. Nonostante le tecniche di rivascularizzazione abbiano compiuto progressi e consentano di ripristinare il flusso anche nel caso di ostruzioni arteriose distali, una serie di pazienti rimane esclusa da tale interventi per la concomitante disfunzione del microcircolo. La terapia genica con sostanze angiogeniche e il trapianto di cellule staminali costituiscono nuove metodologie che singolarmente od in associazione mirano a risolvere il problema di pazienti non curabili con terapie tradizionali. Nonostante queste premesse, i primi trials clinici di angiogenesi terapeutica hanno in parte deluso le aspettative e la terapia cellulare con trapianto autologo di progenitori endoteliali circolanti o di origine midollare ha avuto un inizio troppo precoce e non supportato da sufficienti evidenze pre-cliniche. Scopo della presentazione sarà quello di evidenziare gli attuali limiti dell'approccio e nuove strategie e per superare gli ostacoli che precludono una efficace applicazione clinica.

Emanuelli C, Graiani G, Salis MB, Gadau S, Desortes E, Madeddu P. Prophylactic gene therapy with human tissue kallikrein ameliorates limb ischemia recovery in type 1 diabetic mice. *Diabetes*. 2004; 53(4):1096-103.

Emanuelli C, Salis MB, Pinna A, Graiani G, Manni L, Madeddu P. Nerve growth factor promotes angiogenesis and arteriogenesis in ischemic hindlimbs. *Circulation*. 2002;106(17):2257-62.

Emanuelli C, Salis MB, Pinna A, Stacca T, Milia AF, Spano A, Chao J, Chao L, Sciola L, Madeddu P. Prevention of diabetes-induced microangiopathy by human tissue kallikrein gene transfer. *Circulation*. 2002;106(8):993-999.

## SVILUPPO DI NUOVE MOLECOLE A LOGICA DIFFERENZIATIVA PER L'INDUZIONE DI CARDIOGENESI IN CELLULE STAMINALI

**Ventura C.\***, Maioli M.†, Asara Y.†, Santoni D.‡, Scarlata I.‡, Cantoni S.‡, Perbellini A.\*.

\*Laboratory of Molecular Biology and Stem Cell Engineering, National Institute of Biostructures and Biosystems, University of Bologna, I-40138 Bologna, Italy

†Department of Biomedical Sciences, University of Sassari, I-07100 Sassari, Italy

‡Department of Biochemistry, Biophysics and Chemistry of Macromolecules, University of Trieste, I-34127 Trieste, Italy.

### *Obiettivi*

Le cellule staminali embrionali murine sono in grado di differenziarsi in cellule caratterizzate da architettura e funzioni specifiche, inclusi i cardiomiociti. Tuttavia, il processo della cardiogenesi da cellule staminali è ancora scarsamente delineato in termini molecolari e ha una resa tipicamente molto bassa. Scopo del presente studio è stato quello di sviluppare “nuove molecole a logica differenziativa” in grado di forzare in maniera selettiva il processo di cardiogenesi, ponendo le premesse per futuri approcci di ingegneria tissutale e rigenerazione miocardica.

### *Metodi*

Sono state utilizzate cellule staminali embrionali murine GTR1, contenenti un gene di resistenza alla puomicina sotto il controllo del promotore cardiospecifico di “alpha myosin heavy chain”. Questa strategia di “gene trapping” consente una selezione di una popolazione virtualmente pura di cardiomiociti di derivazione staminale. A partire dalla rimozione del “Leukemia Inhibitory Factor” (LIF) dal terreno di coltura fino al periodo di selezione dei cardiomiociti con puomicina, le cellule sono state coltivate in presenza di un estere misto dell'acido ialuronico con acido butirrico e acido retinoico (HBR).

### *Risultati*

L'HBR è stato in grado di incrementare marcatamente l'espressione dei geni GATA-4 ed Nkx-2.5 che codificano per fattori di trascrizione in grado di promuovere l'orientamento verso il fenotipo cardiaco in diverse speci animali, uomo incluso. L'HBR ha inoltre aumentato l'espressione del gene della prodinorfina, assieme alla sintesi ed alla secrezione di dinorfina B, una endorfina che svolge un ruolo primario nella cardiogenesi in cellule staminali. Questi effetti sono stati indotti dall'HBR a livello trascrizionale, come dimostrato da esperimenti di “nuclear run-off transcription” condotti in nuclei isolati. L'HBR è stato in grado di indurre un notevole aumento dell'espressione di geni cardiospecifici quali “alpha-myosin heavy chain” e “myosin light chain-2V”. Questi effetti si sono tradotti in un drammatico aumento della resa di cardiogenesi valutata come numero di colonie di cardiomiociti dotati di attività contrattile spontanea.

### *Conclusioni*

Questi risultati dimostrano per la prima volta in letteratura la possibilità di modificare chimicamente il programma genico di differenziamento cardiaco in cellule staminali pluripotenti senza ricorrere a metodiche di trasferimento genico mediante vettori virali. Le implicazioni biomediche di questa scoperta aprono la strada a potenziali sviluppi di terapia cellulare del danno cardiaco congenito e acquisito.

*Sessione di Unità Funzionali Biologiche Supramolecolari*

## INVESTIGATION OF PROTEIN AGGREGATION UNDER CONDITIONS IN WHICH THE PROTEIN IS INITIALLY NATIVE

**Fabrizio Chiti**

*Dipartimento di Scienze Biochimiche, Università di Firenze, Viale Morgagni 50, 50134 Firenze- [fcchiti@scibio.unifi.it](mailto:fcchiti@scibio.unifi.it)*

Conversion of specific proteins and peptides into well-ordered aggregates with a fibrillar appearance is associated with and thought to be the pathogenic cause of ca. 25 well described human diseases. We will show that aggregation into amyloid fibrils is not limited to the few polypeptide chains linked to degenerative conditions, but is a property common to many other proteins, including human muscle acylphosphatase (mAcP), the N-terminal domain of the bacterial protein HypF (HypF-N) and the acylphosphatase from *S. solfataricus* (Sso AcP).

Protein aggregation was studied for HypF-N under conditions that are destabilising enough to promote aggregation, but in which the protein domain still adopts a native or native-like conformation (6-12% (v/v) trifluoroethanol). Emphasis was given to the formation of protofibrils, i.e. those pre-fibrillar aggregates that are thought to be the pathogenic agent at least in neurodegenerative diseases. Under these conditions, prior to aggregation, the protein domain has far-UV circular dichroism and intrinsic fluorescence spectra similar to those recorded for the native state in the absence of trifluoroethanol. The binding to the fluorescent probe ANS is also similar for the native protein in the absence of TFE and for the protein in the presence of small amounts of TFE. These observations are indicative of the presence of a species that prior to aggregation is indistinguishable from the native conformation. In spite of the native or native-like conformation present initially under these conditions, the protein domain converts slowly, on the minute-hour time-scale, into amyloid protofibrils, as indicated by Thioflavine T fluorescence measurements, transmission electron microscopy and atomic force microscopy. The observed rate constant for aggregation equals the apparent aggregation rate constant measured under conditions in which the protein populates a partially folded state multiplied by the equilibrium constant between the fully native and the partially folded state. In addition the observed aggregation rate has a strong positive dependence on the concentration of the destabilising agent trifluoroethanol. These kinetic data are consistent with an aggregation process being promoted by the rare and transiently populated partially folded state that is in equilibrium with the fully native state.

We have extended such studies to investigate protein aggregation *in vivo* where a number of additional factors able to modify dramatically the aggregation behaviour of proteins are present. Since HypF-N is from *E.coli*, the expression of this protein domain in *E.coli* cells offers opportunities to study the aggregation of a globular protein in its natural environment. While the solution conditions of the *E.coli* cytosol cannot be modified to decrease the conformational stability of HypF-N with the aim of promoting aggregation, the same end was achieved by expressing variants of the protein domain with destabilising mutations. The results for a range of mutational variants indicate that while mutants with a conformational stability similar to that of the wild-type protein are soluble in the *E. coli* cytosol, folded variants with single point mutations predicted to destabilise, but not denature, the protein invariably aggregate after expression. We show, however, that aggregation of destabilised variants can be prevented by incorporating multiple mutations designed to reduce the intrinsic propensity of the denatured polypeptide chain to aggregate. These results suggest that the mechanism of aggregation of HypF-N under conditions in which the protein is initially native, a mechanism proposed from *in vitro* studies and involving a scarcely populated partially folded state in equilibrium with the native state, also accounts for the physiologically relevant aggregation process observed *in vivo*.

## PROBING PROTEIN CONFORMATION BY MASS SPECTROMETRY.

G. Infusini<sup>1</sup>, D. Pagnozzi<sup>1</sup>, I. Sirangelo<sup>2</sup>, G. Irace<sup>2</sup>, L. Birolo<sup>1</sup> and P. Pucci<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Dip Chimica Organica e Biochimica, Via Cinthia 6, 80126 Napoli. <sup>2</sup>Dip. Biochimica Biofisica, Seconda Università Napoli, Napoli. <sup>3</sup>CEINGE Biotecnologie Avanzate, Napoli.

Integrated strategies combining limited proteolysis (LP) and H/D exchange with Mass Spectrometry (MS) have been optimized for the analysis of transient intermediates in dynamic processes such as protein folding/misfolding and complex formation, and for the definition of the core of protein fibrils.

The LP approach relies on the concept that the three-dimensional structure of proteins provides a stereochemical barrier to enzymatic attack, leaving only the exposed and flexible regions accessible to proteases. In these conditions, the activity of proteolytic enzymes is selectively addressed at few specific sites. When these experiments are performed using various proteases with different specificity, the resulting pattern of preferential proteolytic sites depicts the overall surface topology of the proteins. Different preferential proteolytic patterns will then be observed following conformational changes taking place in different experimental conditions leading to the identification of the regions involved in the variations.

Alternatively, H/D exchange experiments followed by mass spectrometry analysis can be used to monitor conformational changes in proteins. The exchange rate of hydrogens at peptide amide linkages is strongly dependent on their localization in the 3D structure of the protein; amide protons occurring in structured regions and/or hydrogen bonded show slow exchange kinetics, whereas those present in flexible portions display fast H/D exchange. Since MS analysis is able to measure the increase in protein mass associated with the number of deuterium atoms, the amount of deuterium incorporation and the kinetics of H/D exchange can be related to conformational changes of proteins in solution under different experimental conditions. In this respect, mass spectrometry has the unique advantage of being able to analyse the exchange behaviour of coexisting conformation in mixture. Moreover, H/D experiments can also be used to identify individual regions of the polypeptide chain involved in structural changes. Following H/D exchange, the labelled protein is digested with pepsin under acidic conditions and the fragments generated are then analysed by LC-MS/MS. Peptides are identified by their unique mass values and by comparison with the fragments generated by the unlabelled protein/s. The increase in the mass value of the labelled fragments provides information on the solvent exposition of specific regions of the protein/s.

These approaches have been employed to investigate three mutants of sperm whale apomyoglobin. Myoglobin is an alpha-helical globular protein containing two highly conserved Trp residues located at positions 7 and 14 in the first N-terminal alpha-helix of the protein. Folding of myoglobin occurs through an intermediate state in which the subdomain comprising A, G and H helices has a native-like structure. This species was shown to closely resemble an equilibrium intermediate stable at pH 4.0. One or both tryptophanyl residues were substituted with Phe, with the aim to investigate the role of Trp residues in the folding process and to explain why the double mutant is not able to correctly fold at physiological pH and gives rise to amyloid fibrils (1, 2).

Both single mutants showed a less organized AGH subdomain at pH 4.0, with an increase of solvent accessibility to indole residues, particularly for W14F. H/D exchange and limited proteolysis experiments supported these data, indicating a high general flexibility in W14F while W7F showed a more localized loss of structure in the G helix. The same experiments were carried out on the double mutant that is soluble at pH 4.0. The results indicated that the protein is not only much more flexible as a whole, but also less structured in the helices F, G and H, thus suggesting that the AGH subdomain is not correctly folded. The incorrect GH and AH pairings in this mutant can affect the folding pathway and induce amyloid formation.

## CINETICA VERSUS CRISTALLOGRAFIA NELLO STUDIO DELLE RELAZIONI STRUTTURA FUNZIONE DI METALLO-ENZIMI

Di Paolo Maria Luisa, Lunelli Michele, Scarpa Marina, Zanotti Giuseppe e Rigo Adelio

### *Obiettivi*

Valutazione delle possibilità offerte da studi di tipo cinetico e di tipo cristallografico e computazionale nello studio della funzione di enzimi: esempio di alcune ammino-ossidasi al rame la cui struttura 3D è stata recentemente risolta.

### *Metodi*

Metodi cinetici basati sulla misura dell'attività enzimatica per via spettrofotometrica con varie tipologie di substrati ed inibitori, a differenti valori di pH, forza ionica e temperatura.

Metodi cristallografici basati sull'impiego della luce di sincrotrone e di metodi computazionali di meccanica e dinamica molecolare.

### *Risultati*

Le ammino a rame sono degli enzimi ubiquitari, omodimerici, contenenti un cofattore carbonilico ed uno ione rame per subunità. Catalizzano l'ossidazione del gruppo amminico primario del substrato ad aldeide, mediante l'ossigeno molecolare. Nonostante le ammino ossidasi siano ampiamente diffuse nel mondo animale e vegetale, la struttura di solo 5 di questi enzimi è stata risolta mentre la loro attività di è stata studiata utilizzando essenzialmente la benzilamina, una molecola non fisiologica.

I risultati di uno studio da noi intrapreso su due di questi enzimi (ammino ossidasi ottenute da germogli di pisello e dal plasma bovino) hanno dimostrato che:

i metodi cinetici, utilizzando substrati ed inibitori aventi varia struttura (1-3), permettono:

i) la distinzione e caratterizzazione dello stadio di interazione chimica da quello di interazione fisica (docking) mettendo in luce la sostanziale indipendenza del primo dalla struttura del substrato mentre le costanti relative al docking, variano di molti ordini di grandezza, con conseguente variazione dell'efficienza catalitica;

ii) di dedurre un modello della struttura del sito attivo in termini di dimensioni,  $pK_a$  dei gruppi aventi un ruolo nel docking dei substrati ed inibitori, presenza e ruolo delle zone idrofobiche.

i metodi cristallografici e computazionali (4-5) permettono di ottenere immagini 3D dettagliate del sito attivo in termini di dimensioni, distribuzione delle cariche elettriche, delle zone idrofobiche etc. informazioni che tuttavia in certi casi sono insufficienti a spiegare differenti comportamenti funzionali.

### *Conclusioni*

Nel caso di questi due enzimi l'approccio di tipo cinetico ha dimostrato la possibilità di ottenere in modo relativamente semplice informazioni sulle correlazioni funzione-struttura, informazioni che a volte, non si possono ottenere con studi di tipo strutturale.

### *Bibliografia*

(1) Di Paolo, M.L., Scarpa, M., Corazza, A., Stevanato, R. and Rigo, A. (2002) *Biophysical J.* 83: 2231-2239

(2) Di Paolo, M.L., Stevanato, R., Corazza, A., Vianello, F., Lunelli, L., Scarpa, M., and Rigo, A. (2003) *Biochemical J.* 371: 1-8

(3) Di Paolo, M. L., Lunelli, M., Scarpa, M. and A. Rigo (2004). *Biochem. J.* 384: 1-8 (in press).

(4) Calderone, V., Di Paolo, M.L., Trabucco, M., Biadene, M., Battistutta, R., Rigo, A. and Zanotti, G. (2003) *Acta Cryst. Biological Cryst. Section D59: 727-729*

(5) Lunelli, M., Di Paolo, M.L., Buadene, M., Calderone, V., Battistutta, R., Scarpa, M., Rigo, A., and G. Zanotti. (2004) *J.Mol. Biol.* submitted .

## COPPER(II) BINDING SITES AND COORDINATION FEATURES IN PRION PROTEINS

**Enrico Rizzarelli**

*Dipartimento di Scienze Chimiche, Università di Catania e Istituto di Biostrutture e Bioimmagini del CNR, Sezione di Catania.*

Prion diseases are fatal neurodegenerative diseases that include Creutzfeldt-Jacob disease (CJD) in humans, mad cow disease in cattle and scrapie in sheep. The infectious agent in transmissible spongiform encephalopathies is a proteinous infectious particle or “prion”, which is devoid of nucleic acid. It is believed that these spongiform encephalopathies are caused by the accumulation of an abnormally folded isoform of the cellular prion protein (PrP<sup>c</sup>). This misfolded protein is rich in  $\beta$ -sheet and is designated the scrapie isoform, PrP<sup>Sc</sup>.

Whilst normal physiological function of the prion protein is yet to be determined, the ability of PrP<sup>c</sup> to bind Cu<sup>2+</sup> in vivo and in vitro suggests a role in copper homeostasis. Indeed, elevated copper levels promote endocytosis of PrP suggesting that PrP could transport copper into the cell. Recent results have shown that PrP<sup>c</sup> expression increased the binding of copper to the outer plasma cell membrane and increases antioxidant enzyme activities. Furthermore, it is suggested that PrP<sup>c</sup> plays a protective role by binding Cu<sup>2+</sup> in a redox inactive state. An enzymatic role for Cu-PrP is also proposed as it exhibits superoxide dismutase activity.

Structurally, PrP<sup>c</sup> contains two distinct regions. In the absence of Cu<sup>2+</sup>, the N-terminal segment, residues 23-120, is unstructured and has a high degree of main-chain flexibility in the absence of copper. In contrast, the C-terminal domain, residues 121-231, is largely  $\beta$ -helical. Residues 60-91 consist of an octapeptide sequence, PHGGGWGQ, which is repeated four times in human PrP (Hu-PrP). It is unstructured region that binds four copper ions cooperatively. Dissociation constants for copper binding to the octarepeat region have been reported to be between 1 mM and 10  $\mu$ M, although others have suggested a much higher affinity with a K<sub>d</sub> in the femtomolar range. It has been shown that copper binding to the prion protein in vitro leads to a novel protein conformation that depends on the presence of the octarepeats. However, recent studies suggest that a fifth copper can bind to the unstructured domain of PrP outside of the octarepeat region with a femtomolar dissociation constant. Residues His111 and/or His 96 have been implicated in this binding. Interestingly, the unstructured region between the N-terminal domain and the structured C-terminal is considered to be essential for amyloid formation and infectivity in prion disease. Residues in this unstructured region are thought to play a pivotal role in the misfolding of PrP<sup>c</sup> into the  $\beta$ -sheet rich conformation.

The only apparently discordant result concerns experiments carried out using electron paramagnetic resonance analysis on copper(II) interaction with the structured C-terminal domain in mammalian PrP 121-231. This peptide fragment contains three histidine residues but the coordination environment and the location of binding sites of the three copper (II) complex species formed at different pH was not defined. Among the residues encompassing the three helices of the structured region, the peptide PrP 178-193, corresponding to helix two, has been found to promote copper (II) induced lipid peroxidation and cytotoxicity in primary neuronal cultures, while the analogous PrP 180-193 forms amyloid. Both these fragments contain a histidine residue, a potential anchoring site for copper(II). The stoichiometry, the stability, the binding location sites and coordination modes as well as the conformational effect of copper interaction with different peptides representing: i) the N-terminal region, ii) the unstructured domain between the N-terminal and C-terminal parts and iii) the helix two domain were investigated by a combined thermodynamic and spectroscopic approach. The results allowed us to solve some inconsistencies present in the literature, concerning the loci for Cu<sup>2+</sup> coordination and their related affinities. The comparison between the sequences of the corresponding peptide fragments of human PrP (HuPrP) and chicken PrP (ChPrP), that represents the PrP, known so far, most remote from mammalian PrP, allowed us to put into evidence the role played by the motif PXXP of ChPrP in the conformational preferences with and without the presence of copper (II). It must be underlined that the mammalian octarepeat peptides contain 50%

of glycine and 12% of proline residues, respectively, while the chicken hexarepeats encompass 16% of glycine and 33% of proline residues, respectively. The greater flexibility conferred by glycine residues might explain why the mammalian PrP N-terminal tandem amino acid repeats, unlike the ChPrP containing one PXXP sequence for each hexarepeat, do not form a stable protease resistant domain. Differently from the N-terminal regions, both ChPrP and HuPrP share the presence of a PXXP motif within the region encompassed between the N-terminal domain and the structured C-terminal segment. considered to be essential for amyloid formation and infectivity in prion diseases. Coordination of a single copper(II) to both His96 and His111 residues has been found to induce a -sheet like conformation and it has been suggested that the metal ion plays an important role in prion misfolding. While ChPrP and HuPrP share the presence of two His residues in the above-mentioned region, the avian PrP fragment does not possess the two Met amino acids in positions 109 and 112. This last residue has been proposed to be involved in the binding to metal ion, assisting the aggregation process, even though conflicting results have been reported concerning the interaction of side chains of Met residues with the copper ion.

The physiological significance of these differences in the peptide sequences between the ChPrP and HuPrP cannot be presently rationalized, but very recent results reinforce the link between the PXXP motif and the functional properties of cellular mammalian PrP.



## AMILOIDOSI DA BETA2MICROGLOBULINA

**Paolo Viglino**

*Università degli Studi di Udine – Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche*

Le amiloidosi sono patologie legate al misfolding di proteine che in seguito a loro modificazioni strutturali si aggregano e danno origine a fibrille amiloidi. Queste fibrille, pur avendo origine da proteine molto diverse fra loro, rivelano significative somiglianze strutturali indipendenti dalle strutture di partenza. Attualmente le patologie amiloidogeniche naturali conosciute sono una ventina, ma più recentemente si è scoperto che è possibile indurre transizioni amiloidogeniche anche in altre proteine, sia pure in condizioni non fisiologiche. L'amiloidosi dovuta alla beta2microglobulina è una patologia caratteristica dei dializzati cronici, nei quali, nell'arco di alcuni anni, si ha accumulo della proteina amiloidogenica, con successiva genesi di fibrille. Nelle fibrille si ritrovano sia la proteina intatta che alcune forme troncate della stessa. E' stata quindi studiata la specie troncata deltaN6b2m che ha rivelato una tendenza alla autoassociazione molto più marcata della proteina intatta e forma facilmente fibrille. Successivamente è stata caratterizzata completamente la struttura in soluzione della beta2microglobulina intatta, mettendo in evidenza i probabili punti di attacco della transizione conformazionale che porta alla aggregazione ed alla successiva formazione di fibrille. Su questa base sono stati studiati alcuni mutanti della proteina e dalle loro caratteristiche strutturali e dai parametri cinetici del loro processo di decadimento da proteina in soluzione a forma aggregata e quindi a precipitato è stato desunto un modello per la fibrillogenesi da beta2microglobulina.



*Sessione di Biosistemi e Bioregolazioni*

## THE “FUNNY CURRENT: A KEY DETERMINANT OF HEART RATE

### **Dario Di Francesco**

*University of Milano, Department of Biomolecular Sciences and Biotechnology, Laboratory of Molecular Physiology and Neurobiology, via Celoria 26, 20133 Milano, Italy*

Since its first description discovery in 1979 (Brown et al., 1979), extensive work on the  $I_f$  current has amply demonstrated its key role in the generation and neurotransmitter-induced modulation of pacemaker activity in heart (DiFrancesco, 1993). At pacemaker voltages  $I_f$  is an inward current activated by negative voltage and by intracellular cAMP (DiFrancesco & Tortora, 1991). Moderate  $\beta$ -receptor stimulation accelerates, and vagal stimulation slows, cardiac rate by increasing and decreasing, respectively,  $I_f$  at diastolic potentials via changes in cAMP level (DiFrancesco et al., 1989). Cloning of four isoforms of Hyperpolarization-activated, Cyclic-Nucleotide-gated (HCN) channels in the late 90's has shown their correlation to native f-channels. Comparison of the properties of native pacemaker channels with those of HCN channels has provided information concerning the composition and molecular features of native channels in different cardiac regions. We have learned that isoform HCN2 is expressed at low density in all cardiac regions including the conduction tissue, whereas isoform HCN4 is highly expressed in the sino-atrial node (SAN). Isoforms HCN1 and/or HCN2, depending on species, are also present in the SAN, suggesting heteromeric channel composition in the pacemaker region of the heart.

