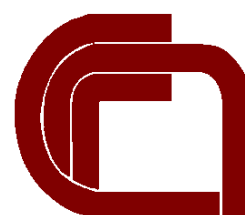


Piano annuale

2008

Scienze della Vita

Consiglio Nazionale delle Ricerche





Consiglio Nazionale delle Ricerche

PIANO ANNUALE 2008

Preliminare

Scienze della Vita

Elenco dei Progetti:

Funzione, regolazione ed evoluzione dei genomi eucariotici

Struttura, funzione e progettazione di proteine, acidi nucleici e loro complessi sopramolecolari

Meccanismi molecolari e segnali nel controllo di proliferazione, differenziamento e morte cellulare

Modelli animali per lo studio di processi fisio-patologici e del comportamento

Meccanismi di adattamento a stress e biodiversità

Bioinformatica e biologia computazionale

Biodiversità molecolare



Funzione, regolazione ed evoluzione dei genomi eucariotici



Studio della regolazione post-trascrizionale dell'espressione genica in risposta a stress. Fattori che controllano lo splicing dei mRNA in cellule normali e nei tumori.

Dati generali

Progetto:	Funzione, regolazione ed evoluzione dei genomi eucariotici
Tipologia di ricerca:	Progetti relativi a linee tematiche a carattere strategico
Istituto esecutore:	Istituto di genetica molecolare
Sede principale svolgimento:	Sede principale Istituto
Dip. di prevista afferenza:	Scienze della Vita
Responsabile indicato:	GIUSEPPE BIAMONTI

Elenco dei partecipanti

Bagarotti Cristina	liv. VII	Cobianchi Fabio	liv. III	Lussignoli Stefano	liv. III
Biamonti Giuseppe	I	Gallo Balma Maria Fede	V	Montana Villamizar Cecilia	IX
Bianchi Anna Agata	VIII	Ghigna Claudia	III	Spairani Mario	VII
Capella Paolo	VII	Lombardi Gloria	V	Tavarne Daniela	VII

Temi

Tematiche di ricerca

A- Modulazione dello splicing in seguito a stress. La ricerca si occuperà: 1) di studiare il destino dei ncRNA di satellite III (SatIII) in cellule normali e stressate; 2) di identificare con analisi in silico i blocchi di SatIII nel genoma e studiare il profilo di espressione/splicing dei geni associati. L'analisi verrà eseguita anche in cellule con difetti di eterocromatina (es. laminopatie); 3) definire i tipi di stress che attivano SatIII; 4) studiare i complessi ribonucleoproteici assemblati su SatIII RNA.

B- Splicing alternativo (AS) e tumori. Modello: gene Ron, che codifica un recettore di membrana. AS di Ron induce la produzione di una isoforma, <Delta>Ron, che promuove la transizione da cellula epiteliale a mesenchimale (EMT) coinvolta nelle proprietà metastatiche dei tumori. La ricerca si propone: 1) di studiare a livello molecolare AS di Ron, 2) di verificare se un'alterata espressione o attività di specifici fattori di splicing sia sufficiente per indurre EMT; 3) correggere lo splicing alternativo di Ron tramite oligo antisense; 4) identificare le condizioni di crescita, che si verificano nel micro-ambiente del tumore, in grado di modulare lo splicing di Ron.

Stato dell'arte

Il 70% circa dei geni umani subiscono eventi di splicing alternativo. Questo meccanismo perciò riveste un ruolo centrale, fino ad oggi sottovalutato, nella regolazione dell'espressione genica. Una deregolazione dello splicing alternativo si verifica durante la progressione tumorale ed in molti casi ha un ruolo critico nella tumorigenesi. Lo splicing alternativo è regolato da specifiche RNA binding proteins i cui livelli, attività e distribuzione sono alterati nei tumori ed in seguito ad eventi stressanti a cui le cellule tumorali sono sottoposte. In effetti lo splicing alternativo rappresenta un meccanismo molto flessibile per modulare l'espressione genica in relazione a cambiamenti anche drastici delle condizioni di crescita. Noi abbiamo recentemente dimostrato che condizioni stressanti inducono la formazione di compartimenti nucleari detti 'stress bodies'. Questi corrispondono a transcription factories specifiche di porzioni eterocromatiche del genoma. Gli RNA non-codificanti prodotti negli stress bodies reclutano in questi distretti nucleari specifiche RNA binding proteins alterando il programma di splicing alternativo dei geni.

Azioni

Attività da svolgere

A) Abbiamo ipotizzato che le sequenze di SatIII DNA regolino lo stato cromatinico e l'attività trascrizionale dei geni associati in risposta allo stress. In collaborazione con la Dr. Lattanzi della sezione di Bologna studieremo l'espressione del SatIII e delle sequenze adiacenti in cellule di laminopatie progeroidi caratterizzate da difetti nell'organizzazione dell'eterocromatina. In parallelo, cercheremo di stabilire se i piccoli RNA SatIII abbiano un ruolo nell'organizzazione cromatinica. Infine, utilizzeremo la strategia TAP-tag per purificare i complessi ribonucleoproteici assemblati su SatIII RNA.

B) Cercheremo di stabilire se il pathway di Non-sense Mediated RNA decay (NMD) è responsabile della degradazione dei trascritti di SF2/ASF prodotti tramite splicing alternativo nelle cellule SW480 cresciute ad alta densità. Questo potrebbe giustificare la riduzione nei livelli di questo fattore di splicing. Inoltre cercheremo di capire se tale meccanismo di regolazione post-trascrizionale sia controllato da cascate di trasduzione del segnale che rispondono alla densità cellulare.



Punti critici e azioni da svolgere

A) Tutti i punti relativi alla caratterizzazione dei nSBs richiedono che proficue collaborazioni con altri laboratori. Ad esempio, per studiare il ruolo del DNA SatIII come modulatore dell'espressione genica abbiamo iniziato una collaborazione con la Dr. Lattanzi (sezione di Bologna dell'IGM) che ha un'esperienza internazionalmente riconosciuta nel campo delle laminopatie e una collezione di cellule laminopatiche. Insieme Dr. Lattanzi abbiamo presentato una richiesta di finanziamento (PRIN) in cui la nostra unità è associata ad un progetto teso a caratterizzare il ruolo dell'eterocromatina costitutiva in sistemi modello

B) Non essendo disponibile presso questo Istituto nè presso l'Università di Pavia uno stabulario adeguato abbiamo intrapreso una collaborazione con il Prof. Tazi dell'Università II di Montpellier per cercare di stabilire se la sovra-espressione del fattore di splicing SF2/ASF sia sufficiente per aumentare il potenziale metastatico delle cellule tumorali.

Competenze, tecnologie e tecniche di indagine

La commessa ha competenze in:

- 1) metodiche per lo studio dell'RNA (isolamento di RNA, Northern blotting, trascrizione in vitro, purificazione e clonaggio di small RNA);
- 2) biologia cellulare (colture cellulari in varie condizioni di crescita, transfezioni transienti e stabili, immunofluorescenza, ibridazioni in situ, analisi al microscopio confocale di cellule fissate ed in vivo, marcature in vivo);
- 3) biologia molecolare (clonaggi, espressione di proteine in sistemi eterologhi, RT-PCR e real-time PCR, Immunoprecipitazione, traduzione in vitro, western blotting, marcatura di proteine in vivo, vaglio di collezioni di cDNA con anticorpi o con saggi funzionali tipo One- Two- e Three- hybrid in lievito; RNA interference);
- 4) analisi biochimiche (purificazioni di enzimi e frazionamenti cellulari).

Strumentazione

Strumenti per gel elettroforesi (proteine ed acidi nucleici), termociclatori, microscopio a fluorescenza dotato di CCD camera e termostato, confocale Leica, centrifughe ed ultracentrifuga, camera radioattiva, camera sterile per colture cellulari, laboratorio attrezzato per esperimenti di Biologia Molecolare, Typhoon GE a tre canali per l'analisi di campioni radioattivi e fluorescenti.

Tecniche di indagine

A) Verranno applicate metodologie di Biologia molecolare (purificazione di RNA, RT-PCR e qRT-PCR, Northern blotting, Two - e Three hybrid assays) biochimiche (purificazione di complessi ribonucleoproteici nucleari su matrici di affinità, Western blotting) e di biologia cellulare (Immunofluorescenza, in situ hybridization, analisi con microscopio confocale, produzione di cloni stabili) al fine di caratterizzare in dettaglio il tipo di complessi che costituiscono i nSBs

B) L'analisi dello splicing alternativo di Ron si avvarrà: 1) Saggi di splicing in vivo che basati su impiego di minigeni trasfettati in cellule umane e analisi dei trascritti con RT-PCR; 2) Analisi dell'effetto che la densità cellulare e le condizioni di crescita in genere hanno sullo slicing alternativo del gene Ron endogeno; 2) identificazione di vie di trasduzione del segnale coinvolte nella regolazione dello splicing (Western blotting con anticorpi specifici per forme fosforilate di chinasi e inibitori farmacologici); 3) Uso di oligonucleotidi e siRNA; 4) Produzione di cloni cellulari stabili.

Tecnologie

Per lo sviluppo di entrambi i punti (A e B): ci avvarremo di differenti tecnologie di Biologia Molecolare, Biologia Cellulare e Biochimica. In particolare svilupperemo modelli cellulari che permetteranno di rispondere a problemi chiave della nostra ricerca come ad esempio il ruolo di differenti signalling pathways nella modulazione dello splicing alternativo.

Collaborazioni (partner e committenti)

Prof. F. Baralle ICGEB - Trieste - Analisi di complessi ribonucleici

Prof. M. Biggiogera Università di Pavia - Microscopia elettronica

Prof. A. Pombo MRC - London - Analisi dei territori cromosomici

Prof. PM Comoglio - IRCCS Candiolo - Ruolo di SF2/ASF nella mobilità cellulare

Prof. Michael Green - Howard Hughes Medical Institute, University of

Massachusetts Medical School, USA. Interazione tra SF2/ASF e trascritti di Ron

Prof. Jamal Tazi, Université Montpellier II- Métabolisme des ARN messagers. Sviluppo di inibitori dello splicing alternativo di specifici geni da utilizzare per approcci terapeutici

Iniziativa per l'acquisizione di ulteriori entrate

E' stata presentata 1 domanda di finanziamento alla fondazione Cariplo per studiare il coinvolgimento dello splicing alternativo nella progressione tumorale e 1 domanda Prin per studiare il ruolo dell'eterocromatina



nell'organizzazione dell'espressione genica. Lo stesso progetto verrà presentato al prossimo bando della fondazione Telethon.

Finalità

Obiettivi

A- 1) Messa a punto di metodiche per la quantificazione dei trascritti di Satellite III in varie condizioni di crescita; 3) Caratterizzazione dei complessi ribonucleoproteici associati ai trascritti; 4) Ruolo dei trascritti indotti da stress nella regolazione dello splicing alternativo. 5) Identificazione dei tipi di stress da cui vengono indotti. 5) Studio del possibile processamento dei trascritti in piccoli RNA; 6) Ruolo del DNA e dell'RNA satellite III nel controllo epigenetico di geni associati ai cluster di satellite III nel genoma.

B- 1) Identificazione di RNA binding proteins coinvolte nello splicing alternativo del gene Ron. 2) Effetto dei livelli di espressione delle RNA binding nella identità cellulare e nella motilità. 3) Effetto delle condizioni di crescita e della densità cellulare sullo splicing di Ron e sull'attività delle RNA binding proteins identificate al punto 1. 4) Analisi del coinvolgimento di RNA binding proteins nella progressione tumorale. 5) Sviluppo di metodiche basate su oligonucleotidi antisense, RNAi o farmaci per curare lo splicing alternativo di Ron in vitro ed in vivo.

Risultati attesi nell'anno

A) 1) Caratterizzare il profilo di espressione dei geni associati al satIII in cellule normali e in cellule con difetti di organizzazione dell'eterocromatina come le laminopatie progeroidi. 2) Comprendere se i piccoli RNA di satIII siano o meno associati alla cromatina, se la loro produzione sia alterata nelle laminopatie e se la loro produzione dipenda dai meccanismi di RNA interference.

B) 1) Identificare nelle cellule di adenocarcinoma primario del colon SW480 un pathway di trasduzione del segnale attivato in risposta a differenti condizioni di densità cellulare (alta vs bassa densità). 2) Comprendere se i meccanismi di NMD siano o meno coinvolti nella stabilità dei trascritti di SF2/ASF generati attraverso alterante splicing. 3) Comprendere se la sovraespressione di SF2/ASF sia sufficiente per conferire proprietà metastatiche alle cellule.

Potenziale impiego

- per processi produttivi

La ricerca si qualifica come una ricerca di base e quindi non è direttamente coinvolta in processi produttivi. Tuttavia alcuni dei prodotti prevedibili della ricerca potrebbero avere ricadute in questo senso. Ad esempio, produzione di anticorpi contro proteine di interesse che potrebbero venir sviluppati e commercializzati in collaborazione con ditte operanti nel campo come ad esempio ARETA International con cui è già in corso una collaborazione. Inoltre ci aspettiamo che l'analisi dello splicing alternativo del gene Ron possa portare allo sviluppo di kit diagnostici e in prospettiva allo sviluppo di tecnologie per curare lo splicing alternativo di specifici geni nei tumori.

- per risposte a bisogni individuali e collettivi

La ricerca si occupa un campo di analisi fino ad ora sottovalutato, ovvero il ruolo dello splicing alternativo nella progressione tumorale e nella risposta a condizioni stressanti. In questo senso la ricerca sicuramente migliorerà la nostra comprensione del processo tumorale e potrebbe offrire nuovi e potenzialmente interessanti approcci terapeutici per la cura dei tumori.

Un altro aspetto innovativo della nostra ricerca riguarda il possibile ruolo delle sequenze di Satellite III nella regolazione di geni associati. Questo potrebbe avere dei riflessi nel caso di patologie con difetti nell'organizzazione dell'eterocromatina come ad esempio le laminopatie e ICF

Moduli

Modulo: Studio della regolazione post-trascrizionale dell'espressione genica in risposta a stress. Fattori che controllano lo splicing dei mRNA in cellule normali e nei tumori.

Istituto esecutore: Istituto di genetica molecolare

Luogo di svolgimento attività: Sede principale Istituto

Modulo: Ruolo delle proteine Shc nella sopravvivenza dei tumori cerebrali a stress

Istituto esecutore: Istituto di genetica molecolare

Luogo di svolgimento attività: Sede principale Istituto



Risorse commessa 2008

Pers. tempo ind/det	Funz.+ Invest.	Spese da Fonti Esterne	Spese per Infrastrutt. tecn.-scient a gestione accentrata	Totale	Risorse da esercizi precedenti	Massa Spendibile	Costi figurativi	Spese generali accentrate	Valore Effettivo
1	2	3	4	5=1+2+3+4	6	7=2+3+6	8	9	10=5+6+8+9
259	0	50	0	309	46	96	36	N.D.	391

valori in migliaia di euro

<i>Unità di personale di ruolo*</i>	
ricercatori	Totale
3	4

*equivalente tempo pieno

<i>Unità di personale non di ruolo</i>									
associato	dottorando	borsista	assegnista	specializzando	incaricato di ricerca	professore visitatore	collaboratore professionale	altro	Totale
0	0	1	1	0	0	0	1	0	3

<i>Richiesta nuove unità di personale</i>			
tempo determinato	tempo indet	non di ruolo*	Totale
1	0	1	2

*dottorati, borse di studio, assegni di ricerca



Biogenesi delle Membrane di Trasduzione dell'Energia.

Dati generali

Progetto:	Funzione, regolazione ed evoluzione dei genomi eucariotici
Tipologia di ricerca:	Progetti relativi a linee tematiche a carattere strategico
Istituto esecutore:	Istituto di biomembrane e bioenergetica
Sede principale svolgimento:	Sede principale Istituto
Dip. di prevista afferenza:	Scienze della Vita
Responsabile indicato:	MARIA NICOLA GDALETA

Elenco dei partecipanti

Ceci Luigi Ruggiero	liv. II	Gattulli Bruno Angelo	liv. VII	Musicco Clara	liv. III
De Leo Francesca	III				

Temi

Tematiche di ricerca

Studio del sistema genetico mitocondriale in organismi modello (riccio di mare, *Drosophila*, ratto) e dei fattori che ne regolano l'espressione in condizioni fisiologiche o di stress, dopo vari trattamenti nutrizionali e farmacologici e il suo coinvolgimento nello sviluppo di tumori. Studio di alterazioni del DNA mitocondriale (mtDNA) associate all'età e ad alterazioni metaboliche, quali diabete e ipotiroidismo e neuropatie ottiche mitocondriali, nell'uomo. Studio del ruolo di Lp(a) nel sistema nervoso centrale e delle implicazioni del sistema del plasmin(ogeno) nelle malattie neurologiche. Studio dell'interazione tra inibitori di proteasi (IP) di pianta e proteasi di insetto. Studio dei meccanismi molecolari di risposta a stress nella fotosintesi. Bio-remediation da metalli pesanti mediante batteri fotosintetici. Biopeptidi ricombinanti come nutraceuticals. Meccanismi di import di tRNA in mitocondri di piante superiori.

Stato dell'arte

Le proteine coinvolte nella replicazione e trascrizione mitocondriale, in particolare nella terminazione della trascrizione, sono ancora poco note. In condizioni di stress quali aging e unloading si evidenzia una ridotta biogenesi mitocondriale sostenibile con vari interventi nutrizionali. Lp(a) non è fisiologicamente prodotta dal CNS, ma può travasare nel liquor di pazienti con malattia neurologica, attraverso la barriera ematoliquorale disfunzionale; vanno studiati gli effetti di Lp(a) sulle cellule nervose. Gli insetti esprimono proteasi insensibili agli inibitori di proteasi (IP) vegetali. Il meccanismo di tale adattamento non è noto. Non è quindi possibile la sintesi di nuovi IP attivi contro esse. I processi fotosintetici nelle piante e nei batteri fotosintetici sono implicati nella risposta a stress, quali l'elevato irraggiamento o l'alta concentrazione di metalli. Tre biopeptidi sono stati espressi in forma ricombinante ed attiva da *E.coli*: l'attività anti-ipertensiva è stata determinata in vitro. E' stato postulato un ruolo rilevante dell'aminoacil sintetasi nell'import di tRNA in mitocondri di piante. Questi enzimi saranno espressi in *E. coli* per studiare l'import di tRNA

Azioni

Attività da svolgere

Clonaggio dei fattori d'inizio della trascrizione mitocondriale di riccio di mare; studio del complesso d'inizio ricostituito in presenza di stampi di DNA contenenti il promotore. Caratterizzazione del fattore D-MTERF3 e studio della regolazione dell'espressione delle proteine della famiglia MTERF in *Drosophila*. Analisi di fattori coinvolti nella biogenesi mit. modulati da ALCAR. Sequenziamento e dosaggio del mtDNA di pazienti italiani con diabete di tipo 2. Identificazione di proteine mitocondriali di fegato di ratto vecchio tramite proteomica. Studio degli effetti della lipoproteina Lp(a) e di molecole ricombinanti di apo(a) di diverse dimensioni sulla modulazione del sistema del plasmin(ogeno) in cellule nervose in vitro. Studio della anomala presenza di plasminogeno e dei suoi prodotti di proteolisi in liquor di pazienti con disfunzione della barriera ematoencefalica. Innovazione processo di sintesi di peptidi bioattivi e sintesi nuovi peptidi. Elementi di regolazione geni *Lhcb1* di spinacio. Proteoma di membrana di *R.sphaeroides*. Studio di inibitori di proteasi (IP) vegetali. Studio di geni del mtDNA della felce *A.nidus*. Espressione di mRNA esogeni in mitocondri di patata

Punti critici e azioni da svolgere

Clonaggio ed espressione di fattori regolatori col sistema del baculovirus. Produzione di fenotipi knock-down e di overexpression in cellule di *Drosophila*. Analisi dei livelli dei trascritti con real time PCR e Northern blotting. Studio di interazioni proteina-proteina. Analisi di gel bidimensionali di mitocondri di fegato di ratto vecchio mediante software dedicati, identificazione delle proteine alterate mediante opportune tecniche di



spettrometria di massa. Coltura di linea di astrociti umani trattati con Lp(a) e apo(a) ricomb. Analisi dell'espressione di attivatori e inibitori del sistema del plasmin(ogeno) mediante western blott, zimografia e real time PCR del sovrantante. Analisi di liquor mediante ELISA e western blott con anticorpi monoclonali. Adattamento della purificazione di biopeptidi. Lo studio del proteoma di membrana di R. sphaeroides richiede opportune tecniche di isolamento ed elettroforesi-2D delle proteine. Saranno avviate collaborazioni con altri laboratori. Per la difficoltà di isolare mitocondri di A. nidus si procede ad amplificazioni con primer dedotti da geni altamente conservati.

Competenze, tecnologie e tecniche di indagine

Competenze di biochimica, biologia molecolare, biologia cellulare, genomica, proteomica e bio-informatica sono largamente rappresentate tra i ricercatori partecipanti.

Strumentazione

Strumentazione di base per studi di biochimica, biologia molecolare, biologia cellulare, genomica, proteomica e bio-informatica. Strumenti di particolare rilievo sono: ultracentrifuga, Real-time PCR (Applied Biosystem, 7000), microscopi a luce trasmessa e fluorescenza con sistema di acquisizione di immagini mediante CCD camera (Zeiss), sistema di analisi di immagini KS300 (Zeiss), microtomo criostatato (Microm), sistema per elettroforesi bidimensionale (GE healthcare).

Tecniche di indagine

Tecniche di indagine dell'espressione genica (macro- e micro-arrays, Real-time PCR, 2D elettroforesi); tecniche di indagine della funzione genica (mutanti con perdita o guadagno di funzione, RNA interference, dominanti negativi e positivi); tecniche di indagine dell'interazione proteina-proteina (two hybrid in lievito, phage display). Tecniche di purificazione delle proteine. Tecniche di analisi delle alterazioni del DNA mitocondriale. Tecniche istochimiche e biomolecolari per lo studio delle alterazioni genotipiche e fenotipiche del muscolo scheletrico. Saggi di attivazione del plasminogeno alla superficie cellulare o su piastre di fibrina. Caratterizzazione fenotipica e genotipica di lipoproteine native e ossidate. Tecniche di western blotting, immunodetection e ELISA. Detection e saggi di attività delle metalloproteasi mediante zimografia. Ingegnerizzazione di sequenze geniche identificate e loro utilizzo per l'espressione in sistemi procariotici (batteri) ed eucariotici (baculovirus lieviti e piante). Saggi biochimici per determinare l'attività di enzimi e peptidi attivi. DNA uptake, run-on e run-off. Trascrizione in organello.

Tecnologie

Tecnologia del DNA ricombinante. Tecnologie dell'RNA. Caratterizzazione quantitativa e qualitativa di proteine. Biotecnologie vegetali.

Collaborazioni (partner e committenti)

Dip. Biochimica e Biologia Molecolare Univ. Bari; Sigma Tau, Industrie Farmaceutiche Riunite, Roma; Instit. for Biophysical and Clinical Research into Human Movement, Manchester Univ. (UK); Lab. Biochemistry of Aging, Univ. Gainesville, Florida; Dep. Laboratory Medicine, Division of Metabolic Diseases, Karolinska Inst., Stockholm, Sweden; Dip. Biochimica, Univ. Autonoma di Madrid; Dip. Biochimica e Biologia Cellulare e Molecolare, Univ. Zaragoza, Spagna; IRCCS De Bellis, Castellana Grotte (BA); INSERM U-698, UFR Medicine Xavier-Bichat, Paris, France; INSERM at Cyceron/U., Caen, France; Dip. Scienze Neurol. e Psichiatr.-Neurofisiopatologia AOU Careggi, Firenze; Dip. Emergenza e Trapianto Organi, Univ. Bari; Lab. Biologie des Entomophages, Univ. Amiens, France; ISMAC CNR-Milano; Dip. Protezione delle piante e Microbiologia applicata, Univ. Bari; Inst. of Plant Molecular Biology - CNRS, Strasbourg, France; Istit. Processi Chimico-Fisici, CNR, Bari; Istit. Tecnologia delle membrane (ITM-CNR); Centro Ricerca Interdip. BIOAGROMED, Univ. Foggia; Dip. Scienze Ambientali, Univ. Tuscia, Viterbo.

Iniziativa per l'acquisizione di ulteriori entrate

Trasferimento delle conoscenze acquisite alle industrie del settore biotecnologico e farmaceutico ed acquisizioni di eventuali brevetti. Partecipazione a programmi di ricerca nazionali e internazionali.

Finalità

Obiettivi

Pubblicazioni scientifiche su riviste nazionali ed internazionali. Sviluppo di conoscenze sui meccanismi della biogenesi mitocondriale, del signaling nucleo-mitocondrio, degli effetti di interventi nutrizionali sulla bioenergetica cellulare. Conoscenza dei meccanismi fisiopatologici di Lp(a) e molecole del sistema del plasmin(ogeno) nel CNS. Identificazione e caratterizzazione di nuovi Inibitori di Proteasi di origine vegetale e sintetici. Identificazione delle caratteristiche strutturali delle proteine coinvolte nella risposta degli organismi fotosintetici agli stress ambientali. Formulazione di alimenti funzionali ad azione anti-ipertensiva. Saggi in vivo per la determinazione dell'attività anti-ipertensiva. Import e processamento di trascritti di geni codificanti tRNA ed import delle molecole mature in mitocondri di piante.



Risultati attesi nell'anno

Pubblicazioni scientifiche su riviste nazionali e internazionali. Ricostituzione del complesso d'inizio della trascrizione mit. e analisi dei promotori. Informazioni sulla funzione del fattore mit. D-MTERF3 e su fattori nucleari che regolano l'espressione delle proteine della fam. MTERF in Drosophila. Associazione tra mutazioni e/o polimorf. nella regione di controllo del mtDNA e contenuto di mtDNA in pazienti italiani con diabete di tipo 2. Identif. di alterazioni qualitative e quantitative del proteoma mit. di fegato di ratto vecchio. Descrizione degli effetti di Lp(a)/r-apo(a) di differente dimensione sulla modulazione di attivatori e inibitori del sistema del plasmin(ogeno) in cellule nervose in vitro. Dimostrazione del travaso di plasminogeno e di suoi frammenti proteolitici in liquor di pazienti neurologici con danno della barriera ematoliquorale. Nazionalizzazione del brevetto PCT/EP/2006/007601. Determinazione delle proteine di R.sphaeroides coinvolte nell'adattamento. Identificazione nuovi IP di piante. Verificare l'editing per geni mt di A.nidus e se nel mtDNA sono codificati tRNA di origine cloroplastica. Rilevanza di regioni 5' e 3' UTR nella traduzione di mt-mRNA.