The relevance of  $I_f$  to pacemaker generation and modulation make f-channels a natural target of drugs aiming to control pharmacologically heart rate. Agents selectively reducing heart rate have been developed which act by specific inhibition of  $I_f$ , such as Ivabradine (Bucchi et al., 2002); these drugs have a high potential for treatment of diseases where heart rate reduction is beneficial, such as angina and heart failure. Knowledge of the molecular properties of HCN clones will help the development of drugs specifically interacting with cardiac, rather than neuronal pacemaker channels. Devices able to replace electronic pacemakers and based on the delivery of a cellular source of pacemaker channels to non-pacing tissue (biological pacemakers) are likely to be developed in the near future and will likely have a tremendous impact on therapies for diseases of heart rhythm.

### *References*

- Brown, H.F., DiFrancesco, D. & Noble, S.J. (1979) How does adrenaline accelerate the heart? *Nature*, 280, 235-236
- Bucchi, A., Baruscotti, M. & DiFrancesco, D. (2002) Current-dependent block of rabbit sino-atrial node  $I_f$  channels by ivabradine. *J. Gen. Physiol.* 120, 1-13
- DiFrancesco, D. (1993) Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. *Ann. Rev. Physiol.* 55, 451-467
- DiFrancesco, D., Ducouret, P. & Robinson, R.B. (1989) Muscarinic modulation of cardiac rate at low acetylcholine concentrations. *Science*, 243, 669-671
- DiFrancesco, D. & Tortora, P. (1991) Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature* 351, 145-147

## MODIFICATIONS OF N-TYPE CALCIUM CHANNEL GATING PROPERTIES IN CAVEOLIN-1 EXPRESSING CELLS

**M. Toselli, G. Biella M. Parenti and V. Taglietti**

*Università di Pavia*

Caveolins are integral proteins of glycolipid/cholesterol-rich plasmalemmal domains. The relationship of caveolin to cholesterol is of considerable interest: caveolin-1 binds cholesterol and also increases endoplasmic reticulum to plasma membrane cholesterol transport, suggesting a primary role for caveolin in cholesterol regulation. Caveolin-1 has been found in many cell types, and a robust expression of this isoform has been observed also in neuron-like cells (PC12) and in DRG neurons. To ascertain if caveolin-1 may influence neuronal voltage-gated Ca channel activity, we stably expressed this isoform in the neuroblastoma x glioma NG108-15 hybrid cell line, lacking endogenous caveolins, but expressing N-type Ca channels. Subsequently, combining whole-cell and single-channel patch-clamp recordings, we examined whether N-type Ca channel biophysical properties might be affected by recombinant caveolin-1 expression. In whole-cell recordings from cells expressing recombinant caveolin-1 we observed that the N-type current density was considerably size reduced without significant changes in the activation/inactivation time courses. In order to gather information about the mechanism of current density reduction in the caveolin-1 expressing clone, single channel activity was also investigated. Our data, obtained from cell-attached patches from control NG108-15 cells and from cells expressing recombinant caveolin-1, indicate that the reduced Ca channel activity mainly shows up in a significant reduction of the probability of channel opening and in an increase of the frequency of null sweeps. Furthermore, these changes in some of the biophysical properties of the channel well correlate with an increase of the amount of cholesterol at the plasma membrane level and with a decrease in membrane fluidity measured in caveolin expressing cells. Overall, our results might suggest that caveolin-1 expression could indirectly modify the gating of the N-type channel.

Toselli M      Dep. Physiol.-Pharmacol. Sci., Pavia, Italy

Biella G        Dep. Physiol.-Pharmacol. Sci., Pavia, Italy

Parenti M      Dep. Med. Biotech., Monza, Italy

Taglietti V     Dep. Physiol.-Pharmacol. Sci., Pavia, Italy

## **SPATIAL REGULATION OF CELL SIGNALLING: THE CASE OF PRION PROTEIN BOUND TO COPPER IONS**

**Vittorio Tomasi**

*Department of Biology, University of Bologna, I -40126 Bologna*

Glycosyl phosphatidyl inositol (GPI) -linked proteins are transmembrane proteins targeted to the outer cell surface, but subjected to internalization when they receive appropriate stimuli. Both the nature of these stimuli as well as the route and fate of internalisation are poorly understood events. The cellular prion protein (PrP<sup>c</sup>) is a well characterized GPI-linked protein which mainly appears to reside in the outer surface membrane, but which in several cells is found in the internal membrane surface (caveolae) and which follows a peculiar non clathrin dependent route of internalization. Using a neural cell line expressing caveolin-1 (cav-1) gene, we have used a combined molecular and cellular biology approach to show that PrP<sup>c</sup>, unlike many other GPI-linked proteins, contain a motif residing in its N-terminal region (octapeptide repeat) having a marked selectivity and affinity (K<sub>d</sub> in a range 1-5 micromolar) for cav-1. In contrast, Doppel, a octarepeat-devoid prion family member, when transfected to GN11 cells localized in the outer leaflet, but failed to translocate to caveolae. To interact with cav-1, PrP<sup>c</sup> has to be clustered by reacting with specific antibodies in the presence of micromolar amounts of copper ions. Once this event is complete (few minutes), the caveolar complex is detached from plasma membrane to be internalized. PrP<sup>c</sup> was found by confocal microscopy to be still intact 1 hr after internalization. Finally, we show that the PrP<sup>c</sup> caveolar complex is involved in the control of signal transduction through modification of mitogen activated protein (MAP) kinase and Fyn phosphorylation state. Thus, GPI-linked proteins appear to undergo caveolae entry only if possessing special motifs allowing an high affinity interaction with cav-1. This reaction is copper dependent and appears to involve stabilizing proteins as Fyn, which, when recruited into caveolae, is involved in the activation of extracellular-signal regulated kinase (Erk) 1/2 and in spatial regulation of cell signalling.

## **RUOLO DELLA PALMITOILAZIONE NELL'ASSOCIAZIONE DEL RECETTORE ALFA DEGLI ESTROGENI (ER $\alpha$ ) ALLA CAVEOLINA-1**

**M.Marino e A.Trentalance**

*Dipartimento di Biologia, Università "Roma 3", v.le Marconi 446, 00146 Roma*

Gli eventi rapidi mediati dal recettore  $\alpha$  degli estrogeni (ER  $\alpha$  sono attualmente ritenuti necessari e sufficienti per l'induzione dei geni che regolano il ciclo cellulare (i.e. la ciclina D1) e la transizione di fase G1/S, azioni ascritte all'effetto di un recettore ER $\alpha$  di membrana.

La strategia di attacco e il sito di localizzazione del recettore non è ancora nota. Per verificare la modalità di associazione del ER con la membrane, la presenza della palmitoilazione del ER $\alpha$  è stata analizzata in linee cellulari esprimenti ER $\alpha$  umano trasfettato o endogeno (rispettivamente HeLa e HepG2) o cellule HeLa trasfettate con un mutante del recettore Cys447Ala non palmitoilabile. Si è potuto definire che ER  $\alpha$  è una proteina palmitoilata e associata alle caveole, che la palmitoilazione è essenziale per la localizzazione sulla membrana e rende possibili le funzioni rapide non genomiche E2 dipendenti (i.e. attivazione di ERK e AKT, del promotore della ciclina D1, della sintesi di DNA); che E2 è in grado di modulare la palmitoilazione e l'interazione del recettore con la caveolina, nonché la sua funzionalità.





*Sessione di Cellule*

## PHARMACOLOGY OF BRAIN $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ EXCHANGER (NCX): FROM MOLECULAR BIOLOGY TO THERAPEUTIC PERSPECTIVES

G Pignataro, R Gala, O Cuomo, R Sirabella, GF Di Renzo and L Annunziato

Division of Pharmacology, Department of Neuroscience, School of Medicine, "Federico II" University of Naples, Via S. Pansini 5, 80131 Naples.

$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger (NCX) is a 9 transmembrane protein, widely distributed in the brain [1,2]. NCX can work in a bidirectional way, since it couples the extrusion of 1  $\text{Ca}^{2+}$  ion with influx of 3  $\text{Na}^+$  ions when it operates in the forward mode [1]. By contrast, in the reverse mode of operation 3  $\text{Na}^+$  ions are extruded and 1  $\text{Ca}^{2+}$  enters into the cells. Since the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger, in parallel with selective ion channels and ATP dependent pumps, maintains intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Na}^+$  homeostasis, it can play a relevant role in several cerebral pathophysiological conditions such as hypoxia-anoxia [3], white matter degeneration after spinal cord injury [4], brain aging [5], and Alzheimer's Disease [6]. Recently, three different isoforms of NCX, NCX1, NCX2 and NCX3 have been described in the brain, [1,2].

To determine whether the three  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger gene products, NCX1, NCX2, and NCX3, play a relevant role in the development of cerebral ischemia induced in rats by permanent middle cerebral artery occlusion (pMCAO), we examined NCX mRNA and protein expression in the ischemic *core* and in the surrounding area at different time intervals starting from the onset of the ischemic insult. The role of each NCX protein was assessed with antisense-oligodeoxynucleotides targeting each isoform. These oligodeoxynucleotides, continuously intracerebroventricularly infused with an osmotic minipump (1  $\mu\text{l}/\text{hour}$ ) for 48 hrs, were administered 24 hrs before and after the beginning of pMCAO. The results showed that all three NCX mRNA and protein levels had a different pattern of expression after pMCAO, thus suggesting that NCX gene products could play differential roles in the ischemic rat brain. The fact that just the oligodeoxynucleotides for NCX1 and NCX3 gene products were capable of inducing an increase in the ischemic lesion suggests that an unimpaired activity of these two NCX proteins may play a relevant neuroprotective role in the development of the lesion [7].

### References:

- [1] Annunziato L, Pignataro G, Di Renzo GF (2004) Pharmacology of Brain  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger (NCX): from molecular biology to therapeutic perspectives. *Pharmacological Review* (In press).
- [2] Papa M, Canitano A, Boscia F, Castaldo P, Sellitti S, Porzig H, Tagliatalata M and Annunziato L (2003) Differential expression of the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger transcripts and proteins in rat brain regions. *J Comp Neurol*. 461: 31-48
- [3] Pignataro G, Tortiglione A, Scorziello A, Giaccio L, Secondo A, Severino B, Santagada V, Caliendo G, Amoroso S, Di Renzo GF and Annunziato L (2004) Evidence for a protective role played by the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger in cerebral ischemia induced by middle cerebral artery occlusion in male rats. *Neuropharmacology* 46:439-448
- [4] Stys PK, Ransom BR, Waxman SG and Davis PK (1990) Role of extracellular calcium in anoxic injury of mammalian central white matter. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87: 4212-4216
- [5] Canzoniero LM, Rossi A, Tagliatalata M, Amoroso S, Annunziato L and Di Renzo GF (1992) The  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger activity in cerebrocortical nerve endings is reduced in old compared to young and mature rats when it operates as a  $\text{Ca}^{2+}$  influx or efflux pathway. *Biochim Biophys Acta* 1107: 175-178
- [6] Wu A, Derrico CA, Hatem L and Colvin RA (1997) Alzheimer's amyloid-beta peptide inhibits sodium/calcium exchange measured in rat and human brain plasma membrane vesicles. *Neuroscience* 80: 675-684
- [7] Pignataro G, Gala R, Cuomo O, Tortiglione A, Giaccio L, Sirabella R, Castaldo P, Matrone C, Canitano A, Amoroso S, Di Renzo GF and Annunziato L (2004) Two sodium/calcium exchanger gene products, NCX1 and NCX3, play a major role in the development of permanent focal cerebral ischemia. *Stroke* (In press, November 2004)

## PLASTICITA' SINAPTICA ATTIVITA'-DIPENDENTE NELLA GIUNZIONE NEUROMUSCOLARE

**Mario Buffelli**

*Dipartimento di Scienze Neurologiche e della Visione, Sezione di Fisiologia, Universita' di Verona Strada le Grazie 8, 37134 – Verona*

Allo sviluppo del sistema nervoso contribuiscono diversi processi tra cui quello noto come eliminazione delle sinapsi. Esso e' caratterizzato dall'iniziale formazione di un numero sovrabbondante di contatti sinaptici e da un successivo processo di rinforzo di alcuni ed eliminazione dei contatti in eccesso. Il processo e' ubiquitario ed e' di carattere competitivo. E' stato osservato per la prima volta nella giunzione neuromuscolare dove il quadro tipico dell'adulto costituito dall'innervazione di ogni fibra muscolare da parte di un solo motoneurone (innervazione mono-neuronale), e' preceduto dall'innervazione da parte di piu' motoneuroni (innervazione polineuronale), durante la vita embrionaria e post-natale precoce. La natura dei meccanismi di competizione e' poco conosciuta ed il sistema neuromuscolare, per la sua relativa semplicita', e' un eccellente modello sperimentale per indagare il ruolo dei diversi fattori in gioco.

E' ormai noto che l'attivita' elettrica neuromuscolare influenza marcatamente questo processo e recenti nostri lavori hanno chiarito il ruolo del pattern di scarica (sincrono vs asincrono) dei motoneuroni nella eliminazione delle sinapsi del muscolo scheletrico (Busetto et al., *J. Neurosci* 20:685-95,2000; Buffelli *et al.*, *PNAS*,99:13200, 2002; Buffelli *et al.* *Nature* 424:430-4, 2003). I nostri risultati sostengono l'ipotesi che l'attivita' sincrona dei motoneuroni presente durante i primi stadi dello sviluppo permetta l'instaurarsi dell'innervazione multipla delle fibre muscolari, mentre la successiva attivita' asincrona induca l'eliminazione dei contatti in eccesso. Infatti la sostituzione della normale attivita' asincrona di scarica dei motoneuroni con quella sincrona, in un paradigma di sinaptogenesi nell'animale adulto, causa una marcata persistenza dell'innervazione polineuronale (Busetto et al. 2000). In registrazioni elettromiografiche dell'attivita' elettrica di coppie di unita' motorie nei ratti neonati abbiamo osservato un'alta correlazione temporale tra le unita' nei primi giorni di vita, mentre nessuna correlazione e' risultata presente dopo la seconda settimana. Inoltre abbiamo osservato che il periodo in cui avviene il cambio della modalita' di scarica da sincrone ad asincrono varia con il tipo di muscolo (flessore vs estensore), ed un andamento concordante e' stato osservato per l'eliminazione delle sinapsi negli stessi muscoli. Quindi i due eventi sono in stretta relazione temporale e verosimilmente causale (Buffelli et al., 2002). Infine, il blocco della sintesi di acetilcolina in alcuni motoneuroni di un dato pool, indotto con tecniche di biologia molecolare, ha dimostrato che i terminali "vincenti", in questo modello "estremo" di competizione, sono sempre quelli capaci di sintetizzare e rilasciare acetilcolina, cioe' quelli in grado di attivare la fibra muscolare (Buffelli et al. 2003).

Risultati preliminari ottenuti di recente nel nostro laboratorio da due diversi paradigmi di sinaptogenesi nell'adulto rinforzano l'ipotesi del ruolo dell'attivita' asincrona nell'eliminazione dei contatti in eccesso. I due modelli sono: a) reinnervazione delle giunzioni neuromuscolari originali dopo schiacciamento del nervo in vicinanza del suo ingresso nel muscolo; e b) reinnervazione di fibre muscolari in rigenerazione dopo la loro distruzione da parte dell'agente miotossico marcaina. Entrambi riproducono lo sviluppo embrionario in quanto presentano una transitoria innervazione multipla delle fibre muscolari, essendo il primo modello caratterizzato dalla distruzione e rigenerazione della componente presinaptica mentre il secondo di quella postsinaptica. La sostituzione della normale attivita' asincrona con quella sincrona, ottenuta mediante blocco di conduzione dello sciatico e stimolazione a valle del blocco, induce in entrambi i paradigmi la persistenza dell'innervazione multipla delle fibre muscolari, dimostrando ancora una volta il ruolo dell'attivita' asincrona (i risultati sono presentati in dettaglio in due poster in questo congresso).

## TAKING UP GLUTAMATE AT CORTICAL SYNAPSES

**Fiorenzo Conti**

*Dipartimento di Neuroscienze, Sezione di Fisiologia, Università Politecnica delle Marche, Via Tronto 10/A, Torrette di Ancona, 60020 Ancona*

In the mammalian cerebral neocortex excitatory synaptic transmission is mediated by axon terminals forming asymmetric synapses and releasing glutamate (Glu), whereas inhibitory transmission is mediated by terminals that form symmetric synapses and release GABA. Glu- and GABA-mediated synaptic transmission in the neocortex is known to be characterized by high variability of synaptic responses, which play a crucial role in information processing in cortical circuits (Mountcastle, V.B. *Perceptual Neuroscience. The Cerebral Cortex*. Harvard University Press, Cambridge, MA, 1998). Among the several factors that contribute to this variability, receptor heterogeneity appears to be of paramount importance, even though presynaptic factors and factors acting at the cleft also have a role (Conti F. and Weinberg R. J., *Trends in Neurosciences*, 22:451-458, 1999; Cherubini E. and Conti F., *Trends in Neurosciences*, 24:155-162, 2001). Elucidation of the contribution of axon terminal molecular heterogeneity to the variability of Glu and GABA responses has so far been hampered by the lack of appropriate molecular probes.

In the last few years, specific vesicular proteins responsible for the uptake and accumulation of Glu and GABA in synaptic vesicles have been identified. Three Glu vesicular transporters (VGLUT), VGLUT1, VGLUT2 and VGLUT3 (Fremeau et al., *Trends in Neurosciences*, 27: 98-103, 2004), and a GABA vesicular transporter, VGAT (McIntire et al., *Nature*, 389:870-876, 1997), have so far been identified and characterized, allowing the issue of the molecular heterogeneity of presynaptic axon terminals to be approached. Accordingly, we undertook a systematic analysis of the distribution, localization and regulation of both VGLUTs and VGAT in the cerebral neocortex of adult and developing rat using single and double-labeling light, confocal and electron microscopic immunocytochemical techniques and blotting methods to unravel the molecular organization of glutamatergic and GABAergic synapses and explore their contribution to synaptic heterogeneity in the cerebral cortex. The results of these studies show a high degree of heterogeneity in the expression of VGLUTs and VGAT and provide new data on the development and synaptic organization of cortical circuits and on the molecular organization of glutamatergic and GABAergic synapses.

## DETERMINANTS OF HIGH FREQUENCY FIRING AND DISCHARGE PATTERN MODULATION IN CEREBELLAR PURKINJE CELLS

**Tempia F. and Sacco T.**

*Section of Human Physiology, Dept. of Internal Medicine, University of Perugia and Dept. of Neuroscience, University of Torino*

Action potentials fired by Purkinje cells are the only output signal from the cerebellar cortex. The information carried by action potentials is coded by their frequency and pattern of discharge. In both cases, the dynamic range of frequencies that can be used to encode information is strictly dependent on the capability to fire also at relatively high rates. Such high frequency firing is attained only by some types of neurons, which possess special sodium and/or potassium channels with specific properties, like fast activation and deactivation kinetics and, for sodium channels, fast recovery from inactivation. In the last decade it became clear that the Kv3 subfamily of the Kv voltage-dependent family of potassium channels meets these requirements of fast activation and deactivation kinetics. We have studied the native Kv3 potassium currents by the patch-clamp technique in intact Purkinje cells in cerebellar slices and compared them with the pattern of expression determined by single-cell RT-PCR. The slices were obtained from 5 to 9 day old mice. At this age, Purkinje cells are still developing but they already have a dendritic tree with the same branching pattern of the adult. Activation and deactivation time constants of the potassium currents at voltages close to the resting potential were about 1 ms, confirming the presence of rapid currents with properties attributable to the Kv3 subfamily. Kv3 channels are also known to activate only at very depolarised potentials, because otherwise their fast activation would dampen the rising phase of the action potential. In fact, the fast potassium currents recorded in Purkinje cells had an activation threshold of -30 / -20 mV, with a half activation voltage of about -5 mV: therefore, they can be considered as high-threshold activating currents. Kv3 channels are formed by the tetrameric assemblage of subunits which are coded by 4 genes, named KCNC1, KCNC2, KCNC3 and KCNC4, or in a different classification Kv3.1, Kv3.2, Kv3.3 and Kv3.4. The channels formed by these subunits differ mainly for the presence and the velocity of inactivation. In particular, the Kv3.4 subunit is correlated with rapidly inactivating currents. We found that in Purkinje cells Kv3 currents had a prominent inactivation, with a velocity intermediate between rapid and slow kinetics. This suggests the combination of rapidly inactivating Kv3.4 subunits with at least one of the others, in which inactivation is either slow or absent. Some steady-state inactivation is already present at -60 mV, close to the resting potential, indicating that at this voltage not all channels are available. At the steady-state, half inactivation is attained at about -50 mV. These data on inactivation indicate that, in Purkinje cells, this is a mechanism that modulates the availability of the Kv3 current depending from the starting membrane potential. The recovery from inactivation follows a slow time course, with a dominant time constant of several seconds. Each of these biophysical properties corresponds to those of Kv3 channels. A further demonstration of the Kv3 identity of the rapid and high-threshold activating potassium currents of Purkinje cells is their sensitivity to very low doses of tetraethylammonium (TEA). The  $K_d$  for the block by TEA was about 0.1 mM, confirming the extreme sensitivity of the currents to this molecule and therefore their Kv3 identity. For the single-cell RT-PCR analysis the mice age was restricted to 7 postnatal days, in order to reduce the variability. The mRNA for the Kv3.1, Kv3.3 and Kv3.4 subunits was detected in all Purkinje cells analysed. The Kv3.2 subunit was negative in all Purkinje cells. In conclusion, the expression of the Kv3 subunits in Purkinje cells at 7 days of age is very homogeneous, with three subunits present in every cell. This result suggests the possibility of formation of heterotetramers, which could explain the intermediate inactivation properties of the Kv3 currents in Purkinje cells. In current-clamp recordings, submillimolar doses of TEA significantly slowed the repolarisation of action potentials and abolished the fast afterhyperpolarisation that immediately follows. This result indicates that Kv3 currents are the main determinant of the short duration of Purkinje cell action potentials and

they are also responsible for the fast component of the afterhyperpolarisation. Both properties are essential for fast spiking because they allow a rapid recovery of sodium channels from inactivation.

The most simple types of discharge pattern are i) firing at constant frequency; ii) accelerating firing; iii) adapting (decelerating) firing. On target neurons, these discharge patterns can produce very different effects. The pattern of discharge can be controlled and modulated by potassium currents with properties opposite to those of Kv3 channels. Thus, in order to control the firing pattern, the current must activate at a low voltage, close to the resting potential. In addition to a low voltage threshold, potassium currents that also have a slow activation can produce an adapting type of discharge pattern, while inactivating currents can produce an accelerating pattern. The former property, a slow activation gate, is known for potassium channels of the KCNQ (KvLQT) and KCNH (eag) families. In 4-7 day old Purkinje cells in cerebellar slices we recorded, for the first time in a central nervous system cell, a current with a biophysical and pharmacological profile corresponding to KCNH channels of the ERG subfamily. Such current was responsible for frequency adaptation, because application of a selective blocker significantly suppressed this type of firing pattern and increased the membrane excitability. In accordance with the presence of an ERG current, we found that the three known ERG subunits (ERG1 or KCNH2, ERG2 or KCNH6, ERG3 or KCNH7) are all expressed by mouse cerebellar Purkinje cells. These findings suggest that ERG currents are important in the control of neuronal excitability and may be involved in the firing frequency adaptation also in other types of neurons in the central nervous system which express channels of the ERG subfamily.

A subthreshold activating, inactivating potassium current that might be involved in frequency acceleration in Purkinje cells was isolated by blocking the Kv3 current with TEA. This current, that can be defined as  $I_{K(A)}$ , started to activate at about -60 mV, clearly below the threshold for action potentials, and was half activated at about -25 mV. At voltages in the range of the resting potential, the time constants of activation and deactivation were between 3 and 5 ms. The inactivation followed a double exponential time course, with time constants of about 20 and 100 ms. The main component of the recovery from inactivation was fast, with a time constant of about 60 ms. The pharmacological profile had a major component sensitive to low concentrations of flecainide, in a range in which this drug is specific for channels of the Kv4 subfamily. A minor component was blocked by Agitoxin-2, which affects some members of the Kv1 subfamily. These results suggest that Purkinje cells express inactivating potassium currents, due to Kv4 and Kv1 channels, that might be involved in the generation of an accelerating firing pattern or in contrasting the frequency adaptation produced by the ERG current.

ABSTRACT  
DEI POSTER

## IN VITRO GROWTH AND DIFFERENTIATION OF HUMAN DENTAL PULP DERIVED MULTIPOTENT MESENCHYMAL STEM CELLS

Alviano F.<sup>o</sup>, Pierdomenico L.<sup>\*</sup>, Fossati V.<sup>o</sup>, Marchionni C.<sup>o</sup>, Arpinati M.<sup>§</sup>, Chirumbolo G.<sup>§</sup>, Becchetti E. #, Calvitti M. #, Bonsi L.<sup>o</sup>, and Bagnara GP<sup>o</sup>

<sup>o</sup>Department of Histology and Embriology, University of Bologna, Italy

<sup>\*</sup>Interdepartmental Center for Cancer Research "G. Prodi", University of Bologna, Italy

# Experimental Medicine and Biochemistry Science Department, University of Perugia, Italy

<sup>§</sup>Department of Hematology and Medical Oncology "Seragnoli", University of Bologna, Italy

### *Background*

Mesenchymal Stem cells (MSCs) are component of bone marrow stroma, capable of differentiation into adipocytes, chondrocytes and osteocytes and whose role in the support of hematopoiesis is well recognized. We aimed at investigating whether dental pulp MCs have such a differentiating potentiality and express the characteristic immunomodulatory activity of MSC derived from known sources such as bone marrow.

### *Methods and results*

Flow cytometric analysis showed that either Dental Pulp and bone marrow MSC from healthy donors were SH2, SH3, SH4, CD29 and CD166 positive as well as CD14, CD34, CD45 negative.

Compared to BM-MSC, DP-MSC expressed clear osteogenic and chondrogenic differentiation, but not the adipogenic one. Proliferation assay ([methyl-<sup>3</sup>H] Thymidine uptake) evaluated up to 15 days demonstrated that DP-MSC radioactivity had a steep increase from day 3 to 8, then decreasing at day 15, although still above the baseline value. On the contrary BM-MSC radioactivity did not change significantly over the time of observation.

Modulation of T Lymphocyte proliferation was studied by co-culturing PHA stimulated T cells in the presence of MSCs. Compared to T cells alone, the uptake of [methyl-<sup>3</sup>H] Thymidine was inhibited by 75 ± 3 % (BM-MSC) or 91 ± 4% (DP-MSC).

### *Conclusions*

Dental pulp is a source of cells expressing the typical phenotype of MSC; compared to BM-MSC, DP-MSC present a higher rate of proliferating cells (S-phase), and lower differentiation capabilities toward adipogenesis. DP-MSC are able to suppress stimulated T lymphocyte proliferation, as described for BM-MSC. Therefore their role in the modulation of T cell mediated reaction (GVHD) in the transplantation setting could be envisaged.



## DETERMINAZIONE DI PESTICIDI ORGANOFOSFORICI E CARBAMMICI MEDIANTE UN BIOSENSORE MONOUSO

F.Arduini<sup>1</sup>, F.Ricci<sup>1</sup>, A.Amine<sup>2</sup>, D.Moscone<sup>1</sup>, G.Palleschi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche, Università di Roma Tor Vergata, Via della Ricerca Scientifica, Rome, Italy

<sup>2</sup>Faculté des Sciences et Techniques de Mohammedia, Morocco

Lo sviluppo industriale e il continuo accrescimento della qualità della vita hanno portato ad un aumento dell'emissione sia nell'atmosfera che nell'aria di sostanze chimiche che possono essere pericolose per la salute umana e per l'ecosistema locale.

Tra i vari prodotti chimici di uso comune, i pesticidi ricoprono un ruolo importante a causa dell'ampio uso nell'agricoltura. Le pratiche agricole hanno visto negli ultimi anni un'importante diminuzione dell'uso dei pesticidi organoclorurati a favore degli organofosfati e carbammati. I pesticidi appartenenti a queste classi hanno il vantaggio, rispetto agli organoclorurati, di avere una minore persistenza nell'ambiente, avendo comunque un'alta tossicità.

Il metodo standard di analisi degli organofosfati è la gascromatografia (1) e dei carbammati è l'H.P.L.C. (cromatografia ad alte pressioni) (2). Tali metodi necessitano di un pretrattamento del campione che rende impossibile un'analisi in situ e in tempo reale, oltre a necessitare di un strumentazione costosa e di personale specializzato. Negli ultimi anni una valida alternativa è stata offerta dai biosensori che coniugano le caratteristiche di specificità proprie di un biocomponente con quelle di un'elevata sensibilità, facilità di utilizzo e strumentazione a basso costo.

Scopo di questa ricerca è proprio quello di sviluppare un biosensore amperometrico per il monitoraggio delle acque potabili per un rapido controllo della concentrazione di organofosfati e carbammati.

L'enzima acetilcolinesterasi è un enzima chiave nella trasmissione degli impulsi nervosi che viene inibito dagli organofosfati e dai carbammati. Tale enzima è stato ampiamente utilizzato nella sensoristica accoppiato all'enzima colina ossidasi per la misura di pesticidi appartenenti a tali classi. (3,4) In questo lavoro è stato sviluppato un sensore amperometrico monoenzimatico utilizzando come substrato dell'enzima l'acetiltiocolina che viene idrolizzata ad acido acetico e tiocolina, molecola elettroattiva. La misura della tiocolina è stata effettuata utilizzando elettrodi monouso ottenuti mediante stampa serigrafica. Tali elettrodi vengono poi modificati con un mediatore elettrochimico il Prussian Blue il quale mostra proprietà elettrocatalitiche verso molecole caratterizzate da gruppi SH. La misura della tiocolina viene effettuata a 200 mV vs Ag/AgCl. L'enzima è in soluzione è la concentrazione di enzima, substrato, tempo di reazione e incubazione sono stati ottimizzati. Sono state effettuate curve di calibrazione del paraoxon e dell'aldicarb.

In seguito l'enzima è stato immobilizzato mediante immobilizzazione chimica e la misura dell'attività enzimatica residua è stata condotta in cronoamperometria in un sistema in goccia.

1) C.N.R. Istituto di ricerca sulle acque. Metodi analitici per le acque.

2) L.S. Clesceri, A.E. Greeberg "Standard methods for examination of water and wastewater" 20<sup>th</sup> edition

3) Bernabei M.; Chiavarini S.; Cremisini C.; Palleschi G. Biosens. Bioelectron. 1993,8,265-271.

4) Albareda-Sirvent, M.; Merkoci, A.; Alegret, S. Sens. Actuators B, 2001, 79, 48-57

Si ringrazia per questo lavoro il finanziamento del progetto FISR 1999.

## EFFECT OF CAGING IN NANOPOROUS SILICA GELS ON THE UNFOLDING THERMODYNAMICS AND KINETICS OF GREEN FLUORESCENT PROTEIN MUT2

Barbara Campanini<sup>1,3</sup>, Sara Bologna<sup>1,3</sup>, Andrea Mozzarelli<sup>1,3</sup>, Fabio Cannone<sup>4</sup>, Giuseppe Chirico<sup>4</sup> and Stefano Bettati<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, <sup>2</sup>Department of Public Health, and <sup>3</sup>National Institute for the Physics of Matter, University of Parma, 43100 Parma, Italy; <sup>4</sup>Department of Physics and National Institute for the Physics of Matter, University of Milan-Bicocca, 20126 Milan, Italy

Proteins encapsulated in wet, nanoporous silica gels usually maintain their structural, dynamic and functional properties [1]. However, excluded volume effects and the perturbation of water structure inside the pores of the gel may have relevant effects on both the thermodynamics and kinetics of functionally relevant conformational states [2]. Therefore, encapsulation of proteins in silica gel can be exploited i) to investigate structure and dynamics of “trapped” reaction intermediates that are metastable in diluted solution [3,4], ii) to select and physically immobilize specific protein conformations useful for biotechnological applications [5], and iii) to reproduce in vitro many of the effects exerted by molecular crowding and confinement on proteins in the cellular environment [6]. To investigate the effects of encapsulation in silica gel on large scale protein dynamics, we have studied the thermodynamic stability and unfolding kinetics of a Green Fluorescent Protein, GFPmut2 (S65A, V68L, S72A GFP). Encapsulation does not induce any relevant perturbation of the secondary and tertiary structure of GFPmut2, as indicated by circular dichroism, absorption and fluorescence emission spectroscopy. However, encapsulation has striking effects on the unfolding kinetics, that are monophasic in solution and biphasic in silica gel. This result can not be attributed to a perturbed unfolding mechanism, with the stabilization in the gel of a kinetic intermediate. Rather, the analysis of the denaturant-dependence of the unfolding rates indicates that caging alters the equilibrium distribution of native conformations, so that at least two alternative substates of the protein, spectrally undistinguishable in bulk studies, are significantly populated in the absence of denaturant.

Single molecule experiments on immobilized GFPmut2 are currently ongoing, in order to gain information on the energy landscape of the distinct populations of molecules stabilized in the gel. The recovery of an altered conformational distribution upon caging indicates that studies in dilute solution can miss functionally relevant structural and dynamic properties, highlighting the importance to carry out experiments in different environments.

[1] Bettati, S., Pioselli, B., Campanini, B., Viappiani, C. and Mozzarelli, A. In *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, Nalwa, H. S., Ed., American Scientific Publishers, CA, USA, 2004, Vol. 9, pp. 81-103.

[2] Sottini, S., Viappiani, C., Ronda, L., Bettati, S. and Mozzarelli, A. *J. Phys. Chem. B* 108, 8475-8484 (2004).

[3] Viappiani, C., Bettati, S., Bruno, S., Ronda, L., Abbruzzetti, S., Mozzarelli, A. and Eaton, W. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, in press.

[4] Samuni, U., Dantsker, D., Juszczak, L. J., Bettati, S., Ronda, L., Mozzarelli, A. and Friedman, J. M. *Biochemistry*, in press.

[5] Pioselli, B., Bettati, S., Demidkina, T. V., Zakomirdina, L. N., Phillips, R. S. and Mozzarelli, A. *Protein Sci.* 13, 913-924 (2004).

[6] Eggers, D. K. and Valentine, J. S. *J. Mol. Biol.* 314, 911-922 (2001).

## A MULTI-BIOSENSOR SYSTEM FOR THE EVALUATION OF ENVIRONMENTAL POLLUTION

F. Bettazzi<sup>a</sup>, S. Laschi<sup>a</sup>, M. Mascini<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Università degli Studi di Firenze, Dipartimento di Chimica, Polo Scientifico, via della Lastruccia 3, 50019, Sesto Fiorentino, Firenze, ITALY, e-mail: [mascini@unifi.it](mailto:mascini@unifi.it)

In recent years the use of herbicides, pesticides and other environmental pollutants have caused a growing interest in their rapid and accurate determination. Standard procedures such as chromatography are reliable however a fast, sensitive and inexpensive detection method is required, especially for in-field measurements. The aim of the work presented is to develop a multi-biosensor system composed of three different electrochemical screen-printed biosensors for the detection of environmental toxicants.

Using this approach different target compounds can be chosen to assess the global level of toxicity towards human health and the environment. In the present work neurotoxic compounds, genotoxicants interacting with DNA and a certain class of herbicides were chosen as indicators of environmental pollution. In particular an acetylcholinesterase-based biosensor, a DNA-based biosensor and an amperometric biosensor based on PSII activity were chosen to detect the aforementioned classes of compounds.

The inhibition effect on acetylcholinesterase activity was used to quantify the presence of organophosphorus and carbamic pesticides: this enzyme catalyses the cleavage of acetylcholine to choline and acetate. The quantity of choline is directly related to the acetylcholinesterase activity. DNA-modified electrodes were used to detect compounds that can interact with the DNA itself. This can be achieved by measuring the changes in the intrinsic electrochemical signals of the DNA. A third parameter to evaluate possible environmental contamination is the quantification of the inhibition effect on the photosystem II (PSII) activity. This is the effect induced by certain herbicides, such as triazine, phenilureas or phenols on this protein complex, which is present in plants and some bacteria, and which is related to the photosynthetic mechanism.

The experimental data obtained with this multi-biosensor could represent an important global indication of the pollution level of particular sites of interest.

## EFFECTS OF ACTIVITY PATTERN ON THE TIME COURSE OF POLYNEURONAL INNERVATION IN A REGENERATING MUSCLE

**Carlo Bidoia, Morgana Favero, Mario Buffelli, Giuseppe Busetto, Alberto Cangiano**

*Dipartimento di Scienze Neurologiche e della Visione, Sezione di Fisiologia, Università di Verona*

Synapse competition and elimination are normal developmental phenomena in PNS and CNS. At developing neuromuscular junctions many motoneurons initially innervate each myofibre but soon after birth only one such contact remains. We previously showed that substitution of the natural activity pattern of motoneurons with a synchronous one evoked by electrical stimulation, strikingly prolongs the phase of polyneuronal innervation during adult *de novo* synaptogenesis [Busetto *et al.* 2000, *JNeurosci*,20:685]. Furthermore, perinatally, homonymous motoneurons were found to switch from synchronous to asynchronous firing, further supporting the existence of a correlation between activity pattern and synapse elimination [Buffelli *et al.* 2002, *PNAS*,99:13200].

Here, we further test the general validity of this correlation using a known model of reinnervation of regenerating myofibres. Injection into the soleus muscle of the myotoxic agent marcaine produces rapid myofibre degeneration leaving the motor nerve intact: soon after treatment, the strength of the directly elicited twitch decreases to less than 5%, to rapidly recover towards normality (50% at day 5 and 90% at day 8). Reinnervation of muscle fibres immediately follows their regeneration as seen by comparing the amplitudes of indirectly and directly evoked twitches. Our electrophysiological and confocal microscopy findings in this model of synapse formation indicate that, 1) polyneuronal innervation is transiently present (days 3-7), 2) synchronous activity, obtained by chronically applying trains of supramaximal electrical stimuli to motor axons distal to a TTX block of the sciatic nerve, significantly delays the process of synapse elimination.

## AMPLIFICATORI DIMENSIONALI PER L'UTILIZZO DELLA MICROSCOPIA A FORZA ATOMICA IN CAMPO DIAGNOSTICO.

Zennaro L., Bortoluzzi S., Rigo A.

Unità di ricerca INBB di Padova presso

Dipartimento di Chimica Biologica – Università di Padova

### Obiettivi

I recenti sviluppi delle ricerche mirate all'immobilizzazione selettiva di biomolecole quali DNA, oligonucleotidi e proteine hanno aperto la strada ad un possibile utilizzo della microscopia a forza atomica come nuova tecnica di indagine diagnostica. La strategia generale prevede l'immobilizzazione su un supporto solido di una molecola complementare alla biomolecola di interesse, che possa legare quest'ultima in modo specifico e ne renda così possibile la successiva rilevazione tramite microscopia a forza atomica. Il limite inferiore di rilevabilità a fini diagnostici non risiede tanto nella concentrazione dell'analita (in quanto la microscopia a forza atomica è teoricamente in grado di rilevare la singola biomolecola immobilizzata sulla superficie del supporto) quanto piuttosto nelle dimensioni molecolari dell'analita stesso: essendo le minime dimensioni determinabili dipendenti dalla rugosità matriciale della superficie, l'utilizzo di un amplificatore di rugosità specifica, cioè di un "amplificatore dimensionale" della specifica biomolecola d'interesse, contribuisce ad abbassare la minima dimensione molecolare rilevabile a fini diagnostici dalla microscopia a forza atomica. Scopo del lavoro è stato quello di individuare un set di possibili amplificatori dimensionali di natura inorganica, superficialmente modificabili mediante l'inserimento di opportuni bio-gruppi funzionali tali da renderli atti ad un accoppiamento specifico con l'analita di interesse, e di mettere a punto un sistema modello per la titolazione quantitativa delle biomolecole oggetto di indagini diagnostiche.

### Metodi

Il sistema modello preso in considerazione è centrato su un DNA virale quale biomolecola di interesse, per il quale sono state disegnate come molecole partner alcune sequenze complementari costituite da oligonucleotidi di 20÷30 basi. Come supporti solidi sono stati scelti vetrini silanizzati. Come amplificatori dimensionali sono state utilizzate nanosfere di lattice, di dimensioni 20-40-80 e 200 nm, funzionalizzate superficialmente con gruppi -COOH, sfruttati per il successivo accoppiamento delle nanosfere alle opportune molecole partner. Tutte le molecole partner usate contenevano un linker amminico utilizzato per la loro immobilizzazione chimica tramite carbodiimmidi ai gruppi -COOH presenti sia sulla superficie del supporto sia sulla superficie degli amplificatori dimensionali. Ogni stadio della procedura sperimentale è stato esaminato mediante microscopio a forza atomica, operando in tapping mode in soluzioni tamponate a pH 7.

### Risultati

Le nanosfere della dimensione di 80nm sono risultate il miglior compromesso per il loro utilizzo come amplificatori dimensionali. La modulazione delle condizioni di forza ionica, pH e sonicazione per le procedure di lavaggio successive alla immobilizzazione su supporto solido hanno permesso di ridurre al minimo il binding aspecifico e di ottenere una riproducibile curva di calibrazione per soluzioni contenenti complessi biomolecola-nanosfera in concentrazioni nel range  $10^{-15}$  –  $10^{-12}$ M.

### Conclusioni

Sono state ottenute superfici piatte chimicamente modificate per l'immobilizzazione specifica di complessi oligonucleotide-DNA-oligonucleotide, accoppiati a nanosfere funzionalizzate quali amplificatori dimensionali per la loro determinazione tramite microscopia a forza atomica in soluzione. È stata realizzata una modulazione quantitativa del binding specifico di complessi modello, utilizzabile per la titolazione quantitativa di varie biomolecole di interesse diagnostico.

## **Ca<sup>2+</sup> DEPLETION INDUCES NUCLEAR CLUSTERIN, A NOVEL EFFECTOR OF APOPTOSIS IN HUMAN PROSTATE CELLS**

**Caccamo<sup>1</sup> A. E., Scaltriti<sup>1</sup> M., Caporali<sup>1</sup> A., D'Arca<sup>2</sup> D., Corti<sup>2</sup> A., Corvetta<sup>1</sup> D., and Bettuzzi<sup>1</sup> S.**

<sup>1</sup> *Dipartimento di Medicina Sperimentale, University of Parma, Via Volturno 39 - 43100 Parma, Italy;* <sup>2</sup> *Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Modena e Reggio Emilia, Modena, Italy.*

### *Objectives:*

Clusterin intracellular trafficking and action have not clearly bound to any known metabolic or signal transduction pathway so far. We report here that cytoplasm Ca<sup>2+</sup> deprivation by BAPTA-AM was sufficient to cause production and translocation of a 45 kDa clusterin isoform to the nucleus in SV40-immortalized human prostate epithelial cells PNT1A, priming cells to cell detachment-induced apoptosis (anoikis).

### *Methods:*

Clusterin protein accumulation was studied using Western blot analysis. Cell growth and viability were studied using both the crystal violet and the trypan blue methods. Cell morphology and apoptotic nuclei were studied using phase contrast images, Giemsa and DAPI nuclear staining. FACS analysis and caspase-3 activity assay were performed for evaluation of apoptosis induction. Clusterin intracellular localisation was analysed using fluorescence immunocytochemistry. Finally, we transiently over-expressed a truncated and not secreted form of clusterin to study its sub-cellular localisation and biological effects.

### *Results:*

Clusterin nuclear isoform initially caused inhibition of cell proliferation, then detachment of cells specifically arrested at the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-S phases checkpoint of the cell cycle, leading ultimately to anoikis death. Both Ca<sup>2+</sup> and the caspase-inhibitor z-VAD-fmk supplementation were effective at rescuing the cells by blocking clusterin nuclear translocation, demonstrating that sub-physiological levels of extra-cellular Ca<sup>2+</sup> can trigger nuclear targeting of the 45 kDa clusterin and apoptosis. Importantly, transient expression of exogenous nuclear clusterin induces growth suppression and anoikis in the absence of Ca<sup>2+</sup> deprivation.

### *Conclusions:*

These results show for the first time that Ca<sup>2+</sup> level is an important factor controlling clusterin expression. Moreover, the control exerted by Ca<sup>2+</sup> signalling on clusterin proteomic profile and intracellular trafficking suggests a role for intracellular Ca<sup>2+</sup> in the regulation of apoptosis in androgen-dependent prostate epithelial cells. This effect is mediated by induction of the anti-proliferative activity of clusterin nuclear form.

## REGULATION OF GENE EXPRESSION OF MITOCHONDRIAL AND HEAT SHOCK PROTEINS (HSPs) IN AGING AND NEURODEGENERATIVE DISORDERS

V. Calabrese, C. Colombrita, A. Ravagna, G. Tomaselli, M. Sapienza, E. Guagliano, D.A. Butterfield, A.M. Giuffrida Stella

Dept of Chemistry, Biochemistry & Mol. Biol. Section, Faculty of Medicine, University of Catania. Viale Andrea Doria 6 - 95100 Catania – ITALY. Email: calabres@mbox.unict.it

Oxidative damage plays a crucial role in the brain aging process<sup>1</sup>. Oxidative stress alters the expression of mammalian antioxidant enzymes and also enhances expression and/or DNA binding of numerous transcription factors, including fos, SAPK, NFkB and HSF. The heat shock factor (HSF) is the transcriptional activator for the synthesis of cytoprotective proteins called heat shock proteins (HSPs)<sup>2</sup>. HSPs induction is not only a signal for detection of physiological stress, but is utilized by the cells in the repair process following a wide range of injuries<sup>3</sup>. Cells constitutively overexpressing HSPs are resistant to a variety of oxidants and to heat shock, and it has been suggested that the protective effect against oxidative injury may result from protection against oxidant-induced DNA damage. In addition, an increasing body of evidence suggests that dysfunction of cell energy metabolism is an important factor in NO-mediated neurotoxicity and that the intracellular content of thiols is crucial in determining the sensitivity of cells to oxidative and nitrosative stress<sup>4-6</sup>.

We have recently demonstrated either in vivo in rat brain or in vitro in astroglial cells the role of reactive oxygen and nitrogen species in inducing the expression of heat shock proteins<sup>7</sup>. The present study was aimed to investigate, in rats 6, 12 and 28 months old, the role of heat shock signals on aging-induced changes in mitochondrial and antioxidant functions. In all brain regions examined the synthesis of heat shock protein 70 increases with age up to 28 months; at this age the maximum induction was observed in the cerebellum followed by cortex, striatum and hippocampus. NO synthase showed a parallel increase, which was associated with significant changes in glutathione redox state. Interestingly, a significant positive correlation between decrease in GSH/GSSG ratio and increase in hsp70 expression was observed in all brain regions examined during aging. Analysis of mitochondrial enzyme activities showed a progressive decrease in Complex I activity in all brain regions examined. However, only in the hippocampus of 28 months aged rats this decrease was statistically significant, compared to 6 months old animals. Our results are in agreement with recent evidence indicating mitochondria as selective target of hsp70 protection against oxidative insult, and sustain our recent hypothesis on a possible regulatory role of glutathione redox state on the expression of heat shock proteins<sup>8,9</sup>. Increase of hsp70 stress proteins would help the functional recovery of oxidatively damaged proteins and thus protects cells from progressive age-related cell damage. In conclusion, our results may be relevant for the free radical hypothesis of brain aging<sup>10</sup> and suggest that the hsp70 signal pathway may represent a basic mechanism of defence to oxidant-induced impairment of CNS function occurring in aging and neurodegenerative disorders.