Potenziale impiego

- per processi produttivi

Alimenti funzionali, Purificazione, Sintesi, Proteine.

I biopeptidi ad azione anti-ipertensiva (coperti da brevetto) potranno essere utilizzati per la preparazione di alimenti funzionali.

- per risposte a bisogni individuali e collettivi

Gli interventi nutrizionali studiati potranno contribuire alla prevenzione dell'atrofia muscolare relativa a stati di immobilizzazione e invecchiamento. Gli studi di Lp(a) e molecole del sistema del plasmin(ogeno) nel CNS potranno consentire di sviluppare nuove terapie delle malattie neurologiche. L'identificazione di nuovi inibitori di proteasi potrà incrementare le difese delle piante contro gli attacchi degli insetti.

Moduli

Modulo: Biogenesi delle Membrane di Trasduzione dell'Energia.
Istituto esecutore: Istituto di biomembrane e bioenergetica
Luogo di svolgimento attività: Sede principale Istituto

Risorse commessa 2008

Pers. tempo ind/det	Funz.+ Invest.	Spese da Fonti Esterne	Spese per Infrastrutt. tecn.-scient a gestione accentrata	Totale	Risorse da esercizi precedenti	Massa Spendibile	Costi figurativi	Spese generali accentrate	Valore Effettivo
1	2	3	4	5=1+2+3+4	6	7=2+3+6	8	9	10=5+6+8+9
173	4	57	0	239	37	98	23	N.D.	299

valori in migliaia di euro

<i>Unità di personale di ruolo*</i>	
ricercatori	Totale
3	4

*equivalente tempo pieno

<i>Unità di personale non di ruolo</i>									
associato	dottorando	borsista	assegnista	specializzando	incaricato di ricerca	professore visitatore	collaboratore professionale	altro	Totale
4	0	0	0	0	0	0	0	0	4

<i>Richiesta nuove unità di personale</i>			
tempo determinato	tempo indet	non di ruolo*	Totale
0	3	3	6

*dottorati, borse di studio, assegni di ricerca



Plasticità genomica: dal genoma ai sistemi biologici

Dati generali

Progetto:	Funzione, regolazione ed evoluzione dei genomi eucariotici
Tipologia di ricerca:	Progetti relativi a linee tematiche a carattere strategico
Istituto esecutore:	Istituto di genetica e biofisica 'Adriano Buzzati Traverso'
Sede principale svolgimento:	Sede principale Istituto
Dip. di prevista afferenza:	Scienze della Vita
Responsabile indicato:	ALFREDO CICCODICOLA

Elenco dei partecipanti

	liv.		liv.		liv.
Aliperti Anna Maria	VII	Esposito Teresa	III	Noviello Ciro	V
Andone Silvia	V	Franco Alfredo	VII	Pellicano' Domenico	VIII
Baiano Salvatore	VII	Franze' Annamaria	III	Porzio Concetta	VII
Beato Antonio	IV	Fusco Ciro	IV	Prezioso Romeo	VI
Bellopede Annunziata	VII	Gianfrancesco Fernando	III	Ragosta Giuseppe	VII
Ciccodicola Alfredo	II	Grimaldi Giovanna	I	Rallo Claudia	VI
Cossu Simone	VI	Iaccarino Maria Rosaria	IV	Rocco Rosaria	VII
Cozzuto Luigi	VIII	La Volpe Adriana	II	Russo Alessandra	VII
D'Esposito Maurizio	II	Lauro Pasquale	VII	Sarracino Fabiana	VIII
De Falco Antonio	VI	Manna Filomena	V	Secondulfo Antonietta	VI
De Falco Vincenzo	VII	Miele Elia	VI	Sepe Gennaro	VII
De Luise Bruno	IV	Mignoli Emiliana	VII	Sicilia Giuseppina	VIII
Desideri Carmela	IV	Morelli Francesco	III	Torelli Raimondo	V
Di Giacomo Alfredo	VII	Moscatiello Francesco	VII	Tuorto Francesca	III
Di Giulio Massimo	III	Navarra Gerardo	VII	Vado Luciano	V
Esposito Bruno	IV				

Temi

Tematiche di ricerca

Le tematiche sviluppate attengono all'analisi dei genomi e all'identificazione di meccanismi molecolari che contribuiscono alla plasticità genomica e loro deregolazione in condizioni patologiche.

- Analisi della varietà genica e genetica di strutture e funzioni complesse.
- Analisi funzionale e comparativa intra- ed inter-genomi di famiglie e sequenze multigeniche.
- Studi di meccanismi molecolari che determinano condizioni patologiche monogeniche e/o multigeniche.
- Studi sul ruolo del epigenoma nei meccanismi di memoria ed identità cellulare.
- Studi sulla ricombinazione e riparo e ruolo nell'omeostasi cellulare.

Stato dell'arte

Il completamento del Genoma Umano e di organismi modello ha portato alla morte il vecchio assioma della Genetica 'un gene, una proteina'. E' apparso subito evidente che il numero previsto di oltre 150.000 geni calcolato sulla base della complessità genomica si è rivelato essere compreso tra 30.000-35.000; è implicito il ruolo rivestito dal processo di splicing.

Inoltre, il sequenziamento dei genomi ha fornito l'opportunità per predire la funzione di elementi regolatori conservati attivi in cis (conserved sequence tags; CST). Il confronto multiplo tra specie è un metodo efficiente per l'identificazione di elementi funzionali di regioni genomiche (footprinting filogenetico). L'analisi dei genomi ha anche messo in luce che la trasmissione del fenotipo non può essere descritta solo nei termini genetici classici di mutazioni e ricombinazioni, in quanto esistono anche meccanismi epigenomici indipendenti dalla sequenza del DNA. Lo studio di tutti questi meccanismi fornisce un nuovo strumento per l'analisi della relazione genotipo-fenotipo.



Azioni

Attività da svolgere

- Analisi dell'evoluzione del genoma in organismi modello, con particolare riguardo alle famiglie multigeniche.
- Caratterizzazione di trascritti, promotori e sequenze conservate non codificanti.
- Studio dei meccanismi di silenziamento genico e imprinting epigenomico, di splicing alternativo, di ricombinazione e riparazione omologa e conseguenti alterazioni di tali processi.
- Studi molecolari alla base di processi patogenetici e comprensione dei meccanismi di deregolazione genetica.
- Studio di networks molecolari e patterns di espressione nella determinazione e mantenimento dell'identità cellulare e di funzioni complesse.
- Studi sui geni evolutivamente conservati, e su geni coinvolti nella sensibilità al danno da agenti ICL e interazioni con checkpoint durante lo sviluppo.
- Studi di topologia nucleare, modulazione farmacologica in patologie genetiche.
- Diagnostica molecolare non invasiva in patologie genetiche.

Punti critici e azioni da svolgere

Reperimento di ulteriori fondi necessari al completo svolgimento delle ricerche pertinenti alla presente commessa.

Disponibilità di nuove unità di personale.

Competenze, tecnologie e tecniche di indagine

Competenze nel campo della biologia molecolare e cellulare, anche comprovata dalle numerose pubblicazioni dei ricercatori afferenti alla presente commessa. Tali competenze scientifiche riguardano:

- lo studio dell'espressione genica e della regolazione cellulare nei processi molecolari.
- L'analisi del mantenimento dell'inattivazione del cromosoma X a livello cromatinico.
- Studi di correlazione tra la metilazione del DNA e topologia nucleare in malattie genetiche umane.
- Diagnosi non invasiva di patologie genetiche tramite applicazioni della metilazione del DNA.
- Studi di genetica molecolare e citogenetica sui genomi eucariotici.
- L'analisi bioinformatica del genoma, del trascrittoma e del proteoma.
- L'analisi dei meccanismi molecolari di patologie genetiche.
- L'analisi di processi molecolari coinvolti nella trasformazione neoplastica.
- Analisi filogenetiche.

Strumentazione

Strumentazione di base in uso in laboratori di biologia molecolare e cellulare. In particolare le seguenti apparecchiature sono essenziali per lo svolgimento delle attività della presente commessa:

- Apparecchi per la PCR.
- Apparecchi per la Real Time PCR.
- Microscopi ottici per DNA FISH (localizzazione nucleare 3D) e RNA FISH (espressione genica).
- Sequenziatori automatici del DNA.
- Dispositivi per l'ibridazione di microarray e loro analisi.
- Servers locali e remoti; rete Lan e Wan su nodo GAR e computers dedicati ad analisi bioinformatiche.
- Locali per la stabulazione di animali modello.



Tecniche di indagine

Tecniche di indagine comunemente in uso in laboratori di biologia molecolare e cellulare. Particolari metodologie impiegate per lo svolgimento delle attività della presente commessa sono:

- Purificazioni di DNA, mRNA e sintesi di cDNA da batteri non patogeni, tessuti e linee cellulari.
- Clonaggio di frammenti genomici.
- Analisi dell'espressione genica.
- Immunoprecipitazione della cromatina.
- Analisi della metilazione del DNA a livello genomico.
- Analisi della localizzazione nucleare e dell'espressione allele specifica.
- Sequenziamento del DNA.
- Ibridazione in situ.
- Analisi di genotipizzazione e linkage.
- Analisi per l'identificazione di alterazioni genetiche.
- Analisi dell'espressione di specifiche sequenze geniche durante la progressione tumorale.
- Set-up di procedure bioinformatiche riguardanti l'analisi su larga scala di dati relativi a famiglie di sequenze nucleotidiche e proteiche.
- Set-up di procedure bioinformatiche per l'identificazione ed estrazione di informazioni da banche dati di sequenza e uso softwares per analisi di clusters filogenetici e fisici.
- Analisi filogenetiche, test statistici, comparazione di proteine, analisi evolutive.

Tecnologie

Le tecnologie che potrebbero essere impiegate per il conseguimento degli obiettivi della presente commessa, prevedono lo sviluppo di modelli animali o cellulari ricombinanti per l'analisi di patologie genetiche e terapie farmacologiche.

Collaborazioni (partner e committenti)

Le ricerche in oggetto sono frutto della collaborazione con:

- Divisione di Neurologia, Ospedale Civile di Verona.
- Ospedale San Giovanni di Roma.
- Unità di Neurologia Pediatrica del Dip. di Neuroscienze dell'Univ. 'Tor Vergata' di Roma.
- Istituto di Biochimica delle Proteine (CNR) di Napoli.
- Istituto TIGEM di Napoli.
- Università di Benevento.
- ITB, Sez. Bioinformatica e Genomica, CNR-Bari.
- Ospedale Cardarelli di Napoli.
- PRIMM sezione di Napoli.
- Dip. di Neuroscienze-Unità di Audiologia, Dip. di Medicina Clinica e Sperimentale, Univ. 'Federico II', Napoli.
- Ist. VIMM, Padova.
- IRCCS Burlo Garofolo, Trieste.
- IRCCS Neuromed-Unità di Neurogenetica, Pozzilli (IS).
- IRCCS G. Pascale, Napoli.
- Azienda ospedaliera ASLSA1 e ASLSA3.
- Univ. of North Carolina, Durham, NC, USA.
- Griffith Univ. Dep. of Health Science, Gold Coast, Australia.
- Dip. di Neurologia e Dip. di Patologia, Seconda Univ. di Napoli.
- Dep. of Molecular & Cellular Biology, Harvard Univ. Cambridge, MA, USA.
- MRC-Human Genetics Unit Edimburgo e Londra.
- Univ. Cattolica, Roma.
- Univ. of Warwick, UK.
- Institut Monod, France.
- Università di Padova.

Iniziativa per l'acquisizione di ulteriori entrate

Ciascun partecipante alla presente commessa ha presentato nel 2007 e presenterà durante il corso del 2008 proposte di finanziamento a agenzie nazionali ed estere per la prosecuzione delle attività della presente commessa.



Finalità

Obiettivi

- Analisi dell'evoluzione del genoma in organismi modello, con particolare riguardo alle famiglie multigeniche. Caratterizzazione di trascritti, promotori e sequenze conservate non codificanti (Alfredo Ciccodicola, Annamaria Franzè, Teresa Esposito, Fernando Gianfrancesco, Giovanna Grimaldi e Massimo DiGiulio).
- Studio dei meccanismi: di silenziamento genico e imprinting epigenomico, di splicing alternativo, di ricombinazione e riparazione omologa e conseguenti alterazioni di tali processi (Maurizio D'Esposito e Alfredo Ciccodicola).
- Studi molecolari alla base di processi patogenetici e comprensione dei meccanismi di deregolazione genetica (Alfredo Ciccodicola, Maurizio D'Esposito, Annamaria Franzè, Teresa Esposito, Fernando Gianfrancesco).
- Studio di networks molecolari e patterns di espressione nella determinazione e mantenimento dell'identità cellulare e di funzioni complesse (Francesco Morelli, Alfredo Ciccodicola e Maurizio D'Esposito).

Risultati attesi nell'anno

Publicazione dei risultati derivanti dalle attività della presente commessa su riviste scientifiche internazionali con Impact Factor e presentazione di dati in congressi nazionali ed internazionali.
Sviluppo di kit diagnostici e brevetti.

Potenziale impiego

- per processi produttivi

Il potenziale impiego delle attività di ricerca della presente commessa che potrebbero essere utilizzate in processi produttivi sono:

- Clonaggio di sequenze geniche per industrie biotecnologiche di interesse in campo biosanitario.
- Sviluppo di kit diagnostici e brevetti nel campo della diagnosi sia molecolare che predittiva.
- Sviluppo di plasmidi e/o virus ricombinanti per l'allestimento di terapie preventive per la cura di patologie genetiche e neoplasie.
- Sviluppo di protocolli per il trattamento farmacologico di patologie genetiche.

- per risposte a bisogni individuali e collettivi

Il potenziale impiego delle attività di ricerca della presente commessa che potrebbero essere utilizzate in risposta a bisogni individuali e/o collettivi sono:

- Clonaggio di sequenze geniche di interesse biosanitario.
- Sviluppo di kit diagnostici e brevetti nel campo della diagnosi sia molecolare che predittiva.
- Sviluppo di plasmidi e/o virus ricombinanti per l'allestimento di terapie preventive per la cura di patologie genetiche e neoplasie.
- Sviluppo di protocolli per il trattamento farmacologico di patologie genetiche.

Moduli

Modulo: Plasticità genomica: dal genoma ai sistemi biologici
Istituto esecutore: Istituto di genetica e biofisica 'Adriano Buzzati Traverso'
Luogo di svolgimento attività: Sede principale Istituto

Risorse commessa 2008

Pers. tempo ind/det	Funz.+ Invest.	Spese da Fonti Esterne	Spese per Infrastrutt. tecn.-scient a gestione accentrata	Totale	Risorse da esercizi precedenti	Massa Spendibile	Costi figurativi	Spese generali accentrate	Valore Effettivo
1	2	3	4	5=1+2+3+4	6	7=2+3+6	8	9	10=5+6+8+9
567	0	60	1	628	42	102	197	N.D.	867

valori in migliaia di euro

Unità di personale di ruolo*	
ricercatori	Totale
7	11

*equivalente tempo pieno



<i>Unità di personale non di ruolo</i>									
associato	dottorando	borsista	assegnista	specializzando	incaricato di ricerca	professore visitatore	collaboratore professionale	altro	Totale
1	0	2	1	0	1	0	2	2	9

<i>Richiesta nuove unità di personale</i>			
tempo determinato	tempo indet	non di ruolo*	Totale
0	8	0	8

*dottorati, borse di studio, assegni di ricerca



Variabilità del genoma ed alterazioni genetiche nell'uomo e loro impatto biologico

Dati generali

Progetto:	Funzione, regolazione ed evoluzione dei genomi eucariotici
Tipologia di ricerca:	Progetti relativi a linee tematiche a carattere strategico
Istituto esecutore:	Istituto di genetica e biofisica 'Adriano Buzzati Traverso'
Sede principale svolgimento:	Sede principale Istituto
Dip. di prevista afferenza:	Scienze della Vita
Responsabile indicato:	MATILDE URSINI

Elenco dei partecipanti

	liv.		liv.		liv.
Acampora Dario	II	Di Giulio Massimo	III	Noviello Ciro	V
Aliperti Anna Maria	VII	Esposito Bruno	IV	Pellicano' Domenico	VIII
Andone Silvia	V	Franco Alfredo	VII	Porzio Concetta	VII
Beato Antonio	IV	Fusco Ciro	IV	Ragosta Giuseppe	VII
Bellopede Annunziata	VII	Iaccarino Maria Rosaria	IV	Rallo Claudia	VI
Cavaliere Daniela	V	Lacerra Giuseppina	III	Rocco Rosaria	VII
Cermola Michele	V	Lauro Pasquale	VII	Russo Alessandra	VII
Cossu Simone	VI	Manna Filomena	V	Sarracino Fabiana	VIII
Cozzuto Luigi	VIII	Matarazzo Maria Rosaria	III	Secondulfo Antonietta	VI
De Angioletti Maria	III	Miano Maria Giuseppina	III	Sepe Gennaro	VII
De Falco Antonio	VI	Miele Elia	VI	Sicilia Giuseppina	VIII
De Falco Vincenzo	VII	Mignoli Emiliana	VII	Simeone Antonio	I
De Luise Bruno	IV	Moscatiello Francesco	VII	Torelli Raimondo	V
Desideri Carmela	IV	Musollino Gennaro	VI	Ursini Matilde	II
Di Giacomo Alfredo	VII	Navarra Gerardo	VII	Vado Luciano	V

Temi

Tematiche di ricerca

La finalità della presente commessa attiene alla identificazione delle alterazioni genomiche e/o della variabilità allelica di geni responsabili dei difetti ereditari dell'uomo già in studio nei gruppi afferenti a tale commessa. Obiettivo sarà quello di stabilire una diretta correlazione tra alterazione e funzione genica attraverso l'utilizzo combinato di diverse tecnologie innovative oltre che di strumenti informatici quali l'interrogazione di banche dati di più recente generazione.

Stato dell'arte

Nei laboratori afferenti alla presente commessa sono in corso studi numerose malattie genetiche monogeniche e multifattoriali.

Una vasta casistica è già stata raccolta per quel che riguarda le talassemie, le displasie ectodermiche (con particolare riguardo all'Incontinentia Pigmenti), ritardo mentale associato al cromosoma X, riarrangiamenti cromosomici dell'X, immunodeficienze X-linked, Sindrome autistica, Sindrome di Down, malattia di Alzheimer (AD) e malattia coronarica (CAD).

Azioni

Attività da svolgere

Combinazione di approcci di studio genomico, proteomico, biochimico-molecolare e morfo-strutturale in una sequenza operativa ben definita di analisi tra di loro strettamente correlate:

-analisi epidemiologica patologica per ampliare la casistica di soggetti affetti dalle patologie in studio nella commessa.

- analisi genetico-molecolare a livello germinale e somatico, mediante analisi mutazionale e citogenetica dei geni candidati coinvolti nelle patologie.

Identificazione delle alterazioni genomiche ed epigenomiche e della variabilità allelica di geni responsabili dei difetti ereditari elencati precedentemente, sviluppo di appropriati ed affidabili strumenti diagnostici, definizione dei network regolativi all'interno dei quali agisce il prodotto genico (analisi di trascritti e di trascrittomi); definizione di nuovi marcatori della variabilità fenotipica; Identificazione di bersagli terapeutici. Un ulteriore approccio metterà in correlazione la variabilità genetica con la suscettibilità all'azione di farmaci. Un punto critico consisterà nell'analisi e nella validazione di una grande quantità di dati prodotta per ciascuno dei disordini monogenici o complessi in studio nella commessa.



Punti critici e azioni da svolgere

Una migliore comprensione dei meccanismi molecolari alla base delle patologie genetiche in studio nella commessa sarà ottenuta dal confronto dei risultati provenienti dall'analisi di ogni singolo componente della sequenza operativa:

- Analisi proteomica e profili di espressione proteica
- Analisi trascrittomiche e profili di espressione di RNA
- Biologia cellulare ed analisi funzionale dei bersagli terapeutici

L'architettura di tale sequenza mira a creare un database integrato, nel quale vengono raccolte e correlate tutte le osservazioni analitiche ottenute nelle diverse fasi di studio: dati epidemiologici, clinico-patologici, genetici, molecolari, di espressione. Questa è la premessa per lo sviluppo di metodiche e kit diagnostici, prognostici e terapeutici per il trattamento delle patologie.

Competenze, tecnologie e tecniche di indagine

Strumentazione

Tecniche di indagine

Tecnologie

Collaborazioni (partner e committenti)

La commessa si avvale delle seguenti collaborazioni internazionali:

Hôpital Saint-Louis, Paris, France; University of Helsinki FINLAND ;NIA-NIH, Baltimore, USA e nazionali, tra cui si potranno identificare anche eventuali committenti con le Università italiane di Napoli, Modena, Benevento, Roma, Salerno, Potenza e con Divisione di Neurologia dell'Ospedale di Verona; Ospedale San Giovanni di Roma; Servizio di Talassemia, Catania.

Iniziativa per l'acquisizione di ulteriori entrate

Poiché l'impegno scientifico dell'intero gruppo costituito nell'ambito della Commessa è basato sia su ricerca di base che su ricerca applicata alla diagnostica (cosiddetta translational research) in ambito genetico, saranno ulteriormente sostenute le richieste di finanziamento da parte di istituzioni pubbliche (Ministero della Salute, Istituto Superiore di Sanità, Assessorati regionali) o private (Telethon, Associazione Italiana Ricerca sul Cancro, Fondazioni, Ditte operanti nel settore farmaceutico e/o biotecnologico).

Un punto di forza per sostenere con maggior vigore tali richieste è dato dal fatto che i laboratori della Commessa hanno a disposizione la strumentazione necessaria ed il personale specializzato adeguato (anche se precario) per svolgere le più comuni attività di biologia molecolare, biologia cellulare, analisi immunostochimica e citogenetica, analisi trascrittomiche e proteomiche.

Finalità

Obiettivi

Obiettivo principale della proposta è l'identificazione delle alterazioni genomiche e della variabilità allelica dei geni responsabili di difetti ereditari dell'uomo quali: le talassemie, le displasie ectodermiche, in particolare l'Incontinentia Pigmenti, ed altre patologie X-linked.

Si stabiliranno nuovi metodi di indagine molecolare e s'indagheranno le diverse correlazioni regolative allo scopo di stabilire la relazione causa-effetto tra alterazioni patologiche e processi cellulari implicati.

Risultati attesi nell'anno

- Ampliamento della genoteca di DNA/RNA da campioni ematici ed istopatologici dei pazienti affetti dalle varie patologie genetiche in studio nella commessa
- Ulteriore preparazione di linee cellulari primarie da tali pazienti per le analisi proteomiche e funzionali
- Identificazione di mutazioni genetiche in geni noti e nuovi coinvolti nelle patologie genetiche elencate
- Definizione dei pattern di espressione genica a livello dei trascritti e delle proteine (profili biomolecolari) in cellule sane e alterate
- Studi su proteine bersaglio candidate al fine di definire nuovi protocolli per il riconoscimento molecolare e l'interazione con molecole a putativa attività farmacologica

Potenziale impiego

- per processi produttivi
- Sviluppo di kit diagnostici.



- per risposte a bisogni individuali e collettivi

Sviluppo di kit diagnostici nel campo della diagnosi sia molecolare che predittiva.

Moduli

Modulo: Variabilità del genoma ed alterazioni genetiche nell'uomo e loro impatto biologico -

Istituto esecutore: Istituto di genetica e biofisica 'Adriano Buzzati Traverso'

Luogo di svolgimento attività: Sede principale Istituto

Risorse commessa 2008

Pers. tempo ind/det	Funz.+ Invest.	Spese da Fonti Esterne	Spese per Infrastrutt. tecn.-scient a gestione accentrata	Totale	Risorse da esercizi precedenti	Massa Spendibile	Costi figurativi	Spese generali accentrate	Valore Effettivo
1	2	3	4	5=1+2+3+4	6	7=2+3+6	8	9	10=5+6+8+9
393	0	183	1	577	26	209	187	N.D.	790

valori in migliaia di euro

<i>Unità di personale di ruolo*</i>	
ricercatori	Totale
4	9

*equivalente tempo pieno

<i>Unità di personale non di ruolo</i>									
associato	dottorando	borsista	assegnista	specializzando	incaricato di ricerca	professore visitatore	collaboratore professionale	altro	Totale
0	2	0	1	0	3	0	1	0	7

<i>Richiesta nuove unità di personale</i>			
tempo determinato	tempo indet	non di ruolo*	Totale
4	6	4	14

*dottorati, borse di studio, assegni di ricerca



Regolazione dell'espressione genica e sua integrazione con la rete di segnalazione cellulare

Dati generali

Progetto:	Funzione, regolazione ed evoluzione dei genomi eucariotici
Tipologia di ricerca:	Progetti di sviluppo competenze
Istituto esecutore:	Istituto di biologia e patologia molecolari
Sede principale svolgimento:	Sede principale Istituto
Dip. di prevista afferenza:	Scienze della Vita
Responsabile indicato:	IDA RUBERTI

Temi

Tematiche di ricerca

La ricerca si inserisce nelle tematiche post-genomiche finalizzate alla decifrazione delle reti di regolazione implicate nei processi di differenziamento e sviluppo in organismi animali e vegetali, anche in risposta a stimoli ambientali.

Stato dell'arte

Gli studi di Genetica e Biologia Molecolare hanno chiarito i meccanismi di base della regolazione genica ed identificato singole vie di segnalazione nei processi di differenziamento e sviluppo. L'approccio genetico-molecolare non consente però di identificare reti di regolazione complesse ed indagarne i meccanismi di integrazione alla base dei processi di sviluppo e differenziamento degli eucarioti superiori. Tali problematiche possono essere ora affrontate attraverso le nuove tecnologie post-genomiche ed informatiche, avvalendosi anche di nuovi metodi computazionali per integrare vari livelli di informazione e costruire modelli predittivi.