### References:

2. Calabrese V. et al., 2004. *Mech. Age Dev.* 125: 325-335.
3. Poon H.F. et al., 2004. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 59: 478-493.
4. Poon H.F. et al., 2004. *Clin. Geriatr. Med.* 20: 329-359.
5. Ames BN. 2004. *Free Radic. Res.* 38:157-165.
6. Scacco S. et al., 2004. *J. Biol. Chem.* 278: 44161-44167.
7. Carelli V. et al., 2004. *Biochim Biophys Acta.* 1658: 172-179.
8. Calabrese V., et al., 2002. *J. Neurosci. Res.* 67: 612-623.
9. Calabrese V. et al., 2004. *Antioxid Redox Signal.* 6: 895-913.
10. Scapagnini G. et al., 2004. *Antioxid Redox Signal.* 6: 811-818.
11. Calabrese V. et al., 2004. *In Vivo.* 18: 245-267.

## COMBINED NMR-CRYSTALLOGRAPHIC INVESTIGATION OF THE INCLUSION OF MOLSIDOMINE INTO $\alpha$ -, $\beta$ - AND $\gamma$ -CYCLODEXTRINS

Uccello-Barretta G.<sup>a</sup>, Balzano F.<sup>a</sup>, Paolino D.<sup>b§</sup>, Ciaccio R.<sup>b</sup>, Guccione S.<sup>b</sup>.

<sup>a</sup>Dipartimento di Chimica e Chimica Industriale, Università degli Studi di Pisa, via Risorgimento 35, 56126 Pisa, Italy.

<sup>b</sup>Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università degli Studi di Catania, V.le A. Doria 6, Ed. 2 Città Universitaria, I-95125 Catania, Italy.

NMR spectroscopic and molecular modelling methods have been employed to describe the inclusion of molsidomine into  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -cyclodextrins, pointing out the factors determining the selectivity of the complexation<sup>1,2</sup>. The experimental results were compared and validated by the analysis of crystallographic data as retrieved from the Cambridge Structural Database (CSD) (version 5.25, November 2003. (Data update 3: July 2004: CSD code : KABZES)<sup>3-8</sup>.

Molsidomine represents an ideal model to exemplify the cavity selectivity: it is constituted by a central polar ring, the sydnone moiety, flanked by two less polar groups having different sizes, the smaller ethyl chain and the larger morpholine ring<sup>1,3-8</sup>.

Our results by a combined NMR study and crystallographic data analysis with the support of molecular modelling by the software MACROMODEL<sup>9</sup> address towards an important topic regarding the formation of inclusion complexes: the relative contribution of attractive interactions occurring at the external surface of the cyclodextrins (involving their hydroxyl functions) and at the internal apolar surfaces. The first can control the selectivity of the inclusion stereochemistry: by the large cavity vs the small cavity inclusion. A good fit between cavity size and included systems, essential to optimise the attractive hydrophobic interactions, is the basis of the stabilization of the included molecules. Overall the depicted dynamic process of binding between the cyclodextrin and the mesoionic guest results from a subtle interplay between polar and steric conditions, the hydration of the free species and the complexes, van der Waals interactions, dipole-dipole interactions, hydrogen bonding, and mutual conformational changes of the interacting molecules. The complexation is controlled by topological and topographic parameters indicating the relevance of the van der Waals and hydrophobic interactions. An analysis of the CSD structure reveals a strong tendency of the molsidomine to form such a kind of contacts<sup>3-8</sup>.

The polar heart of the molsidomine drives always towards the interaction with the secondary hydroxyls, leading both groups in proximity of the large diameter cavity, however a good fit between cavity size and included moieties is given by  $\alpha$ -CD towards the ethyl group, thus leading to an high degree of stabilization. By contrast the cavities of  $\beta$ - and  $\gamma$ -CD are too large to give a good fit both with the two moieties, i.e. ethyl group and morpholine ring, therefore these are included with low selectivity and the stabilizing contribution relies only on the superficial interactions which are similar for both complexes.

1) Uekama, K., Horikawa, T., Yamanaka, M., Hirayama, F. *J. Pharm. Pharmacol.* 1994, 46, 714.

2) Uccello-Barretta, G., Balzano, F., Sicoli, G., Frýglola, C., Aldana, I., Monge, A., Paolino, D., Guccione, S. *Bioorg. Med. Chem.* 2004, 12, 447 (and references cited therein).

3) Allen, F. H., Kennard, O. *Chem. Des. Autom.* 1993, 8, 1 and 31.

4) Allen, F. H. *Acta Cryst.* 2002, B58, 380.

5) Bruno, I. J., Cole, J. C., Edgington, P. R., Kessler, M., Macrae, C. F., McCabe, P., Pearson, J., Taylor, R. *Acta Cryst.* 2002, B58, 389.

6) Allen, F. H., Motherwell W. D. S., *Acta Cryst.* 2002, B58, 407.

7) Taylor R. and Macrae C. F., *Acta Cryst.* 2001, B57, 815.

8) Giordano F., *Gazz. Chim. Ital.* 1988, 118, 501.

9) a) Mohamadi, F., Richards, N. G. J., Guida, W. C., Liskamp, R., Lipton, M., Cauleld, C., Chang, G., Hendrickson, T., Still, W. G. *J. Comput. Chem.* 1990, 11, 440; b) Schrodinger, Inc.: 1500 S. W. First Avenue, Suite 1180, Portland OR 97201, USA/One Exchange Place, Suite 604, Jersey City, NJ 07302, US ([www.schrodinger.com](http://www.schrodinger.com)).

❖ Paper *in press* by the same Authors.

§ Present address: Dipartimento di Scienze Farmacobiologiche, -University Magna Grascia Catanzaro- Complesso Nini Babrieri, I-88021 Roccella di Borgia (CZ), Italy



## ANALISI MUTAZIONALE DEI GENI FANCONI IN TUMORI SPORADICI DI PAZIENTI SARDI

**Maria Colombino<sup>1,2</sup>, Maria Gavina Camboni<sup>1,2</sup>, Milena Casula<sup>2</sup>, Grazia Palomba<sup>2</sup>, Maria Stefania Ninniri<sup>1</sup>, Giuseppe Palmieri<sup>2</sup> e Francesco Galimi<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Istituto Nazionale di Biostrutture e Biosistemi, Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Sassari; e <sup>2</sup> Istituto di Chimica Biomolecolare-Sezione di Sassari, C.N.R., Alghero (SS).

L'Anemia di Fanconi (FA) è una malattia autosomica recessiva caratterizzata da anomalie congenite, progressiva insufficienza midollare, instabilità cromosomica, ipersensibilità ad agenti DNA-crosslinking e una elevata predisposizione allo sviluppo di neoplasie. La FA è rara con una prevalenza di circa 1-5 per milione ed è legata ad una alterata funzione di almeno 8 geni (FANCA, C, D1-BRCA2, D2, E, F, G, L) che cooperano in un meccanismo cellulare comune conosciuto come FA/BRCA pathway.

L'identificazione e la classificazione funzionale di BRCA2 (gene di suscettibilità al cancro alla mammella e all'ovaio) come gene Fanconi implica che il pathway è coinvolto nei meccanismi di riparo del DNA. Infatti, studi recenti indicano che alterazioni genetiche del FA/BRCA pathway, sia a livello germinale che somatico, od il silenziamento dei geni Fanconi sono in grado di promuovere il cancro mammario e ovarico o, più in generale, la trasformazione neoplastica. L'insorgenza di tumori associati ad anomalie di tale pathway è stata descritta prevalentemente su casi singoli, spesso caratterizzati da una insorgenza relativamente precoce rispetto all'età media. In uno studio condotto su 659 casi di carcinoma mammario, non selezionati per familiarità, nella popolazione del Nord Sardegna, la frequenza di mutazioni germinali di BRCA2 è risultata relativamente bassa (24 casi; 3.6%). Tuttavia, l'incidenza ed il ruolo di alterazioni dell'intero FA/BRCA pathway nei tumori solidi nonché le sue correlazioni ai diversi aspetti clinico-patologici della malattia sono ancora poco conosciuti.

L'obiettivo della ricerca è quello di verificare eventuali alterazioni dei geni Fanconi su tumori sporadici provenienti da pazienti sardi selezionati sulla base dei seguenti criteri: carcinomi diagnosticati in pazienti con età di insorgenza inferiore di almeno dieci anni rispetto all'età media o con sede di insorgenza in organi le cui neoplasie sono notoriamente sensibili al cisplatino ed agli alchilanti del DNA. E' in corso un'analisi molecolare degli otto geni FA su un totale di 100 pazienti sardi affetti da carcinoma del colon (età alla diagnosi: mediana, 51 anni; range, 29-57 anni), mediante approcci di screening multipli. In particolare, abbiamo avviato un'analisi mutazionale basata sia su MLPA, a livello dei geni FANCA e FANCD2 (entrambi comprendenti 43 esoni), che su DHPLC e sequenziamento nucleotidico, a livello dei rimanenti geni FA.

## CONFORMATIONAL SUBSTATES IN MET-HEMOGLOBIN AND DEOXY-HEMOGLOBIN CORRELATED WITH MET-MYOGLOBIN AND DEOXY-MYOGLOBIN

S.Croci<sup>1,2</sup>, J.O.Babalola<sup>1</sup>, F.Parak<sup>2</sup>, I.Ortali<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Sanità Pubblica - Sezione di Fisica –  
Università degli studi di Parma, Italy

<sup>2</sup>Physik-Department E17, Technische Universität München, Germany

### *Aims*

Protein conformations and dynamics are strictly correlated to protein functions. It is well established that proteins exist in many conformational substates or microstates characterised by a slightly different structures. Under the freezing temperature each protein is frozen in a particular substate that has a different energy enthalpy barrier.

In this work we investigate the CO binding to haemoglobin and myoglobin providing information about the dynamics of conformational substates.

### *Methods*

The binding to CO has been followed by Mössbauer spectroscopy. In particular different samples have been created: met-hemoglobin (metHb), deoxy-hemoglobin (deoxyHb) and deoxy-myoglobin (deoxyMb) in a glycerol /water solution and a deoxyMb sample in buffer without glycerol.

All the samples have been irradiated with X-ray for around 96 h and at T=100K. This irradiation creates CO molecules and in case of metHb samples creates a metastable iron II low spin (LS) component. The binding to CO is followed performing thermal cycles consisting of rising the temperature for a fixed time and cooling again. All the measurements are performed at T=77K.

### *Results*

The deoxyMb sample prepared without glycerol clearly shows that no CO molecules are inside the heme pocket at temperature lower than T=170 K and moreover that the biggest amount of CO is produced by glycerol radiolysis, since only 10% of carboxy-myoglobin is formed in this sample. In case of the metHb samples the metastable FeII LS component decreasing at T =160, T=170 and T=180 K can be fitted with a gamma distribution of energy enthalpy barriers. Even in the case of deoxyMb and deoxyHb it is possible to look at the CO binding that is produced after the irradiation and to follow the conformational changes from one deoxy stable state to the carboxy stable state.

### *Conclusions*

These experiments have shown that this method is useful to follow the CO binding. The different enthalpy barriers in case of metHb samples and deoxyHb have been compared with metMb samples (Prusakov '95) and deoxyMb samples (this work) and correlated to the influence of the solvent and to quaternary and tertiary structures.

## PRODUZIONE DI LATTE DELATTOSATO MEDIANTE BIOREATTORI NON ISOTERMI

Diano N.<sup>1,2</sup>, Grano V.<sup>1,2</sup>, Rossi S.<sup>2</sup>, Portaccio M.<sup>1</sup>, Attanasio A.<sup>2</sup>, Cermola M.<sup>2</sup>, Spezie R.<sup>3</sup>, Citton C.<sup>2</sup>, Mita D.G.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Dip. Medicina Sperimentale, Seconda Università degli Studi di Napoli

<sup>2</sup>Istituto di Genetica e Biofisica "A. Buzzati Traverso"- CNR

<sup>3</sup>Cirio Ricerche, Tenuta La Fagianeria, Piana di Monte Verna, Caserta, Italy.

L'attività della  $\beta$ -galattosidasi da *K. lactis*, immobilizzata su membrane di Nylon, è stata studiata in funzione del tempo di immobilizzazione, ovvero del tempo di contatto tra la membrana attivata e la soluzione enzimatica di immobilizzazione.

A tale scopo sono state preparate sei membrane catalitiche, differenti solo per il tempo di immobilizzazione, usando membrane di Nylon graffate con glicidil metacrilato ed attivate con esametildiammina e gluteraldeide, usate rispettivamente come spaziatore ed agente legante l'enzima. Come substrato di partenza è stato utilizzato latte totalmente scremato. L'enzima è rappresentato da una preparazione industriale di  $\beta$ -galattosidasi da *K. lactis* in glicerolo (Maxilact). Il confronto tra le sei membrane è stato effettuato esaminando i tempi necessari per aggiungere il 75% di idrolisi del lattosio inizialmente presente nel latte, operando sia in condizioni non isoterme che in paragonabili condizioni isoterme. Tale percento di conversione è il valore minimo necessario affinché il prodotto sia competitivo rispetto a quelli attualmente in commercio. In vista dell'applicazione industriale di queste membrane tutti i risultati sono stati discussi in termini della riduzione percentuale dei tempi di produzione che si ottiene operando in presenza di gradienti di temperatura.

La membrana M<sub>2</sub>, ottenuta con un tempo di immobilizzazione di 2 ore, è risultata la migliore presentando in condizioni non isoterme il più alto incremento di attività catalitica. Questa membrana rappresenta il miglior compromesso tra la quantità di enzima attivo immobilizzato e l'idrofobicità della membrana catalitica, essendo quest'ultima caratteristica un requisito fondamentale per l'instaurarsi del fenomeno della termodialisi. Con questa membrana si è ottenuta una riduzione dei tempi di produzione del 64%.

## **IMPIEGO DI BIOREATTORI ISOTERMI E NON ISOTERMI NELLA DETOSSIFICAZIONE DI ACQUE REFLUE INQUINATE DA COMPOSTI AROMATICI MEDIANTE L'USO DI LACCASI IMMOBILIZZATA**

**Durante D.<sup>1</sup>, La Montagna C.<sup>1</sup>, Maiuri P.<sup>1</sup>, Attanasio A.<sup>1</sup>, Fraconte L.<sup>2</sup>, Recupito A.<sup>2</sup>, Portaccio M.<sup>1</sup>, De Luca P.<sup>1</sup>,  
Di Martino S.<sup>1</sup>, Bencivenga U.<sup>2</sup>, Rossi S.<sup>2</sup> and Mita D.G.<sup>1,2</sup>.**

<sup>1</sup> *Dip. di Medicina Sperimentale, Seconda Università di Napoli.*

<sup>2</sup> *Istituto di Genetica e Biofisica "Buzzati Traverso" CNR, Napoli.*

Laccasi da *Rhus vernicifera* è stata immobilizzata su una membrana di nylon trattata mediante grafting chimico con glicidil metacrilato (GMA), con esametildiammina (HMDA) come spaziatore e con glutaraldeide (GLU) come agente legante bifunzionale. Idrochinone è stato utilizzato come modello di composto aromatico inquinante.

Per verificare come le procedure di immobilizzazione influenzino la velocità di reazione enzimatica, è stato studiato il comportamento catalitico della laccasi sia in forma libera che immobilizzata, in funzione del pH, della temperatura e della concentrazione del substrato. Da questi esperimenti sono emersi due comportamenti particolari: (i) la sovrapposizione dei profili dell'attività in funzione del pH per enzima libero e immobilizzato; (ii) l'aumento dell'affinità dell'enzima immobilizzato per il substrato.

Il comportamento della membrana catalitica è stato inoltre studiato in un bioreattore operante anche in condizioni non isoterme, in funzione della concentrazione di substrato e del gradiente di temperatura applicato attraverso la membrana. È stato trovato che, in condizioni non isoterme, mantenendo costante la temperatura media all'interno del bioreattore, la velocità di reazione enzimatica aumenta linearmente con l'aumento della differenza di temperatura. Tali risultati sono stati spiegati considerando il processo di termodialisi, responsabile di flussi di termodiffusione di substrato attraverso la membrana, che si aggiungono al normale flusso diffusivo.

I vantaggi di condurre il processo catalitico in condizioni non isoterme, sono discussi in termini di riduzione dei tempi di produzione e di aumento percentuale dell'attività enzimatica.

## BIOMOLECULAR ASSOCIATION: FROM STRUCTURAL DATA TO BINDING AFFINITY PREDICTION USING HINT, A “NATURAL” FORCE FIELD

Cozzini Pietro<sup>1</sup>, Fornabaio Micaela<sup>2</sup>, Francesca Spyarakis<sup>2</sup>, Kellogg Glen E.<sup>3</sup>, Abraham Donald J<sup>3</sup> and Mozzarelli Andrea<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Molecular Modelling Laboratory - Dept. General and Inorganic Chemistry, and <sup>2</sup>Dept. Biochemistry and Molecular Biology, University of Parma, 43010 Parma, Italy.

<sup>3</sup>Dept. Medicinal Chemistry and Institute for Structural Biology and Drug Discovery, Virginia Commonwealth University, Richmond, VA 23298

The prediction of the binding affinity between a protein and ligands using “*in silico*” techniques is one of the most challenging issues for computational biochemistry and drug discovery. The procedure that we are developing is based on high resolution structural data of biological macromolecules and the software HINT (Hydrophobic Interaction). HINT is a force field based on the solute partitioning data between water and 1-octanol ( $\log P_{o/w}$ ). This method is able to evaluate all the interactions involved during the biomolecular association with a unified procedure. It was validated using a set of 76 ligand-protein complexes characterized by different active site polarity and hydrophobic or polar ligands, and dissociation constants that vary over about 14 orders of magnitude. The calculated correlation between HINT score and experimental free energies exhibited a standard error of less than 2 kcal/mole. Furthermore, a procedure called “computational titration” was developed to evaluate the dependence of the binding free energy on the ionization state of ionizable groups of the ligand and the protein active site. This procedure, applied to a set of neuraminidase and HIV-1 protease inhibitor complexes, detected the optimal protonation state for binding. The contribution to the free energy of conserved water molecules bridging protein and ligand was evaluated for a set of 33 protein-ligand complexes formed by HIV-1 protease, HIV-2 protease and endothiapepsin. HINT has been also linked to docking packages, such as Autodock and Gold, to be used as scoring function.

Cozzini P., Fornabaio, M. et al. (2002) “Simple. Intuitive calculations of free energy of binding for protein-ligand complexes. 1. Models without explicit constrained water.”

J.Med.Chem. 45: 2469-2483

Kellogg G.E., J.C. Burnett et al. (2001) “Very empirical treatment of solvation and entropy: a force field derived from  $\log P_{o/w}$ .” J.Comput. Aided Mol.Des. 15:381-393

Kellogg G.E. and Abraham D.J. (2000) “Hydrophobicity: is  $\log P_{o/w}$  more than the sum of its part?” Eur.J.Med.Chem. 35:651-661

P.Cozzini, M.Fornabaio, A.Marabotti, D.J.Abraham, G.E.Kellogg and A.Mozzarelli

Free energy of ligand binding to protein: evaluation of the contribution of water molecules by computational methods Current Medicinal Chemistry - Review in press

M.Fornabaio, P.Cozzini, A.Mozzarelli, D.J.Abraham, and G.E.Kellogg Simple, intuitive calculations of free energy of binding for protein-ligand complex: II. Computational titration and pH effects in molecular models of Neuraminidase-inhibitor complexes J. Med. Chem., 2003; 46: 4487-4500

Kellogg, G.E., Fornabaio, M., Spyarakis F., Lodola A., Cozzini P., Mozzarelli A., Abraham D.J.

Getting it right. Modeling of pH, Solvent and “Nearly” Everything Else in Virtual Screening of Biological Targets J Mol Graph Model. 2004; 22: 479-486.

M.Fornabaio, F.Spyarakis, P.Cozzini, A.Mozzarelli, D.J.Abraham, and G.E.Kellogg

Simple, intuitive calculations of free energy of binding for protein-ligand complex: III. Including the free energy contribution of structural water molecules J. Med. Chem. 2004; 47: 4507-4516

# TOTAL PHENOLIC AND ANTIOXIDANT CONTENT, IN TEA AND WINE BY A NEW ENZYMATIC METHOD

Eliminato:

Stevanato R., Fabris S., Momo F.

Department of Physical Chemistry, University of Venice.

Aim of the present work is to set up a new method for the determination of the total polyphenolic content in food and beverages as possible alternative of the Folin method.

Eliminato: INTRODUCTION¶

The enzymatic method we propose offers the advantages of a briefer measuring period, a greater specificity towards the polyphenols and the almost total absence of the common interferences.

Eliminato: In the present study we propose a new enzymatic m

Eliminato:

It takes inspiration from the classic Trinder reaction and measures the total (poly)phenolic content expressed as Catechine Equivalent (CE) molarity. In fact, in the presence of peroxidase, catechin reacts with hydrogen peroxide and 4-aminophenazone, colourless, to give a coloured compound ( $\epsilon = 5900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), which absorbance at 500 nm (Fig. 1) is proportional to the amount of catechin present in the sample (inset of Fig. 1), according to the scheme-type of the Trinder reaction:

Eliminato: . In comparison with

Eliminato: , t

Eliminato: ¶  
METHODS¶

The enzymatic method we propose for the total (poly)phenolic content determination

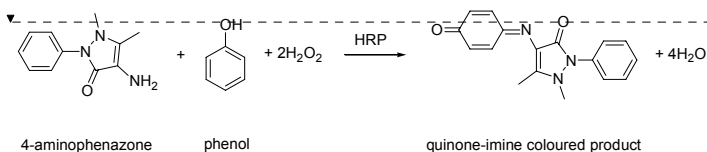
Eliminato: .

Eliminato: reacts with phenol(s)

Eliminato: (4-AP)

Eliminato:  $\text{H}_2\text{O}_2$  pre

Eliminato: following



We applied the enzymatic method for the determination of the total polyphenols contents in samples of tea (12) and red and white wine (39), and compared the results with those obtained by the Folin-Ciocalteu and quenching of the DPPH EPR signal methods. From the experimental data we found that, for tea, the different methods give an extraordinary equivalence of results ( $\approx 4 \text{ mM CE}$ ; correlation coefficient better than 0.9), supporting the validity of the enzymatic method here proposed.

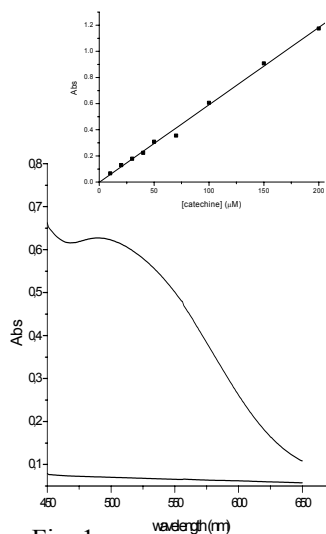


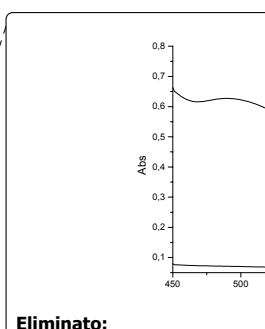
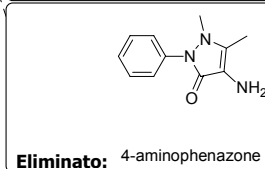
Fig. 1

In the analysis of all the wines, the three methods give different results in relation to the different specificity, and, in particular, the CE values obtained applying the Folin method appear generally higher than those obtained by the EPR method, while, as expected, the enzymatic one gives intermediate results, i.e. for the same sample it concludes:  $\text{CE}_{\text{Folin}} > \text{CE}_{\text{enz}} > \text{CE}_{\text{ESR}}$ .