Azioni

Attività da svolgere

Per il conseguimento degli obiettivi saranno condotte le seguenti attività:

- analisi di profili di espressione di RNA e proteine;
- identificazione e modellizzazione di reti complesse che regolano i processi di differenziamento e sviluppo in organismi animali e vegetali, anche in risposta a stimoli ambientali;
- studio della funzione di regolatori critici di reti complesse.

Punti critici e azioni da svolgere

Non si evidenziano punti critici significativi e le azioni appaiono fattibili sulla base delle competenze e delle collaborazioni già esistenti.

Per le analisi di espressione genica globale, i ricercatori hanno dovuto negli anni scorsi ricorrere a servizi esterni con costi molto elevati.

La realizzazione in loco di piattaforme post-genomiche determinerebbe la possibilità di abbattere significativamente i costi e di aumentare l'efficienza delle attività.

Si auspica che il CNR possa contribuire almeno in parte alla realizzazione di tali piattaforme.

Sarà proseguita l'attività di elaborazione e proposta di progetti di ricerca in ambito nazionale ed europeo.

Competenze, tecnologie e tecniche di indagine

Competenze di biologia molecolare, biologia cellulare, genomica funzionale ed informatica sono largamente rappresentate tra i ricercatori partecipanti.

Strumentazione

I ricercatori si avvalgono della strumentazione di base per studi di biologia molecolare, biologia cellulare, genomica funzionale ed informatica. Tra le attrezzature di particolare rilievo: camera P2 sterile per cellule animali, camera di crescita per le piante con sistema di illuminazione LED (Percival Model E30 Led Trichromatic), qPCR (Applied Biosystem 7000, Roche LightCycler 480), sistema automatico per la preparazione di piastre a 384 pozzetti (Tecan Freedom EVO® 75), sistema biolistico (BioRad), luminometro (Turner Design), microscopi DIC e fluorescenza (Zeiss), sistema per analisi di immagini (ProgRes C10plus Cooled Janoptiks), microscopio confocale (Leica).

Tecniche di indagine

Tecniche di indagine per l'analisi dell'espressione genica: micro-arrays, qPCR. Tecniche di indagine per l'analisi dell'espressione di proteine: Western blot, immunistoichimica, microscopia a fluorescenza e confocale. Tecniche di indagine per l'analisi della funzione genica: mutanti con perdita o guadagno di



funzione, vettori di espressione costitutiva e inducibile, RNA interference. Tecniche di indagine per l'analisi di interazioni proteina-proteina: two hybrid in lievito, phage display.

Tecnologie

Metodologie per l'analisi di dati post-genomici e la costruzione di modelli di reti regolative. Metodologie per la costruzione di linee cellulari e organismi animali e vegetali transgenici.

Collaborazioni (partner e committenti)

Saranno proseguite le numerose collaborazioni con Istituzioni universitarie ed Enti di Ricerca in Italia ed all'estero.

Iniziative per l'acquisizione di ulteriori entrate

Elaborazione di proposte di ricerca presentate a MUR, MAE, AIRC, Telethon, Commissione Europea

Finalità

Obiettivi

L'obiettivo è di decifrare la funzione dei geni nelle reti di regolazione complesse, con un approccio post-genomico in cellule e organismi animali e vegetali, in condizioni normali e patologiche

Risultati attesi nell'anno

L'attività di ricerca produrrà i seguenti risultati:

- linee cellulari e organismi transgenici per regolatori critici di processi di differenziamento e sviluppo in organismi animali e vegetali;
- nuovi profili di espressione globale;
- sviluppo di modelli di reti biologiche;
- pubblicazioni scientifiche su riviste internazionali.

Potenziale impiego

- per processi produttivi

Non si prevedono impieghi per processi produttivi

- per risposte a bisogni individuali e collettivi

La conoscenza delle reti di regolazione e delle loro interconnessioni in organismi animali e vegetali potrà essere utilizzata per i seguenti fini:

- sviluppo di nuove strategie terapeutiche per la distrofia muscolare di Duchenne, le neoplasie e le patologie del sistema nervoso;
- miglioramento genetico di piante coltivate;
- sviluppo di nuove strategie per la produzione di bioenergia.

Moduli

Modulo: Regolazione dell'espressione genica e sua integrazione con la rete di segnalazione cellulare

Istituto esecutore: Istituto di biologia e patologia molecolari

Luogo di svolgimento attività: Sede principale Istituto

Risorse commessa 2008

Pers. tempo ind/det	Funz.+ Invest.	Spese da Fonti Esterne	Spese per Infrastrutt. tecn.-scient a gestione accentrata	Totale	Risorse da esercizi precedenti	Massa Spendibile	Costi figurativi	Spese generali accentrate	Valore Effettivo
1	2	3	4	5=1+2+3+4	6	7=2+3+6	8	9	10=5+6+8+9
0	0	199	0	199	135	334	0	N.D.	334

valori in migliaia di euro

Unità di personale di ruolo*	
ricercatori	Totale
0	0

*equivalente tempo pieno



<i>Unità di personale non di ruolo</i>									
associato	dottorando	borsista	assegnista	specializzando	incaricato di ricerca	professore visitatore	collaboratore professionale	altro	Totale
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

<i>Richiesta nuove unità di personale</i>			
tempo determinato	tempo indet	non di ruolo*	Totale
0	0	0	0

*dottorati, borse di studio, assegni di ricerca



Meccanismi molecolari della plasticità genomica e loro deregolazione

Dati generali

Progetto:	Funzione, regolazione ed evoluzione dei genomi eucariotici
Tipologia di ricerca:	Progetti relativi a linee tematiche a carattere strategico
Istituto esecutore:	Istituto di genetica e biofisica 'Adriano Buzzati Traverso'
Sede principale svolgimento:	Sede principale Istituto
Dip. di prevista afferenza:	Scienze della Vita
Responsabile indicato:	MAURIZIO DESPOSITO

Temi

Tematiche di ricerca

Studio della componente genetica di malattie complesse, come la malattia di Alzheimer (AD), la malattia coronarica (CAD), l'autismo, e la sindrome di Down (DS) attraverso una indagine sulla variazione comune e rara di geni associati alle suddette patologie, mediante tecniche di screening a livello molecolare.

Stato dell'arte

La maggior parte delle malattie comuni sono disordini genetici complessi, alla cui suscettibilità contribuiscono molteplici componenti genetiche ed ambientali. E' stato proposto che la variazione genetica, sia a livello polimorfico che sub-polimorfico, possa influenzare la suscettibilità alle malattie comuni. Questa ipotesi è sempre di più verificata in numerosi studi di associazione tra variazione genetica e la variabilità nella suscettibilità alla malattia.

Azioni

Attività da svolgere

Punti critici e azioni da svolgere

Competenze, tecnologie e tecniche di indagine

Strumentazione

Tecniche di indagine

Tecnologie

Collaborazioni (partner e committenti)

Le ricerche in oggetto sono frutto della collaborazione con la Divisione di Neurologia dell'Ospedale Civile di Verona, per quanto riguarda la malattia di Alzheimer. Per la malattia coronarica ci si avvale di collaborazioni con l'ospedale San Giovanni di Roma e di strutture ospedaliere locali della zona del Cilento (Campania). L'Unità di Neurologia Pediatrica del Dipartimento di Neuroscienze dell'Università 'Tor Vergata' di Roma è coinvolta nell'indagine su autismo e sindrome di Down.

Iniziative per l'acquisizione di ulteriori entrate

Elaborazione di proposte di ricerca presentate a MUR, MAE, AIRC, Telethon, Commissione Europea

Finalità

Obiettivi

Obiettivo del presente progetto è di investigare la componente genetica di alcune malattie complesse attraverso lo studio della variazione comune e rara di geni associati alle suddette patologie, utilizzando tecniche di screening a livello molecolare. Questo allo scopo di verificare il ruolo effettivo dei geni 'candidati', anche al fine di valutare l'opportunità di interventi di tipo preventivo e terapeutico.



Risultati attesi nell'anno

Potenziale impiego

- per processi produttivi

- per risposte a bisogni individuali e collettivi

Moduli

Modulo: Basi molecolari ed impatto biologico della variabilità genetica e della plasticità genomica

Istituto esecutore: Istituto di biologia e patologia molecolari

Luogo di svolgimento attività: Sede principale Istituto

Risorse commessa 2008

Pers. tempo ind/det	Funz.+ Invest.	Spese da Fonti Esterne	Spese per Infrastrutt. tecn.-scient a gestione accentrata	Totale	Risorse da esercizi precedenti	Massa Spendibile	Costi figurativi	Spese generali accentrate	Valore Effettivo
1	2	3	4	5=1+2+3+4	6	7=2+3+6	8	9	10=5+6+8+9
0	5	0	0	5	0	5	0	N.D.	5

valori in migliaia di euro

<i>Unità di personale di ruolo*</i>	
ricercatori	Totale
0	0

*equivalente tempo pieno

<i>Unità di personale non di ruolo</i>									
associato	dottorando	borsista	assegnista	specializzando	incaricato di ricerca	professore visitatore	collaboratore professionale	altro	Totale
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

<i>Richiesta nuove unità di personale</i>			
tempo determinato	tempo indet	non di ruolo*	Totale
0	0	0	0

*dottorati, borse di studio, assegni di ricerca



Struttura, funzione e progettazione di proteine, acidi nucleici e loro complessi sopramolecolari



Interazione proteine-acidi nucleici ed organizzazione sopramolecolare della cromatina

Dati generali

Progetto:	Struttura, funzione e progettazione di proteine, acidi nucleici e loro complessi sopramolecolari
Tipologia di ricerca:	Progetti relativi a linee tematiche a carattere strategico
Istituto esecutore:	Istituto per lo studio delle macromolecole
Sede principale svolgimento:	Sede di Genova
Dip. di prevista afferenza:	Scienze della Vita
Responsabile indicato:	PATRIZIO ARRIGO

Elenco dei partecipanti

	liv.		liv.		liv.
Arrigo Patrizio	III	De Bernardi Roberta	IV	Mormino Michele	IV
Barbieri Paolo	VI	La Penna Giovanni	II	Perico Angelo	I

Temi

Tematiche di ricerca

Folding, misfolding e aggregazione di proteine;

Sviluppo ed applicazioni del metodo della massima entropia vincolata, in solventi impliciti per la descrizione della statistica di biopolimeri;

Determinazione chimico fisica sperimentale e teorico-modellistico della struttura e della dinamica della cromatina a diversa forza ionica;

Analisi delle funzioni ed interazioni dei geni coinvolti nelle cardiopatie e nelle malattie neurodegenerative.

Stato dell'arte

La ricerca in questa commessa si colloca sui temi strategici principali della postgenomica che riguardano la comprensione della funzione biologica di peptidi, proteine, DNA e complessi sopramolecolari di proteine-DNA. Nelle scienze della vita uno dei punti di maggiore interesse è oggi la comprensione dei meccanismi molecolari responsabili delle malattie multifattoriali, come le malattie cardiovascolari e tumorali, neurodegenerative, attribuibili a cambiamenti conformazionali di peptidi e proteine dipendenti dalle condizioni ambientali che possono portare ad aggregazione amiloidee ed a malattie come l'Alzheimer, il Parkinson e le malattie prioniche. Altro importante tema è relativo alla comprensione strutturale e funzionale dell'organizzazione della cromatina nel nucleo degli eucarioti e quindi dei meccanismi dell'apertura e chiusura del materiale genetico, del silenziamento genico, dell'apoptosi cellulare e dell'insorgenza e diffusione della modificazione tumorale.

Azioni

Attività da svolgere

Interazioni proteine-DNA: il modello elettrostatico da noi proposto e simulazioni dell'interazione DNA operon O1-O3 lac repressor (LAC-I) verranno usati per spiegare la regolazione dell'espressione genica di Lac-I; saranno estesi i modelli coarse-grained della struttura, anche di ordine superiore, della cromatina; nell'ambito di nuove ricerche su materiali bioispirati saranno studiate le interazioni DNA nanoparticelle(NP) e polimeri-NP.

Aggregazione: saranno conclusi gli studi sperimentali e modellistici sulla cinetica di aggregazione di diversi peptidi beta-amiloidei evidenziando la correlazione tra cinetiche e Alzheimer; sarà sviluppato un modello dell'energia libera di peptidi per la determinazione della propensione a formare domini secondari specifici; sarà studiata l'interazione tra Zn^{+2} e Cu^{+2} con il frammento 1-16 del peptide Ab(1-42).

Cardioworkbench: completamento dell'attività sperimentale di proteomica e selezione delle proteine sovraespresse nei pazienti cardiovascolari selezionati. Determinazione delle caratteristiche conformazionali delle sequenze genomiche e caratterizzazione bioinformatica delle sonde per RNA interference relative alle proteine selezionate.

Punti critici e azioni da svolgere

Il problema principale è la mancanza di turn-over che porterà la commessa alla fine del 2008 ad 1 ricercatore in ISMAC-GE, 1 ricercatore in ICCOM-FI più 1 amministrativo e tecnico: si noti che la commessa aveva complessivamente 9.5 persone nel 2004. Alla fine del 2008 potrà continuare una buona attività bioinformatica a Genova e una buona attività modellistica biologica a Firenze ma la commessa come tale non potrà che chiudere.



Competenze, tecnologie e tecniche di indagine

Le competenze presenti nella commessa sono ben articolate per gli scopi della commessa:

Teoria e modellistica: meccanica statistica e dinamica dei sistemi condensati, dei polimeri e di proteine e acidi nucleici; interazioni proteine acidi nucleici. Interazioni elettrostatiche tra polielettroliti mediate da controioni mono e multivalenti. Calcolo della cinetica delle transizioni conformazionali in biopolimeri ed aggregazione. Simulazioni di dinamica molecolare e di Monte Carlo atomistiche, effettive, canoniche e multicanoniche.

Bioinformatica: Reti Neurali Artificiali applicate all'analisi di biosequenze. Metodologie di Knowledge Discovery su banche dati eterogenee (di origine sperimentale e testuali).

Chimica fisica di sistemi macromolecolari biologici; analisi strutturale e morfologica mediante microscopia elettronica a trasmissione. Conformazione di peptidi e biopolimeri in funzione delle condizioni ambientali: transizioni conformazionali, aggregazione.

Strumentazione

Calcolo:

Cluster di 11 processori.

Spettroscopia:

- Spettrofotometro Lambda 2 UV/Vis Perkin Elmer.
- Spettrofotometro UV/Vis Varian 400 Bio Cary.
- Spettrofotometro FT-IR Bruker IFS 28.
- Spettrofluorimetro Perkin Elmer LS 50 B.
- Spettropolarimetro JASCO J-500 (CD).
- Sistema per misure cinetiche veloci con dicroismo circolare (stopped flow).

Microscopia:

- Microscopio elettronico a trasmissione (TEM) Zeiss Leo EM 900.
- Cannone elettronico Edwards.
- Ultramicrotomo Leica Ultracut UCT.
- Camera oscura per sviluppo di lastre TEM.
- Microscopio ottico Leica DM-RXP.

Varie:

- Sonicatore Labsonic U.
- Elettroforesi mono e bidimensionale.
- Camera fredda.

Tecniche di indagine

- 1) Laboratorio di estrazione, separazione, purificazione e caratterizzazione di molecole biologiche.
- 2) Metodologie di analisi al TEM. Immuno-elettromicroscopia: uso di anticorpi coniugati con particelle d'oro per l'identificazione di proteine in sezioni ultrasottili di campioni inglobati in resina. Metodologie per l'osservazione di molecole isolate (cromatina, DNA, proteine) mediante ombreggiatura o colorazione negativa con metalli pesanti; di materiale biologico mediante inglobamento in resina, taglio di sezioni ultrasottili e colorazione con metalli pesanti.
- 3) Analisi della composizione in struttura secondaria di proteine da misure CD mediante software dedicato.
- 4) Programmi propri per il calcolo della dinamica di macromolecole in soluzione nell'ambito della teoria diffusiva mode-coupling (MCD) da noi sviluppata per calcolo di viscoelasticità, rilassamento NMR e anisotropia di fluorescenza
- 5) Programmi propri per lo sviluppo di simulazioni vincolate a dati teorici o sperimentali col metodo della massima entropia. Dinamica molecolare, Simulazioni di Monte Carlo, Bioinformatica.

Tecnologie

Abbiamo sviluppato un sito web aperto al pubblico, biocomp.ge.ismac.cnr.it, per l'analisi di testi biomedici (apartire da PubMed) e per la ricerca di sequenze di DNA che governano la regolazione dell'espressione genica.

Collaborazioni (partner e committenti)

ISMAL-MI, CNR e CERM, Università Firenze: struttura e dinamica NMR; Dip. Fisica ed Institute for Molecular Sciences, Okazaki, Giappone: simulazioni multicanoniche; Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro (IST) GE: interazione cromatina-proteine regolatrici in cellule tumorali; Department of Chemistry, The University of Chicago: modelli per la cinetica di folding e misfolding di proteine. Dipartimento di Neuroscienze, Università di Genova; ICCOM, Firenze, CNR: malattie conformazionali. Laboratorio di chimica della coordinazione, CNRS, Tolosa(Francia): correlazione legame metallo-proteina. Dipartimento di informatica, sistemistica e telematica, Università di Genova: programma Cardioworkbench. Dipartimento di scienze della salute, Università di Genova: programma Cardioworkbench, RNA interference e proteomica



cardiovascolare. Istituto per le applicazioni del calcolo 'M. Picone', Roma, CNR: programma Cardioworkbench.

Iniziativa per l'acquisizione di ulteriori entrate

UE, VII programma quadro è stato presentato un progetto di piccola scala dal titolo 'Modelli per la relazione tra pressione ossidativa ed invecchiamento nel lievito', a cui partecipiamo come unità operativa CNR. Sarà valutato alla fine del 2007.

E' stato sottomesso un progetto PRIN su 'Studio della suscettibilità agli eventi cardio-cerebro-vascolari al fine della loro prevenzione. Analisi integrata, in relazione al genere, dell'interferenza tra metabolismo dell'ospite e microorganismi nella formazione della placca ateromastica' a cui partecipiamo come unità CNR.

E' stato sottomesso un progetto UE PQ-7 CARDIOPHARMAGEN su 'Pharmacogenomics and individual therapeutical concepts in the treatment of hischemic heart failure and its pitbulls', a cui partecipiamo come unità operativa CNR.

Finalità

Obiettivi

L'obiettivo è la comprensione della funzione biologica di peptidi, proteine, DNA/RNA e complessi sopramolecolari di proteine-DNA e proteine- RNA attraverso l'uso integrato di metodologie quali strutturistica e rilassamento NMR, microscopia elettronica, spettroscopie (UV, visibile, fluorescenza e CD), modellistica e bioinformatica. Si tratta, ad esempio, di spiegare i meccanismi alla base di patologie neurodegenerative (Alzheimer, Parkinson, malattie prioniche, amyotrophic lateral sclerosis) legate all'aggregazione di peptidi e proteine e di patologie multifattoriali, come nel caso delle malattie cardiovascolari e tumorali; i meccanismi dell'espressione o del silenziamento genico e della modificazione tumorale, governati dalle interazioni intermolecolari che generano il folding della catena polinucleosomiale nella cromatina nucleare.

Risultati attesi nell'anno

Ci si aspetta di portare a conclusione e sottomettere per la pubblicazione nel 2008:

- un lavoro generale sulla modellizzazione mediante calcolo dell'energia libera della propensità di vari peptidi a generare in opportune situazioni domini specifici in processi di conversione strutturale di proteine.
- un lavoro sull'interazione elettrostatica DNA nanoparticelle cationiche mediata dai controioni.
- un lavoro sui meccanismi di regolazione dell'espressione genica da parte del lac-repressor attraverso il wrapping-unwrapping del DNA su LAC-I.
- la conclusione degli studi sperimentali e modellistici di cinetica di aggregazione su differenti peptidi beta-amiloidei, dovrebbe portare a 2 lavori, quello teorico basato sulla teoria diffusiva, in collaborazione con K. Freed, Università di Chicago.
- un articolo sull'interazione tra Zn^{+2} e frammento Ab(1-16) del peptide Ab(1-42).
- due lavori: uno sui risultati dell'analisi integrata genomica-proteomica sul panel dei pazienti cardiovascolari; un' altro sulla analisi dell'effetto di farmaci sulla espressione di micro-rna coinvolti nella patologia cardiovascolare.

Potenziale impiego

- per processi produttivi

farmaci, terapia genica, antitumorali

- per risposte a bisogni individuali e collettivi

Questi studi rispondono alla necessità di comprendere e combattere malattie di grande rilevanza sociale come le malattie neurodegenerative cardiovascolari ed i tumori.

Moduli

Modulo:	Interazione proteine-acidi nucleici e farmacogenomica
Istituto esecutore:	Istituto per lo studio delle macromolecole
Luogo di svolgimento attività:	Sede di Genova

Modulo:	Aggregazione di proteine e struttura della cromatina
Istituto esecutore:	Istituto di chimica dei composti organo - metallici
Luogo di svolgimento attività:	Sede principale Istituto



Risorse commessa 2008

Pers. tempo ind/det	Funz.+ Invest.	Spese da Fonti Esterne	Spese per Infrastrutt. tecn.-scient a gestione accentrata	Totale	Risorse da esercizi precedenti	Massa Spendibile	Costi figurativi	Spese generali accentrate	Valore Effettivo
1	2	3	4	5=1+2+3+4	6	7=2+3+6	8	9	10=5+6+8+9
218	47	0	48	313	42	89	52	N.D.	407

valori in migliaia di euro

<i>Unità di personale di ruolo*</i>	
ricercatori	Totale
2	4

*equivalente tempo pieno

<i>Unità di personale non di ruolo</i>									
associato	dottorando	borsista	assegnista	specializzando	incaricato di ricerca	professore visitatore	collaboratore professionale	altro	Totale
0	0	0	7	0	0	0	0	0	7

<i>Richiesta nuove unità di personale</i>			
tempo determinato	tempo indet	non di ruolo*	Totale
4	4	4	12

*dottorati, borse di studio, assegni di ricerca



Applicazioni innovative di enzimi e biotrasformazioni

Dati generali

Progetto:	Struttura, funzione e progettazione di proteine, acidi nucleici e loro complessi sopramolecolari
Tipologia di ricerca:	Progetti di sviluppo competenze
Istituto esecutore:	Istituto di biochimica delle proteine
Sede principale svolgimento:	Sede principale Istituto
Dip. di prevista afferenza:	Scienze della Vita
Responsabile indicato:	MOSE' ROSSI

Elenco dei partecipanti

	liv.		liv.		liv.
Cannio Raffaele	III	Fiume Immacolata	VI	Palmieri Gianna	III
Capasso Antonio	II	Ionata Elena	III	Raia Carlo Antonio	II
Carrara Adriana	V	La Cara Francesco	II	Ruggiero Giuseppe	III
Del Rio Antonio	IV	Morana Alessandra	III		

Temi

Tematiche di ricerca

Questo progetto riguarda l'individuazione e l'utilizzo di nuove attività enzimatiche (isolate anche da organismi che vivono in ambienti estremi) per biotrasformazioni da impiegare in chimica fine, farmaceutica, diagnostica e nel comparto alimentare. Inoltre, la commessa intende sviluppare metodologie analitiche innovative di elevata sensibilità e facile utilizzo che consentono una precoce identificazione di analiti target di interesse sociale ed industriale.

Stato dell'arte

Gli enzimi accelerano enormemente le reazioni chimiche consentendo lo svolgimento delle funzioni vitali della cellula, pertanto essi rappresentano gli strumenti ideali da utilizzare in campo industriale in biotrasformazioni e diagnostica, sfruttando la loro estrema specificità ed efficienza. In questo contesto, l'individuazione di nuove attività enzimatiche e la messa a punto di nuove metodologie analitiche rappresentano la premessa essenziale per l'utilizzo di questi biocatalizzatori.

Azioni

Attività da svolgere

Le attività da svolgere sono la conseguente evoluzione delle attività del 2007 e riguardano essenzialmente l'approfondimento mediante analisi dei meccanismi di reazione dei vari enzimi in corso di studio (acilasi, chetoreductasi, glicosidasi e glicosintasi, xilosidasi, cellulasi, proteasi) per la messa a punto di nuovi protocolli. Saranno analizzate le sequenze dei geni codificanti per oligopeptide binding protein e tali proteine saranno prodotte in *E. coli*.

Si ricercheranno inibitori di proteasi in estremofili e proteine ed enzimi da utilizzare in metodologie analitiche innovative.

Più in generale, si continuerà il lavoro sulla individuazione, caratterizzazione e produzione di nuove attività enzimatiche da estremofili per biotrasformazioni industriali.

Punti critici e azioni da svolgere

I punti critici riguardano essenzialmente l'estensione delle collaborazioni industriali e l'ottenimento di nuovi finanziamenti per poter far fronte alle prospettive di ricerca con personale aggiuntivo.

Competenze, tecnologie e tecniche di indagine

Il personale afferente alla commessa ha comprovata competenza nel campo dell'enzimologia, la biochimica, la biologia molecolare e la biotecnologia molecolare e la biofisica. Tali competenze sono riconosciute a livello internazionale dalle pubblicazioni su riviste peer-reviewed e dal coinvolgimento in convegni nazionali ed internazionali.

Strumentazione

Tra le apparecchiature all'avanguardia disponibili nella commessa si annoverano: fluorimetro per esperimenti di fluorescenza statica, robot per micro e macro-array, spettrofotometri, spettrofluorimetri, spettropolarimetri, sistemi cromatografici FPLC ed HPLC, sequenziatori automatici di proteine, assorbimento atomico, spettrometro di massa SELDI, scintillatori, sistemi di acquisizione/analisi di immagini.



Tecniche di indagine

Le metodologie utilizzate per lo studio di applicazioni innovative di enzimi e proteine comprendono: tecniche di purificazione delle proteine, saggi enzimatici, mutagenesi sito-diretta e random, genomica e proteomica di procarioti ed eucarioti, immobilizzazione di biomolecole, chimica di superficie e nanodeposizioni per la preparazione di chip e nanochip.