Notwithstanding this, comparing the three series of data, correlation coefficients ranging from 0.85 to 0.95 were obtained for red wines while, in the case of the white wines, the corresponding values vary between 0.70 and 0.81. Independently from the method used, the red wines show CE values ( $\approx 7 \text{ mM}$ ) more than a magnitude order higher than those relating to white ones (0.5 mM), according to the literature. Unlike the Trinder method, the enzymatic one shows negligible effects from the presence of ascorbate, citrate and sulfite at 3 mM concentration.

The method we propose represents a valid alternative of the Trinder method. In fact the peroxidase catalyzed formation of the phenoxyl radicals from tea and wine (poly)phenols and their quantification by the measurement of the quinone-imine coloured product, guaranteed by the specificity of the peroxidase towards the phenolic structures, appears a more suitable measure of the antioxidant properties of polyphenols.

Stevanato, R., Fabris, S., Momo, F. *A new enzymatic method for the determination of total phenolic content in tea and wine*. In press on J. Agric. Food Chem.



## IL SISTEMA NERVOSO CENTRALE (SNC) DI OCTOPUS VULGARIS: UN NUOVO MODELLO NELLO STUDIO DELLA REAZIONE DI ADP-RIBOSILAZIONE

M. R. Faraone Mennella,<sup>1</sup> A. De Maio,<sup>1</sup> E. Natale<sup>1</sup> e B. Farina<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Dipartimento di Chimica biologica, Facoltà di Scienze, Università "Federico II" di Napoli.

C. Di Cristo<sup>2</sup> e A. Di Cosmo<sup>2</sup>.

<sup>2</sup> Facoltà di Scienze, Università del Sannio, Benevento.

### Obiettivi

*Octopus vulgaris* è un Cefalopode utilizzato spesso in ricerche di grande interesse biologico.

Negli ultimi anni il SNC di questi organismi, nel quale è stata dimostrata la presenza di diversi neurotrasmettitori, ha rappresentato un ottimo modello di studio per la trasmissione del segnale tra neuroni. E', ormai, ben noto il coinvolgimento della poli-ADPRpolimerasi (PARP) nell'esotossicità, indotta dall'ossido nitrico, un composto prodotto in risposta all'azione del glutammato, un neurotrasmettitore che si lega a recettori specifici (N-metil-D-aspartato). La PARP, utilizzando il NAD come substrato, produce polimeri di adenosina difosfato ribosio (ADPR), che si legano a specifiche proteine, modulandone la struttura e la funzione. Recentemente è stata descritta una relazione tra la poli-ADPRibosilazione di proteine associate alla cromatina e l'espressione della memoria a lungo termine, nel mollusco *Aplysia* (M. Cohen-Armon, Science, 304,1820-1822).

Alla luce di queste interessanti conoscenze, gli obiettivi preliminari della nostra ricerca sono stati :

- identificare e localizzare specificamente l'eventuale presenza di un sistema ADPRibosilante nel SNC di *Octopus vulgaris*;
- definire il ruolo fisiologico dell'ADPRibosilazione nei diversi distretti nervosi esaminati .

### Materiali e Metodi

I nuclei da cervello e lobi ottici sono stati isolati secondo il metodo di Adamietz e coll. (J.Biol. Chem., 259, 1984).

Per la purificazione delle frazioni mitocondriali da cervello, lobi e nervi ottici è stato utilizzato il metodo di Rendon e Masmoudi (J.Neurosci. Methods, 14,1985).

L'attività enzimatica nelle diverse frazioni è stata determinata sulla base dell'incorporazione di radioattività nel materiale TCA-precipitabile, ( De Lucia e coll., J. Cell. Biochem., 63,1986).

Le analisi immunoistochimiche sono state eseguite secondo Di Cosmo, (J.C.N., 428, 2000).

### Risultati

Dallo studio della localizzazione e caratterizzazione del sistema ADP-ribosilante è emerso che:

1. negli omogenati di cervello, lobi e nervi ottici del SNC di *Octopus v.* è presente una ben definita attività ADP-ribosilante;
2. tale enzima è presente in maggiore quantità nei nervi ottici;
3. l'attività enzimatica è localizzata esclusivamente nelle frazioni citoplasmatiche dei distretti nervosi esaminati;
4. l'enzima ha un peso molecolare di circa 193 kDa.
5. l'unico accettore di poli-ADPR è rappresentato da una proteina di circa 240 kDa.

Le analisi immunoistochimiche di sezioni di lobi ottici, con anticorpi anti-PARP diretti contro il sito catalitico, hanno evidenziato che l'immunoreattività è localizzata in zone ben definite ed in particolare nei nervi ottici, che rappresentano fasci di fibre nervose privi di corpi cellulari.

### Conclusioni

Nelle regioni del SNC di *Octopus vulgaris*, fino ad ora esaminate, è presente un attivo sistema ADPRibosilante extranucleare. L'enzima responsabile di tale attività potrebbe essere la v-PARP, che costituisce un componente fondamentale delle vaults, particelle ribonucleoproteiche, che hanno un ruolo importante nel trasporto di sostanze tra il citoplasma e il nucleo.

## II SISTEMA ADPRIBOSILANTE IN UN EUCARIOTE INFERIORE, IL SACCAROMYCES CEREVISIAE

M. R. Faraone-Mennella<sup>1</sup>, A. De Maio<sup>1</sup>, A. Petrella<sup>1</sup>, E. Syntichaki<sup>1</sup>, A. M. Kerbaleva<sup>2</sup>, T.G. Gulyamova<sup>2</sup> e B. Farina<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Dipartimento di Chimica Biologica, Facoltà di Scienze, Università "Federico II" di Napoli.

<sup>2</sup> Istituto di Microbiologia, facoltà di Scienze, Uzbekistan

### Obiettivi

L'ADP-ribosilazione è una modificazione post-traduzionale di proteine, catalizzata da due famiglie di enzimi: le mono-ADPRtransferasi e le poli-ADPRpolimerasi (PARP), il cui membro principale è la PARP1 eucariotica, di 116 kDa, a localizzazione nucleare.

Entrambi gli enzimi utilizzano il NAD<sup>+</sup> come substrato e trasferiscono monomeri o polimeri di adenosina difosfato ribosio (ADPR), rispettivamente, a specifiche proteine accettrici coinvolte nella regolazione di numerosi processi cellulari

Scopo di questo lavoro è stato verificare la possibile esistenza di un sistema ADPribosilante in *Saccharomyces cerevisiae*, la cui presenza non è stata ad oggi confermata, mediante determinazione dell'attività enzimatica, analisi dell'espressione della proteina e caratterizzazione dei prodotti di reazione.

### Materiali e metodi.

I nuclei da colture cellulari di *S. cerevisiae* sono stati isolati utilizzando il metodo di Adamietz e coll. (J.B.C., 259, 1984).

L'attività enzimatica su omogenati di lievito ed estratti nucleari è stata saggiata in presenza di <sup>32</sup>P-NAD (0,64mM, 10.000 cpm/nmole) dopo incubazione per 30 minuti a 37 °C o a temperatura ambiente (25°C), secondo De Lucia (J. Cell. Biochem., 63, 1986).

I saggi di attività enzimatica sono stati effettuati utilizzando due diverse miscele di reazione (miscela A e B). La miscela A è composta da NaF (2,0 mM) in Tris/HCl (100mM) pH 7,8 e la miscela B contiene Tris/HCl (10mM) pH 8,0 e MgCl<sub>2</sub> (10mM).

Gli esperimenti di immunoblotting sono stati condotti secondo E. Harlow (Antibodies: a laboratory manual, Cold Spring Harbor).

I prodotti di reazione sono stati isolati secondo M. R. Faraone-Mennella (FEBS Letters, 378, 1996).

### Risultati

Le indagini condotte su liofilizzati di cellule di lievito, su omogenati di lievito come tale e su estratti nucleari da cellule in coltura hanno messo in evidenza che:

- i valori dell'attività enzimatica, determinati sia a 37°C che a temperatura ambiente, nelle condizioni di saggio ottimali per l'enzima eucariotico, sono paragonabili;
- in presenza di inibitori specifici della PARP quali la 3-amminobenzammide (10mM), la nicotinnammide (25mM) e la teofillina (15mM), l'attività enzimatica è ridotta rispettivamente del 40%, del 20%, e del 35% ;
- l'enzima cross-reagisce con anticorpi anti-PARP1 diretti contro il sito catalitico;
- l'enzima ha un peso molecolare di circa 80-90 kDa;
- gli accettori di ADPR sono proteine di diverso peso molecolare e il prodotto della reazione enzimatica, dopo analisi specifiche, prevalentemente corrisponde ad un oligomero di ADPR.

### Conclusioni

La caratterizzazione strutturale dell'enzima presente in un eucariote inferiore, rappresentato da *Saccharomyces cerevisiae*, permetterà di definire a quale membro di proteine ADPribosilanti appartenga l'enzima di lievito e definirne, successivamente, il ruolo in specifici processi cellulari che hanno luogo in questo organismo.



## MODULAZIONE DELLA BIOSINTESI DI ACIL-PAF IN CELLULE ENDOTELIALI DURANTE LO STRESS OSSIDATIVO

M.L. Balestrieri, P. Pari, F. Felice, D. Palma, L. Quagliuolo, L. Servillo

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

Nella prevenzione del cancro e delle malattie cardiovascolari è noto che le sostanze in grado di neutralizzare i radicali liberi svolgono un'azione particolarmente efficace. Tra queste, i carotenoidi e in particolare il licopene, che rappresenta più dell'80% dei carotenoidi totali del pomodoro, proteggono le LDL (low density lipoprotein) dall'ossidazione e riducono l'espressione di molecole di adesione sull'endotelio ritardando così lo sviluppo di ateromi e di processi infiammatori. È stato dimostrato che gli effetti benefici associati al consumo di vegetali ricchi di licopene sono dovuti all'azione sinergica di tutti i componenti naturali in essi contenuti. In particolare, il licopene in associazione con alfa-tocoferolo inibisce la proliferazione di cellule cancerose in maniera ancor più efficiente del licopene da solo.

Nel presente lavoro abbiamo esaminato i meccanismi molecolari che regolano le proprietà anti-infiammatorie del licopene. In particolare, abbiamo studiato l'effetto del licopene da solo, in associazione con alfa-tocoferolo o sotto forma di estratti lipofili da pomodoro ad elevato contenuto di licopene (>90%), sulla sintesi di PAF (Fattore di Attivazione Piastrinico) e acil-PAF in cellule endoteliali durante stress ossidativo. L'acil-PAF differisce dal PAF, un potente mediatore dell'infiammazione, per la natura del legame in posizione 1 del glicerolo. Esso è circa 500 volte meno potente del PAF, agisce come inibitore non competitivo del PAF nell'attivazione dei neutrofili umani e riduce la suscettibilità delle LDL a modificazioni di tipo ossidativo. Il PAF e l'acil-PAF sono sintetizzati dalle cellule endoteliali in seguito a stimoli di tipo infiammatorio o durante stress ossidativo. L'enzima principale della biosintesi di PAF e di acil-PAF nella "via di rimodellamento" è l'acetilCoA-acetiltrasferasi (AT). La biosintesi di acil-PAF avviene, inoltre, anche ad opera della transacetilasi PAF-dipendente (TA) che utilizza i lisofosfolipidi come substrato accettore del gruppo acetile del PAF (attività  $TA_L$  della TA) catalizzando in questo modo la concomitante biosintesi di acil-PAF e degradazione del PAF.

Per tali studi le cellule endoteliali in coltura sono state prima trattate con estratti lipofili da quattro diverse cultivar di pomodoro o con licopene puro sia da solo che in associazione con alfa-tocoferolo e, successivamente, stimolate con  $H_2O_2$ .

I risultati hanno indicato che il pretrattamento con solo licopene inibisce l'attività AT; tale inibizione è maggiore quando il pretrattamento è fatto in presenza di estratti lipofili oppure licopene in associazione con alfa-tocoferolo. L'attività  $TA_L$ , invece, non subisce alcuna significativa variazione in presenza di licopene puro da solo ma incrementa in modo significativo quando le cellule endoteliali sono pre-trattate con estratti lipofili o con licopene puro in associazione con alfa-tocoferolo. Tali osservazioni suggeriscono che l'alfa-tocoferolo oppure i composti lipofili minori contenuti nel succo di pomodoro potenziano l'effetto anti-infiammatorio del licopene attraverso la modulazione della biosintesi di PAF e acil-PAF in cellule endoteliali durante stress ossidativo.

## EFFECTS OF SYNCHRONOUS AND ASYNCHRONOUS ACTION POTENTIAL ACTIVITY ON INPUT ELIMINATION AT REGENERATING NEUROMUSCULAR SYNAPSES.

**Morgana Favero, Carlo Bidoia, Mario Buffelli, Giuseppe Busetto, Alberto Cangiano**

*Dipartimento di Scienze Neurologiche e della Visione, Sezione di Fisiologia.  
Università di Verona Strada Le Grazie 8, 37134 Verona, Italy*

Synapse competition and elimination are basic features in developing CNS and PNS, and also in regenerating PNS. Our first aim is to investigate if synchrony of firing of the individual spikes of the motoneurons of a given pool can prevent synapse elimination during muscle reinnervation by its original nerve. This is important to confirm that physiological asynchronous activity of motoneurons is an essential factor in inducing synapse elimination (see Busetto *et al.* J.Neurosci, 2000, 20:685-695). Our second aim is to investigate what is the amount of asynchrony necessary to activate the elimination process.

In the first approach, we perform the following procedures: 1) bilateral crush of soleus or extensor digitorum longus (EDL) nerve, 2) establishment of a chronic sciatic nerve conduction block by TTX, and distal application of stimulating electrodes, on one side only. After 12-21 days of chronic stimulation *in vivo*, soleus and EDL muscles of both sides are dissected out with their nerves and placed *in vitro* for electrophysiological examination. Under curare, endplate potentials are evoked by electrical stimulation of the nerve with single shocks of gradually increasing intensity: fibres with two or more steps are deemed poly-innervated. We examined 8 experimental (2 soleus and 6 EDL, 163 fibres) and 7 control muscles (2 soleus and 5 EDL, 158 fibres). The mean percentage of poly-innervated fibers was significantly higher in the former muscles than in the latter ( $15.2 \pm 1.99$  S.E. vs  $3.4 \pm 2.7$ ,  $p < 0.005$ ), according to our initial working hypothesis.

For the second approach we use a special strain of rats (AO) in which the soleus muscle is innervated by two, rather than only one nerve: original and aberrant nerve can be independently excited with *asynchronous* stimuli. Presently we are studying the time course of the process of polyneuronal innervation and thus of synapse elimination that follow reinnervation after crush of the two nerves.

## STUDY OF INTERACTION OF COPPER (II) WITH AMYLIN.

A. Flagiello<sup>\*,</sup>, G. Infusini<sup>o,</sup>, A. Amoresano<sup>o,</sup>, A. Magri<sup>\*</sup>, G. Impellizzeri<sup>\*</sup>, G. Pappalardo<sup>\*</sup>, P. Pucci<sup>o\*</sup>, and E. Rizzarelli<sup>\*</sup>.

<sup>o</sup>Università di Napoli, Dipartimento di Chimica Organica e Biochimica, Via Cynthia 4, Napoli.

<sup>\*</sup>CEINGE Biotecnologie Avanzate, Via Comunale Margherita 482, Napoli.

<sup>\*</sup>C.N.R., Istituto di Biostrutture e Bioimmagini, Sezione di Catania, Viale A. Doria 6,

<sup>\*</sup>Università di Catania, Dipartimento di Scienze Chimiche, Viale A. Doria 6, Catania.

Amyloid fibril formation is the common hallmark of different diseases such as Alzheimer's disease and type 2 diabetes, known as conformational diseases. In all these disorders, a soluble non toxic protein is converted into a partial unfolded intermediate which gives rise to soluble aggregates that in turn form insoluble fibrils containing high percentages of  $\beta$ -sheet structure. Recently, it has been demonstrated that metal ions play an important role in the unfolding process that generates the partially unfolded intermediate and leads to the amyloid fibrils. In the case of type 2 diabetes the role of metal ions in the aggregation process is still unclear but there are several evidences indicating altered metal ion concentrations during the course of the disease. In particular, it was reported that the level of Cu(II) in the blood of patients affected by type 2 diabetes was lower than the normal values observed in healthy people. The major protein found in the insoluble aggregates in this pathology is amylin or islet amyloid polypeptide (h-A or IAPP), a 37 amino acid residues peptide amidated at the C-terminal, that is co-secreted with insulin by the pancreatic  $\beta$ -cells. The physiological role of amylin is not clear, even though the most accepted hypothesis suggest that amylin is related to the control of insulin secretion. The extracellular cytotoxic fibril deposits constituted by amylin were found in 95% of post mortem patients affected by type 2 diabetes and their amount strictly correlated with the severity of the disease. Remarkably, amyloid aggregates were found in humans but not in other animal species like rats (r-A). A comparison of rat and human amylin shows that the two sequences differ in only six amino acids residues located within the 18-29 region.

To study the potential role of the metal ions in type 2 diabetes disease, the Cu(II) complexes with h-A and r-A were investigated in parallel by electrospray mass spectrometry. Moreover, hydrogen-deuterium exchange experiments followed by LC-ESI-MS analysis were carried out on h-amylin and its complex with Cu(II), while limited proteolysis experiments on both the isolated protein and the complex are currently in progress.

Finally, spectroscopic measurements (UV-Vis, CD, EPR) and ESI-MS studies were performed on synthetic peptides encompassing the residues 17-29 of both h-A and r-A in order to determine the role played by the different amino acid residues in the coordination to metal ions and in the aggregation process.

# ISOLATION AND IN VITRO DIFFERENTIATION OF HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS FROM NEW ALTERNATIVE SOURCES: FETAL MEMBRANES AND PLACENTA

Fossati V.<sup>o</sup>, Pierdomenico L.\*, Alviano F.<sup>o</sup>, Arpinati M.§, Marchionni C.<sup>o</sup>, Franchina M.#, Croci S.<sup>o</sup>, Bonsi L.<sup>o</sup>, Cantore A.<sup>o</sup>, Lanzoni G.<sup>o</sup> and Bagnara GP<sup>o</sup>

<sup>o</sup>Department of Histology and Embriology, University of Bologna, Italy

\*Interdepartmental Center for Cancer Research "G. Prodi", University of Bologna, Italy #Department of Obstetrics and Gynaecology, University of Bologna, Italy

§Institute of Hematology "L.&A. Seragnoli", Bologna, Italy

<sup>o</sup>International Center for Cancer Research, University of Bologna, Bologna, Italy

## Introduction.

Human mesenchymal stem cells (hMSCs), existing in the bone marrow as demonstrated by previous studies, represent a promising population for supporting new cell-based therapeutic strategies (1).

The aim of this work was to investigate whether other tissue sources can provide cells with MSCs characteristics and multilineage differentiation potential: in particular we isolated these cells from amniotic membrane and chorion (fetal membranes), umbilical cord and placenta of healthy newborns.

## Methods and Results.

At the beginning, we focused our study on the immunophenotypical characterization of the spindle-shaped adherent cells expanded from the primary culture of fetal membranes, umbilical cord and placenta samples, by flow cytometry or by immunohistochemistry.

Similar to MSCs from bone marrow, cells isolated from these different sources were homogenously positive to the typical mesenchymal immunological markers (CD105, CD73, CD29, CD166,  $\alpha$ -smooth muscle actin), while they do not express the hematopoietic markers CD14, CD34, CD45.

The following aim of our study was to investigate the osteogenic, adipogenic and chondrogenic differentiation capacity in vitro, after cultivation in the respective media. We tested these maturations by morphological analysis, histochemical assays and RT-PCR. Moreover, since it is still a controversial issue, we sought whether MSCs are also capable of differentiating into skeletal muscle cells; by RT-PCR we showed the expression of the early myogenic marker MyoD and by immunohistochemistry the presence of the cytoplasmic myogenic protein desmin (2).

**Conclusion.** The easy isolation and culture, as well as the high ex vivo expansive potential make these cells an attractive and important alternative source compared to bone marrow.

1. Short B., Broiard N., Occhiodoro-Scott T., Ramakrishnan A., Simmons P.J. Mesenchymal Stem Cells. Archives of Medical research 34 (2003) 565-571.
2. Muguruma Y. et al. In vivo and in vitro differentiation of myocytes from human bone marrow-derived multipotent progenitor cells. Experimental Hematology 31 (2003) 1323-1330.

## ENZYMATIC AND CELLULAR PROPERTIES OF TOXINS FROM PLANTS AND THEIR SYNTHETIC CONJUGATES

V. Giordani, A. Oratore, A. Bozzi, A.R. Lizzi, F. Brisdelli, A.M. D'alessandro, G. Pitari, M.L. Salucci, R. Ippoliti  
Department of Pure and Applied Biology and Department of Medical Sciences and Technology  
University of L'Aquila  
Via Vetoio snc. Loc. Coppito, 67010 L'Aquila, Italy

### *Introduction*

RIPs (Ribosome Inactivating Proteins) are enzymes produced by many plant species, whose N-glycosidase activity removes a single adenine residue from the eukaryotic 28S rRNA, thus irreversibly damaging the ribosome and stopping protein synthesis. The most toxic of these enzymes (i.e. ricin, the dimeric lectin from *Ricinus communis*) can kill cultured cells as well as animals ( $IC_{50}$   $10^{-13}$ M and  $LD_{50} < 1\mu\text{g/kg}$ ), and have been taken as models for the construction of chimeric cytotoxins directed towards cancer cells (i.e. immunotoxins) by chemically or engineered substitutions of the membrane binding subunit. Despite the presence of a specific carrier (the antibody) sometimes these molecules fail to be very efficient and show some aspecific toxicity. The interaction of RIPs and chimeras with their substrate (the ribosome) and the cellular pathways followed after their internalization are among the scopes of this study.

### *Results*

We report here 1) the characterization of mutants of the single chain RIP saporin, for their interaction with eukaryotic ribosomes and synthetic substrates. Two lysines were mutated into alanines and identified as responsible of the aspecific interaction of the wt protein with ribosomes, producing mutants with higher specific activity ( $2 \times 10^{-10}$  M for the mutants vs  $6 \times 10^{-9}$  M for wt as  $RC_{50}$ ;  $RC_{50}$ = the concentration necessary for 50% adenine release). Steady state kinetics parameters will also be reported for synthetic substrates.

2) The intracellular absorption of an immunotoxin made up of a monoclonal antibody against human CD7 linked to saporin, compared with the toxin ricin, during the intoxication of HSB2 human leukaemic cells. The immunotoxin is partially overlapping ricin distribution, being visualised inside the Golgi apparatus of intoxicated cells, but is differentially sensitive to the presence of drugs interfering with ricin toxicity.

3) The activity on erithroleukaemic cells (K562) of a chimeric saporin-transferrin conjugate was demonstrated to be highly increased by the presence of chloroquine and AZT, two commonly used drugs, if compared to ricin, suggesting its potential use as anticancer agent in HIV-infected patients. In this case the two toxins, although partially following the same pattern of endocytosis, are differentially influenced by the presence of the drugs.

### *Conclusions*

Our results suggest that each construct must be characterized in its enzymatic and cellular properties, and that there are not generally valid rules to predict the final destination of internalized toxins. These may allow to introduce corrections with the aim of the production of new molecules or the induction of pathways inside the target cell that can increase specificity and efficiency of these molecules.