Tecnologie

Le metodologie impiegate in questa commessa sull'identificazione mediante genomica e proteomica di biomolecole di possibile applicazione e sulla loro espressione in diversi organismi per uno scale-up produttivo. Le metodologie includono anche tecnologie di Labeling per la derivatizzazione di proteine ed anticorpi con sonde fluorescenti e tecnologie di chimica di superficie per la produzione di proteine immobilizzate e microchip.

Collaborazioni (partner e committenti)

Università di Napoli Federico II Istituto Elettronico Nazionale Galileo Ferraris, Torino. University of Maryland at Baltimore, USA. ICB-CNR. Università di York. Università di Ancona. Università di Milano. Istituto di Scienze dell'Alimentazione, CNR, Avellino. The Rowett Research Institute, Aberdeen, Scozia, UK. ACS DOBFAR s.p.a.

Iniziativa per l'acquisizione di ulteriori entrate

È stato presentato un progetto nell'ambito dei PRIN 2007.

Partecipazione ai bandi per il finanziamento nell'ambito del VII Programma Quadro della Unione Europea, nonché a quelli del Ministero della Università e Ricerca, PON e POR della Regione Campania e di altre agenzie nazionali ed internazionali.

Finalità

Obiettivi

Sviluppo di nuove metodologie per la determinazione di analiti di interesse sociale. Isolamento di nuovi enzimi per analisi proteomica di microrganismi estremofili ed anareobi del tratto intestinale ed orale. Sviluppo di nuove metodologie per la sintesi chemo-enzimatica di oligosaccaridi Sviluppo di nuove biotrasformazioni per la produzione di antibiotici

Risultati attesi nell'anno

Produzione degli enzimi e proteine di interesse e loro caratterizzazione strutturale e funzionale, nonché ottenimento di mutanti di interesse con differenti metodologie di ingegneria enzimatica.

Utilizzazione dei risultati per sperimentare nuove biotrasformazioni di interesse industriale.

Potenziale impiego

- per processi produttivi

- per risposte a bisogni individuali e collettivi

Moduli

Modulo: PROF. M. ROSSI: Applicazioni innovative di enzimi e biotrasformazioni

Istituto esecutore: Istituto di biochimica delle proteine

Luogo di svolgimento attività: Sede principale Istituto

Risorse commessa 2008

Pers. tempo ind/det	Funz.+ Invest.	Spese da Fonti Esterne	Spese per Infrastrutt. tecn.-scient a gestione accentrata	Totale	Risorse da esercizi precedenti	Massa Spendibile	Costi figurativi	Spese generali accentrate	Valore Effettivo
1	2	3	4	5=1+2+3+4	6	7=2+3+6	8	9	10=5+6+8+9
352	0	316	0	668	0	316	88	N.D.	756

valori in migliaia di euro



<i>Unità di personale di ruolo*</i>	
ricercatori	Totale
5	7

*equivalente tempo pieno

<i>Unità di personale non di ruolo</i>									
associato	dottorando	borsista	assegnista	specializzando	incaricato di ricerca	professore visitatore	collaboratore professionale	altro	Totale
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

<i>Richiesta nuove unità di personale</i>			
tempo determinato	tempo indet	non di ruolo*	Totale
0	0	0	0

*dottorati, borse di studio, assegni di ricerca



Utilizzo di sistemi procariotici per la progettazione di strutture proteiche e di acidi nucleici adatti alla formulazione di nuovi tipi di vaccini

Dati generali

Progetto:	Struttura, funzione e progettazione di proteine, acidi nucleici e loro complessi sopramolecolari
Tipologia di ricerca:	Progetti relativi a linee tematiche a carattere strategico
Istituto esecutore:	Istituto di biochimica delle proteine
Sede principale svolgimento:	Sede principale Istituto
Dip. di prevista afferenza:	Scienze della Vita
Responsabile indicato:	PIERGIUSEPPE DE BERARDINIS

Elenco dei partecipanti

	liv.		liv.		liv.
Balestrieri Marco	III	Coscia Maria Rosaria	III	Jesu Amedeo	IV
Ciardello Maria Antonietta	III	De Berardinis Piergiuseppe	II	Oreste Umberto	II

Temi

Tematiche di ricerca

Sviluppo di sistemi di veicolazione antigenica, basati sul batteriofago filamentoso fd e sulla proteina E2 del complesso multienzimatico della piruvato deidrogenasi di *B. Steraothermophilus*, da utilizzare per la formulazione di nuovi vaccini ricombinanti. Isolamento e produzione di antigeni e/o allergeni veicolati in conformazione nativa. Targeting di sottopopolazioni cellulari e di compartimenti intracellulari tramite inserimento di sequenze bersaglio nella proteina minore pIII del capsido di fd. Utilizzo del sistema fd per vaccinazione a DNA mediante modificazione del genoma fagico e inserimento di geni codificanti per antigeni noti sotto il controllo di promotori eucariotici. Utilizzo di un approccio immunichimico e di modellistica molecolare per la formulazione di sequenze nucleotidiche e proteiche ottimali, allo scopo di minimizzare divergenze tra le sequenze dei diversi isolati di patogeni presenti in banche dati e le sequenze da esprimere nei nostri costrutti.

Stato dell'arte

E' generalmente noto che nuove formulazioni vacciniche sono a tuttoggi necessarie sia per ottenere risposte immuni protettive nei confronti di molti patogeni sia per complementare le opzioni esistenti. Inoltre, le nuove strategie di vaccinazione prevedono stimolazioni ripetute che necessitano diversi sistemi di veicolazione antigenica. Idealmente un vaccino dovrebbe sia indurre una risposta immunitaria cellulare sia la produzione di anticorpi. Questi ultimi ed in particolare gli anticorpi protettivi il più delle volte sono rivolti contro epitopi conformazionali e per la loro induzione è necessario effettuare immunizzazioni con antigeni che conservano la struttura nativa. I sistemi di veicolazione fd ed E2 da noi descritti oltre ad essere innocui ed economicamente vantaggiosi sono estremamente efficaci nell'indurre una forte risposta immunitaria antigene-specifica sia in vitro che in vivo e si prestano ad ulteriore sviluppo.

Azioni

Attività da svolgere

Si valuterà l'immunogenicità dei nuovi costrutti fagici in grado di indirizzare direttamente gli antigeni alle cellule dendritiche. Si utilizzerà la tecnica del phage display per identificare peptidi in grado di legare cellule tumorali e veicolare particelle fagiche ingegnerizzate con cassette di espressione eucariotica. Inoltre si valuterà la capacità di complessi E2 esprimenti proteine o mimotopi di HIV-1 di indurre anticorpi anti-virus neutralizzanti.

Proseguirà lo studio dell'allergoma del frutto di kiwi allo scopo di isolare e caratterizzare altri allergeni ed eventualmente inserirli nell'elenco delle proteine fornite alla VBC-Genomics. Proseguirà lo studio del peptide kissper.

Punti critici e azioni da svolgere

Mancano certezze su risorse umane e finanziarie per programmazione a medio e lungo termine. Aspetti molto interessanti del progetto dovranno essere trascurati per mancanza di risorse.

Competenze, tecnologie e tecniche di indagine

Le competenze possedute dai partecipanti alla commessa includono Immunologia, Biochimica, Biologia Strutturale e Biologia Molecolare.



Strumentazione

Nell'Istituto e nei laboratori proponenti la presente commessa vi sono le attrezzature per svolgere esperimenti di Biochimica, Biologia Molecolare, Immunologia Molecolare e stanze attrezzate per studi di Immunologia Cellulare. Disponiamo inoltre di: Citofluorimetro; Biacore; Bioreattore per crescite massive; Spettrometro di massa; servizio per sequenziamento di proteine. Nell'area di ricerca in cui è situato l'Istituto sono presenti ed accessibili: un servizio di sequenziamento di DNA e uno stabulario.

Tecniche di indagine

Si effettueranno studi di immunogenicità ed antigenicità sia in vitro che in modelli animali. Studi di microscopia elettronica serviranno ad analizzare la struttura dei complessi E2. Infine ci si avvarrà di un approccio immunochimico per definire il livello atomico delle strutture da noi generate.

Tecnologie

Il sistema fd si basa su una modificazione della tecnologia nota come 'phage display' e consiste nell'inserzione di determinanti antigenici nella regione N-terminale della proteina maggiore del capsido di virioni batteriofagici fd. Mentre la proteina E2 di *B. Stereothermophilus* si assembla in trimeri che a loro volta si aggregano a formare un complesso costituito da 60 monomeri con una struttura costituita da un core pentagonale dodecaedrico di 1.5MDa a simmetria icosaedrica. Il sistema E2 ricombinante può esporre pertanto fino a 60 copie di antigeni multipli alla superficie dello scaffold formato dalla proteina E2.

Collaborazioni (partner e committenti)

Collaborazioni: G. Scala, Università della Magna Grecia, Catanzaro; R. De Palma, II Università di Napoli; N. Doria-Rose e N. Haigwood, Seattle Biomedical Research Institute, USA; M. Rescigno Istituto europeo di Oncologia, Milano; G. Casorati, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano.

Committenti: MIUR; NIH, USA.

Iniziative per l'acquisizione di ulteriori entrate

Sono stati presentati due progetti PRIN

Finalità

Obiettivi

Costruzione di nuovi vettori in grado sia di consentire l'espressione contemporanea di antigeni o proteine bersaglio sulle proteine capsidiche pVIII e pIII, sia contenenti geni di patogeni sotto il controllo di un promotore eucariotico. Tali particelle estremamente versatili saranno utilizzabili anche per vaccinazioni a DNA e per essere specificamente veicolate in specifiche popolazioni cellulari e/o in specifici compartimenti intracellulari. Espressione nello 'scaffold' icosaedrico E2 di proteine intere di microorganismi patogeni e/o di allergeni. Valutazione di struttura, antigenicità ed immunogenicità.

Risultati attesi nell'anno

Pubblicazioni su riviste internazionali

Potenziale impiego

- per processi produttivi

Formulazione di nuovi vaccini ricombinanti. Veicolazione intracellulare di acidi nucleici per trascrizione e traduzione di sequenze proteiche di interesse.

- per risposte a bisogni individuali e collettivi

Diagnostico: utilizzo dei costrutti fd e/o E2 come sistemi di 'antigen display' per identificazione di anticorpi ad attività neutralizzante e popolazioni cellulari coinvolte nella patogenesi di malattie.



Moduli

Modulo: DR. DE BERARDINIS: SV.P03.006
Istituto esecutore: Istituto di biochimica delle proteine
Luogo di svolgimento attività: Sede principale Istituto

Risorse commessa 2008

Pers. tempo ind/det	Funz.+ Invest.	Spese da Fonti Esterne	Spese per Infrastrutt. tecn-scient a gestione accentrata	Totale	Risorse da esercizi precedenti	Massa Spendibile	Costi figurativi	Spese generali accentrate	Valore Effettivo
1	2	3	4	5=1+2+3+4	6	7=2+3+6	8	9	10=5+6+8+9
128	0	64	0	192	0	64	75	N.D.	267

valori in migliaia di euro

<i>Unità di personale di ruolo*</i>	
ricercatori	Totale
2	2

*equivalente tempo pieno

<i>Unità di personale non di ruolo</i>									
associato	dottorando	borsista	assegnista	specializzando	incaricato di ricerca	professore visitatore	collaboratore professionale	altro	Totale
0	1	0	3	0	0	0	0	0	4

<i>Richiesta nuove unità di personale</i>			
tempo determinato	tempo indet	non di ruolo*	Totale
0	0	0	0

*dottorati, borse di studio, assegni di ricerca



Studio del Rapporto Struttura-Funzione e progettazione di Enzimi e Proteine

Dati generali

Progetto:	Struttura, funzione e progettazione di proteine, acidi nucleici e loro complessi sopramolecolari
Tipologia di ricerca:	Progetti relativi a linee tematiche a carattere strategico
Istituto esecutore:	Istituto di biochimica delle proteine
Sede principale svolgimento:	Sede principale Istituto
Dip. di prevista afferenza:	Scienze della Vita
Responsabile indicato:	MARCO MORACCI

Elenco dei partecipanti

Camardella Laura	liv. II	D'Avino Rossana	liv. II	Moracci Marco	liv. II
Capasso Clemente	liv. III	Jesu Amedeo	liv. IV	Morana Alessandra	liv. III
Cobucci Ponzano Beatrice	liv. III	La Cara Francesco	liv. II	Tamburrini Maurizio	liv. II
D'Auria Sabato	liv. II	Maurelli Luisa	liv. VII		

Temi

Tematiche di ricerca

Caratterizzazione dei meccanismi di reazione e del substrate-binding di idrolasi e ossidasi. Caratterizzazione di glicosiltrasferasi, di proteine metal-, glucose-binding e allergeniche. Caratterizzazione di idrolasi, ossidasi, depolimerasi specifiche per lo sviluppo di sistemi di bioconversione e biodegradazione. Sviluppo di nuovi sistemi di veicolazione antigenica basati su sistemi di espressione proteica innovativi. Progettazione di nuovi enzimi. Studio di enzimi del sistema endocannabinoide.

Stato dell'arte

Il sequenziamento dei genomi di molti organismi tra cui l'uomo, permette di accedere ad un gran numero di informazioni sull'organizzazione dei geni. Tuttavia tali informazioni sono incomplete senza lo studio dei loro prodotti genici, le proteine, di cui gli enzimi rappresentano una classe importante. Quindi, la biochimica delle proteine e l'enzimologia avranno un ruolo chiave nella ricerca scientifica e tecnologica dei prossimi anni, permettendo di assegnare la funzione biologica ai geni.

Azioni

Attività da svolgere

Screening di microrganismi (iper)termofili per la ricerca di nuove attività glicosil-idrolasiche coinvolte nella degradazione di oligo- e polisaccaridi. Caratterizzazione del meccanismo di reazione di glicosidasi termofile. Progettazione e caratterizzazione di nuove glicosintasi. Identificazione di geni interrotti in archaea. Caratterizzazione strutturale di una maltose-binding protein. Studio della struttura in soluzione del peptide di 4 kDa kissper, derivante dal processamento della kiwellina, per CD e/o NMR in varie condizioni. Purificazione di due isoforme di aspartico proteasi dallo stomaco dell'osteitro Trematomus bernacchii. Introduzione di cDNA codificante per il collagene in cellule eucariotiche (COS-7). Purificazione e caratterizzazione della invertasi vacuolare da pomodoro e costruzione del suo modello molecolare. Caratterizzazione dell'inibitore della PME di kiwi e studi di folding.

Punti critici e azioni da svolgere

E' auspicabile l'acquisizione di finanziamenti da parte dell'Ente realmente destinabili all'attività di ricerca, nonché la stabilizzazione di personale precario.

Competenze, tecnologie e tecniche di indagine

Il personale afferente alla commessa ha comprovata competenza nel campo dell'enzimologia, la biochimica, la biologia molecolare e la biotecnologia molecolare. Tali competenze sono riconosciute a livello internazionale dalle pubblicazioni su riviste peer-reviewed e dal coinvolgimento in convegni nazionali ed internazionali.



Strumentazione

La commessa dispone di apparecchiature all'avanguardia per lo svolgimento delle ricerche descritte. Tra esse: spettrofotometri, spettrofluorimetri, spettropolarimetri, sistemi cromatografici FPLC ed HPLC, Biacore per misure di risonanza plasmonica superficiale, PCR real time, sequenziatori automatici di proteine, assorbimento atomico, spettrometro di massa SELDI, scintillatori, sistemi di acquisizione/analisi di immagini.

Tecniche di indagine

Le metodologie utilizzate per lo studio del rapporto struttura/funzione di enzimi e proteine comprendono: tecniche di purificazione delle proteine, saggi enzimatici, mutagenesi sito-diretta e random, genomica e proteomica di procarioti ed eucarioti, modelling molecolare, immobilizzazione di enzimi e proteine.

Tecnologie

Le metodologie impiegate in questa commessa si basano su analisi di strutture tridimensionali di enzimi e proteine per la comprensione dei meccanismi di catalisi e di riconoscimento di ligandi. Tali metodologie sono supportate da modelling molecolari per la preparazione di mutanti utili a migliorare le prestazioni dei catalizzatori.

Collaborazioni (partner e committenti)

S. Bartolucci, E. Ricca Università di Napoli Federico II; M. De Rosa Seconda Università di Napoli; A. Trincone Istituto Chimica Biomolecolare- CNR; G. Davies University of York (UK); PST Sicilia; F. Ancona Università di Ancona; M. Bolognesi Università di Genova.

Iniziative per l'acquisizione di ulteriori entrate

Sono stati presentati progetti al MUR (PRIN 2007), all'Agenzia Spaziale Italiana, alla Regione Campania, alla Comunità Europea (FP7) e ad industrie internazionali. Nel 2008 verrà valutata la possibilità di applicare ulteriori progetti a queste e ad altre agenzie nazionali ed internazionali ed ad industrie nazionali ed internazionali.

Finalità

Obiettivi

L'obiettivo generale di questa commessa è lo studio del rapporto struttura/funzione di alcune proteine ed enzimi che permetterà di chiarirne le caratteristiche biofisiche i meccanismi di azione, le specificità ed il ruolo fisiologico. Queste informazioni costituiranno la premessa indispensabile per consentire diverse applicazioni (sintesi enzimatica, bioconversioni, diagnostica, vaccini, etc.). Le competenze, includono biochimica, enzimologia, biologia molecolare, biofisica, immunologia.

Risultati attesi nell'anno

Caratterizzazione di attività glicosidasiche termofile. Messa a punto delle condizioni di crescita ottimali di microrganismi termofili per la produzione di cellulasi. Produzione di nuovi mutanti in grado di sintetizzare oligosaccaridi. Identificazione di meccanismi di espressione di geni interrotti. Struttura in soluzione del peptide kissper. Caratterizzazione delle isoforme native di pepsina di pesce. Confronto delle proprietà biochimiche delle isoforme native con gli isoenzimi ricombinanti. Produzione di fibroblasti con aumentata sintesi del collagene.

Potenziale impiego

- per processi produttivi

Biotrasformazioni, sintesi chemo-enzimatica, bioconversioni, diagnostica

- per risposte a bisogni individuali e collettivi

Le proteine e gli enzimi sono le biomolecole che attuano il disegno biologico custodito nei geni ed il loro studio permette di comprendere i meccanismi molecolari del funzionamento dei viventi. L'aumento di conoscenza porterà allo sviluppo di strumenti (farmaci, kit diagnostici, trasformazioni industriali) utili alla salute dell'uomo ed alla qualità della vita.



Moduli

Modulo: DR. MORACCI: Studio del Rapporto Struttura-Funzione e progettazione di Enzimi e Proteine
Istituto esecutore: Istituto di biochimica delle proteine
Luogo di svolgimento attività: Sede principale Istituto

Risorse commessa 2008

Pers. tempo ind/det	Funz.+ Invest.	Spese da Fonti Esterne	Spese per Infrastrutt. tecn.-scient a gestione accentrata	Totale	Risorse da esercizi precedenti	Massa Spendibile	Costi figurativi	Spese generali accentrate	Valore Effettivo
1	2	3	4	5=1+2+3+4	6	7=2+3+6	8	9	10=5+6+8+9
252	0	69	0	321	0	69	82	N.D.	403

valori in migliaia di euro

<i>Unità di personale di ruolo*</i>	
ricercatori	Totale
4	5

*equivalente tempo pieno

<i>Unità di personale non di ruolo</i>									
associato	dottorando	borsista	assegnista	specializzando	incaricato di ricerca	professore visitatore	collaboratore professionale	altro	Totale
0	0	0	1	0	0	0	0	0	1

<i>Richiesta nuove unità di personale</i>			
tempo determinato	tempo indet	non di ruolo*	Totale
0	0	0	0

*dottorati, borse di studio, assegni di ricerca



Sistemi bioenergetici di membrana: meccanismi funzionali e fisiopatologia.

Dati generali

Progetto:	Struttura, funzione e progettazione di proteine, acidi nucleici e loro complessi sopramolecolari
Tipologia di ricerca:	Progetti relativi a linee tematiche a carattere strategico
Istituto esecutore:	Istituto di biomembrane e bioenergetica
Sede principale svolgimento:	Sede principale Istituto
Dip. di prevista afferenza:	Scienze della Vita
Responsabile indicato:	SERGIO PAPA

Elenco dei partecipanti

	liv.		liv.		liv.
Altamura Nicola	II	Gaballo Antonio	III	Marzulli Domenico	III
Castaldo Rosa	V	Lippolis Rosa	III	Sgaramella Giuseppe	VI
Di Paola Marco	III				

Temi

Tematiche di ricerca

Analisi dei complessi respiratori e dell'ATPasi in mitocondri umani, animali e batteri. Bioenergetica di microrganismi di interesse industriale. Geni nucleari coinvolti nella biogenesi mitocondriale e nel nonsense-mediated mRNA decay. Bilancio delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) e loro effetti sui sistemi mitocondriali. Ruolo dei mitocondri nella cascata apoptotica. Genomica, proteomica e biochimica di geni candidati in malattie mitocondriali di interesse pediatrico e neurologico.

Stato dell'arte

L'analisi cristallografica, spettroscopica e biofisica dei sistemi di membrana trasduttori di energia fornisce nuovo know how per la definizione dei meccanismi molecolari dei sistemi di trasferimento di energia nelle membrane biologiche, settore nel quale IIBBE è particolarmente attivo. Avanzamenti di genomica e proteomica hanno rivelato un ruolo centrale dei mitocondri nella crescita, differenziamento e morte cellulare. La biogenesi e funzionalità dei sistemi della fosforilazione ossidativa risulta controllata dalla cascata dell'AMP ciclico. È aumentato il numero di patologie con un ruolo determinante dei mitocondri (malattie monogeniche) o complementare (malattie neurodegenerative e cardiovascolari). Dati recenti suggeriscono che il non sense mediated mRNA decay (NMD) agisce da sistema di sorveglianza di mRNA contenenti mutazioni nonsense e modula il turnover e la traduzione di mRNA normali. L'espressione e l'attività delle catene respiratorie batteriche dipendono dalle condizioni di crescita. La conoscenza del metabolismo primario è di fondamentale importanza ai fini del miglioramento dei processi biotecnologici.

Azioni

Attività da svolgere

Verranno studiati i processi di regolazione della biogenesi e funzione mitocondriale da parte dell'AMP ciclico. Si condurranno analisi strutturali e funzionali di complessi della catena respiratoria e ATP sintasi mitocondriali e batteriche. Verrà studiato il ruolo delle subunità costituenti l'ATP sintasi ectopica, presente sulla membrana plasmatica di alcune cellule eucariotiche. Analisi delle attività di Upf1p nella prevenzione della soppressione nonsense e nel NMD in contesti genetici nei quali potenziali chinasi di Upf1p sono inibite o eliminate.

Si studierà il ruolo dei ROS e della cardiolipina nelle alterazioni della bioenergetica mitocondriale in varie situazioni fisiopatologiche ed in diversi tessuti. Verrà studiato il ruolo dei mitocondri e dei ROS nel differenziamento cellulare. Si confronterà il sistema NADH/cito-c citosolico con altri sistemi navetta. Verranno condotte analisi genetico-molecolari e mutazionali in pazienti affetti da miopatie mitocondriali e/o di interesse pediatrico e neurologico. Verrà studiata la bioenergetica di batteri aerobi produttori di antibiotici al fine di implementare la produzione di molecole bioattive.

Punti critici e azioni da svolgere

PUNTI CRITICI: Esiguità della dotazione ordinaria. Necessità di incremento della dotazione per l'acquisto di grandi apparecchiature; rinnovo attrezzature di base; lungaggine degli atti amministrativi. Difficoltà ad intraprendere collaborazioni internazionali in assenza di risorse certe in tempi certi. Al fine di una reale partecipazione dei ricercatori C.N.R. alla formazione di dottorandi di ricerca nell'ambito delle convenzioni con l'Università, occorre la disponibilità di borse di dottorato. Incentivi per attrarre giovani ricercatori. **CONDIZIONI DI FATTIBILITÀ:** competenze scientifiche e tecnologiche offerte dai ricercatori CNR e



Universitari associati; disponibilità presso il Dipartimento Universitario ospitante di apparecchiature per analisi genomica e proteomica.

Competenze, tecnologie e tecniche di indagine

Competenze nel campo della Biologia cellulare, Biochimica, Biologia Molecolare e Genetica Molecolare con particolare riferimento a:

- Allestimento e mantenimento di colture di cellule umane, murine e di lievito (*Saccharomyces cerevisiae*).
- Allestimento e mantenimento di colture batteriche ad habitus unicellulare e miceliale.
- Bioenergetica e biogenesi mitocondriale.
- Studio dell'espressione genica in colture cellulari e batteriche.
- Caratterizzazione strutturale e funzionale dei sistemi OXPHOS mitocondriali e batterici.
- Proteomica e fosfoproteomica.
- Meccanismi di regolazione della via mitocondriale dell'apoptosi.
- Meccanismi di trasduzione del segnale.
- Analisi mutazionale di geni nucleari e mitocondriali.

Strumentazione

- Spettrofotometri
- Spettrofluorimetri
- Ossigrafo
- Incubatori per colture batteriche
- Cappe a flusso laminare per colture cellulari
- Incubatori CO₂
- Thermal Cycler per PCR e Real Time PCR
- Sequenziatore DNA
- Apparat per elettroforesi e trasferimento di proteine ed acidi nucleici
- Densitometro Bio-Rad
- Laboratorio attrezzato per esperimenti di ibridazione molecolare con sonde radioattive
- Scintillatore in fase liquida
- HPLC
- Microscopio ottico
- Microscopio a contrasto di fase
- Spettrometro di massa

Tecniche di indagine

Misure spettrofotofluorimetriche e potenziometriche su complessi respiratori mitocondriali e batterici.

Saggi di funzionalità mitocondriale (indice di controllo respiratorio, dosaggi di attività enzimatica, produzione di ROS, poro di transizione di permeabilità).

Trasfezione di cDNA.

Sequenziamento del DNA.

Analisi dell'espressione genica e della biosintesi delle proteine.

Northern Blotting, Western Blotting, Southern blotting.

Analisi dell'immagine.

Analisi quantitativa di trascritti in cellule eucariotiche e batteriche tramite real-time RT-PCR.

Spettrometria di massa.

Tecnologie

Manipolazione genetica di cellule umane in coltura (linee cellulari) mediante trasfezione. Manipolazione genetica di cellule di lievito.

Collaborazioni (partner e committenti)

Institute of Microbiology, Czech Academy of Sciences, Prague, Czech Republic

Northwestern Medical School, USA Dept of Cellular and Structural Biology, Health Science Center University of Texas, USA

Centre de Génétique Moléculaire, CNRS, France.

U.O. Medicina Molecolare, I.R.C.C.S. Ospedale pediatrico Bambini Gesù, Roma.

Div. Neurogenetica molecolare, Istituto Neurologico 'C. Besta', Milano.

Laboratori del Sincrotrone di Grenoble.

Sanofi Aventis.



Iniziative per l'acquisizione di ulteriori entrate

Proposte progettuali per partecipazione a programmi di ricerca nelle scienze biomediche e nel settore biotecnologico di interesse industriale in Italia, UE e altri paesi. Convenzioni con industrie nel campo della produzione di sostanze bioattive (antibiotici).

Finalità

Obiettivi

Chiarimento dei meccanismi catalitici dei complessi della fosforilazione ossidativa. Analisi genica e biochimica dei complessi respiratori in patologia umana. Contributo di geni nucleari nella regolazione dell'NMD e della biogenesi dei mitocondri. Caratterizzazione a livello biochimico e molecolare del sistema della fosforilazione ossidativa in microrganismi di interesse industriale. Strategie antiossidanti e protettive del danno cardiaco nella riperfusione post-ischemica. Interazioni funzionali proteine-fosfolipidi nei mitocondri. Impatto della cascata dell'AMP ciclico sul sistema della fosforilazione ossidativa. Chiarimento del ruolo di secondi messaggeri lipidici e della produzione di ROS ad essi associata nella via mitocondriale dell'apoptosi.

Risultati attesi nell'anno

Caratterizzazione strutturale e funzionale dei meccanismi molecolari della cooperatività allosterica nella ossidasi terminale ad eme e rame. Caratterizzazione genetico-molecolare di pazienti affetti da miopatie mitocondriali. Studio proteomico-biochimico e/o molecolare di aspetti metabolici correlati alla produzione di antibiotici in Attinomiceti di interesse industriale. Identificazione della(e) chinasi di Nam7p/Upf1p. Comprensione del ruolo della cardiolipina nelle alterazioni della bioenergetica mitocondriale indotte dall'invecchiamento del cervello. Definizione dei parametri energetici del trasporto elettronico NADH/cito-citosolico e loro impatto sull'apoptosi. Chiarimento del ruolo dei ROS nel differenziamento di monociti umani in cellule dendritiche. Comprensione del ruolo dell'ATP sintasi ectopica in cellule staminali, tessuti in fase di angiogenesi, cellule tumorali o cellule deplete del genoma mitocondriale. Impatto dell'AMP ciclico nell'import mitocondriale di subunità di complessi respiratori e ATP sintasi

Potenziale impiego

- per processi produttivi

Tra le numerose varietà di microrganismi aerobi, ve ne sono alcune, ad oggi poco caratterizzate, che producono sostanze bioreattive di potenziale interesse industriale e medico come antibiotici di nuova generazione. Il chiarimento della struttura, della catalisi redox e dei meccanismi di conversione e conservazione dell'energia da parte delle catene respiratorie di tali microrganismi, così come l'identificazione e la caratterizzazione dei geni codificanti i complessi della fosforilazione ossidativa, oltre a contribuire alla conoscenza di un processo vitale fondamentale, possono rappresentare un importante riferimento per l'individuazione di condizioni ottimali di crescita e/o produzione e per la selezione o creazione di ceppi alto-produttori di metaboliti di elevato interesse industriale. Lo sviluppo di sonde e nuove metodologie per la diagnostica molecolare di malattie genetiche neurologiche potrà essere strumentale per la proposta di progetto nazionale interdipartimenti CNR su Encefalomiopatie Mitocondriali.

- per risposte a bisogni individuali e collettivi

Le relazioni struttura/funzione dei complessi della fosforilazione ossidativa in condizioni fisio-patologiche, la biogenesi mitocondriale, il ruolo dei mitocondri nell'apoptosi, le interazioni funzionali proteine-fosfolipidi a livello mitocondriale sono aspetti di fondamentale importanza, non solo per la conoscenza di base, ma anche per lo sviluppo di sonde molecolari per una nuova strategia diagnostica ed approcci farmacologici per la prevenzione e la cura di patologie umane sia di tipo degenerativo che neoplastico. La possibilità di modulare l'NMD ha importanti implicazioni nel trattamento delle malattie ereditarie associate a mutazioni nonsense.



Moduli

Modulo: Sistemi bioenergetici di membrana: meccanismi funzionali e fisiopatologia.
Istituto esecutore: Istituto di biomembrane e bioenergetica
Luogo di svolgimento attività: Sede principale Istituto

Risorse commessa 2008

Pers. tempo ind/det	Funz.+ Invest.	Spese da Fonti Esterne	Spese per Infrastrutt. tecn.-scient a gestione accentrata	Totale	Risorse da esercizi precedenti	Massa Spendibile	Costi figurativi	Spese generali accentrate	Valore Effettivo
1	2	3	4	5=1+2+3+4	6	7=2+3+6	8	9	10=5+6+8+9
354	4	210	0	568	33	247	41	N.D.	642

valori in migliaia di euro

<i>Unità di personale di ruolo*</i>	
ricercatori	Totale
5	7

*equivalente tempo pieno

<i>Unità di personale non di ruolo</i>									
associato	dottorando	borsista	assegnista	specializzando	incaricato di ricerca	professore visitatore	collaboratore professionale	altro	Totale
4	0	0	0	0	0	0	0	0	4

<i>Richiesta nuove unità di personale</i>			
tempo determinato	tempo indet	non di ruolo*	Totale
0	5	1	6

*dottorati, borse di studio, assegni di ricerca



Biotechnologie Molecolari per la Progettazione di Vaccini Innovativi

Dati generali

Progetto:	Struttura, funzione e progettazione di proteine, acidi nucleici e loro complessi sopramolecolari
Tipologia di ricerca:	Progetti di sviluppo competenze
Istituto esecutore:	Istituto di biomedicina e immunologia molecolare 'Alberto Monroy'
Sede principale svolgimento:	Sede principale Istituto
Dip. di prevista afferenza:	Scienze della Vita
Responsabile indicato:	PAOLO COLOMBO

Elenco dei partecipanti

	liv.		liv.		liv.
Bonomolo Anna	III	Di Blasi Francesco	III	Scatassa Valentina	VII
Bonura Angela	III	Geraci Domenico	I	Spera Donatella	VII
Cavoli Francesca	VII	Parisi Pietrina	V	Tarantino Provvidenza	VII
Ciacco Mirella	III	Riccobono Daniela	VII	Turatto Rosa	VII
Colombo Paolo	III	Sanzone Sabrina	VII		

Temi

Tematiche di ricerca

Le malattie allergiche, caratterizzate da una predominante risposta immunitaria di tipo Th2 e dalla produzione di anticorpi IgE verso molecole comunemente presenti nell'ambiente, mostrano negli ultimi decenni una crescente prevalenza nei paesi a stile di vita occidentalizzato, attualmente stimabile intorno al 25-30%, che non può essere imputata soltanto al miglioramento delle procedure diagnostiche e della percezione del problema. Una molteplicità di fattori governa la complessa eziologia delle manifestazioni cliniche della atopia, sia al livello iniziale della sensibilizzazione allergica sia nel successivo instaurarsi di fenomeni infiammatori che, cronicizzando in assenza di opportuni approcci preventivi e terapeutici, possono portare a danni anche irreversibili. L'identificazione di questi fattori è fondamentale per il riconoscimento di individui a rischio e per il disegno di interventi sui fattori modificabili a scopo preventivo e terapeutico. Una delle ulteriori tematiche sviluppate dalla commessa riguarda la cura delle malattie indotte da agenti parassitari (Leishmania).

Stato dell'arte

L'immunoterapia specifica costituisce tuttora l'unico intervento in grado di modificare stabilmente ed in modo specifico la reattività immunologica dell'individuo allergico. L'individuazione degli allergeni, o più precisamente delle strutture allergeniche (epitopi) causali della patologia in esame, risulta di fondamentale importanza per l'applicazione di una corretta terapia specifica e per la formulazione di nuove molecole da utilizzare nelle terapie immunosoppressive del polline della Parietaria.

Azioni

Attività da svolgere

Nel corso del 2008 questa commessa si ripromette di approfondire: 1) il ruolo dell'immunità innata nella patogenesi della risposta allergica al polline di Parietaria allo scopo di definire nuovi protocolli di immunomodulazione. Verranno studiati i comportamenti immunologici degli allergeni contenuti nel polline di questa pianta e la loro capacità di attivare tipi cellulari diversi; 2) verrà espletato il progetto relativo al Network di Eccellenza GA2LEN (Work Package 2.6) di cui la commessa è co-responsabile; 3) Verrà proseguito lo studio dell'espressione genica delle nuove isoforme del fattore di trascrizione NF-kB allo scopo di identificare mRNA specifici attivati durante alcuni processi infiammatori; 4) in merito al progetto Leishmania infantum, visti i risultati preliminari di inoculazione in cavie, ci si propone un ulteriore approfondimento con l'utilizzo dei nuovi cloni attenuati nel gene dhfr-ts allo scopo di realizzare gradi di resistenza superiori o totali.



Punti critici e azioni da svolgere

I principali punti critici sono rappresentati da:

- 1) validazione dei sistemi animali per studi in vivo. Nella nostra Area della Ricerca non è presente uno stabulario pertanto tutti gli studi in vivo vengono svolti in collaborazione con altri Centri di Ricerca;
- 2) La strumentazione dell'Istituto è obsoleta e l'assenza di fondi di dotazione ordinaria non consentono l'ammodernamento degli stessi;
- 3) la carenza di personale di ruolo che viene sostituita da personale a contratto gravante sui fondi esterni della commessa depauperando le risorse finanziarie della stessa

Competenze, tecnologie e tecniche di indagine

Tecniche di Biologia Molecolare e Cellulare, purificazione di tipi cellulari mediante cell sorting, citofluorimetria a flusso.

Strumentazione

Laboratorio colture cellulari, citofluorimetro, termociclatori, sistemi di elettroforesi per acidi nucleici e proteine, sistemi cromatografici per la purificazione di proteine.

Tecniche di indagine

Produzione di allergeni ricombinanti per lo sviluppo di nuove forme di vaccini per la cura delle patologie allergiche. Studio dei meccanismi molecolari della risposta allergica mediante real-time PCR e secrezione di citochine. Identificazione di mutanti attenuati di *Leishmania* mediante esperimenti di knock-out genomico. Identificazione di nuovi partner proteici del fattore di trascrizione NFkB

Tecnologie

Collaborazioni (partner e committenti)

Collaborazioni con Istituzioni Italiane:

- 1) Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie e Immuno-mediate, Istituto Superiore di Sanita', Roma
- 2) Unita' Operativa di Allergologia ed Immunologia Clinica dell'Ospedale Civico di Palermo,
- 3) ENEA, Casaccia, Roma
- 4) Istituto Zooprofilattico di Sicilia, Palermo
- 5) Dipartimento di Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Università degli Studi di Palermo
- 6) Dipartimento di Zoologia Animale, Università degli Studi di Palermo

Collaborazioni con Istituzioni Straniere:

- 1) Università di Southampton, School of Medicine, Inghilterra,
- 2) Istituto di Patologia Sperimentale, Università Nazionale di Salta, Argentina.

Collaborazioni interdipartimentali

- 1) Istituto di Biofisica del Consiglio Nazionale delle Ricerche, sez. di Palermo,

Collaborazioni intradipartimentali:

Commessa ME.P07.002 (Epidemiologia delle Broncopneumopatie)

Iniziative per l'acquisizione di ulteriori entrate

Sono in corso contatti con industrie si settore per la concessione in licenza dei brevetti depositati.

Codesta commessa è stata inclusa nel Centro di Competenza Tecnologica Agro-industria e Agroalimentare (PON Ricerca Scientifica, Sviluppo Tecnologico, Alta formazione 2000-2006)

Finalità

Obiettivi

- 1) Caratterizzazione della reattività immunologica di forme ricombinanti di allergeni da pollini. Messa a punto di un sistema muri per studi pre-clinici
- 2) Caratterizzazione di ceppi attenuati di *Leishmania infantum* da utilizzare in protocolli di immunizzazione.

Risultati attesi nell'anno

La ricerca si propone i seguenti obiettivi: 1) Caratterizzazione biochimica e valutazione del rapporto tra attività allergenica e funzione biologica degli allergeni della *Parietaria judaica*; 2) Analisi dell'induzione della risposta anticorpale in ceppi murini immunizzati con mutanti attenuati del parassita *Leishmania infantum*; 3) Analisi del profilo d'espressione di una nuova isoforma di NF-kB in PBMC di soggetti sani ed analisi dell'attività trascrizionale su sequenze consensus specifiche di fattori di trascrizione.

Potenziale impiego

- per processi produttivi

Le strategie descritte in codesta commessa mirano alla formulazione di nuove formulazioni immuoterapeutiche per la diagnosi e la cura delle patologie allergiche e delle malattie indotte da agenti parassitari.



- per risposte a bisogni individuali e collettivi

I progressi nella conoscenza dei meccanismi cellulari e molecolari che sono alla base della patogenesi delle malattie allergiche consentono di delineare approcci integrati di immunodeviiazione, con i quali individuare modalità di vaccinazione profilattica o immunoterapeutica capaci di contrastare l'insorgenza o controllare la progressione delle patologie allergiche. L'immunoterapia specifica costituisce infatti tuttora l'unico intervento in grado di modificare stabilmente ed in modo specifico la reattività immunologica dell'individuo trattato verso gli allergeni responsabili, soprattutto quando le misure di eliminazione o riduzione degli allergeni sono inattuabili, come ad esempio per quasi tutti gli allergeni classificabili come "outdoor". In questa categoria rientrano gli allergeni che originano da sorgenti presenti nell'ambiente esterno (essenzialmente i pollini ed in misura minore alcune spore ed ife fungine). La produzione di ceppi attenuati di Leishmania per la produzione di vaccini

Moduli

Modulo: Biotecnologie Molecolari per la Progettazione di Vaccini Innovativi
Istituto esecutore: Istituto di biomedicina e immunologia molecolare 'Alberto Monroy'
Luogo di svolgimento attività: Sede principale Istituto

Modulo: Rapporto tra Immunità Innata ed Adattativa
Istituto esecutore: Istituto di biomedicina e immunologia molecolare 'Alberto Monroy'
Luogo di svolgimento attività: Sede principale Istituto

Risorse commessa 2008

Pers. tempo ind/det	Funz.+ Invest.	Spese da Fonti Esterne	Spese per Infrastrutt. tecn.-scient a gestione accentrata	Totale	Risorse da esercizi precedenti	Massa Spendibile	Costi figurativi	Spese generali accentrate	Valore Effettivo
1	2	3	4	5=1+2+3+4	6	7=2+3+6	8	9	10=5+6+8+9
231	34	0	71	336	0	34	35	N.D.	371

valori in migliaia di euro

<i>Unità di personale di ruolo*</i>	
ricercatori	Totale
4	5

*equivalente tempo pieno

<i>Unità di personale non di ruolo</i>									
associato	dottorando	borsista	assegnista	specializzando	incaricato di ricerca	professore visitatore	collaboratore professionale	altro	Totale
0	1	0	1	0	0	0	1	0	3

<i>Richiesta nuove unità di personale</i>			
tempo determinato	tempo indet	non di ruolo*	Totale
1	4	0	5

*dottorati, borse di studio, assegni di ricerca



Trasportatori mitocondriali: struttura e meccanismi funzionali

Dati generali

Progetto:	Struttura, funzione e progettazione di proteine, acidi nucleici e loro complessi sopramolecolari
Tipologia di ricerca:	Progetti relativi a linee tematiche a carattere strategico
Istituto esecutore:	Istituto di biomembrane e bioenergetica
Sede principale svolgimento:	Sede principale Istituto
Dip. di prevista afferenza:	Scienze della Vita
Responsabile indicato:	FERDINANDO PALMIERI

Elenco dei partecipanti

	liv.		liv.		liv.
Arrigoni Roberto	III	Lasorsa Francesco Massimo	III	Tonazzi Annamaria	III
Giangregorio Nicola	III				

Temi

Tematiche di ricerca

Analisi trascrittomica e proteomica dei trasportatori mitocondriali nel lievito, nelle piante e nell'uomo. Studi struttura-funzione dei trasportatori mitocondriali mediante mutagenesi sito diretta, modificazione chimica ed analisi spettroscopica. Analisi filogenetica e analisi molecolare dei carrier mitocondriali di *A.thaliana* ed altre specie vegetali. Modelli cellulari per lo studio dei ruoli fisiologici dei trasportatori mitocondriali. Studio di mutazioni correlate a patologie mitocondriali.

Stato dell'arte

La recente risoluzione della struttura cristallografica del carrier dell'ADP/ATP, quale primo membro della famiglia dei trasportatori mitocondriali di cui e' nota la struttura tridimensionale pone le premesse per lo studio della struttura e funzione dei trasportatori mitocondriali attraverso la ricostruzione tridimensionale degli altri trasportatori (homology modelling) e per realizzare simulazioni dinamiche. Negli ultimi 2 decenni sono state descritte molte malattie dovute a deficienza di uno specifico carrier mitocondriale come il carrier dell'ADP/ATP, della carnitina/acilcarnitina o dell'ornitina. Di alcune di queste malattie, per esempio la sindrome di Stanley (deficit di carrier della carnitina), sono descritte alcune alterazioni geniche responsabili della malattia. Più recentemente si sta facendo luce su ulteriori patologie collegate a alterazioni di trasportatori mitocondriali, come, nel 2005, sull'epilessia mioclonica correlata a difetti nel carrier mitocondriale del glutammato.

Azioni

Attività da svolgere

Analisi trascrittomica e proteomica dei trasportatori mitocondriali nel lievito e nell'uomo.

Si porteranno avanti studi volti a comprendere i rapporti struttura-funzione dei trasportatori mitocondriali mediante approccio mutagenetico e mediante modificazione chimica. I dati saranno interpretati in termini di topografia dinamica di alcuni domini proteici, in particolare dei carrier del chetoglutarato e della carnitina/acilcarnitina.

Analisi filogenetica e analisi molecolare dei carrier mitocondriali di *A.thaliana*.

Si metteranno appunto modelli cellulari per lo studio dei ruoli fisiologici dei trasportatori mitocondriali.

Si studieranno mutazioni correlate a patologie mitocondriali.

Punti critici e azioni da svolgere

Punti critici di maggiore rilevanza sono sia la difficoltà nel coinvolgere nuovi giovani ricercatori nelle attività di ricerca, data la scarsità di assegni e contratti a termine disponibili sia, eventualmente, di trattenerli definitivamente con contratti a tempo indeterminato. Inoltre la strumentazione esistente dovrebbe essere integrata con nuova strumentazione.



Competenze, tecnologie e tecniche di indagine

- Competenze nel campo della Biologia cellulare, Biochimica, Biologia Molecolare
- Espressione omologa ed eterologa di proteine
- Overespressione di proteine e silencing di geni mediante RNA interference
- Meccanismi di regolazione genica
- Determinazione quantitativa di metaboliti nella matrice mitocondriale
- Ricostituzione di proteine di membrana
- Allestimento e mantenimento di colture cellulari umane, vegetali e di lievito.
- Determinazione quantitativa dell'attività di enzimi citosolici e mitocondriali mediante spettrofluorimetria, luminometria, citofluorimetria e microscopia a fluorescenza.

Strumentazione

- Spettrofotometri
- Spettrofluorimetri
- citofluorimetro
- Ossigrafo
- Incubatori per colture batteriche
- Cappe a flusso laminare per colture cellulari
- Incubatori CO₂
- Thermal Cycler per PCR e Real Time PCR
- Sequenziatore DNA
- Apparat per elettroforesi e trasferimento di proteine ed acidi nucleici
- Densitometro Bio-Rad
- Scintillatore in fase liquida
- HPLC
- Microscopio ottico
- Microscopio a contrasto di fase
- Spettrometro di massa

Tecniche di indagine

- Ricostituzione di proteine di membrana in liposomi.
- Misure di attività di trasporto e di parametri cinetici di proteine di membrana ricostituite in proteoliposomi.
- Mutagenesi.
- Overespressione di proteine di membrana di mammifero e di arabidopsis thaliana in E.coli ed in S. cerevisiae.
- Analisi fenotipica di ceppi di lievito mutanti.
- Trasfezione di cDNA.
- Sequenziamento del DNA.
- Analisi dell'espressione genica e della biosintesi delle proteine.
- Northern Blotting, Western Blotting, Southern blotting.
- Analisi quantitativa di trascritti in cellule eucariotiche e batteriche tramite real-time RT-PCR.
- Determinazione di vitalità e proliferazione cellulare mediante citofluorimetria e luminometria.

Tecnologie

Generazione di linee transgeniche di piante per l'overespressione ed il silenziamento di geni codificanti per trasportatori di membrana tramite trasformazione mediata da *A.tumefaciens*.

Caratterizzazione fisiologica e metabolica delle linee transgeniche tramite determinazione del fenotipo e gas mass e dosaggi enzimatici.

Localizzazione tissutale tramite tecnologia GUS e localizzazione sub cellulare tramite tecnologia GFP.



Collaborazioni (partner e committenti)

- Prof. Ramon De Lucas (Facoltà di Farmacia di Alcala de Henares - Madrid, Spagna)
- Prof. Faustino Bisaccia (Università della Basilicata) Prof. Alessandro Desideri (Università di Tor Vergata - Roma)
- Prof. Cesare Indiveri (Università della Calabria)
- Dr. M. Hodges (Université de Paris Sud, Francia)
- Dr A. Fernie (Max Planck Institute Germania) Dr. Massimo Zeviani (Besta, Milano)
- Dr. E Kunji Medical Research Council, Dunn Human Nutrition Unit, Hills Road, Cambridge CB2 2XY, United Kingdom.
- Prof. J Walker Medical Research Council, Dunn Human Nutrition Unit, Hills Road, Cambridge CB2 2XY, United Kingdom.
- Dr. Robin Lachmann National Hospital for Neurology and Neurosurgery London UK

Iniziativa per l'acquisizione di ulteriori entrate

Si potranno prendere contatti con aziende del settore biotecnologico per il trasferimento delle competenze, acquisite mediante la ricerca di base, alle industrie che operano nel settore. Nell'ambito di queste attività alcuni dei processi biotecnologici messi a punto potrebbero essere oggetto di brevetti mirati all'acquisizione di nuove entrate finanziarie.

Finalità

Obiettivi

L'obiettivo primario è quello di approfondire sempre più le conoscenze dei meccanismi alla base del trasporto di metaboliti attraverso le membrane biologiche, con una particolare attenzione alla membrana mitocondriale, partendo da approcci sperimentali classici fino ad utilizzare le tecnologie più avanzate oggi a disposizione della ricerca. Allo scopo di raggiungere questo obiettivo si metteranno a punto e utilizzeranno modelli sperimentali, si studierà il metabolismo cellulare, il rapporto struttura/funzione di proteine di membrana, l'espressione genica di tali proteine.

Risultati attesi nell'anno

Pubblicazioni scientifiche su riviste nazionali e internazionali.

Studio del sito attivo e del meccanismo della traslocazione di carrier con particolare attenzione alla topologia dinamica di alcuni domini dei trasportatori.

Analisi quali/quantitativa della distribuzione tissutale di specifici trasportatori mitocondriali di mammiferi e studio degli elementi di regolazione trascrizionale. Sviluppo di nuovi sistemi (e.g. *Lactococcus lactis*, linee cellulari di mammifero) per l'over-espressione e la purificazione di trasportatori mitocondriali ricombinanti. Identificazione e caratterizzazione biochimica di trasportatori mitocondriali di *A. thaliana* mediante over-espressione eterologa, purificazione dei prodotti genici e ricostituzione funzionale nei liposomi. Analisi trascrittomica dei trasportatori mitocondriali in diversi tessuti in diverse condizioni fisiologiche/ambientali. Generazione di tools e modelli cellulari per la diagnostica molecolare. Analisi mutazionale e studi patogenetici di malattie ereditarie associate. Analisi di strutture tridimensionali di proteine di trasporto mediante modeling molecolare.

Potenziale impiego

- per processi produttivi

Le tecnologie biologiche messe a punto nello sviluppo delle attività di questa ricerca di base hanno una importante applicazione nel campo della salute umana in quanto permettono di valutare la presenza di geni alterati in cellule di organismi animali (fra cui l'uomo). Questa applicazione rappresenta un punto molto importante nella diagnostica delle malattie genetiche la cui causa è il funzionamento difettoso dei sistemi di trasporto di membrana studiati. L'applicazione industriale di questi processi potrebbe permettere in un futuro immediato di preparare kit diagnostici.

- per risposte a bisogni individuali e collettivi

La messa a punto di kit diagnostici potrà essere impiegata per screening di popolazione per la diagnosi precoce di malattie genetiche.