## EFFETTO DI FRAMMENTI PECTICI SULL'ATTIVITA' DELL'ENZIMA PECTINA METILESTERASI

C. Balestrieri, M. Scognamiglio, A. Gagliardi, M. Boccellino, A. Giovane

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

L'enzima pectina metilesterasi (PME) è di fondamentale importanza nel metabolismo delle sostanze pectiche nella cellula vegetale agendo in maniera concertata con la poligalatturonasi (PG) nel degradare la matrice pectica e con le glicosilidrolasi e le glicosiltrasferasi coinvolte nei processi di accrescimento della parete cellulare (1). Fino a pochi anni fa, si riteneva generalmente che le PME da piante agissero secondo uno schema idrolitico a blocchi, producendo in tal modo grappoli di gruppi carbossilici vicinali, mentre si riteneva che le PME fungine agissero in maniera casuale nel corso dell'attività idrolitica. Recentemente è stato mostrato che alcune isoforme di PME da piante possono esibire entrambi i meccanismi in dipendenza del pH (2). La regolazione dell'attività PME si realizza sia tramite l'espressione differenziale delle isoforme che tramite meccanismi post-traduzionali. Si è postulato infatti che l'attività PME è regolata dalla concentrazione idrogenionica in maniera ciclica durante l'accrescimento della parete cellulare. L'attività dell'enzima è massima a pH prossimi alla neutralità e si riduce in seguito a diminuzioni locali di pH dovute all'attività dell'enzima stesso. A sua volta, la diminuzione di pH attiva le glicosidasi e le glicosiltrasferasi coinvolte nella crescita della parete cellulare. La conseguente diminuzione della densità di carica negativa e l'aumento di pH locale ha per effetto la riattivazione della PME con la partenza di un nuovo ciclo. La scoperta dell'esistenza di inibitori della PME (3,4) in varie specie di piante fa però ipotizzare che altri meccanismi possano essere coinvolti nella regolazione dell'attività PME. Tra questi meccanismi potrebbe anche esservi il controllo dell'attività enzimatica da parte di sostanze a basso peso molecolare prodotte nelle reazioni sopra citate. Infatti qui riportiamo l'osservazione che gli oligogalatturonidi possono inibire l'attività pectina metilesterasica.

Gli oligogalatturonidi, di peso molecolare corrispondente a circa venti residui di ac. galatturonico, erano ottenuti per idrolisi dell'acido poligalatturonico a caldo a pH 4 e purificati per precipitazione da miscela idroalcolica e successiva cromatografia per setaccio molecolare. Quando la PME era saggata in presenza di concentrazioni crescenti di oligogalatturonidi si notava una progressiva diminuzione dell'attività enzimatica. L'inibizione risultava essere di tipo competitivo dal grafico di Lineweaver-Burk, usando come substrato pectina da arancia. La  $K_m$  apparente risultava aumentata di tre volte rispetto a quella calcolata in assenza dell'inibitore. Esperimenti di cromatografia per filtrazione su gel hanno mostrato che gli oligogalatturonidi usati avevano un peso molecolare di circa 4000 Da, che corrisponde a una composizione di 20-22 unità monometriche per molecola di polimero. L'acido poligalatturonico come tale non mostrava invece alcun effetto sull'attività PME, mentre gli oligogalatturonidi ad alto peso molecolare sembravano attivarla leggermente. L'inibizione della PME da parte degli oligogalatturonidi a basso peso molecolare potrebbe avere una rilevanza fisiologica considerando che la demetilazione della pectina attiva nella parete cellulare la poligalatturonasi, la cui attività produce gli oligogalatturonidi. Pertanto l'aumento di concentrazione di questi ultimi potrebbe a livello della parete cellulare controllare l'attività PME con un meccanismo di tipo feed back.

1. Giovane A et al (2004) *BBA proteins and proteomics* 1696, 245-252

2. Denés J M et al. (2000) *Carbohydr. Res.* 327, 385-393

3. Giovane A et al. (1995) *Eur J Biochem.* 233, 926-929

4. Raiola A, et al. (2004) *FEBS Letters* 557, 199-203

# 5-HT<sub>1A</sub> RECEPTOR BINDING ANALYSIS OF THIENOPYRIMIDINONES PARTIAL AGONISTS: A PARADIGM BREAKING STUDY REGARDING THE PHARMACOPHORIC LEADERSHIP OF THE PROTONATED PIPERAZINE RING IN GPCR LIGANDS

Spyrakakis F.<sup>a</sup>, Giurato L.<sup>bs</sup>, Cozzini P.<sup>c\*</sup>, Modica M.<sup>b</sup>, Sylte I.<sup>d</sup>, and Guccione S.<sup>b\*</sup>

<sup>a</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Parma, Parco Area delle Scienze 23/A, I-43100 Parma (Italy). <sup>b</sup>Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, University of Catania, viale Andrea Doria 6, Ed. 2 Città Universitaria, I-95125 Catania (Italy).

<sup>c</sup>Molecular Modelling Laboratory, Department of General and Inorganic Chemistry, University of Parma, Parco Area delle Scienze 17/A, I-43100 Parma (Italy).

<sup>d</sup>Department of Pharmacology, Institute of Medical Biology, University of Tromsø, N-9035 Tromsø, Norway.

In this work, we address the issues of modelling how the ionization states of a ligand, namely new thienopyrimidinones 5HT<sub>1A</sub> partial agonists, can affect the binding and revisit by a *battery* of methods and a homology model the generally assumed pharmacophoric role of the piperazine ring when positively charged in GPCR ligands<sup>1</sup>. A new and fairly rapid protocol called “computational titration”<sup>2</sup> that enables modeling of multiple ionization ensembles for each distinct protonation level i.e. the ionization state as a factor that can strongly influence the binding of functional groups on the ligands at the binding site and *vice versa*, was applied. For cases where some compounds are *ambiguous* (e.g., piperazines)<sup>1</sup>, this avoids picking a single state or protonation site for each molecule form, that includes a careful modeling of the ionization states and resonance forms for the ligands and protein residues at the binding site hence the evaluation of the free energy of binding for modeled complexes by the HINT (Hydropatic INTERactions). Conformational analyses by the software MACROMODEL<sup>3</sup> were also carried out to avoid the AUTODOCK (docking software)<sup>4,5</sup> drawback due to the missing consideration of the ligand flexibility that is to input the right (chair or twisted-chair) conformation of the piperazine ring. Comparative docking by the software FLO were also carried out<sup>6</sup>.

Solvation energy calculations by the software ZAP allowed to discard possible *misunderstandings* by HINT<sup>2</sup> namely to input the potential high scoring diprotonated (piperazine and NH<sub>2</sub>) form which is actually not stable.

The synergy between *state of art* computational methodologies is a powerful tool either to uncover substructures features not present in *single* models or to go beyond the strict statistical and contouring formalism raising the informations to some extent at an experimental level or integrating *wet* (NMR, crystallographic, biological) evidences.

Our results by a combined study address towards an important topic regarding the *dogma* of the charged piperazine ring as GPCR pharmacophore.

## References:

1) Modica M., Santagati M., Guccione S., A. Santagati A., F. Russo F., Cagnotto A., Goegan M., Mennini T.,

*Eur. J. Med. Chem.* 2001, 36, 287 and refs. cited therein.

2) Cozzini, P.; Fornabaio, M.; Marabotti, A.; Abraham, D. J.; Kellogg, G. E.; Mozzarelli, A. *J.*

*Med. Chem.* 2002, 45, 2469 and refs. cited therein.

3) Schrodinger, Inc.: 1500 S. W. First Avenue, Suite 1180, Portland OR 97201, USA/One Exchange Place, Suite 604, Jersey City, NJ 07302, US (www.schrodinger.com).

4) Morris G.M., Goodsell D.S., Halliday R.S., Huey R., Hart W.E., Belew R.K., Olson A.J. *J. Comp. Chem.* 1998, 19, 1639.

5) Osterberg F., Morris G.M., Sanner M.F., Olson A.J., Goodsell D.S. *Proteins* 2002, 46, 34-40.

6) Pignatello, R., Guccione, S., Forte, S., Di Giacomo, C., Sorrenti, V., Vicari, L., Uccello Barretta, G., Balzano, F., Puglisi, G. *Bioorg. Med. Chem.* 2004, 12, 2951 and refs. cited therein.

❖ Paper *in press* by the same Authors.

## GEL BASED ELECTROLYTIC MATRIXES: CONDUCTIVITY AND ION MOBILITY ANALYSIS

**E. Stura, V. Bavastrello, S. Carrara and C. Nicolini**

*Nanoworld Institute, c.so Europa 30, 16132 Genova (ITALY). Email: enrico@hotmail.com*

One of the most significant polymer used as electrolytic matrix both for capacitors and lithium ion batteries is poly(ethylene oxide). This material is used to ease the mobility of  $\text{Li}^+$  ions across the gel (or solid) electrolyte, so that charge is moved inside the device.

Poly(ethylene oxide) at room temperature consists of two phases, an amorphous one and a crystalline one. The first one is highly more conductive than the second, and the ratio of crystalline to amorphous phase is strongly dependent on the thermal history of the sample.

Twenty samples of poly(ethylene oxide) were prepared on glass, to investigate by means of optical microscopy the evolution of the crystallization process.

A phenomenon of "thermal hysteresis" was reported, showing that low temperature induces the formation of stable crystals, that coming back to room temperature are still in this condition, so the ionic conductivity of the matrix with salts dissolved is low (0.4 mS/cm). Reversely, high temperature dissolves crystals and generates a higher amount of amorphous phase, and if the cooling is slow (1 °C/min), the ion conductivity of the poly(ethylene oxide) based electrolyte is higher (3 mS/cm).

A second test was oriented to find out how the polymeric matrix behaves in the crystallization time period if conditioned by an electric field obtained using two insulated parallel biased electrodes. A spatial anisotropy was obtained in crystallization. This could be due to the polarity of the poly(ethylene oxide) molecule. The polarization of the electrolyte, however, is a time-limited effect, as demonstrated by experimental data, showing after 24 hours the same values of non biased samples.



## SVILUPPO E MESSA A PUNTO DI UN BIOSENSORE AMPEROMETRICO AD ELEVATA SENSIBILITÀ PER LA DETERMINAZIONE DEI COMPOSTI FENOLICI

Vianello, F.<sup>a</sup>, Ragusa, S.<sup>b</sup>, Cambria M.T.<sup>b</sup> e Rigo A.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Unità INBB, Sezione di Padova.

<sup>b</sup> Unità INBB, Sezione di Catania.

### Obiettivi

Sostanze di tipo fenolico vengono annualmente prodotte in quantità elevatissime (Mton/anno). A questa vasta classe di composti appartengono molecole che presentano una rilevante tossicità, inoltre, alcune di esse, possiedono effetti cancerogenici ed allergenici. La rivelazione e l'eliminazione di queste molecole dall'ambiente diviene sempre più pressante ed aumenta l'interesse nei confronti di nuove metodiche ad elevata sensibilità per il loro monitoraggio. L'obiettivo del presente lavoro è lo sviluppo e la messa a punto di un biosensore amperometrico operante in flusso e caratterizzato da un basso limite di rivelazione per la determinazione dei composti fenolici presenti nelle acque di vegetazione prodotte durante la lavorazione dell'olio di oliva, utilizzando, come bioelemento la laccasi da *Rigidoporus lignosus*.

### Metodi

La laccasi da *Rigidoporus lignosus* è stata covalentemente immobilizzata ad una resina polisaccaridica posta all'interno di un microreattore. Tale microreattore è stato poi inserito in un circuito costituito da una pompa, da un iniettore ed da un rivelatore amperometrico.

### Risultati

L'enzima è stato caratterizzato dal punto vista cinetico usando vari substrati di natura fenolica che sono frequentemente presenti nelle acque di vegetazione. La laccasi da *Rigidoporus lignosus* ha dimostrato una elevata attività ossidativa nei confronti di questi fenoli ed una scarsa specificità di substrato sia in soluzione che immobilizzata, e quindi appare particolarmente adatta per l'utilizzo in un biosensore per la determinazione di questi inquinanti. È stato quindi realizzato un biosensore, che è stato caratterizzato in funzione del potenziale applicato e del flusso della soluzione acquosa, utilizzando come substrato di riferimento il 1,4-idrochinone. Nelle condizioni operative del biosensore, l'enzima immobilizzato è in grado di ossidare i fenoli presenti nelle acque di vegetazione a completamento. È stata inoltre valutata la stabilità del biosensore, mostrando che il dispositivo messo a punto possiede una risposta costante per un periodo superiore a 100 giorni lavorativi.

### Conclusioni

Il biosensore sviluppato è in grado di rilevare i fenoli presenti nelle acque di vegetazione con un limite di rivelazione di 30 nM ed una sensibilità di 100 nA/μM, utilizzando l'1,4-idrochinone come substrato. La risposta si è dimostrata lineare nell'intervallo di concentrazioni 0 – 500 μM ed, all'interno dell'intervallo di linearità, le sostanze fenoliche presenti nelle acque di vegetazione prodotte dalla lavorazione dell'olio di oliva sono state ossidate fino a completamento, eliminando la necessità di laboriose procedure di preparazione del campione necessarie per questo tipo di analisi con un biosensore sviluppato recentemente (Vianello et al., 2004, *Biosensors and Bioelectronics*). La semplicità del sistema e delle procedure di analisi, la possibilità di effettuare circa 20 determinazioni per ora, la capacità di ossidare un gran numero di composti fenolici e l'elevata stabilità del biosensore rendono la sua applicazione nel monitoraggio di questi inquinanti ambientali particolarmente interessante.

## **RIDUZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DI ELASTASI MEDIANTE ANTIPROTEASI IMMOBILIZZATE: UN NUOVO APPROCCIO TERAPEUTICO**

**Grano V.<sup>1,2</sup>, Diano N.<sup>1,2</sup>, Portaccio M.<sup>1</sup>, Rossi S.<sup>2</sup>, Bencivenga U.<sup>2</sup>, Anna De Maio<sup>1</sup>, Mita D.G.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>*Dip. Medicina Sperimentale, Seconda Università degli Studi di Napoli*

<sup>2</sup>*Istituto di Genetica e Biofisica "A. Buzzati Traverso"- CNR*

Obiettivo della ricerca è stato la realizzazione e la caratterizzazione di tre membrane di Nylon sulle quali sono stati immobilizzati tre diversi inibitori di proteasi:  $\alpha_1$ -antitripsina, aprotinina ed elastatinal. Lo scopo è di ridurre, attraverso l'interazione proteasi/antiproteasi, la concentrazione ematica di proteasi attive rilasciate durante l'emodialisi o durante le operazioni di bypass cardiopolmonare.

Le antiproteasi sono state immobilizzate separatamente su membrane di Nylon, 150  $\mu\text{m}$  di spessore e con pori di diametro 0.2  $\mu\text{m}$ , sulle quali era copolimerizzato chimicamente glicidil metacrilato. In particolare, l' $\alpha_1$ -antitripsina e l'aprotinina sono state immobilizzate per diazotizzazione attraverso i residui di tirosina, non coinvolti nell'interazione con la proteasi in quanto localizzati in una porzione della molecola lontana dal sito di legame. L'elastatinal invece, è stato immobilizzato per condensazione, coinvolgendo il gruppo amminico del residuo di glutammina, in quanto la molecola non presenta tirosine.

Come proteasi modello è stata scelta l'elastasi da neutrofili. Il potere inibente di ciascuna membrana, quindi, è stato determinato misurando l'attività di elastasi in funzione del tempo di contatto della soluzione con la membrana attivata. L'efficienza di ogni membrana è stata studiata in funzione della quantità di inibitore immobilizzato e della temperatura. Tutti i risultati ottenuti indicano che è possibile ridurre l'attività dell'elastasi presente in una soluzione posta a contatto con una membrana attivata con uno specifico inibitore immobilizzato. L'inibitore più efficiente è risultato l' $\alpha_1$ -antitripsina, mentre quello meno efficiente l'aprotinina. Si è trovato inoltre che l'abbattimento di attività inoltre, aumenta all'aumentare della quantità di inibitore immobilizzato e della temperatura utilizzata.

## EFFETTO DELLA SOSTITUZIONE DEI RESIDUI TRIPTOFANILICI SULLE PROPRIETA' CONFORMAZIONALI E DINAMICHE DEL SUBDOMINIO AGH DELL'APOMIOGLOBINA

Iannuzzi C.<sup>1</sup>, Malmo C.<sup>1</sup>, Vilasi S.<sup>1</sup>, Birolo L.<sup>2</sup>, Pucci P.<sup>2</sup>, Marino G.<sup>2</sup>, Irace G.<sup>1</sup>, Sirangelo I.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dip. di Biochimica e Biofisica, Seconda Università degli Studi di Napoli

<sup>2</sup>Dip. di Chimica Organica e Biochimica, Università degli Studi di Napoli "federico II"

La mioglobina è una proteina globulare la cui conformazione è essenzialmente di tipo  $\alpha$ -elicoidale e nella cui sequenza sono presenti due residui di triptofano altamente conservati nelle posizioni 7 e 14 che giocano un ruolo chiave nel guidare il processo di folding. Questo processo procede attraverso la formazione di un intermedio molten globule in cui le eliche A, G ed H sono organizzate come nello stato nativo mentre il resto della proteina è essenzialmente destrutturato. Recenti studi condotti nel nostro laboratorio hanno mostrato che la sostituzione dei due residui triptofanilici rende la mioglobina capace di aggregare rapidamente formando fibrille di tipo amiloide in condizioni fisiologiche (1,2). Allo scopo di chiarire le relazioni che intercorrono tra folding e misfolding a livello molecolare abbiamo esaminato, da un punto di vista strutturale, il percorso di folding dei mutanti W7F, W14F e W7FW14F mediante l'impiego di tecniche spettroscopiche (dicromismo circolare e fluorescenza) e di procedure di proteolisi limitata e scambio idrogeno/deuterio integrate a tecniche avanzate di spettrometria di massa. Al fine di caratterizzare la conformazione della proteina nativa e dell'intermedio "molten globule", le misure sono state condotte a pH 7.0 e a pH 4.0; i risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti sulla proteina wild type.

I risultati ottenuti mostrano che la sostituzione del residuo in posizione 7 (W7F) determina una parziale disorganizzazione del dominio AGH che appare molto più accentuata nello stato molten. La sostituzione del residuo triptofanilico in posizione 14 (W14F) causa invece un aumento di flessibilità strutturale sia nello stato nativo sia nello stato molten. I dati ottenuti sul mutante W7FW14F a pH 4.0, che in queste condizioni risulta solubile, mostrano che la simultanea sostituzione dei residui triptofanilici genera un rilassamento della struttura proteica determinando una conformazione maggiormente flessibile in cui i contatti all'interno del sottodominio AGH sono profondamente alterati. La perdita di interazioni chiave, e precisamente quelle che l'elica A instaura con le eliche G ed H, ostacola il corretto percorso di folding che conduce allo stato nativo.

In conclusione, mentre la sostituzione del triptofano 14 induce degli effetti legati ad un rilassamento della struttura tridimensionale a livello globale, la sostituzione in posizione 7 provoca una serie di deformazioni strutturali a livello locale ed una contemporanea perdita di contatti nel dominio AGH. Quando gli effetti provocati dalla sostituzione in posizione 7 e 14 si combinano nel doppio mutante, alcuni residui idrofobici, che nella conformazione nativa restano confinati nel core della proteina, diventano maggiormente esposti promuovendo fenomeni di aggregazione. In particolare, in seguito alla sostituzione dei due residui indolici la proteina si trova sprovvista di alcune fondamentali interazioni necessarie a stabilizzare la sua struttura tridimensionale ed espone il tratto della catena polipeptidica all'estremità N-terminale che, avendo un carattere particolarmente idrofobico e, avendo tendenza a formare strutture secondarie di tipo  $\beta$ , tende ad aggregare e ad innescare il processo di fibrillogenesi.

1. Sirangelo I., Malmo C., Casillo M., Mezzogiorno A., Papa M., Irace G. (2002). *J. Biol. Chem.*, 277(48): 45887-91.

2. Sirangelo I., Malmo C., Iannuzzi C., Mezzogiorno A., Bianco M. R., Papa M., Irace G. (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 13183-13189.

## ENZYME-BASED ELECTROCHEMICAL GENOSENSOR FOR SEQUENCE- SPECIFIC ANALYSIS OF FISH SPECIES

F. Lucarelli<sup>1</sup>, M.L. Del Giallo<sup>1</sup>, E. Pistarino<sup>2</sup>, B. Santamaria<sup>2</sup>, G. Marrazza<sup>1</sup>, M. Mascini<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry, University of Florence, (Italy)

<sup>2</sup>Laboratorio di Sicurezza Alimentare ed Ambientale, Dipartimento di Chimica e Chimica Industriale, University of Genova (Italy)

An electrochemical genosensor for the differentiation of toxic fish species (*Takifugu niphobles*) from edible species (*Lophius budegassa*) was developed using disposable screen-printed gold electrodes.

A unique couple of primers was firstly designed to amplify regions of the mitochondrial DNA of both fish species. The gold electrode surfaces were then modified with a mixed monolayer of a 21-mer thiol-tethered DNA probe and 6-mercapto-1-hexanol (MCH) as the spacer thiol. The DNA probe sequence corresponded to the top primer used for the PCR amplification, thus allowing both amplicons to be captured at the electrode surface.

The differentiation between the two fish species was accomplished using a biotinylated secondary probe, specific for either the toxic or edible specie, in a sandwich hybridisation assay. An enzyme-amplified detection scheme, based on the coupling of a streptavidin-alkaline phosphatase conjugate was finally applied. The enzyme catalysed the hydrolysis of the electroinactive  $\alpha$ -naphthyl phosphate to  $\alpha$ -naphthol and this electroactive product was detected by means of differential pulse voltammetry.

The assay was firstly characterised using biotinylated target oligonucleotides. After optimisation of the most relevant analytical parameters, the genosensor response was found to be linearly related ( $R^2 = 0.998$ ) to the target concentration between 0 and 15 nmol/L; a detection limit of 0.06 nmol/L of oligonucleotide target sequence (i.e.,  $3.6 \cdot 10^8$  target molecules in 10  $\mu$ L of sample solution) was estimated from the reproducibility of the determinations.

The procedure was then applied for the identification of fish species in DNA samples isolated from fish fillets and amplified by PCR. Critical aspects of the analytical assay, such as thiolated DNA probe sequence and surface density and biotinylated secondary probe sequence were investigated and optimised. Almost no signal was obtained exposing the probe modified electrodes to pure buffer, secondary probe alone and both amplicons (12 nmol/L) in the absence of the biotinylated secondary probe. Clear sample identification was on the contrary achieved analysing both DNAs in the presence of the corresponding biotinylated secondary probe.

In conclusion, the results showed that the genosensor enabled sensitive differentiation of fish species. Its use for tracing the presence of toxic species in industrial fish products (in which the morphological identity of the fish is lost) appears to be an attractive application.