Moduli

Modulo: Trasportatori mitocondriali: struttura e meccanismi funzionali
Istituto esecutore: Istituto di biomembrane e bioenergetica
Luogo di svolgimento attività: Sede principale Istituto

Risorse commessa 2008

Pers. tempo ind/det	Funz.+ Invest.	Spese da Fonti Esterne	Spese per Infrastrutt. tecn-scient a gestione accentrata	Totale	Risorse da esercizi precedenti	Massa Spendibile	Costi figurativi	Spese generali accentrate	Valore Effettivo
1	2	3	4	5=1+2+3+4	6	7=2+3+6	8	9	10=5+6+8+9
178	4	9	0	191	27	40	26	N.D.	244

valori in migliaia di euro

<i>Unità di personale di ruolo*</i>	
ricercatori	Totale
4	4

*equivalente tempo pieno

<i>Unità di personale non di ruolo</i>									
associato	dottorando	borsista	assegnista	specializzando	incaricato di ricerca	professore visitatore	collaboratore professionale	altro	Totale
1	0	0	0	0	0	0	0	0	1

<i>Richiesta nuove unità di personale</i>			
tempo determinato	tempo indet	non di ruolo*	Totale
0	3	0	3

*dottorati, borse di studio, assegni di ricerca



Biologia strutturale: struttura-funzione, dinamica e riconoscimento in proteine

Dati generali

Progetto:	Struttura, funzione e progettazione di proteine, acidi nucleici e loro complessi sopramolecolari
Tipologia di ricerca:	Progetti relativi a linee tematiche a carattere strategico
Istituto esecutore:	Istituto di biologia e patologia molecolari
Sede principale svolgimento:	Sede principale Istituto
Dip. di prevista afferenza:	Scienze della Vita
Responsabile indicato:	EMILIA CHIANCONE

Elenco dei partecipanti

	liv.		liv.		liv.
Allegría Vanda	IV	Gianni Stefano	III	Peresempio Vincenzo	VI
Antolini Rachele	V	Giuffrè Alessandro	II	Pistolesi Gabriella	IV
Ballini Amleto	IV	Iani Paola	V	Savino Carmelinda	III
Colotti Gianni	III	Ilari Andrea	III	Tramonti Angela	III
Federici Marco	VI	Morea Veronica	III	Verzili Daniela	II
Foppoli Cesira	III				

Temí

Tematiche di ricerca

L'attività di ricerca mira ad approfondire le conoscenze su struttura e funzione di proteine modello coinvolte in processi biologici fondamentali, di interesse biomedico e/o biotecnologico, quali: risposta cellulare a stress ossidativo o nitrosativo (Dps, flavoproteine di tipo A, molecole antiossidanti, tirosinasi); trasduzione di segnali Ca-dipendenti (sorcina); trasporto e metabolismo di ossigeno e NO (emoglobine batteriche, citocromi c e ossidasi eme-rame, nitrito reductasi); peptidi antimicrobici; acido resistenza in batteri (sistema gad). Sarà pertanto determinata la struttura 3D e caratterizzato il meccanismo di azione di proteine coinvolte in tali processi. Saranno estesi gli studi su: processo detto di 'folding', che conduce le proteine ad assumere spontaneamente la struttura nativa, con la caratterizzazione di 'permutanti' di sequenza, sia per il loro significato fondamentale che per il numero crescente di patologie associate a eventi di 'misfolding'; 'maturazione' dei citocromi tramite analisi del complesso fra CcmH e CcmG; struttura 3D di enzimi redox da Schistosoma per valutare la possibilità di disegno razionale di farmaci e/o di determinanti antigenici per vaccini.

Stato dell'arte

Negli ultimi anni gli studi di struttura e funzione delle proteine, come tutta la ricerca biologica, hanno ricevuto un grande impulso dalla genomica e dalla possibilità di manipolare geni specifici modificando così la struttura delle proteine da essi codificate per studiarne l'effetto sulle proprietà funzionali. Poiché in tutte le macromolecole biologiche la 'forma codifica la funzione', per studiare la funzione proteica e la sua regolazione a livello molecolare è indispensabile definire i determinanti strutturali delle singole proprietà come capacità di catalizzare reazioni chimiche, legare o trasportare composti, interagire con altre proteine, acidi nucleici, peptidi o ioni, etc. L'insieme di queste conoscenze costituisce la base non solo per comprendere il ruolo fisiologico delle proteine, ma anche per progettare nuove molecole con proprietà desiderate.



Azioni

Attività da svolgere

L'attività proseguirà con particolare attenzione a:

- dinamica del processo di 'folding' in proteine ed in domini proteici modello. Considerato il numero sempre crescente di patologie riconducibili ad alterazioni di questi processi ('misfolding'), saranno studiati soprattutto intermedi chiave che possono indirizzare il processo di 'folding' verso forme non native, potenzialmente patogeniche.
- proteine e meccanismi di protezione dal danno prodotto da specie reattive dell'ossigeno (ROS) e dell'azoto (RNS) come le tirosinasi, le flavoproteine a doppio ferro di protozoi e batteri patogeni e le proteine Dps (DNA-binding proteins from starved cells). Le Dps rivestono interesse anche per la loro struttura a sfera cava, contenitore ideale per reazioni in ambienti dalle dimensioni controllate
- proteine coinvolte nella segnalazione mediata dal calcio, come sorcina (soluble resistance-related calcium-binding protein) che partecipa alla regolazione di diversi processi come la contrazione cardiaca e presenilina 2, proteina cerebrale coinvolta nell'insorgere dell'Alzheimer giovanile.
- peptidi antimicrobici della risposta immunitaria
- sistemi di acido resistenza in batteri (sistema gad)

Punti critici e azioni da svolgere

I punti critici principali, ai quali sono direttamente collegate le azioni da svolgere, riguardano da un lato il reclutamento di giovani ricercatori, dall'altro la scarsità di fondi istituzionali che si riflette anche nel mancato rinnovamento della strumentazione obsoleta o non più funzionante.

Competenze, tecnologie e tecniche di indagine

La ricerca presuppone competenze scientifiche e tecnico-metodologiche complementari e l'utilizzo di strumentazione avanzata per la caratterizzazione chimico-fisica di proteine. Il personale CNR coinvolto si avvale anche di competenze ed attrezzature disponibili presso il Dipartimento di Scienze Biochimiche dell'Università di Roma 'La Sapienza', che ospita la Sede dell'IBPM.

Il personale ha competenze ed esperienza pluriennali e qualificate nello studio della struttura e funzione di proteine, studio affrontato con metodologie e tecniche avanzate proprie della biologia molecolare, della biologia strutturale (cristallografia a raggi X e spettroscopie di assorbimento, dicroismo circolare, fluorescenza, infrarosso) e della biochimica.

Strumentazione

Le principali apparecchiature sono costituite da:

- Ultracentrifuga analitica Beckman Optima-XLI
- Apparecchi di mescolamento rapido a flusso interrotto (stopped flow, Applied Photophysics) per misure tempo-risolve in fluorescenza ed assorbimento a lunghezza d'onda singola e multipla.
- Workstation Linux box per la modellizzazione di strutture proteiche
- Spettropolarimetro di dicroismo circolare Jasco
- Spettrofluorimetro Fluorolog Jobin Yvon

A queste si aggiungono apparecchiature del Dipartimento di Scienze Biochimiche dell'Università di Roma 'La Sapienza':

- Strumentazione per laser-fotolisi (HYL200 5ns-pulsed laser, Quanta Systems)
- Spettrometri di massa ESI, MALDI-TOF, Gas/Massa
- Apparecchi di mescolamento rapido a flusso interrotto (stopped flow, Applied Photophysics) ed a flusso continuo per misure tempo-risolve in fluorescenza e dicroismo circolare.
- Spettrometro infrarosso Nicolet 760

Tecniche di indagine

Le principali tecniche utilizzate comprendono:

- diffrazione a raggi X di cristalli proteici e uso dei metodi MR (Molecular Replacement) e MIR (Molecular Isomorphous Replacement)
- ultracentrifugazione analitica (velocità ed equilibrio di sedimentazione)
- tecniche del DNA ricombinante per la mutagenesi sito-diretta di proteine
- tecniche spettroscopiche (assorbimento, fluorescenza, dicroismo circolare, IR)
- sequenziamento di peptidi e proteine
- spettrometria di massa
- analisi di sequenze geniche e proteiche e di strutture tridimensionali di proteine
- tecniche spettroscopiche di cinetica rapida, in particolare 'stopped-flow' (assorbimento UV/vis, fluorescenza, dicroismo circolare) e laser-fotolisi
- metodi elettrochimici (NO amperometria e ossigrafia polarografica)



Tecnologie

Metodi di predizione della struttura tridimensionale di proteine integrati con l'ingegneria proteica per la progettazione, sintesi e caratterizzazione di proteine mutanti di potenziale rilevanza biomedica e biotecnologica.

Applicazione di una strategia sperimentale che accoppia lo studio della cinetica di "folding" di proteine modello semplici a mutagenesi sito-specifica estensiva per definire tutte le interazioni che stabilizzano lo stato di transizione, cioè la conformazione a più alta energia nel processo che guida la catena denaturata verso la corrispondente forma nativa. Mutando sistematicamente diverse catene laterali in proteine modello semplici, e misurando la destabilizzazione introdotta nello stato di transizione rispetto a quella osservata nello stato nativo, è infatti possibile calcolare, per ogni residuo di una data proteina, il parametro phi che rappresenta un indice di strutturazione dello stato di transizione rispetto alla struttura nativa.

Collaborazioni (partner e committenti)

La ricerca si avvale di una rete di collaborazioni con gruppi di ricerca operanti presso l'Università di Roma 'La Sapienza', ed in particolare presso il Dipartimento di Scienze Biochimiche, il Centro di Eccellenza BEMM e l'Istituto Pasteur-Fondazione Cenci Bolognetti. Il personale CNR coinvolto nella ricerca collabora inoltre con ricercatori di altre istituzioni di ricerca nazionali ed estere, quali: Università Wisconsin Medical School (USA), New Hampshire (USA), Glasgow (Gran Bretagna), Lisbona (Portogallo), Moscow State (Russia), Frankfurt, Ulm e Karlsruhe (Germania); Università di Siena e Sassari; Weizmann Institut (Israele); Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC (Spagna).

Committenti: Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca (MIUR) con progetti di ricerca nell'ambito del Fondo per gli Investimenti della Ricerca di Base (FIRB).

Iniziativa per l'acquisizione di ulteriori entrate

I ricercatori hanno presentato diverse domande di finanziamento al MiUR, al Ministero della Salute e ad organizzazioni internazionali.

Finalità

Obiettivi

La ricerca si pone come obiettivo generale lo studio a livello molecolare della relazione tra struttura tridimensionale, anche nei suoi aspetti dinamici, e funzione biologica di proteine coinvolte in processi biologici fondamentali.

La comprensione dei processi di trasporto e di catalisi enzimatica, dei principi che regolano il riconoscimento nelle macromolecole, dei meccanismi fisiologici e patologici di acquisizione della struttura tridimensionale ("folding" e "misfolding") è di rilevanza indiscutibile, anche nell'ottica di possibili applicazioni di tipo biomedico e/o biotecnologico.

Risultati attesi nell'anno

Si prevede che le ricerche in corso permettano di ottenere risultati degni di pubblicazione su riviste internazionali di prestigio su tutti i sistemi oggetto di indagine. Diversi sono i contributi già accettati per la pubblicazione.

Potenziale impiego

- per processi produttivi

Alcuni dei sistemi studiati possono trovare potenziale impiego:

- nella progettazione di proteine di rilevanza biotecnologica (produzione di antibiotici)
- nella produzione di materiale con proprietà nanomagnetico (proteine Dps)

- per risposte a bisogni individuali e collettivi

Alcuni dei sistemi oggetto di studio possono trovare potenziale utilizzo come:

- nuovi peptidi antimicrobici
- bersagli farmacologici (e.g. le flavoproteine a due ferri).



Moduli

Modulo: Biologia strutturale e bioinformatica: struttura-funzione, dinamica e riconoscimento in proteine

Istituto esecutore: Istituto di biologia e patologia molecolari

Luogo di svolgimento attività: Sede principale Istituto

Modulo: Oligopeptide binding proteins da Archaea

Istituto esecutore: Istituto di biologia e patologia molecolari

Luogo di svolgimento attività: Sede principale Istituto

Risorse commessa 2008

Pers. tempo ind/det	Funz.+ Invest.	Spese da Fonti Esterne	Spese per Infrastrutt. tecn.-scient a gestione accentrata	Totale	Risorse da esercizi precedenti	Massa Spendibile	Costi figurativi	Spese generali accentrate	Valore Effettivo
1	2	3	4	5=1+2+3+4	6	7=2+3+6	8	9	10=5+6+8+9
630	49	60	0	739	60	169	77	N.D.	876

valori in migliaia di euro

<i>Unità di personale di ruolo*</i>	
ricercatori	Totale
9	13

*equivalente tempo pieno

<i>Unità di personale non di ruolo</i>									
associato	dottorando	borsista	assegnista	specializzando	incaricato di ricerca	professore visitatore	collaboratore professionale	altro	Totale
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

<i>Richiesta nuove unità di personale</i>			
tempo determinato	tempo indet	non di ruolo*	Totale
0	2	0	2

*dottorati, borse di studio, assegni di ricerca



Struttura e funzione di acidi nucleici e cromatina. Epigenetica

Dati generali

Progetto:	Struttura, funzione e progettazione di proteine, acidi nucleici e loro complessi sopramolecolari
Tipologia di ricerca:	Progetti relativi a linee tematiche a carattere strategico
Istituto esecutore:	Istituto di biologia e patologia molecolari
Sede principale svolgimento:	Sede principale Istituto
Dip. di prevista afferenza:	Scienze della Vita
Responsabile indicato:	ERNESTO DI MAURO

Elenco dei partecipanti

	liv.		liv.		liv.
Allegría Vanda	IV	Costanzo Giovanna Maria	III	Micheli Gioacchino	III
Antolini Rachele	V	Di Franco Mario	VII	Nasi Sergio	II
Arceci Massimo	VIII	Filetici Patrizia	III	Pisaneschi Giuseppe	V
Beccari Elena	II	Fragapane Paola	III	Pistolesi Gabriella	IV
Caffarelli Elisa	II	Fruscalzo Alberto	III	Rizzo Nicola	VII
Caneva Roberto	II	Chelardini Patrizia	II	Ruberti Ida	I
Carabelli Monica	III	Iani Paola	V	Sarracino Filomena	VII
Cardarelli Maura	III	Junakovic Nikolaj	II	Sessa Giovanna	III
Caserta Micaela	II	Marchioni Marcella	V	Verdone Loredana	III

Temi

Tematiche di ricerca

Le tematiche di ricerca si avvalgono di una piattaforma conoscitiva consolidata e sono focalizzate da un lato sullo studio della struttura della cromatina e dei processi di rimodellamento in sistemi sperimentali modello, dall'altro sulla comprensione del ruolo biologico degli RNA non codificanti. Verranno sviluppate piattaforme di epigenomica globale in sistema umano. Il progetto svilupperà tecniche di genomica globale e si proporrà di ottenere modelli di analisi high throughput per l'analisi su scala genomica. Epigenomica.

Stato dell'arte

L'indagine ad ampio spettro della regolazione epigenetica e della struttura sopramolecolare del genoma consentirà di chiarire alcuni meccanismi molecolari di controllo della struttura globale genomica. In prospettiva i risultati ottenuti consentiranno il disegno e la produzione di nuove molecole in grado di agire sulla cromatina per la cura di diverse patologie.

Azioni

Attività da svolgere

Le attività si focalizzeranno da un lato sullo studio della struttura della cromatina e dei processi di rimodellamento in sistemi sperimentali modello quali lieviti e cellule in coltura animali, dall'altro sulla comprensione del ruolo biologico degli RNA non codificanti.

Particolare rilevanza avranno gli studi focalizzati sui meccanismi di regolazione a base epigenetica.

Punti critici e azioni da svolgere

Lo studio proposto non presenta punti critici significativi e appare fattibile sulla base delle competenze disponibili e delle collaborazioni già esistenti.

La collocazione di giovani a contratto gioverebbe grandemente allo svolgimento del progetto per apportare nuove, preziose risorse.

Competenze, tecnologie e tecniche di indagine

Competenze complementari nel campo della biologia strutturale e nella genetica molecolare in sistemi sperimentali modello.

Strumentazione

I ricercatori si avvalgono della strumentazione di base per studi di biologia molecolare, biologia cellulare, genomica ed informatica

Tecniche di indagine

Tecniche di genomica globale al fine di ottenere modelli di analisi high throughput per l'analisi su scala genomica. Epigenomica.



Tecnologie

Sintesi, manipolazioni e trasmissioni di informazioni genetiche.
Disegno e produzione di nuove molecole in grado di agire sulla cromatina per la cura di diverse patologie.
Produzione di piccoli RNA non codificanti e applicazioni in terapia genica.

Collaborazioni (partner e committenti)

Sono già intense le collaborazioni con il Dipartimento di Genetica e Biologia Molecolare della Università di Roma 'La Sapienza' e con la Fondazione Pasteur-Cenci Bolognetti e con Istituzioni universitarie italiane ed estere.

Iniziative per l'acquisizione di ulteriori entrate

I ricercatori partecipanti otterranno finanziamenti da:

- Agenzia Spaziale Italiana (Progetto MoMa e da Contratto II/014/06). E' inoltre in elaborazione un progetto per l'acquisizione di finanziamento nell'ambito del programma ASI / Missione Foton.
- Progetto Scambio Internazionale Italia - Messico.
- Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio, Effetti sulla salute umana di polveri e particolato prodotti dall'inquinamento ambientale. E' prevista la prosecuzione del finanziamento erogato per l'anno precedente, a partire da Giugno 2008.

Finalità

Obiettivi

Tra gli obiettivi il progetto si propone di individuare meccanismi di regolazione cromatinica su regioni di controllo trascrizionale (promotori genici), e su regioni di DNA strutturale non codificante come i telomeri ed i centromeri così come l'origine e la funzione di RNA non codificanti.

Risultati attesi nell'anno

I risultati produrranno pubblicazioni di alto impatto scientifico; la programmazione e sintesi di molecole di interesse applicativo costituirà un obiettivo fondamentale.

Tra i temi che saranno sviluppati: modelli teorici sull'evoluzione delle macromolecole biologiche; meccanismi e proprietà regolative della molecola di DNA e studi su biosintesi, struttura e funzione di piccoli RNA non codificanti e loro applicazioni in terapia genica.

Funzioni telomeriche nella regolazione genetica, nell'invecchiamento, nello sviluppo di nuovi farmaci

Potenziale impiego

- per processi produttivi

Non si prevedono al momento impieghi per processi produttivi.

- per risposte a bisogni individuali e collettivi

Le conoscenze acquisite saranno utilizzate per (i) disegno e produzione di nuove molecole in grado di agire sulla cromatina per la cura di diverse patologie, (ii) produzione di piccoli RNA non codificanti e applicazioni in terapia genica.

Moduli

Modulo: Struttura e funzione di Acidi nucleici e Cromatina. Epigenetica
Istituto esecutore: Istituto di biologia e patologia molecolari
Luogo di svolgimento attività: Sede principale Istituto

Modulo: Regolazione della biosintesi e funzione dell' RNA
Istituto esecutore: Istituto di biologia e patologia molecolari
Luogo di svolgimento attività: Sede principale Istituto

Risorse commessa 2008

Pers. tempo ind/det	Funz.+ Invest.	Spese da Fonti Esterne	Spese per Infrastrutt. tecn.-scient a gestione accentrata	Totale	Risorse da esercizi precedenti	Massa Spendibile	Costi figurativi	Spese generali accentrate	Valore Effettivo
1	2	3	4	5=1+2+3+4	6	7=2+3+6	8	9	10=5+6+8+9
1.345	31	27	0	1.403	60	118	138	N.D.	1.601

valori in migliaia di euro



<i>Unità di personale di ruolo*</i>	
ricercatori	Totale
17	24

*equivalente tempo pieno

<i>Unità di personale non di ruolo</i>									
associato	dottorando	borsista	assegnista	specializzando	incaricato di ricerca	professore visitatore	collaboratore professionale	altro	Totale
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

<i>Richiesta nuove unità di personale</i>			
tempo determinato	tempo indet	non di ruolo*	Totale
0	0	0	0

*dottorati, borse di studio, assegni di ricerca



Studi di idrolasi da fonti diverse e proteine vegetali: relazione struttura/funzione e possibili applicazioni

Dati generali

Progetto:	Struttura, funzione e progettazione di proteine, acidi nucleici e loro complessi sopramolecolari
Tipologia di ricerca:	Progetti relativi a linee tematiche a carattere strategico
Istituto esecutore:	Istituto di biochimica delle proteine
Sede principale svolgimento:	Sede principale Istituto
Dip. di prevista afferenza:	Scienze della Vita
Responsabile indicato:	GIUSEPPE MANCO

Elenco dei partecipanti

	liv.		liv.		liv.
Camardella Laura	II	Febbraio Ferdinando	III	Nucci Roberto	I
Capasso Antonio	II	La Cara Francesco	II	Palmieri Gianna	III
Carrara Adriana	V	Manco Giuseppe	II	Schioppa Gennaro	VII
Ciardello Maria Antonietta	III	Morana Alessandra	III	Tamburrini Maurizio	II
D'Avino Rossana	II				

Tem

Tematiche di ricerca

Isolamento, produzione, progettazione, caratterizzazione e valutazione di idrolasi [carbossilosterasi, fosfotriesterasi, proteasi, endoglucanasi, xilanasi e pectinasi] per la rivelazione e decontaminazione di sostanze tossiche, per il miglioramento delle proprietà di alimenti, per la chimica fine. Proteomica di *S. solfataricus* in diverse condizioni di stress da xenobioti e presenza di nutrienti diversi. Analisi proteomica dei frutti di kiwi verde e kiwi gold durante il processo di maturazione, della PME e suo inibitore. Analisi proteomica dei tessuti vegetali di pero e albicocco. Costruzione di modelli molecolari di proteine ed enzimi di interesse. Espressione genica in piante esposte ad agenti patogeni. Analisi strutturale e funzionale dei dimeri non nativi della tireoglobulina umana.

Stato dell'arte

L'importanza delle biotecnologie in ambito agro-alimentare, ambientale, chimico e della salute umana è dimostrata dai numerosi programmi di sostegno a livello mondiale. Tali programmi prevedono anche il potenziamento della ricerca industriale, delle metodologie e degli approcci sistemici a supporto dei processi d'innovazione in definiti contesti territoriali. La ricerca proposta, oltre a creare una rete di competenze, andrà incontro alla domanda tecnologica delle PMI costituenti la base dell'industria agroalimentare, chimica e farmaceutica italiana.

Azioni

Attività da svolgere

- Continueranno gli studi su: 1) progettazione molecolare mediante evoluzione guidata e screening di fosfotriesterasi termostabili per la degradazione dei pesticidi;
- 2) valutazione di esterasi termostabili per rivelazione e rimozione di pesticidi organofosfati in determinati alimenti, per la maturazione dei formaggi in sistemi modello, per la sintesi di antibiotici;
- 3) costruzione di mappe 3D e 2D di sub-proteomi di *S. solfataricus* e individuazione di differenze nei pattern proteici indotte da perturbanti chimico-fisici e nutrienti diversi;
- 4) rapporto struttura/funzione della pectina metilesterasi (PME) da frutti, modulazione dell'attività enzimatica e interazione con l'inibitore proteico da kiwi;
- 6) l'analisi proteomica del frutto di kiwi e altri frutti;
- 7) modelli di proteine ed enzimi di interesse e dei relativi mutanti.
- 8) Saranno isolate idrolasi responsabili del miglioramento delle caratteristiche organolettiche di alimenti tipici.
- 9) Analisi differenziale dell'espressione genica in piante di agrumi esposte ad infezione con virus 'Tristeza' (CTV).
- 10). Isolamento degli intermedi di denaturazione della tireoglobulina umana e loro caratterizzazione funzionale e strutturale.



Punti critici e azioni da svolgere

Le attività da svolgere prevedono l'utilizzo di consolidate competenze che vanno dalla biochimica fine delle proteine, all'enzimologia, alla bioinformatica, microbiologia, proteomica ed evoluzione guidata di enzimi. Queste ultime due tecnologie costituiscono approcci innovativi che richiedono attrezzature sofisticate (piattaforme robotiche per il liquid handling e spettrometri di massa) che l'IBP ha acquisito recentemente grazie ai finanziamenti regionali per il centro di competenza BioTeKnet di cui fa parte. E' auspicabile poter fornire a giovani ricercatori l'opportunità di acquisire conoscenze e capacità operative in questi ambiti strategici per lo sviluppo della ricerca e della tecnologia nei prossimi anni. A tale scopo si richiede l'assunzione di un ricercatore a tempo indeterminato e di uno a tempo determinato. Non si prevedono particolari problemi scientifici e tecnologici per la gran parte della ricerca proposta. Per il miglioramento delle caratteristiche organolettiche di pane e pasta dovranno essere affrontate problematiche connesse con i campionamenti e l'eterogeneità della flora microbica degli ambienti in cui sono effettuate le lavorazioni degli alimenti allo studio.

Competenze, tecnologie e tecniche di indagine

Le competenze a disposizione della Commessa sono: biochimica, enzimologia, biologia strutturale, bioinformatica, microbiologia, proteomica, evoluzione guidata di enzimi. La dott. L. Camardella è stata nominata come delegata nel Management Committee dell'azione COST 928' Control and exploitation of enzymes for added-value food products'. La Dr Merone (assegnista-Manco) ha usufruito di una borsa short-term EMBO presso il Prof. A. Griffiths (Francia) nell'ambito dell'evoluzione di enzimi. Il Dr G. Manco e la Dr.ssa L. Camardella hanno portato a termine i trainings per l'utilizzo del SELDI TOF e del Q TOF Elite.

Strumentazione

Spettrofotometri, spettrofluorimetri, FPLC, HPLC, sequenziatore, analizzatore di aminoacidi, termociclatori, SELDI-ToF, piattaforma robotica per piastre multipozzetto, fermentatori e incubatori, centrifughe, Silicon Grafics, Biocore, assorbimento atomico, ChemiDoc, Phosphorimager, beta-counters, UV-crosslinker.

Tecniche di indagine

Cromatografia; saggi enzimatici; elettroforesi 1 e 2D; spettri di fluorescenza e CD; spettroscopia di assorbimento atomico; sequenziamento di proteine e acidi nucleici; analisi della composizione aminoacidica; analisi di carboidrati; cristallografia RX; NMR; spettrometria di massa; modellazione e dinamica molecolare; fermentazione; risonanza plasmonica di superficie; analisi proteomica; ingegneria proteica; analisi differenziale del pattern di espressione genica; interazione proteina-proteina, proteina-ligando, proteina-membrana; analisi in banche dati.

Tecnologie

Purificazione di proteine; clonaggio ed espressione di geni; evoluzione in vitro di enzimi; produzione di antisieri e biosensori; produzione di sistemi per biotrasformazione e biocatalisi; predizione e produzione di strutture di proteine; produzione di librerie genomiche e databases proteici.

Collaborazioni (partner e committenti)

Progetto CNR/CONICET 2007-2008 'Incidenza di un' esterasi termofila sull' aggregazione del caglio e nella maturazione di formaggi a pasta dura e semidura' C. Meinardi, CONICET, Santa Fè, Argentina; A. Scaloni, ISPAAM-CNR, Napoli; P. Del Vecchio, G. Barone; P. Pucci, D. Picone Univ. di Napoli Federico II; T. Tancredi ICB-CNR; G. De Simone e C. Pedone, IBB-CNR, Napoli; D. Tawfik, Weizmann Institute of Science, Israel; P. Masson, Centre de Recherches du Service de Sante des Armees, France; L. Sarda, H. Chaininian, A. Abousalham, Univ. de Provence, France; A. Griffiths, Univ. Luis Pasteur, France; N. Di Fonzo, Istituto di Cerealicoltura, Foggia; R. Siciliano, M.G. Volpe ISA-CNR, Avellino; A. Giovane, L. Servillo, Seconda Univ. di Napoli; D. Bellincampi, B. Reca, Univ. La Sapienza, Roma; T. Giardina, Univ. Aix- Marseille 3, France. M. Pastore, M. Buccheri, E. Carboni Ist. Sperimentale per la Frutticoltura, C.R.A., Sez. Caserta e Sez. Roma; S. Micelli Univ. degli Studi di Bari. G. Saviano e F. Gentile, Univ. Molise. Collaborazione tra l'IBP e l'Azienda Ospedaliera Monaldi di Napoli. F. Cellini e S. Di Gennaro, Metapontum Agrobios. A. Riccio, RC Impianti; A. Catara, Parco Scientifico e Tecnologico della Sicilia, Università di Catania



Iniziativa per l'acquisizione di ulteriori entrate

Prog. FP7 'ADVANCED SYSTEMS FOR BIO-SENSING, DECONTAMINATION AND THERAPY AFTER WARFARE AGENTS EXPOSURE Prop. IBP G. Manco

Prog. PN Ric. Milit.: SISTEMI AVANZATI PER LA RIVELAZIONE E DECONTAMINAZIONE DOPO ESPOSIZIONE A CBA DI INTERESSE MILITARE. Prop. IBP G. Manco.

Prog. Regione Campania Legge.3.17: 'ENZIMI INNOVATIVI PER LA DEPURAZIONE BIOLOGICA DI PESTICIDI ORGANOFOSFATI IN ACQUE CONTAMINATE'. Prop. IBP G. Manco.

Prog. PRIN 2007 'Il ruolo di specifiche esterasi nella risposta agli organofosfati analizzato mediante caratterizzazione funzionale e strutturale nel sistema nervoso di 'hen' come modello biologico' Prop. IBP G. Manco.

Prog. PRIN 2007 'Cibo funzionale e salute umana. Studi della struttura e dell'attività biologica di un nuovo peptide isolato dal frutto del kiwi. Potenziali applicazioni farmacologiche e biotecnologiche.' Prop. IBP MA Giardiello

Partecipazione a PRIN2007 sulla caratterizzazione immunologica degli intermedi di denaturazione della Tireoglobulina umana (F. Febbraio).

Finalità

Obiettivi

Nuovi enzimi e processi per la rivelazione e decontaminazione di sostanze tossiche negli alimenti e nell'ambiente per il miglioramento della qualità e sicurezza degli alimenti. Proteomica di *S. solfataricus* per la comprensione delle alterazioni metaboliche indotte da xenobioti e da nutrienti diversi. Potenziali applicazioni di proteine e peptidi nella qualità e sicurezza di alimenti vegetali; caratterizzazione della PME, del suo inibitore da kiwi e proteomica di frutti.

Risultati attesi nell'anno

Utilizzo di esterasi per la rivelazione e rimozione di pesticidi dagli alimenti e per il miglioramento della qualità dei formaggi. Caratterizzazione e produzione di mutanti iperattivi della paraoxonasi di *S. solfataricus* per la degradazione di pesticidi. Costruzione di mappe 3D e 2D di sub-proteomi di *S. solfataricus* e individuazione di differenze nei pattern proteici indotte da perturbanti chimico-fisici e nutrienti diversi. Isolamento e caratterizzazione di alcune delle attività individuate.

Identificazione e caratterizzazione di nuove proteine del frutto del kiwi responsabili di allergie alimentari. Studio dell'interazione tra l'invetasi vacuolare di pomodoro ed il suo inibitore proteico espresso in Picchia e caratterizzazione dell'inibitore dell'invetasi. Isolamento di inibitori della PME da fonti vegetali. Produzione di cDNA 'full-length' ottenuto dai campioni controllo e inoculati. Amplificazione mediante Differential Display del cDNA ottenuto. Individuazione delle bande di cDNA differenzialmente espresse. Clonaggio in *E. coli* e sequenziamento dei cDNA individuati. Isolamento delle forme intermedie di denaturazione e caratterizzazione strutturale e funzionale delle stesse.

Potenziale impiego

- per processi produttivi

Qualità di alimenti, decontaminazione di pesticidi, rivelazione di pesticidi, chimica fine, enzimi idrolitici

- per risposte a bisogni individuali e collettivi

Miglioramento della qualità degli alimenti mediante la rivelazione e la decontaminazione di sostanze tossiche, la caratterizzazione di proteine e peptidi bioattivi, il miglioramento delle proprietà di prodotti tradizionali e la comprensione delle alterazioni metaboliche indotte da xenobioti, individuazione di markers diagnostici di patologie umana

Moduli

Modulo: DR. MANCO : Studi di idrolasi da fonti diverse e proteine vegetali.

Istituto esecutore: Istituto di biochimica delle proteine

Luogo di svolgimento attività: Sede principale Istituto

Risorse commessa 2008

Pers. tempo ind/det	Funz.+ Invest.	Spese da Fonti Esterne	Spese per Infrastrutt. tecn.-scient a gestione accentrata	Totale	Risorse da esercizi precedenti	Massa Spendibile	Costi figurativi	Spese generali accentrate	Valore Effettivo
1	2	3	4	5=1+2+3+4	6	7=2+3+6	8	9	10=5+6+8+9
416	0	31	0	447	0	31	93	N.D.	540

valori in migliaia di euro



<i>Unità di personale di ruolo*</i>	
ricercatori	Totale
6	7

*equivalente tempo pieno

<i>Richiesta nuove unità di personale</i>			
tempo determinato	tempo indet	non di ruolo*	Totale
0	0	0	0

*dottorati, borse di studio, assegni di ricerca



Meccanismi molecolari e segnali nel controllo di proliferazione, differenziamento e morte cellulare



Basi molecolari della cancerogenesi

Dati generali

Progetto:	Meccanismi molecolari e segnali nel controllo di proliferazione, differenziamento e morte cellulare
Tipologia di ricerca:	Progetti di sviluppo competenze
Istituto esecutore:	Istituto per l'endocrinologia e l'oncologia sperimentale 'Gaetano Salvatore'
Sede principale svolgimento:	Sede principale Istituto
Dip. di prevista afferenza:	Scienze della Vita
Responsabile indicato:	FRANCESCA CARLOMAGNO

Elenco dei partecipanti

	liv.		liv.		liv.
Berardone Mario	VII	De Cristofaro Tiziana	III	Mellone Stefano	VI
Berlingieri Maria Teresa	III	De Franciscis Vittorio	I	Moscato Fortunato	VI
Cali Gaetano	III	Desiderio Andrea	V	Mostardi Mario	VII
Carlo Magno Francesca	III	Fedele Monica	II	Occorsio Ugo	VI
Cassano Silvana	III	Ferraro Paola	III	Pacifico Francesco Maria	III
Castellone Maria Domenica	III	Galli Paolo	VI	Peluso Maria	VII
Celetti Angela	III	Gallo Adriana	III	Rotoli Deborah	VI
Cerrato Aniello	III	Gentile Flaviana	VI	Salvatore Giuliana	III
Chiariello Mario	II	Kisslinger Annamaria	III	Speranza Giulia	VII
Cinquegrani Marco	II	Liguoro Domenico	III	Viglietto Giuseppe	III
Cirafici Anna Maria	III	Mascia Anna	III	Visconti Roberta	III
Colucci D'Amato Generoso	III	Mastrocinque Michele	V	Zannini Maria Stella	II
Luca		Melillo Rosa Marina	III		
D'Agnello Francesco	VII				

Temi

Tematiche di ricerca

I quattro moduli di ricerca della commessa hanno lo scopo di:

Scopo della presente commessa e':

- 1) Individuare le basi molecolari della cancerogenesi tiroidea attraverso l'analisi delle alterazioni genetiche ed epigenetiche in tumori tiroidei umani e in differenti sistemi modello animali e cellulari sviluppati nei nostri laboratori. Questo permettera' l'individuazione di nuovi bersagli terapeutici per il trattamento dei tumori non responsivi alla terapia radiometabolica (carcinomi tiroidei midollari e anaplastici)
- 2) Identificare e caratterizzare nuovi co-regolatori dei fattori trascrizionali tiroidei Pax3 e TTF-1 coinvolti nel differenziamento e nella tumorigenesi tiroidea.
- 3) Generare e caratterizzare topi geneticamente modificati per l'analisi del ruolo delle proteine HMGA e PATZ nella tumorigenesi; Sperimentare un nuovo analogo della somatostatina per il trattamento dei tumori ipofisari.
- 4) Identificare nuovi bersagli nella diagnosi e/o terapia del cancro; sviluppo di biomolecole di RNA come ligandi specifici di cellule tumorali; messa a punto di nuove modalita' di distribuzione delle biomolecole antitumorali al tessuto affetto.

Stato dell'arte

Alcune delle lesioni genetiche associate ai tumori tiroidei, quali attivazione di chinasi ed inattivazioni di oncosoppressori sono state individuate. L'effetto trascrizionale di queste lesioni e' stato descritto e l'espressione di numerosi geni varia rispetto alle cellule normali. Inoltre chinasi iperfunzionanti quali RET e B-RAF sono possibili target per terapie innovative mediante l'utilizzo di composti a basso peso molecolare. L'utilizzo di cellule tiroidee differenziate e non-differenziate ha permesso l'identificazione di diverse molecole coinvolte nel differenziamento cellulare e di nuovi partners dei fattori trascrizionali Pax3 e TTF1 come DREAM e TAZ.

Per quanto riguarda i geni della famiglia HMGA, essi sono riarrangiati o iperespressi, svolgendo un ruolo critico, in numerose neoplasie sia benigne che maligne, incluso gli adenomi ipofisari. PATZ è un potenziale oncosoppressore di cui si conosce ancora poco in letteratura.

Infine, la disponibilita' di piattaforme in grado di analizzare l'espressione genica combinata con le tecnologie di chimica combinatoriale (tra cui la SELEX) ha aperto nuove prospettive per lo sviluppo di strategie innovative per la lotta contro il cancro.



Azioni

Attività da svolgere

Concentreremo i nostri sforzi sulla identificazione di pathways molecolari coinvolti nella tumorigenesi tiroidea soprattutto di tipo indifferenziato, sullo sviluppo di nuovi tool per il bersagliamento farmacologico di proteine già note e sull'individuazione di nuovi bersagli.

Cercheremo di identificare altri geni regolati dalle HMGA e implicati nella tumorigenesi ipofisaria e di analizzare la suscettibilità dei topi knockout di PATZ allo sviluppo di neoplasie, il ruolo della proteina PATZ nella tumorigenesi e la sua espressione nei tumori umani. altri obiettivi saranno svelare il ruolo di Shp1 nella sopravvivenza cellulare del carcinoma mammario, identificare strategie combinatoriali per l'identificazione di membrane signatures in NSCLC cells e sviluppare aptameri multifunzionali e nanoparticelle per l'uso terapeutico in vivo. Completeremo la caratterizzazione funzionale delle proteine DREAM e TAZ, avvalendoci anche di modelli animali disponibili in laboratorio. Individueremo nuovi interattori della proteina TAZ. Analizzeremo i meccanismi molecolari che regolano l'espressione delle caderine nel tessuto tiroideo.

Punti critici e azioni da svolgere

Sarà importante identificare gli eventi fondamentali della trasformazione tiroidea. In futuro sarà importante instaurare progetti di collaborazione con case farmaceutiche o piccole biotech in grado di sviluppare farmaci in grado di bersagliare i target che si dimostreranno migliori in esperimenti preclinici.

In particolare sarà critico:

- 1) Identificare molecole bersaglio coinvolte nella trasformazione neoplastica;
- 2) identificare interattori strutturali e funzionali con specifiche molecole della trasduzione del segnale;
- 3) validare la conseguenza biologica dell'interazione in vitro e in vivo.

Si richiede inoltre la messa a punto di:

- 1) Saggi di legame delle HMGA ai promotori dei geni scelti e significato biologico;
- 2) analisi per qRT-PCR di tali geni in adenomi ipofisari e ipofisi umane;
- 3) cancerogenesi chimica dei topi knockout di Patz;
- 4) verifica in vivo delle interazioni tra PATZ, pRB, p53 e le HMGA, e loro significato biologico;
- 5) Caratterizzazione dell'effetto del silenziamento genico di TAZ in cellule tiroidee differenziate e del fenotipo tiroideo del topo knock-out per TAZ;
- 6) Set up di un sistema per l'identificazione di nuovi interattori di TAZ.

Competenze, tecnologie e tecniche di indagine

Le competenze necessarie sono molteplici e comprendono: competenze di oncologia molecolare, di ingegneria genetica, di proteomica, di biochimica, di biologia molecolare e di biologia cellulare.

Sono state sviluppate, inoltre, competenze nell'utilizzo di oociti di *Xenopus Laevis* per lo studio di eventi legati al ciclo cellulare, nella manipolazione di cellule staminali murine e generazione di topi transgenici e knockout, nella manipolazione di lieviti e tecnologia del doppio ibrido per l'analisi delle interazioni proteina-proteina.

Per ogni tipo di tecnologia è disponibile, o è stato istruito tramite corsi specifici, personale del CNR in grado di gestire gli apparecchi e di trasferire la tecnologia ad altri ricercatori afferenti all'istituto.

Strumentazione

- Strumentazione base per laboratori di biologia e cellulare e molecolare
- Luminometro
- Citofluorimetro con sorter
- Microscopio confocale
- Scanner per microarray
- Termociclatore per PCR
- IQCycler per real time PCR
- Gamma-counter
- Microscopio a fluorescenza
- Pyrosequenziatore
- Stabulario SPF convenzionale per la stabulazione e sperimentazione animale



Tecniche di indagine

- Trasfezioni stabili e transienti
- Generazione di vettori procariotici ed eucariotici
- Estrazione di proteine, RNA e DNA da cellule e tessuti umani
- PCR e Real-time PCR
- Northern e Western blot
- Silenziamento genico (RNA interference)
- Saggi di transattivazione
- Saggi di pull-down e co-immunoprecipitazione
- Saggi EMSA e Chromatin immunoprecipitation
- Immunoistochimica,
- Citofluorimetria (FACS)
- SELEX.

Tecnologie

Saranno utilizzate tecnologie ben consolidate, come il 'gene chip microarray' per l'analisi dei profili d'espressione genica e la proteomica (elettroforesi bi-dimensionale e MALDI/MS). Inoltre sarà utilizzata la SELEX, che è una procedura di chimica combinatoriale che consente di selezionare in vitro da vaste librerie di oligonucleotidi a singolo filamento (RNA, DNA o RNA modificato) aptameri caratterizzati da un'elevata affinità di legame verso uno specifico bersaglio.

Collaborazioni (partner e committenti)

Istituzioni internazionali:

CEA / DSV / DRM / SHFJ – INSERM U 803, Francia; CNRS, Gif sur Yvette Francia; Ohio State University, Columbus, US; Dpto. Biología Molecular y Celular, Centro Nacional de Biotecnología, Madrid, Spagna; Instituto de Investigaciones Biomedicas, Madrid, Spagna; Center for Biomedical Integrated Genoproteomics, University of Liege, Belgium; National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIH, Bethesda, MD, USA; Duke University Medical Center, Durham, NC; National Cancer Institute, NIH, Bethesda, MD; Cancer Discovery, Astra Zeneca, Mereside, UK; Bayer Pharmaceuticals Corporation-West Haven, CT 06516; CNRS, Lyon, France; LRI, Cancer UK, London, UK.

Istituzioni Nazionali:

Dpt Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare, Dpt Ingegneria dei Materiali e della Produzione, Dpt Endocrinologia ed Anatomia - Università 'Federico II', Napoli; Istituto Europeo Oncologico, Milano; Istituto dei Tumori di Napoli; CIB, Trieste; Dpt di Scienze Biologiche ed Ambientali, Università degli Studi del Sannio, Benevento; Istituto per il Sistema Produzione Animale in Ambiente Mediterraneo (ISPAAM)-CNR, Napoli; Dpt di Scienze e Tecnologie Biomediche, Università degli Studi di Udine.

Iniziativa per l'acquisizione di ulteriori entrate

- Progetto AIRC j 60.000 (Melillo)
- Progetto AIRC j 60.000 (Celetti)
- AIRC 2008 j 200.000 (Santoro)
- MUR-PRIN 2007 j 100.000 (Melillo)
- MUR-PRIN 2007 j 100.000 (Carlomagno)
- MUR-PRIN 2007 j 100.000 (Santoro)
- ERC advanced grants j 300.000 (Melillo)
- Ministero della salute- Bando Giovani Ricercatori j 100.000 (Carlomagno)
- MUR-PRIN 2007 j 100.000 (Fedele)
- MUR-PRIN 2007 j 100.000 (Zannini)
- MUR-PRIN 2007 j 100.000 (Nitsch)
- AIRC 2008 j 50.000 (Melillo)
- AIRC 2008 j 50.000 (Fedele)
- AIRC 2008 j 50.000 (Celetti)
- ERC WP 2008 (De Francis) (De Francis)
- FP7 Nanotechnologies (De Francis)

Finalità

Obiettivi

1 Obiettivo specifico e' in generale identificare le basi molecolari della cancerogenesi tiroidea e su tale conoscenza poter disegnare strategie terapeutiche innovative per la cura dei tumori della tiroide. Identificazione, mediante cromatografia di affinità su estratti proteici di cellule tiroidee, di interattori biochimici dei fattori di trascrizione Pax3 e TTF-1 e l'analisi del loro ruolo sia nel differenziamento che nella



tumorigenesi tiroidea così come la caratterizzazione delle modificazioni post-traduzionali di Pax8 in grado di regolare l'attività trascrizionale sono un altro obiettivo.

Intendiamo inoltre chiarire i meccanismi alla base dell'insorgenza degli adenomi ipofisari e sperimentare nuovi farmaci in grado di bloccare e/o fare regredire lo sviluppo di questo tumore; definire la funzione delle proteine HMGA e PATZ nella cancerogenesi; analizzare l'espressione di PATZ nei tumori umani.

Infine l'ultimo obiettivo è lo sviluppo di strategie combinatoriali innovative accoppiate a piattaforme tecnologiche ad alto livello di risoluzione per l'identificazione di bersagli molecolari coinvolti nella trasformazione neoplastica e lo sviluppo di ligandi specifici

Risultati attesi nell'anno

Ci aspettiamo di ottenere informazioni circa il coinvolgimento dei geni dell'infiammazione quali le citochine e della instabilità genetica nella tumorigenesi tiroidea. Ci aspettiamo di meglio caratterizzare la funzione biochimica di NCOA4 e H4 nel controllo del ciclo cellulare e dei checkpoints. Ci aspettiamo di individuare nuove molecole anti-RET e di continuare lo sviluppo di anticorpi monoclonali anti-RET.

Inoltre prevediamo di ottenere informazioni sulla specifica regolazione da parte delle HMGA della ciclina B2 e di Pit1 e loro implicazione nella tumorigenesi ipofisaria, sulle interazioni tra PATZ e le proteine pRB, p53, HMGA e sull'espressione di PATZ in tumori umani del testicolo e della mammella.

Altri punti importanti saranno la localizzazione intracellulare di Shp1 in cellule di carcinoma di mammella, la determinazione del meccanismo di cross-talk Ret/TrkB in neuroblastoma, l'identificazione dei bersagli presenti sulla superficie di cellule di glioma, a selezione di aptameri specifici per cellule di carcinoma polmonare, la definizione del ruolo di TAZ e DREAM nel differenziamento tiroideo, l'identificazione di nuovi interattori tiroidei di TAZ.

Potenziale impiego

- per processi produttivi

a) Individuazione di nuovi bersagli terapeutici per i tumori tiroidei con possibilità di sviluppo di molecole che bloccano tali bersagli

b) Utilizzo degli inibitori di chinasi e degli anticorpi anti-RET per bersagliare le forme oncogene di RET nei pazienti affetti da carcinomi tiroidei.

c) Utilizzo dei fattori isolati dal secretoma delle cellule di carcinoma anaplastico della tiroide come nuovi markers per la diagnosi dei tumori tiroidei e sviluppo di nuove molecole farmacologiche che possano interferire con l'attività di questi fattori.

d) Lo sviluppo di modelli animali in grado di riprodurre una patologia neoplastica umana ha la potenzialità di servire come modello pre-clinico per la sperimentazione di nuovi farmaci in grado di intervenire e bloccare un determinato processo tumorale.

e) Identificazione di bersagli molecolari e sviluppo di piccole molecole (aptameri, miRNA, siRNA) multifunzionali o veicolati da nanoparticelle per l'uso terapeutico in vivo

f) Lo studio dei meccanismi molecolari alla base del differenziamento tiroideo e l'individuazione di nuove molecole in esso coinvolte può rappresentare il presupposto per l'identificazione di nuovi bersagli terapeutici

- per risposte a bisogni individuali e collettivi

a) Lo sviluppo di un determinato tumore in animali geneticamente modificati consente di avere la materia prima (il tumore) in quantità sufficienti per studiare in vivo i meccanismi che ne regolano la crescita e progressione. Lo studio di tali meccanismi è fondamentale per la ricerca di possibili strategie terapeutiche.

b) Impiego potenziale nella diagnosi e nella terapia del cancro e potenziale impatto nelle problematiche di salute pubblica connesse a patologie tumorali

Moduli

Modulo:	Ruolo delle proteine cromatiniche nella tumorigenesi
Istituto esecutore:	Istituto per l'endocrinologia e l'oncologia sperimentale "Gaetano Salvatore"
Luogo di svolgimento attività:	Sede principale Istituto

Modulo:	Caratterizzazione di nuovi co-regolatori trascrizionali coinvolti nel differenziamento e nella tumorigenesi tiroidea
Istituto esecutore:	Istituto per l'endocrinologia e l'oncologia sperimentale "Gaetano Salvatore"
Luogo di svolgimento attività:	Sede principale Istituto



Modulo: Identificazione e caratterizzazione funzionale dei geni e delle proteine coinvolti nella tumorigenesi tiroidea
Istituto esecutore: Istituto per l'endocrinologia e l'oncologia sperimentale 'Gaetano Salvatore'
Luogo di svolgimento attività: Sede principale Istituto

Modulo: Strategie innovative per la terapia e la diagnosi dei tumori
Istituto esecutore: Istituto per l'endocrinologia e l'oncologia sperimentale 'Gaetano Salvatore'
Luogo di svolgimento attività: Sede principale Istituto

Risorse commessa 2008

Pers. tempo ind/det	Funz.+ Invest.	Spese da Fonti Esterne	Spese per Infrastrutt. tecn.-scient a gestione accentrata	Totale	Risorse da esercizi precedenti	Massa Spendibile	Costi figurativi	Spese generali accentrate	Valore Effettivo
1	2	3	4	5=1+2+3+4	6	7=2+3+6	8	9	10=5+6+8+9
1.490	0	461	0	1.951	100	561	449	N.D.	2.500

valori in migliaia di euro

<i>Unità di personale di ruolo*</i>	
ricercatori	Totale
25	37

*equivalente tempo pieno

<i>Unità di personale non di ruolo</i>									
associato	dottorando	borsista	assegnista	specializzando	incaricato di ricerca	professore visitatore	collaboratore professionale	altro	Totale
34	3	1	1	0	0	0	0	2	41

<i>Richiesta nuove unità di personale</i>			
tempo determinato	tempo indet	non di ruolo*	Totale
2	5	0	7

*dottorati, borse di studio, assegni di ricerca



Controllo trascrizionale e post-trascrizionale nello sviluppo, nel differenziamento cellulare e nella trasduzione del segnale

Dati generali

Progetto:	Meccanismi molecolari e segnali nel controllo di proliferazione, differenziamento e morte cellulare
Tipologia di ricerca:	Progetti di sviluppo competenze
Istituto esecutore:	Istituto di biomedicina e immunologia molecolare 'Alberto Monroy'
Sede principale svolgimento:	Sede principale Istituto
Dip. di prevista afferenza:	Scienze della Vita
Responsabile indicato:	AGATA GIALLONGO

Elenco dei partecipanti

	liv.		liv.		liv.
Anello Letizia	III	Giallongo Agata	I	Sanzone Sabrina	VII
Bongiovanni Antonella	III	Parisi Pietrina	V	Scatassa Valentina	VII
Cavoli Francesca	VII	Riccobono Daniela	VII	Spera Donatella	VII
Di Bernardo Maria	II	Romancino Daniele	III	Tarantino Providenza	VII
Geraci Domenico	I	Rubino Patrizia	VI	Turatto Rosa	VII

Temi

Tematiche di ricerca

La ricerca proposta riguarda lo studio delle fasi precoci dello sviluppo embrionale e del differenziamento cellulare in condizioni normali ed alterate. Le principali tematiche sono:

- analisi funzionale di geni con homeobox in relazione alla determinazione dei destini cellulari durante lo sviluppo embrionale
- caratterizzazione della funzione di BERF-1/ZBP-39 e Ozz-E3 nel differenziamento miogenico mediante l'uso di linee cellulari, colture primarie, topi KO per Ozz, silenziamento transiente dei geni di interesse e analisi del proteoma.