### Acknowledgement

This work is supported by the Istituto Superiore di Sanità (contract n° 0M2/C1)

## **RUOLO DELL'ATTIVITA' DELLE CELLULE DEL PURKINJE NELLA COMPETIZIONE SINAPTICA OMOLOGA E ETEROLOGA NEL CERVELLETTO**

**Erika Lorenzetto, Mario Buffelli, Alberto Cangiano**

*Dipartimento di Scienze Neurologiche e della Visione, Sezione di Fisiologia, Università di Verona*

Lo sviluppo di precise connessione tra i neuroni richiede l'intervento di fattori genetici e di meccanismi di competizione sinaptica attivita'-dipendenti. Nel cervelletto ad esempio si ritiene che meccanismi di competizione siano alla base dell'ordinato sviluppo delle due afferenze eccitatorie, quello delle fibre rampicanti e quello delle parallele sull'albero dendritico delle cellule del Purkinje (CP). Nell'animale adulto una sola fibra rampicante innerva la parte prossimale dell'albero dendritico della singola CP mentre piu' fibre parallele innervano la parte piu' distale. Durante lo sviluppo embrionale il quadro di innervazione e' piu' complesso: piu' fibre rampicanti innervano il soma e la regione prossimale dell'albero dendritico della CP mentre le fibre parallele innervano sia la parte prossimale che quella distale dell'albero dendritico. A cio' segue, nelle prime fasi della vita postnatale, un periodo di competizione sinaptica attivita'-dipendente tra le fibre rampicanti (competizione omologa) e tra le fibre rampicanti e quelle parallele (competizione eterologa). Che l'attivita' abbia un ruolo in tali processi competitivi e' stato mostrato da vari dati sperimentali, tra cui il marcato rimaneggiamento dei due input eccitatori dopo applicazione di tetrodotossina nel cervelletto ( Bravin et al., PNAS 96:1704-9, 1999). Comunque il preciso ruolo della componente pre e postsinaptica non e' noto.

Lo scopo del nostro lavoro e' quello di studiare i processi di competizione omo-eterosinaptica nel cervelletto in un modello di topo transgenico in cui la componente post-sinaptica, cioe' l'attivita' delle CP e' selettivamente depressa mediante la sovraespressione di un canale del cloro. Grazie alle proprieta' del promotore usato (L7/pcp-2), l'espressione del canale inizia a partire da P5, percio' lo sviluppo dell'animale fino a tale giorno e' assolutamente normale. Inoltre, nel nostro modello, il canale del cloro e' fuso con una proteina fluorescente verde (YFP) che ne conferma la localizzazione a livello delle CP pur senza interferire con l'attivita' del canale.

Studi preliminari di immunostochimica hanno permesso di dimostrare la presenza e di quantificare l'espressione del canale nel topo transgenico: poche CP esprimono il canale del cloro a P5, il 69% a P12 e l'86% circa a P30.

Attraverso la marcatura specifica delle terminazioni delle fibre rampicanti con anticorpi contro il trasportatore vescicolare del glutammato di tipo 2 abbiamo osservato la persistenza anche a P30 di sinapsi perisomatiche sulle cellule del Purkinje sovraesprimenti il canale del Cloro, cioe' ad una eta' in cui le terminazioni delle fibre rampicanti si sono normalmente gia' da tempo spostate dal soma verso la regione prossimale nell'albero dendritico. Inoltre, la marcatura delle fibre parallele (trasportatore vescicolare del glutammato di tipo 1) suggerisce la loro estensione alla regione prossimale dell'albero dendritico. Cio' potrebbe indicare un ritardo o un blocco dei processi di competizione ed un ruolo importante dell'attivita' posinaptica delle CP nello sviluppo del cervelletto.

Sono in allestimento esperimenti di elettrofisiologia che hanno lo scopo di investigare l'entita' del blocco dell'attivita' elettrica della CP e l'eventuale presenza di un ritardo o di un blocco della eliminazione sinaptica nell'ambito degli input delle fibre rampicanti, indotta dall'espressione del canale del cloro.

## CRYSTAL STRUCTURE OF AMINE OXIDASE FROM BOVINE SERUM

**Michele Lunelli<sup>b</sup>, Maria Luisa Di Paolo, Marianna Biadene<sup>a</sup>, Vito Calderone<sup>a</sup>, Marina Scarpa, Roberto Battistutta<sup>a,c</sup>, Adelio Rigo<sup>b</sup>, and Giuseppe Zanotti<sup>a,c\*</sup>**

<sup>a</sup> *Dipartimento di Scienze Chimiche, Università di Padova, Via Marzolo 1, 35131 Padova, Italy*

<sup>b</sup> *Dipartimento di Chimica Biologica, Università di Padova, Via Colombo 3, 35121 Padova, Italy*

<sup>c</sup> *Venetian Institute of Molecular Medicine, Via Orus 2, 35100 Padova, Italy*

The structural characterization of copper-containing amine oxidases [amine-oxygen oxidoreductase (deaminating)(copper/TPQ-containing); EC 1.4.3.6] is of broad importance to understand the structure/function relationships of these enzymes that play a variety of fundamental functions in the metabolism of cellular and extracellular amines. Copper-containing amine oxidases are a class of ubiquitous enzymes that catalyze the two-electron oxidation of primary amines to the corresponding aldehydes, with reduction of molecular oxygen to hydrogen peroxide [1]. Till now, the three-dimensional structure of the enzyme from higher animals and, in particular, from mammalian organisms has not been determined. One of the most studied among these enzymes family is bovine serum amine oxidase [2], which is an homodimer, each monomer comprising 746 amino acids and a Cu(II) ion. The copper-containing amine oxidase extracted from bovine serum and purified to homogeneity has been deglycosylated and crystallized [3]. The crystal structure has been solved through X-ray crystallography at 2.37 Å resolution. The protein will be described, and some important structural features of the active site, which explain its substrate binding mechanism, will be highlighted.

## SAFFRON PREVENTS LIGHT-INDUCED PHOTORECEPTOR DEATH IN RATS

**R. Maccarone, and S. Bisti**

*Dept. Biomedical Science and Technology, Univ. L'Aquila, Italy*

Extract of saffron (*Crocus sativus* L.) have been largely used in traditional medicine in the treatment of numerous illness. However, recent pharmacological studies have demonstrated that saffron extract has an antitumor effect, radical scavenger property and hypolipemic effects. At the level of the central nervous system saffron prevents ethanol-induced inhibition of hippocampal long-term potentiation (LTP). Here we report data showing that L'Aquila Saffron (Pelutinum), supplemented with the diet, drastically reduced the apoptosis in the outer nuclear layer (ONL) and maintained retinal response to light stimuli after exposing albino rats at bright continuous light (BCL intensity 1000 lux) for 24 hours.

Two experimental groups, control and treated (Sprague Dowley two months old) were used. 1mg of saffron extracts /Kg/die) was supplemented for variable time (from three weeks to two days) before the experimental sessions. fERG was recorded in control and treated rats before and a week after light exposure, amplitude and latency of a and b waves have been analysed. At the end of the second recording session the animals were sacrificed and the retinae were quickly removed, fixed, cryosectioned and labelled to analyse the thickness of the ONL. The photoreceptor layers was pretty much preserved in treated animals as it was the fERG response. In a second series of experiments rats were sacrificed at the end of light exposure and the amount of apoptotic figures in the ONL was assessed by terminal transferase-mediated deoxyuridine triphosphate (d-UTP) –biotin nick-end labeling (TUNEL). BCL induced the DNA fragmentation characteristic of dying cells almost exclusively in the photoreceptor layer. The rate of photoreceptor death induced by BCL, expressed as the frequency of TUNEL+ profiles/mm of retina, appeared drastically reduced in treated animals. Our results show that saffron might protect photoreceptors from retinal stresses, probably acting as a regulator of cell death program. Further studies may provide a basis for the development of new therapeutic or preventive approaches to some overcome neurodegenerative diseases.

## **L'ESPRESSIONE DI UN SISTEMA ENDORFINERGICO MEDIANTE TRASDUZIONE LENTIVIRALE INDUCE CARDIOGENESI IN CELLULE STAMINALI EMBRIONALI MURINE**

**Maioli M, Asara Y, Santoni D, Pintus A, Ninniri S, Galimi F, Ventura C\***

*Istituto Nazionale di Biostrutture e Biosistemi, Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Sassari, \* Laboratorio di Biologia Molecolare e Bioingegneria delle Cellule Staminali Istituto Nazionale Biostrutture e Biosistemi, Università di Bologna*

### *Obiettivi.*

La cardiogenesi, uno dei primi eventi morfogenetici che si verificano nell'embrione, è un processo complesso che comprende una serie di eventi molecolari non ancora del tutto compresi. A tale riguardo, fattori di trascrizione quali il gene "homeobox" Csx/Nkx-2.5 e GATA-4, sono risultati essenziali per il normale sviluppo del cuore in diverse specie animali e nell'uomo, anche se rimangono da chiarire alcuni aspetti riguardanti la loro espressione. Lo scopo del nostro lavoro è stato di valutare il ruolo del gene della prodinorfina durante il processo di cardiogenesi in una linea di cellule embrionali staminali totipotenti murine, derivanti dalle R1 (GTR1). Metodi. Il gene della prodinorfina è stato sovraespresso mediante un vettore lentivirale di terza generazione. È stata quindi valutata l'espressione di geni cardiogenetici GATA-4 ed Nkx-2.5 mediante RT-PCR, in cellule normali ed in cellule trasdotte con il vettore lentivirale. Sono stati inoltre determinati i livelli di mRNA di trascritti cardiospecifici, "α-myosin-heavy-chain" e "myosin light chain-2V", in cellule normali e trasdotte avviate al differenziamento miocardico.

### *Risultati.*

In cellule GTR1 trasdotte si assisteva ad un significativo incremento nel numero di cardiomiociti contrattili rispetto alle cellule non trasdotte. L'analisi dell'espressione genica mostrava un significativo incremento dei livelli dei trascritti cardiospecifici GATA-4 e NKX-2.5. Di particolare interesse è risultata essere l'osservazione che la sovraespressione del gene della prodinorfina era in grado di indurre il processo cardiogenetico anche in presenza di Leukemia Inhibitory Factor, citochina inibitrice del potenziale differenziativo di cellule embrionali staminali murine.

### *Conclusioni.*

I nostri risultati sperimentali evidenziano che il gene della prodinorfina svolge un ruolo centrale nell'orchestrazione del processo di differenziamento miocardico, e forniscono importanti chiarimenti sugli eventi molecolari che si verificano durante lo sviluppo del cuore.



## EFFETTO DI AGENTI ANTIAGGREGANTI SULLE PROPRIETA' CITOTOSSICHE DI AGGREGATI AMILOIDI DI APOMIOGLOBINA MUTATA

Malmo C.<sup>^</sup>, Iannuzzi C.<sup>^</sup>, Vilasi S.<sup>^</sup>, Mezzogiorno A.\*, Papa M.\*, Irace G.<sup>^</sup>, Sirangelo I.<sup>^</sup>

<sup>^</sup>Dipartimento di Biochimica e Biofisica, Seconda Università di Napoli

\*Dipartimento di Medicina Pubblica-Anatomia

Via L. De Crechio 7, 80138 Napoli.

La mioglobina è una proteina globulare organizzata quasi esclusivamente in struttura ad  $\alpha$ -elica. Recenti studi condotti nel nostro laboratorio hanno mostrato che la sostituzione dei due residui triptofanilici altamente conservati lungo la scala evolutiva rende la mioglobina rapidamente aggregabile in condizioni fisiologiche<sup>1</sup>, con formazione di fibrille di tipo amiloide. In questa comunicazione riportiamo i dati ottenuti seguendo il processo di fibrillazione dell'apomioglobina in presenza di agenti anti-aggreganti. I risultati mostrano che queste molecole hanno la capacità di inibire il processo di fibrillogenesi e di disgregare le fibre amiloidi mature generando aggregati amorfi altamente citotossici.

La citotossicità degli aggregati in assenza di farmaco è stata studiata valutando la vitalità cellulare, la permeabilità di membrana e l'organizzazione del citoscheletro misurate rispettivamente mediante saggi di metabolizzazione dell'MTT, di legame dello ioduro di propidio (PI) con il DNA e di legame della falloidina con il citoscheletro. I risultati sono stati paragonati a quelli ottenuti esponendo le stesse cellule alla proteina wild-type. I risultati relativi al saggio dell'MTT hanno evidenziato che le fibrille mature non risultano tossiche mentre gli aggregati amorfi pre-fibrillari che si osservano nelle prime fasi del processo di fibrillogenesi sono fortemente citotossici. Inoltre, la positività al test del PI indica che l'interazione delle pre-fibrille con la membrana cellulare determina un'alterazione della sua permeabilità. Comunque, al danno di membrana non sono associate alterazioni dell'organizzazione molecolare del citoscheletro e, quindi, alterazioni morfologiche, come evidenziato dalle immagini ottenute mediante fluorescenza della falloidina<sup>2</sup>.

L'azione antiaggregante di farmaci (tetraciclina e derivati, quinacrina, clorpromazina) è stata seguita mediante tecniche di microscopia elettronica e di spettrofluorimetria. La citotossicità degli aggregati in presenza di tali sostanze è stata studiata valutando la vitalità cellulare mediante saggi di metabolizzazione dell'MTT. I risultati ottenuti hanno dimostrato che la presenza dei farmaci inibisce la formazione di fibrille amiloidi mature mantenendo la proteina in forma granulare e, pertanto, altamente citotossica.

---

<sup>1</sup> I. Sirangelo et al. (2002). "Tryptophanyl substitutions in apomyoglobin determine protein aggregation and amyloid-like fibril formation at physiological pH". *Journal of Biological Chemistry*, 277(48): 45887-91.

<sup>2</sup> I. Sirangelo et al. (2004) "Fibrillogenesis and cytotoxic activity of the amyloid-forming apomyoglobin mutant W7FW14F". *Journal of Biological Chemistry*, 279(13):13183-9.

## **MUTATIONAL SCREENING OF TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA 2 (TGF-beta 2) GENE IN PATIENTS WITH CONGENITAL THROMBOCYTOPAENIA WITH ABSENT RADII (TAR)**

**Marchionni C.°, Tonelli R.°, Pantucci E. °, Pierdomenico L.\*, Fossati V.°, Alviano F.°, Bonsi L.°, Bagnara G.P.°\***

*°Institute of Histology and Embriology, University of Bologna, Italy; §Department of Pediatrics III, University of Bologna, Bologna, Italy; \*Interdepartmental Center for Cancer Research "G. Prodi", University of Bologna, Bologna, Italy.*

Thrombocytopenia with absent radii (TAR) is a rare autosomal recessive disease characterized by hypomegakaryocytic thrombocytopaenia and bilateral radial aplasia. We performed mutational screening of TGF-beta 2 gene by sequencing analysis in four patients affected by TAR syndrome. The aim of our research program is to verify the possible involvement of TGF-beta 2 gene which plays a pivotal role in mesenchymal stem cells differentiation on the pathogenesis of TAR syndrome.

This hypothesis is supported by previous studies on TGF-beta 2 null mice [Sanford et al, 1997] showing several similarities between TGF-beta 2 null mice phenotype and TAR patients phenotype. Automatic sequencing of complete coding region and the promoter region of TGF-beta 2 gene, in TAR family analysed, have shown many polymorphisms, observed comparing electropherograms obtained by DNA patients analysis and normal sequence with Gene-Bank accession number M87843, including codifying gene for human TGF-beta 2 (5579 bp). In particular the sequence analysis have allowed us to document two mutations undetectable in sequenced DNA from sixty normal individuals. In order to define these two mutations found in our TAR patient as cause of syndrome we are performing the functional assay.

A specific region of the TGF-beta 2 gene with a potential of regulatory activity, including the two identified mutations, has been amplified by PCR from the genomic DNA of both the mutated and the wild type samples. The two fragments obtained have been cloned in a specific vector for functional assay. The identified mutations found in the 5' end non-coding sequence of TGF-beta 2 gene could change the level of gene expression.

## MITOCHONDRIAL GENE EXPRESSION IN RAT BRAIN REGIONS DURING AGING: EFFECT OF ANTIOXIDANT DIET.

V.G. Nicoletti, C. Cuppari, V. Marino, D. Licciardello, A.M. Giuffrida Stella

Dept. Chemistry, Sect. of Biochem. & Mol. Biol., University of Catania, V.le A. Doria 6, 95125 Catania, Italy.

Increased level of ROS that occurs with age, leads to changes of gene expression both *in vitro* and *in vivo* (1). Free radicals generated through mitochondrial respiratory chain, particularly at sites of complex I and III (2), can be the causative factor of cell dysfunction and death during aging. Mitochondrial respiratory chain, in particular complex I, is a site of oxygen superoxide production. Moreover the decline of cell functions with aging and upon mtDNA alteration enhances the production of free radical and leads to a vicious cycle that increases macromolecular derangement. However, the reduced efficiency of damaged respiratory complex can be also balanced by compensatory mechanism of up-regulation (3). It has been proposed that dietary caloric restriction might slow the rate of oxidative damage by reduction of oxygen consumption (4) and superoxide generation (5). N-acetyl cysteine is known to provide thiolic group to glutathione and to the mitochondrial respiratory chain proteins that are impaired during aging (6). In order to assess a relationship between the oxidative stress and the observed change of expression, in the present study we evaluated in different brain areas of rat at 6, 12, 28 months of age, the effect of *in vivo* caloric restriction and chronic dietary supplementation with NAC on the expression, of some genes of the oxidative phosphorylation machinery: 39kDa and ND1 complex I subunit, cytochrome c oxidase subunit IV (CO-IV) of complex IV, subunit alpha of F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP synthase complex V. The expression of other energy transduction related component such as the mitochondrial Adenine Nucleotide Translocator isoform 1 (ANT 1) was evaluated as well.

The experiment were performed using male Wistar Kyoto rats. The brain region were dissected at 4°C, frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until used. Dietary treatment were performed by 30% caloric restriction or 0,3% of diet supplementation with NAC for 1 year from 16 to 28 months. Total RNA was extracted as described by Chomczynsky and Sacchi. The level of mRNA were determined by semi-quantitative PCR using Cyclophilin A as internal control. Expression of mitochondrial protein was measured by western blotting.

We observed an age-related up-regulation of mRNA expression of subunit ND1 and a down-regulation of ANT-1 in the hippocampus. The mRNA level of 39 kDa subunit showed an age related up-regulation in the parietal, frontal cortex and hippocampus. The age-related up regulation of protein subunit 39kDa was also observed in the parietal and frontal cortex, but with no change in the cerebellum. A significant reduction of subunit alpha of F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP synthase was found in the frontal and parietal cortex, without change in the cerebellum. The CO-IV subunit expression did not change in all the areas analysed. The two different dietary treatment prevented the age-related up or down regulation of the different subunits examined. Our results are of particular interest because focus on the importance of therapeutic long lasting dietary treatment in the elderly, for example with an antioxidant natural compound rich diet.

1) Esposito, F., et al, 2003 Neuroch. Res. 29, (3) 617-628

2) Lenaz, G., 1998 Biochim. Biophys. Acta 1366, 53-67

3) Nicoletti, V.G., et al, 1998 Biochimie 80, 871-881

4) Merry, B. J., 2004 Aging cell 3, 7-12

5) Bevilacqua, L., et al, 2004 Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.

6) Martinez, M., et al, 2000 Brain Research 859, 173-175.

ACKNOWLEDGEMENTS: This study was supported by MIUR Cofin 2000 and Cluster C04 Biomedicine.

# VARIAZIONE DELL'ATTIVITA' CATALITICA DELLA PEROSSIDASI IN PRESENZA DI CAMPI ELETTROMAGNETICI A BASSA FREQUENZA: DIPENDENZA DALLA FREQUENZA.

Portaccio M.<sup>1</sup>, De Luca P.<sup>1</sup>, Durante D.<sup>1</sup>, Grano V.<sup>2</sup>, Rossi S.<sup>2</sup>, Bencivenga U.<sup>2</sup>, Lepore M.<sup>1</sup>, Mita D.G.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Medicina Sperimentale - Seconda Università di Napoli.

<sup>2</sup> Istituto di Genetica e Biofisica "Buzzati Traverso" - CNR - Napoli.

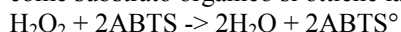
## *Obiettivi*

Il lavoro di ricerca da noi svolto ha riguardato l'influenza di campi elettromagnetici a diversa frequenza, da 50 a 400 Hz, sull'attività di enzimi liberi ed immobilizzati.

Come enzima modello è stato scelto la perossidasi da rafano nella cui struttura è presente un gruppo eme che potrebbe mediare l'effetto del campo elettromagnetico sull'attività enzimatica.

## *Metodi*

La perossidasi (POD) è un enzima che "in vivo" è in grado di rimuovere il perossido di idrogeno dalle cellule trasformandolo in acqua. In genere, questo enzima catalizza l'ossidazione di substrati organici utilizzando il perossido di idrogeno come accettore finale di elettroni. Utilizzando l'ABTS come substrato organico si ottiene la seguente reazione:



Il prodotto della reazione è il radicale ABTS<sup>°</sup>, una sostanza colorata la cui concentrazione può essere valutata spettrofotometricamente.

Gli esperimenti sono stati effettuati sia sull'enzima libero che sull'enzima immobilizzato. Per simulare le condizioni nelle quali l'enzima opera "in vivo", la perossidasi è stata immobilizzata per intrappolamento in un gel di gelatina al 10% oppure mediante legame covalente su membrane di Nylon precedentemente trattate con la tecnica del grafting chimico. Le misure dell'attività enzimatica sono state condotte simultaneamente su due campioni: uno esposto al campo e l'altro, di controllo, non esposto. I tempi di esposizione utilizzati sono stati di 1h, 2h, 3h e 4h.

## *Risultati*

Sia per l'enzima libero che per quello immobilizzato, è stato osservato che l'esposizione ad un campo elettromagnetico di intensità 1 mT produce effetti diversi sull'attività enzimatica a seconda della frequenza a cui il campione viene sottoposto. Per l'enzima solubile abbiamo osservato effetto zero alle frequenze di 75 e 250 Hz, mentre 130 Hz rappresenta il valore ottimale di frequenza alla quale c'è il massimo effetto positivo. Al di sotto di 75 Hz e al di sopra di 250 Hz abbiamo osservato un effetto negativo, cioè un aumento della velocità di disattivazione dell'enzima.

Con il POD immobilizzato covalentemente abbiamo registrato effetto zero a 50 Hz e a frequenze superiori ai 200 Hz. In questo caso il valore ottimale di frequenza al quale si ottiene il massimo effetto positivo è spostato a 170 Hz, cioè verso frequenze più alte rispetto all'enzima solubile.

Per l'enzima intrappolato in gelatina non abbiamo osservato alcuna interazione tra l'attività enzimatica e il campo elettromagnetico a 50 Hz e a frequenze superiori a 250 Hz. Il massimo effetto positivo è stato osservato a 150 Hz, valore intermedio tra la frequenza ottimale dell'enzima libero e quella dell'enzima immobilizzato su Nylon.

## *Conclusioni*

Dai risultati ottenuti si può concludere che un campo elettromagnetico a bassa frequenza è in grado di indurre variazioni dell'attività della perossidasi e che l'entità di queste variazioni dipendono dalla frequenza e dallo stato dell'enzima. Infatti, variazioni più ampie si osservano con l'enzima in forma solubile, mentre per l'enzima in forma insolubile si osservano variazioni più moderate che dipendono anche dalle forze fisiche coinvolte nel processo di immobilizzazione.

## REALIZZAZIONE DI UN MICROBIOSENSORE PER LA RIVELAZIONE DEL GLUCOSIO

Portaccio M.<sup>1</sup>, Durante D.<sup>1</sup>, Viggiano A.<sup>1</sup>, De Luca P.<sup>1</sup>, Maiuri P.<sup>1</sup>, Di Martino S.<sup>1</sup>, Rossi S.<sup>2</sup>, De Luca B.<sup>1</sup> and Mita D.G.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Medicina Sperimentale - Seconda Università di Napoli.

<sup>2</sup> Istituto di Genetica e Biofisica "Buzzati Traverso" - CNR - Napoli.

L'enzima Glucosio ossidasi (GOD) è stato utilizzato per la costruzione di un biosensore per la rivelazione del glucosio sia in campo clinico che alimentare.

Il biosensore utilizzato è costituito da tre elettrodi: l'elettrodo di lavoro (un filo di Pt di diametro 100 µm e lunghezza 3 mm), l'elettrodo di riferimento (un filo di Ag di diametro 100 µm che viene clorinato per una lunghezza di 3 mm (Ag/AgCl)) e l'elettrodo contatore anch'esso di Ag. Il sistema viene alimentato con un potenziostato che permette anche di leggere la corrente.

L'elettrodo di lavoro è stato ricoperto con un film di acetato di cellulosa (AC), lo spessore dello strato è stato standardizzato mediante pesata e la sua permeabilità mediante la lettura di una soluzione di acqua ossigenata (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Per ottenere l'immobilizzazione l'elettrodo ricoperto di AC è poi posto a contatto con una soluzione contenente un agente spaziatore (esametildiammina) ed un agente accoppiante bifunzionale (glutaraldeide) che lega covalentemente l'enzima.

La reazione catalizzata dal GOD, prevede l'ossidazione del glucosio con la riduzione dell'ossigeno molecolare a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, quest'ultima viene poi rivelata dall'elettrodo di Pt applicando una differenza di potenziale costante di 700 mV.

Il funzionamento e l'efficacia degli elettrodi sono stati esaminati con riferimento al range di concentrazione di glucosio in cui la risposta dello strumento è lineare e alla sensibilità.

Tali parametri sono stati valutati al variare delle percentuali di esametildiammina e glutaraldeide. La sensibilità massima è stata trovata con un biosensore costruito con glutaraldeide al 2.5% ed esametildiammina al 5%.

Con esametildiammina al 5%, all'aumentare del percento di glutaraldeide (dall'1% al 5%) aumenta il range lineare, fino a 100 mM di glucosio.

Mantenendo fissa la percentuale di glutaraldeide al 2.5%, il range lineare aumenta fino a 100 mM al diminuire della percentuale di esametildiammina dal 10% al 2.5%.

Allo scopo di utilizzare il biosensore per la determinazione del glucosio ematico, è stata valutata l'interferenza di sostanze quali acido urico e acido ascorbico. La loro interferenza può essere resa trascurabile rispetto a quella dell'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scegliendo appropriate condizioni sperimentali. Il biosensore che nel range di concentrazione del glucosio ematico (4-20 mM) presenta una maggiore sensibilità è risultato essere quello costruito con esametildiammina al 5% e glutaraldeide al 2.5%.

## AMYLOID- $\beta$ -PEPTIDE IMPAIRS NITRIC OXIDE/CGMP/CREB PATHWAY DURING HIPPOCAMPAL SYNAPTIC PLASTICITY

<sup>1,3,5</sup>Daniela Puzzo, <sup>4</sup>Ottavio Vitolo, <sup>1,3</sup>Fabrizio Trinchese, <sup>5</sup>Salvatore Sapienza, <sup>5</sup>Agostino Palmeri, <sup>4</sup>Michael Shelanski, <sup>1,4</sup>Ottavio Arancio

<sup>1</sup>Dept. of Psychiatry, <sup>2</sup>Physiology and Neuroscience New York University School of Medicine, New York, New York 10016 and <sup>3</sup>Dementia Research Center Nathan Kline Institute for Psychiatric Research, Orangeburg, New York 10962, USA; <sup>4</sup>Dept. of Pathology, Taub Institute for Research on Alzheimer's Disease and the Aging Brain, Columbia University, New York, NY, 10032, USA; <sup>5</sup>Dept. of Physiological Sciences, University of Catania, 95125 Catania, Italy

Increase and deposits of beta-amyloid (A $\beta$ ) represent two of the main hallmarks of Alzheimer's Disease (AD). However, synaptic alterations, more than A $\beta$  levels and plaques, are highly correlated with the severity of clinical dementia in humans. Indeed, long-term potentiation (LTP), a widely studied cellular model of synaptic plasticity that might underlie learning and memory, is impaired following exposure to A $\beta$  (Selkoe D.J., Science 2002) and its impairment occurs at early stages in animal models of AD. Nitric oxide (NO)/soluble guanylyl cyclase (sGC)/cGMP/cGMP-dependent protein kinase (cGK) and cAMP/cAMP-dependent protein kinase (cAK) might activate independent/converging pathways involving phosphorylation of the memory gene CREB during LTP. Since the involvement of cAMP/cAK in A $\beta$ -induced damage of synaptic plasticity has been previously investigated, we examined the role of NO/sGC/cGMP/cGK/CREB pathway in the A $\beta$ -induced LTP impairment.

### Methods

Hippocampal mice slices were prepared as previously described (Vitolo, PNAS, 2002). Field extracellular recordings were performed by stimulating the Schaeffer collateral fibers and recording in CA1 *stratum radiatum*. LTP was induced after a 15-minute baseline, recorded every minute at an intensity that evokes a response approximately 35% of the maximum evoked response, using a theta-burst stimulation (4 pulses at 100 Hz, with the bursts repeated at 5 Hz and each tetanus including 3 ten-burst trains separated by 15 seconds). Immunocytochemistry: Experiments were performed as previously described (Lu, J Neurosci, 1999). We used rabbit polyclonal anti-phospho-CREB and goat anti-rabbit antibody labeled with Alexa Fluor 488. Slices were examined by confocal microscopy.

### Results

When we treated the slices with a NO donor, DEA/NO, the LTP impairment, induced by twenty minutes perfusion with oligomeric A $\beta$ 42, was reversed. Similar to DEA/NO, perfusion with cGMP analogs (8-Br-cGMP or 8-pCPT-cGMP) rescued the A $\beta$ -induced LTP impairment. This protection was specifically due to modulation of cGK activity. Immunocytochemistry showed that NO and cGMP reversed the A $\beta$ -induced suppression of CREB phosphorylation.

### Conclusions

The present study clarifies one of the roles of NO and cGMP in A $\beta$ -induced nervous system damage. Furthermore, these results might yield new therapies with potential in treatment of AD and other neurodegenerative disorders.

## ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE IN RELAZIONE ALLA PRESENZA DI RADICALI LIBERI STABILI NEI VINI ROSSI

Rossetto M.<sup>1</sup>, Vanzani P.<sup>1</sup>, Zennaro L.<sup>1</sup>, Mattivi F.<sup>2</sup>, Scarpa M.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Chimica Biologica, Università di Padova, Padova. <sup>2</sup> Dipartimento Laboratorio Analisi e Ricerche, Istituto Agrario di San Michele all'Adige, San Michele all'Adige, Trento. <sup>3</sup> Dipartimento di Fisica and INFN, Università di Trento Trento.

### *Obiettivi*

Il vino è uno degli alimenti che possiede una elevata azione antiossidante per merito dell'elevato contenuto in polifenoli (1-3g/Kg) che varia per tipo di vino, processo di vinificazione e grado di invecchiamento. Si sono esaminati 8 tipi di vino (Teroldego, Enantio, Marzemino, Lagrein, Cabernet Sauvignon, Merlo, Pinot nero, Schiava), con due diversi periodi di invecchiamento in bottiglia (2 e 7 anni) al fine di avere un gruppo di campioni eterogenei per composizione e poter valutare quali parametri influiscano sull'attività antiossidante.

### *Metodi*

L'analisi della composizione polifenolica dei vini, comprensiva della frazioni polimerica ad alti pesi molecolari (HMWP), è stata condotta mediante analisi HPLC, mentre l'identificazione e la quantificazione di radicali liberi stabili (SFR) è stata determinata mediante risonanza di spin elettronico direttamente sui vini in bottiglia in condizioni anaerobiche. L'attività antiossidante, espressa come capacità di bloccare i radicali perossidici (PRTC) è stata misurata utilizzando un sistema modello che riproduce il processo di perossidazione lipidica.

### *Risultati*

L'analisi della composizione in polifenoli ha evidenziato che all'invecchiamento è associata ad una forte riduzione della concentrazione delle antocianine libere (fino ad un ordine di grandezza), accompagnata dall'aumento di proantocianidine ad elevato grado di polimerizzazione ( $n \geq 5$ , 40% in media) e all'aumento della concentrazione di SFR (fino a 3 volte). L'analisi di regressione multivariata ha mostrato che le concentrazioni di HMWP e SFR sono indipendentemente associate con la PRTC, mentre la concentrazione di HMWP e delle antocianine sono indipendentemente associate con la formazione di SFR.

### *Conclusioni*

Questi risultati dimostrano che, durante l'invecchiamento dei vini, i processi di condensazione tra antocianine e flavanoli che portano alla formazione delle proantocianidine sono responsabili di un aumento della capacità di inibire la perossidazione lipidica. Questo comportamento dipende dal fatto che la struttura delle proantocianidine, che sono specie polimeriche contenenti strutture insature coniugate molto estese, è in grado di stabilizzare i radicali liberi mediante delocalizzazione di elettroni spaiati.

## **PROFILING OF GENES DIFFERENTIALLY EXPRESSED BY CLUSTERIN OVER-EXPRESSION IN PC-3 HUMAN PROSTATE CANCER CELLS BY DNA MICROARRAY**

**Scaltriti M, Caporali A, \*D'Arca D, Cacciamo AE, §Medico E, \*Corti A and Bettuzzi S.**

*University of Parma, Italy; \*University of Modena and Reggio Emilia, Italy; §University of Torino, Italy. E-mail: saverio.bettuzzi@unipr.it*

### *Objectives:*

Clusterin (CLU) is the most potently induced gene during rat prostate involution following castration. Many functions have been proposed for CLU *in vivo*, but its precise role has not been established yet, in particular with regard to cell proliferation and apoptosis, or its possible biological functions during prostate cancer (CaP) onset and progression. We previously found CLU down-regulated in human CaP. Transient overexpression caused inhibition of cell cycle progression. Our aim was to study gene regulation following CLU over-expression in isolated PC-3 surviving clones.

### *Materials and methods:*

Full length CLU was cloned in pIRES-hyg1 vector (Clontech) and stably transfected colonies were isolated after selection with hygromycin B. Stable mock controls were isolated after transfection with the empty plasmid. Expression analysis was carried out by DNA microarray (Affimetrix, 21,000 genes). 10µg of total RNA of PC-3 clones (controls and over-expressing CLU) were used for each experiment. Experiments were performed in duplicate.

### *Results:*

Stable over-expression of CLU caused severe clonogenic toxicity. Stable CLU over-expression cells showed slow proliferation rate in association to irreversible multinucleate phenotype, impaired mitosis and endoreduplication. Significant differences were found in transcripts involved in cell cycle regulation and apoptosis as compared to mock controls. In particular, Survivin, Ras and IAP gene were found up-regulated, suggesting the acquisition of a more aggressive phenotype with anti-apoptotic features that allowed the rare survivor clones to tolerate CLU over-expression. The altered phenotype of cell clones was also accompanied by significant changes in the expression of genes involved in G<sub>2</sub>/M phase modulation, such as mitogen inducible protein 2, M-phase phosphoprotein 1, mitotic centromere-associated kinase (all up-regulated) and mitosin (down-regulated).

### *Conclusions:*

Taken together, these data confirm the anti-proliferative and pro-apoptotic properties of CLU, whose overexpression was capable of killing the vast majority of PC-3 cells, also suggesting that survival to CLU over-expression is indeed possible, but this involves the selection of tumor cell clones developing apoptosis-inhibitory properties. These data can also explain controversial findings and opposite hypothesis on CLU action, emphasizing the importance of CLU expression for the balance between cell death and viability in prostate cancer cells.



## RANKING THE STRENGTH OF INTERACTION BETWEEN WATER MOLECULES AND PROTEINS USING HINT, A "NATURAL" FORCE FIELD

Francesca Spyraakis<sup>o</sup>, Alessio Amadasi<sup>o</sup>, Micaela Fornabaio\*, Pietro Cozzini<sup>^</sup>, Glen E. Kellogg\*, Donald J. Abraham\*, and Andrea Mozzarelli<sup>o</sup>,

<sup>o</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, and <sup>^</sup>Department of General and Inorganic Chemistry, University of Parma, 43100 Parma, Italy. \*Department of Medicinal Chemistry & Institute for Structural Biology and Drug Discovery, Virginia Commonwealth University, Richmond, Virginia, USA.

Water molecules play a variety of essential roles in biological systems: solvent for most metabolic species, building block of macromolecules, "lubrificant" of protein conformational changes and protein-protein and protein-DNA interactions, and key actions in folding, catalysis and regulation. Waters can be located in different positions of proteins, active sites, cavities, clefts, grooves, and in monolayers or multilayers. Some structural and conserved waters, placed in proteins active sites, contribute to the complementary surface between ligand and protein and to the free energy of binding. This points out to the need of taking into account water molecules in computational applications like docking and drug design. Our aim was to investigate the role played by crystallographic water molecules in native and ligand-protein complexes, using a computational approach, that relies on the software HINT (Hydrophatic INTERactions) [1]. HINT is a natural force field, based on  $\text{LogP}_{\text{octanol/water}}$  values, able to evaluate the interactions between two different molecules (protein-ligand, protein-water, ligand-water, protein-DNA). Its particular and distinctive features are that all interactions are quantified using the same mathematical protocol and the binding process is considered a concerted event, as it is. In previous studies we have demonstrated that HINT scoring function accurately quantifies the energetic contribution of structured water molecules involved in ligand binding to proteins [2]. The analyses, carried out on a set of 23 HIV-1 protease-ligand complexes, demonstrated that the inclusion of water 301 contribution in the calculation of the free energy of binding significantly improved the correlation between experimental and computational data, while the addition of other and more peripheral waters (water 313, water 313', water 313bis and water 313bis') did not improve the correlation. These results led to the improvement of the software through the development of new options, like the possibility to automatically identify waters placed at the interface between molecules, the automatic optimization of their positions and the evaluation of the potential hydrogen bonds formed by each solvent molecule with both the macromolecule and the ligand [3]. The rank order does not simply represents the number of potential hydrogen bonds, but the probability that every hydrogen bond could exist, taking into account distances and angles. Therefore, the value for each water molecule represents a weighted rank.

In the present work, we analysed five different native proteins: HIV-1 protease, lipid binding protein, p120GAP GTPase-activating domain, ribonuclease A and Hsp90 Geldanamycin binding domain. The three dimensional structures, determined at resolution lower than 1.9 Å, revealed the presence of an average of 163 crystallographic water molecules per protein. We have classified the water molecules on the basis of the number of potential hydrogen bonds (rank order) and the Hint Score<sub>protein-water</sub>. We found that i) the rank order for the second layer of external water is about 0.4, 1.5 for the first layer, 1.9 for waters placed in active sites, 2.5 for waters in cavities, and 3 for the buried water, ii) the Hint Score averaged over all water molecules in a defined location is significantly dependent on water location: 29 for the second layer, 205 for the first layer, 190 for waters in active sites, 254 for waters in cavities, and 277 for buried waters. The mean Hint Score for all 817 analysed waters is 199, while 959 is the maximum determined HINT Score, indicating a tightly bound water.

We have further analyzed four protein-ligand complexes, HIV-1 and HIV-2 protease, endothiapepsin and thrombin, containing several conserved water molecules. Results confirmed that conserved waters, that are able to stabilize the complex formation, exhibit the highest rank values and Hint Scores.

These findings are of particular relevance in the perspective of designing new drugs, since HINT could be used as an excellent tool to rapidly identify water molecules that play a critical role in mediating ligand-protein interactions.

[1] G.E. Kellogg and D.J. Abraham, Hydrophobicity: is  $\text{Log}P_{o/w}$  more than the sum of its parts? *Eur. J. Med. Chem.*, 35: 651-661, 2000.

[2] M. Fornabaio, F. Spyraakis, A. Mozzarelli, P. Cozzini, D.-J. Abraham, G.-E. Kellogg, Simple, intuitive calculations of free energy of binding for protein-ligand complexes. 3. Including the free energy contribution of structural water molecules in HIV-1 Protease. *J. Med. Chem.*, in press.

[3] G.E. Kellogg and Deliang Chen, The importance of being exhaustive. Optimization of bridging water molecules and water networks in models of biological systems. *Chemistry and Biodiversity*, 1: 98-105, 2004.

## REALIZZAZIONE DI UN ALGOMETRO COMPUTERIZZATO

Viggiano Andrea<sup>1</sup>, Zagaria Nicola<sup>2</sup>, Baccari Maria Ena<sup>2</sup>, Aurilio Caterina<sup>2</sup>, Chiefari Maria<sup>2</sup>, Monda Marcellino<sup>1</sup>, De Luca Bruno<sup>1</sup>

*1 Dip. Medicina Sperimentale-Sez. Fisiologia Umana, Seconda Università di Napoli*

*2 Dip. Scienze Anestesiologiche, Chirurgiche e dell'Emergenza*

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di mettere a punto un metodo per ottenere una misurazione della soglia del dolore cutaneo evocato mediante stimolazione meccanica pressoria. Un ago d'acciaio del diametro di 0.8mm è stato incollato ad un sensore di pressione; il tutto è stato fissato al bracciolo di una sedia in modo da porre l'ago in posizione verticale. Il segnale di pressione è stato successivamente amplificato, filtrato, digitalizzato ed acquisito mediante PC. È stato sviluppato un software per la visualizzazione in tempo reale e per la registrazione dell'andamento nel tempo della forza esercitata. Prima di ogni test algometrico, il sistema è stato tarato per esprimere la forza premente sull'ago in grammi. Il test consisteva nel chiedere al soggetto in esame di premere sull'ago fino a quando avvertiva dolore. Sono stati eseguiti test algometrici sui polpastrelli e sul dorso di indice, medio, anulare e mignolo e ripetuti su un totale di 10 soggetti volontari sani, 5 maschi e 5 femmine, di età compresa tra i 25 e i 35 anni. A ciascun soggetto è stato chiesto di effettuare un primo gruppo di tests esercitando, su ciascuna sede, la minima pressione che evocava dolore; quindi è stato chiesto di ripetere lo stesso gruppo di tests esercitando la massima pressione sopportabile. Per valutare la ripetibilità del dato, inoltre, entrambi i gruppi di tests sono stati ripetuti una seconda volta su ciascun soggetto a distanza di almeno una settimana dalla prima volta. I risultati indicano che la metodica sviluppata risulta di rapida esecuzione, con poco o nessun disagio per il soggetto in esame; le misurazioni ottenute sono risultate affidabili e ripetibili ed indipendenti dall'esaminatore.

## BIODEGRADAZIONE COMETABOLICA DI COMPOSTI ORGANICI CLORURATI (COC).

Fedi S, Frascari D<sup>b</sup>, Nocentini M<sup>b</sup>, Pinelli D<sup>b</sup>, Fava F<sup>c</sup>, Zannoni D

<sup>a</sup> BES- Dipartimento di Biologia Evoluzionistica Sperimentale, Via Selmi, 3 Bologna.

<sup>b</sup> Dipartimento di Ingegneria Chimica, Mineraria e delle Tecnologie Ambientali, Via Terracini, 34, Bologna.

<sup>c</sup> Dipartimento di Chimica Applicata e Scienza dei Materiali, V.le Risorgimento, 2 Bologna.

I Composti Organici Clorurati (COC) sono una delle principali fonti di inquinamento dei suoli e delle acque e rappresentano un effettivo rischio per la salute umana e per l'equilibrio ecologico delle aree naturali. Fino ad oggi non sono stati ancora identificati microrganismi aerobi che siano in grado di utilizzare numerosi COC, tra cui il tricloroetilene, il cloroformio, o i policlorobifenili (PCB), come unica fonte di carbonio ed energia. Tuttavia alcuni batteri che possiedono mono- e diossigenasi non specifiche (propano- o butano-monoossigenasi, e bifenile diossigenasi) possono degradare parzialmente o totalmente numerosi COC mediante un processo definito di cometabolismo. L'impiego di tali microrganismi, nei processi di biorisanamento *in situ*, si presenta come uno dei metodi più promettenti per la decontaminazione di inquinanti clorurati presenti nelle falde acquifere o nei suoli.

Nel nostro laboratorio, il cometabolismo aerobico di COC è stato studiato su popolazioni batteriche che utilizzano come substrato di crescita propano, butano o bifenile e sintetizzano rispettivamente propano-, butano-monoossigenasi o bifenile-diossigenasi.

La degradazione mediante cometabolismo aerobico è stata osservata per diversi idrocarburi alifatici clorurati (tra cui il cloroformio, il cloruro di vinile e il tricloroetilene) con batteri aerobi in grado di crescere con propano e butano come uniche fonti di carbonio. Gli studi sono stati condotti per periodi prolungati di tempo con prove *batch* in microcosmi contenenti acque di falda contaminate e sedimenti monitorando e caratterizzando periodicamente la concentrazione degli inquinanti e delle popolazioni batteriche. Alcuni isolati appartenenti al genere *Rhodococcus* sono stati ulteriormente studiati in quanto capaci di cometabolizzare diversi idrocarburi alifatici clorurati tra cui il cloruro di vinile, il cloroformio e il cis-dicloroetano.

La degradazione dei policlorobifenili (PCB), composti altamente tossici e persistenti nell'ambienti naturali, è operata da microrganismi aerobi in grado di crescere impiegando il bifenile come unica fonte di carbonio. In questo caso, attraverso la sintesi delle bifenil-diossigenasi, i batteri sono in grado di cometabolizzare numerosi congeneri di PCB. Per lo studio della degradazione cometabolica dei PCB, sono stati allestiti dei reattori in fase fissa con liquido di ricircolo, utilizzando ciclodestrine industriali per incrementare la biodisponibilità dei contaminanti. Il trattamento è stato condotto per sei mesi dopo i quali sono stati osservati aumenti rilevanti di degradazione di alcuni congeneri di PCB nei reattori addizionati con 0,5% e 1,0% di ciclodestrine. Al termine delle prove, il DNA totale è stato estratto da campioni di suolo dei diversi reattori. Per l'identificazione delle specie batteriche presenti nei reattori, il DNA ribosomiale della subunità 16S è stato amplificato mediante PCR e caratterizzato sia con il clonaggio e successivo sequenziamento sia con la tecnica della Terminal-Restiction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP). Combinando i dati ottenuti è stato possibile identificare alcune delle popolazioni batteriche maggiormente rappresentate nei reattori e determinarne la loro affiliazione filogenetica.

## **THE PONTINE NUCLEI PROJECT TO CEREBELLAR NUCLEI AND/OR CEREBELLAR CORTEX WITH BOTH COUPLED AND UNCOUPLED PATTERN**

**A.Zappalà, M.F. Serapide, R. Parenti, M.R. Pantò and F. Cicirata**

*Dipartimento di Scienze Fisiologiche, Università di Catania, v.le A.Doria,6, 95125 Catania*

The cerebellar projections from the basilar pontine nuclei (BPN) and the nucleus reticularis tegmenti pontis (NRTP) to the cerebellar cortex (CC) and nuclei (CN) of albino rats, were studied. Experimental procedures involved the tracer staining of pontine nuclei, or areas of the CC, or CN of intact brain rats as well as after electrolytic interruption of the medial cerebellar peduncle, ipsi or contralateral to the staining. Main results are as follow. BPN - 80% of BPN neurons project to the contralateral cerebellum and the 20% to the ipsilateral one. The projections to the CN were segregated to restricted areas of the contralateral nuclei: the ventrolateral part of the nucleus lateralis and the ventrocaudal aspect of the nucleus interpositalis posterioris , while those to the CC were traced to areas of both sides. These areas included ones, which in turn project to nuclear regions innervated from the same pontine areas (coupled projections), and ones which project to nuclear regions not innervated from the same pontine areas (uncoupled projections). NRTP – the 60% of NRTP neurons project to the contralateral cerebellum and the 40% to the ipsilateral one. Projections were traced to the CN and cortical areas of both sides. NRTP projections to CC and CN were arranged with both coupled and uncoupled pattern. In conclusion, the study definitively proved the different projection pattern of the BPN and the NRTP to the cerebellum. The uncoupled projections (traced to the CC and not to the corresponding CN regions), support an inhibitory control of the pontine nuclei to the CN, by the transcortical pathway. The BPN, through the transcerebellar pathway, control segregated areas of the contralateral motor cortex, which were principally concerned in the bilateral control of body movements.