Stato dell'arte

Molte patologie sono legate al malfunzionamento di meccanismi che controllano l'espressione genica a diversi livelli: trascrizionale (attivazione e silenziamento di geni, tramite rimodellamento della cromatina o l'azione diretta di fattori della trascrizione) e post-trascrizionale (stabilità del messaggero e dei prodotti proteici), nonché ad alterazioni nella trasduzione del segnale. Nell'ambito di questa tematica i nostri risultati hanno dimostrato che il silenziamento di Ozz comporta un danno tissutale a carico del muscolo nei topi KO. Un'altra tematica affrontata ha portato all'identificazione di un effetto negativo sul differenziamento miogenico da parte di mutanti del fattore della trascrizione BERF-1/ZBP-39. Nel riccio di mare abbiamo identificato una relazione funzionale fra la perturbazione dell'espressione di specifici geni regolatori tra cui PIHbox12 e modificazioni essenziali nel pattern di sviluppo.

Azioni

Attività da svolgere

Attività previste:

- identificazione di siti di legame per fattori di regolazione della trascrizione del gene di riccio di mare HB12 e studio del coinvolgimento di networks molecolari;
- purificazione di una proteina di fusione GST-HB12 per la produzione di un anticorpo specifico.
- l'analisi preliminare delle linee BERF-1/TET On (mass culture di cellule miogeniche inducibili) non ha rilevato dei buoni livelli di induzione, per cui si procederà con l'isolamento di cloni singoli ed in parallelo con le cellule che esprimono ER-BERF-1. La stabilità del messaggero di BERF-1 potrebbe essere alla base della scarsa efficienza dell'espressione inducibile;
- gli stessi costrutti ed altri preparati nel corso di questo anno saranno usati per mappare i domini responsabili della stabilità/instabilità in un sistema cellulare TET/Off;
- analisi del ruolo di proteine partner di Ozz sulla localizzazione cellulare di Ozz e sui processi di endocitosi. Studi su linee cellulari muscolari (C2C12) e su colture primarie di cellule muscolari, isolate da topi wild-type o Ozz^{-/-}, silenziate o meno con il sistema RNAi specifico per l'espressione delle proteine in esame.



Punti critici e azioni da svolgere

Le attività proposte non presentano particolari problematiche di natura tecnica, comunque di seguito sono descritti alcuni eventuali punti critici e possibili approcci alternativi:

- a) Lo studio dei fattori che regolano l'espressione di HB12 verrà condotto mediante l'uso di anticorpi commerciali e anticorpi generati da noi e da altri contro i fattori in trans identificati in 'silico' sul promotore del gene. Sarà quindi necessaria una standardizzazione delle procedure.
- b) L'overespressione di BERF-1 potrebbe essere vanificata dal 'rate' di degradazione del messaggero se il sistema di induzione non è sufficientemente robusto. Per superare questo problema, e studiare in maniera alternativa gli effetti della modulazione dei livelli di BERF-1 in cellule miogeniche, si procederà con la messa a punto del silenziamento tramite la tecnica siRNA.
- c) A causa della diversa emivita delle proteine target del silenziamento con siRNA specifici (Ozz e suoi partner) sarà necessario diversificare e mettere a punto i protocolli di RNAi utilizzati.

Competenze, tecnologie e tecniche di indagine

Ci si avvarrà delle competenze di biologia cellulare e molecolare maturate negli anni dai singoli proponenti, basate anche su periodi di formazione e approfondimento di tematiche specifiche in laboratori internazionali, e di collaborazioni già in atto con gruppi di ricerca esterni. In aggiunta alla messa a punto di sistemi cellulari stabili e transienti per modulare l'espressione genica e identificare targets ed associazioni proteiche, il personale afferente alla commessa ha acquisito competenze per la generazione di topi geneticamente mutati e per la manipolazione tramite microiniezione di embrioni di riccio di mare.

Strumentazione

Microscopio a fluorescenza, termociclatore (standard e Real Time), microiniettore, citofluorimetro.

Tecniche di indagine

Bioteologie molecolari e cellulari: microiniezioni in embrioni, trasfezioni stabili e transienti, RNAi, microscopia a fluorescenza, western blot, immunoblot, gel bidimensionali, proteomica, spettrometria di massa, RT-PCR, Realtime PCR. Strategie per la generazione di modelli animali transgenici.

Tecnologie

Collaborazioni (partner e committenti)

Dip. Oncologia Sperimentale e Applicazioni Cliniche, Dip. Biologia Cellulare e Sviluppo, e Dipartimento di Medicina Sperimentale Sezione di Anatomia Umana Università di Palermo; SCRI, Dicit, H. San Raffaele, Milano; EU - NoE Marine Genomics; Genetics and Tumor Cell Biology Department, St. Jude CRH, Memphis, USA.

Iniziativa per l'acquisizione di ulteriori entrate

In attesa di riscontro: progetti di ricerca di interesse nazionale (PRIN Decreto ministeriale n. 1175/ric del 18/09/2007), 2007.

Presentazione di proposte di progetto a AIRC e TELETHON.

Finalità

Obiettivi

L'obiettivo è l'identificazione di nuovi targets molecolari nel network funzionale dello sviluppo embrionale e della specializzazione cellulare con lo scopo di formulare nuovi approcci farmacologici e terapeutici.

Risultati attesi nell'anno

Per quanto riguarda sviluppo, destino e specificazione cellulare del riccio di mare ci si aspetta di: a) ottenere informazioni sul coinvolgimento di fattori in trans necessari per l'attivazione/silenziamento del gene HB12; b) produrre un anticorpo policlonale specifico contro la proteina HB12. Riguardo l'identificazione di nuovi meccanismi di controllo che regolano il differenziamento miogenico, si prevede di: a) stabilire un sistema cellulare idoneo per modulare l'espressione di BERF-1/ZBP-39, da utilizzare per lo studio degli effetti sul differenziamento miogenico e per l'identificazione di target diretti e indiretti; b) caratterizzare in maniera definitiva le isoforme di BERF-1 e mappare le regioni di instabilità nel messaggero di BERF-1; c) valutare la relazione funzionale tra Ozz ed uno dei suoi partner proteici, in termini di localizzazione cellulare e regolazione dell'attività ubiquitina-ligasi.

Potenziale impiego

- per processi produttivi

Le conoscenze acquisite potrebbero in futuro essere utilizzate per lo sviluppo di test diagnostici e terapie mirate e quindi essere di particolare interesse per l'industria farmaceutica e l'industria biomedica



- per risposte a bisogni individuali e collettivi

A lungo termine, i risultati del progetto potranno contribuire al miglioramento del processo di diagnosi di patologie associate ad una alterazione dei meccanismi molecolari che regolano determinazione, proliferazione e differenziamento nelle prime fasi dello sviluppo.

Moduli

Modulo: Controllo trascrizionale e post-trascrizionale nello sviluppo, nel differenziamento cellulare e nella trasduzione del segnale

Istituto esecutore: Istituto di biomedicina e immunologia molecolare 'Alberto Monroy'

Luogo di svolgimento attività: Sede principale Istituto

Risorse commessa 2008

Pers. tempo ind/det	Funz.+ Invest.	Spese da Fonti Esterne	Spese per Infrastrutt. tecn.-scient a gestione accentrata	Totale	Risorse da esercizi precedenti	Massa Spendibile	Costi figurativi	Spese generali accentrate	Valore Effettivo
1	2	3	4	5=1+2+3+4	6	7=2+3+6	8	9	10=5+6+8+9
379	34	25	71	509	8	67	45	N.D.	562

valori in migliaia di euro

<i>Unità di personale di ruolo*</i>	
ricercatori	Totale
5	7

*equivalente tempo pieno

<i>Unità di personale non di ruolo</i>									
associato	dottorando	borsista	assegnista	specializzando	incaricato di ricerca	professore visitatore	collaboratore professionale	altro	Totale
1	1	0	2	0	0	0	1	0	5

<i>Richiesta nuove unità di personale</i>			
tempo determinato	tempo indet	non di ruolo*	Totale
0	3	2	5

*dottorati, borse di studio, assegni di ricerca



Interrelazione nucleo/citoplasma/mitocondri nell'omeostasi cellulare.

Dati generali

Progetto:	Meccanismi molecolari e segnali nel controllo di proliferazione, differenziamento e morte cellulare
Tipologia di ricerca:	Progetti relativi a linee tematiche a carattere strategico
Istituto esecutore:	Istituto di biomembrane e bioenergetica
Sede principale svolgimento:	Sede principale Istituto
Dip. di prevista afferenza:	Scienze della Vita
Responsabile indicato:	ERSILIA MARRA

Elenco dei partecipanti

	liv.		liv.		liv.
Atlante Anna	II	Lattanzio Paolo	V	Perlino Elda	II
Bobba Antonella	II	Marra Ersilia	I	Petragallo Vito Antonio	VI
Giannattasio Sergio	II	Merafina Riccardo Sandro	V	Vacca Rosa Anna	III
Greco Margherita	II	Moro Loredana	III	Valenti Daniela	III

Tem

Tematiche di ricerca

Studio e caratterizzazione delle vie di comunicazione citoplasma-nucleo nella risposta cellulare allo stress e di enzimi e fattori implicati nell'omeostasi di cofattori flavinici.

Identificazione di determinanti molecolari e caratterizzazione della bioenergetica mitocondriale nella morte cellulare di cellule eucariotiche animali e vegetali.

Caratterizzazione del meccanismo di morte cellulare programmata in *Saccharomyces cerevisiae*: ruolo del citocromo c, produzione di ATP, ruolo della comunicazione mitocondri-nucleo; sistemi proteolitici intracellulari.

Studio e caratterizzazione del network di interazioni intra- ed inter-cellulari nella regolazione di proliferazione, invasione e morte cellulare.

Individuazione di nuovi biomarkers tumorali per fini diagnostici e/o prognostici

Studio dei geni coinvolti nella regolazione dei processi che stimolano e/o inibiscono la proliferazione delle cellule eucarioti (omeostasi) e dei meccanismi responsabili di patologie a base proliferativa.

Stato dell'arte

Così come cellule diverse posseggono caratteristiche strutturali e funzionali differenti anche i mitocondri di varia origine si distinguono per proprietà di permeabilità e metabolismo diversi. I mitocondri si stanno rivelando fattori chiave nella regolazione della crescita/morte cellulare, nella segnalazione intracellulare e nell'integrazione dei segnali di stress. Il delicato bilancio fra morte e proliferazione cellulare è essenziale non solo nei processi di embriogenesi e omeostasi degli organismi viventi ma anche nella genesi di diverse patologie, dalle malattie degenerative al cancro. Alterazioni genetiche e/o metaboliche mitocondriali sono coinvolte nell'eziologia di diversi tumori, contribuendo sia al fenotipo invasivo delle cellule tumorali che alla resistenza ad andare incontro ad apoptosi in seguito a trattamento chemioterapico. Su queste basi, i mitocondri sono attualmente considerati potenziali targets nelle terapie oncologiche. L'alto grado di conservazione dei processi cellulari e molecolari fra lievito *S. cerevisiae* e gli eucarioti superiori rendono il lievito un sistema modello per gli studi sui geni e sulle vie metaboliche coinvolti in vari processi fisiopatologici



Azioni

Attività da svolgere

Identificazione dei determinanti molecolari e studio della bioenergetica mitocondriale nella patogenesi della Sindrome di Down.

Studio del ruolo dei sistemi proteolitici, di YCA1 e dei ROS nel meccanismo di rilascio del citocromo c nell'apoptosi di *S.Cerevisiae*. Sarà inoltre intrapreso uno studio volto ad analizzare se la risposta retrograda a disfunzioni mitocondriali abbia un ruolo nel meccanismo di AA-PCD.

Identificazione delle sorgenti responsabili della produzione di ROS in condizione di morte per apoptosi, e della molecola radicalica maggiormente coinvolta nei fenomeni neurodegenerativi. Studio dell'effetto di NO sulla funzionalità mitocondriale in corso di apoptosi.

Studio dei meccanismi molecolari di regolazione del fenotipo neoplastico in seguito a stress genetico e/o metabolico mitocondriale in cellule di prostata umana. Studio del ruolo di BRCA2 nella regolazione dell'invasione tumorale.

Studio dell'espressione di geni nucleari, quali il fattore di crescita TGF- β 1, il fattore di adesione Integrina B1C e il fattore apoptotico Bcl-2, coinvolti nel processo di proliferazione normale e tumorale in presenza e/o assenza di terapia ormonale.

Punti critici e azioni da svolgere

PUNTI CRITICI: Si ribadisce l'esigenza di rinnovare e/o integrare la strumentazione disponibile (incubatore crio-termostato; citometro a flusso).

Ulteriore punto critico resta la difficoltà di trattenere e/o attrarre giovani ricercatori per la mancanza di concrete prospettive quali borse di studio per dottorati e post-dottorati

CONDIZIONI DI FATTIBILITÀ: l'insieme delle competenze dei singoli ricercatori nel campo della biochimica, biologia molecolare e cellulare, unitamente alle facilities disponibili, rendono elevato il grado di fattibilità del progetto. L'interazione con altri istituti di ricerca sia italiani che stranieri facilita il raggiungimento degli obiettivi prefissati.

Competenze, tecnologie e tecniche di indagine

Competenze nel campo della Biologia cellulare, Biochimica, Biologia Molecolare e Genetica Molecolare con particolare riferimento a:

- Allestimento e mantenimento di colture di cellule tumorali, di neuroni, di cellule vegetali (*Nicotiana Tabacum*) e di lievito (*Saccharomyces cerevisiae*)
- Bioenergetica e biogenesi mitocondriale
- Studio dell'espressione genica in tessuti e/o colture cellulari umane.
- Interazione delle cellule con la matrice extracellulare (adesione)
- Meccanismi di regolazione dei processi di morte cellulare programmata, invasione/metastasi, proliferazione e resistenza alla morte cellulare
- Meccanismi di trasduzione del segnale out-in e in-out
- Meccanismi di regolazione dell'espressione genica e dell'attività di vie di segnale intracellulari
- Cross-talk nucleo-citoplasma-mitocondri

Strumentazione

- Spettrofotometri
- Spettrofluorimetri
- Elettroporatore
- Cappe per colture cellulari a flusso laminare
- Incubatori CO₂
- Thermal Cycler per PCR
- Apparati per elettroforesi e trasferimento di proteine ed acidi nucleici
- Densitometro Bio-Rad GS 700
- Laboratorio attrezzato per esperimenti di ibridazione molecolare con sonde radioattive
- Analizzatore di fluorescenza/chemiluminescenza/radioattivo Amersham Typhoon 8600
- HPLC
- Microscopio ottico
- Microscopio a contrasto di fase
- Microscopio in epifluorescenza



Tecniche di indagine

Saggi di caratterizzazione di morte cellulare (analisi di sopravvivenza cellulare, analisi di integrità del genoma nucleare, analisi di attività proteolitica)

Saggi di funzionalità mitocondriale (attività di carrier mitocondriali, indice di controllo respiratorio, dosaggi di attività enzimatica)

Saggi di caratterizzazione del fenotipo cellulare neoplastico (espressione di geni markers tumorali, attività di vie di trasduzione del segnale, adesione, invasione, proliferazione, resistenza alla morte cellulare, ...)

Trasfezione di cDNAs, antisense oligonucleotides, small interference RNAs (siRNA)

Analisi dell'espressione genica e della biosintesi delle proteine. Northern Blotting, Western Blotting, Analisi dell'immagine

Tecnologie

Manipolazione genetica di cellule umane in coltura (linee cellulari) mediante transfezione o trattamento chimico

Manipolazione genetica di cellule di lievito

Collaborazioni (partner e committenti)

Istituto di Neurologia e Medicina Molecolare, CNR, Roma

Dip Scienze per la Salute, Univ del Molise, Campobasso

Dept of Pathology, UT Southwestern Medical Center, Dallas (TX), USA

Dept of Pathology and Laboratory Medicine, University of Rochester (NY), USA

Dept of Cancer Biology, School of Medicine, Univ Massachussets, Worcester, MA, USA

Dip di Biologia e Patologia Vegetale, Univ Bari

CIR, Università Campus Biomedico, Roma

Dept of Molecular Biology, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX, USA

Dep de Biologia, Universidade do Minho, Braga, Portogallo

Biochemisches Institut der Universität Zürich, Svizzera

Medical Genetic Center, Vilnius University Hospital, Lituania

Institute Pasteur de Tunis, Tunisi, Tunisia

Dip dell'emergenza e dei trapianti di organi, Univ Bari

Dip Anatomia Patologica e di Genetica (DAPEG), Sezione di Anatomia Patologica, Univ Bari

Laboratorio di Biologia Sperimentale, Istituto Oncologico, Bari

Dip Biologia e Patologia Molecolare e Cellulare, Facoltà di Medicina, Univ Federico II Napoli

Institut fur Biochemie und Molekular Biologie, Universitat Freiburg, Freiburg, Germany

Dip Biologia Cellulare, Univ della Calabria, Arcavacata di Rende (CS)

Iniziative per l'acquisizione di ulteriori entrate

L'attività di ricerca della commessa pur essendo in prevalenza orientata verso la ricerca di base è caratterizzata anche da una forte componente di trasferimento tecnologico. Alla luce di queste proprietà già da tempo sono state sviluppate linee di ricerca fortemente orientate verso il settore biomedico con notevoli potenzialità di sviluppo di protocolli diagnostici e/o prognostici in campo applicativo. Pertanto si è costituita una fitta rete di collaborazioni tale da consentire una proficua interazione con gruppi clinici che ci consentirà di presentare application per progetti finalizzati alla ricerca orientata.

Si prevede la:

Presentazione di progetti di collaborazione scientifica multilaterale presso Agenzie nazionali ed internazionali

Partecipazione a network internazionali per accedere a finanziamenti nell'ambito del VII Programma Quadro della Comunità Europea.

Progetti bilaterali

Progetti di cooperazione e trasferimento tecnologico con Paesi Terzi Mediterranei.



Finalità

Obiettivi

In diversi sistemi cellulari modello si caratterizzeranno:

La sequenza di eventi ed i determinanti molecolari coinvolti nel signaling della morte e della proliferazione cellulare

Il ruolo dei mitocondri nella risposta cellulare allo stress e nella resistenza alla morte cellulare.

Il ruolo di alcuni geni codificanti proteine di regolazione nel processo di proliferazione cellulare durante la progressione da cellula normale a cellula maligna trasformata.

I biomarkers con potenzialità diagnostica nel distinguere il tumore dalle patologie benigne dello stesso organo

Le vie di trasduzione di segnali in-out e out-in alterate durante l'inizio e/o la progressione tumorale al fine di individuare nuovi bersagli molecolari per innovative strategie terapeutiche anti-tumorali

Il ruolo dei mitocondri nella bioenergetica della morte cellulare programmata in colture cellulari di *Nicotian tabacum* sottoposte a shock termico

La sequenza degli eventi e dei determinanti molecolari coinvolti nel meccanismo molecolare della morte cellulare programmata indotta da acido acetico in *S. cerevisiae*.

Risultati attesi nell'anno

PUBBLICAZIONI SCIENTIFICHE su riviste nazionali ed internazionali;

SVILUPPO di tecnologie che consentono la comprensione di meccanismi di base e possibili applicazioni;

TRASFERIMENTO TECNOLOGICO di metodologie sperimentali verso ospedali, Laboratori di analisi, Parchi scientifici e tecnologici e PMI nel campo bio-sanitario.

IDENTIFICAZIONE di composti farmacologicamente attivi in grado di limitare lo stress ossidativo che si instaura nella morte cellulare per apoptosi.

IDENTIFICAZIONE DI BERSAGLI TERAPEUTICI per patologie tumorali e neurodegenerative.

Identificazione della sequenza di eventi e valutazione della correlazione causale-temporale negli stadi molecolari cruciali della morte cellulare programmata

Identificazione di nuovi biomarkers aventi potenzialità diagnostica nel distinguere il tumore dalle patologie benigne dello stesso organo

Caratterizzazione del ruolo dei mitocondri nell'eziologia del carcinoma di prostata

Potenziale impiego

- per processi produttivi

Le tecnologie biologiche messe a punto nello sviluppo delle attività di ricerca della commessa hanno una importante ricaduta nel campo della salute umana. Esse rappresentano un valido potenziale per il trasferimento tecnologico in campo sanitario sia a livello di prevenzione che di intervento terapeutico. Gli studi in corso sono finalizzati all'individuazione di composti che influenzino positivamente la funzionalità cellulare e mitocondriale. I risultati attesi potrebbero aprire nuove prospettive sia a livello di prevenzione che di intervento terapeutico in diverse malattie neurodegenerative e proliferative. Inoltre, nell'ambito dello sviluppo di farmaci basati sul bersaglio, il lievito *S. cerevisiae* costituisce un valido strumento per lo studio dell'interazione chimica fra farmaci e bersagli biologici.

Parole chiave: peptici neurotossici, agenti farmacologici, agenti antitumorali, diagnostica, clinica

- per risposte a bisogni individuali e collettivi

Individuazione di molecole ad azione anti- e pro-apoptotica e di nuovi bersagli molecolari per la diagnosi e la terapia di patologie neoplastiche e neurodegenerative.

Design di nuovi farmaci contro specifici targets molecolari al fine di bloccare/rallentare la progressione della morte cellulare, la proliferazione cellulare tumorale e/o la formazione di metastasi

Individuazione di nuovi markers biologici per la diagnosi e terapia dei tumori e delle malattie degenerative



Moduli

Modulo: Interrelazione nucleo/citoplasma/mitocondri nell'omeostasi cellulare.
Istituto esecutore: Istituto di biomembrane e bioenergetica
Luogo di svolgimento attività: Sede principale Istituto

Risorse commessa 2008

Pers. tempo ind/det	Funz.+ Invest.	Spese da Fonti Esterne	Spese per Infrastrutt. tecn-scient a gestione accentrata	Totale	Risorse da esercizi precedenti	Massa Spendibile	Costi figurativi	Spese generali accentrate	Valore Effettivo
1	2	3	4	5=1+2+3+4	6	7=2+3+6	8	9	10=5+6+8+9
731	4	43	0	778	50	97	80	N.D.	908

valori in migliaia di euro

<i>Unità di personale di ruolo*</i>	
ricercatori	Totale
9	12

*equivalente tempo pieno

<i>Unità di personale non di ruolo</i>									
associato	dottorando	borsista	assegnista	specializzando	incaricato di ricerca	professore visitatore	collaboratore professionale	altro	Totale
1	0	0	0	0	0	0	0	0	1

<i>Richiesta nuove unità di personale</i>			
tempo determinato	tempo indet	non di ruolo*	Totale
0	3	0	3

*dottorati, borse di studio, assegni di ricerca



Trasduzione del segnale e malattie multifattoriali

Dati generali

Progetto:	Meccanismi molecolari e segnali nel controllo di proliferazione, differenziamento e morte cellulare
Tipologia di ricerca:	Progetti relativi a linee tematiche a carattere strategico
Istituto esecutore:	Istituto di biologia cellulare
Sede principale svolgimento:	Sede principale Istituto
Dip. di prevista afferenza:	Scienze della Vita
Responsabile indicato:	STEFANO ALEMA'

Elenco dei partecipanti

Alema' Stefano	liv. I	Cozzari Costantino	liv. III	Papoff Giuliana	liv. III
Cardinali Beatrice	III	Falcone Germana	II	Ruberti Giovina	I
Cascino Isabella	III				

Temi

Tematiche di ricerca

Generazione di modelli animali e cellulari per lo studio dei regolatori negativi dei recettori tirosin-chinasi. Definizione dei meccanismi di controllo del citoscheletro di actina esercitato da tirosina-chinasi e da GTPasi. Ruolo dei complessi giunzionali cellula-cellula nella proliferazione e trasformazione di cellule epiteliali. Identificazione di target trascrizionali della proteina p63. Caratterizzazione del controllo post-trascrizionale di messaggeri tessuto-specifici. Ruolo dei micro RNA durante la miogenesi. Meccanismi di regolazione della funzione di FADD e TRADD nell'apoptosi, proliferazione, ciclo cellulare ed immunità. Regolazione del traffico nucleo/citoplasma, della compartimentalizzazione e delle modificazioni post-traduzionali di FADD e TRADD. Ricerca di sequenze che regolano la stabilità del mRNA e la localizzazione cellulare di CTLA-4. Caratterizzazione funzionale di polimorfismi associati al diabete di tipo I ed alla spondilite anchilosante.

Stato dell'arte

Stimoli extra ed intracellulari e mediatori coinvolti nell'innescamento, trasmissione ed esecuzione di specifici segnali di proliferazione cellulare, apoptosi e differenziamento sono stati identificati e caratterizzati in diversi organismi e sistemi cellulari. Tuttavia i meccanismi molecolari che regolano il destino cellulare e l'azione di mediatori coinvolti nella trasduzione di segnali diversi (es. sia apoptosi che proliferazione cellulare) sono ancora poco noti. Il tentativo di comprendere alcuni dei meccanismi molecolari che generano la diversità cellulare e la morte cellulare, ancorchè ambizioso è tuttavia supportato dalle recenti tecnologie postgenomiche delle quali noi pianifichiamo fare grande uso in questa proposta. La nostra convinzione che una migliore conoscenza del meccanismo di azione di mediatori del segnale dovrebbe fornire la base razionale per l'identificazione di nuove classi di agenti terapeutici selettivi.

Azioni

Attività da svolgere

Identificazione dei meccanismi alla base della regolazione negativa dei recettori ErbB da parte di RALT, un inibitore retroattivo, e di come la deregolazione di RALT contribuisce alla progressione tumorale. I livelli di espressione di RALT verranno correlati con la suscettibilità di cellule cancerose umane al trattamento con farmaci specifici anti-ErbB. Identificazione dei geni bersaglio dei microRNA modulati nella miogenesi e studio della loro funzione biologica nella progressione e nel mantenimento del differenziamento muscolare. Studio dei meccanismi che regolano la fosforilazione e defosforilazione di FADD nel ciclo cellulare, e messa a punto di sistemi cellulari per l'analisi del ruolo di FADD/CaM in mitosi, apoptosi e immunità naturale. Nella Spondilite Anchilosante verranno analizzati 4 geni candidati (NKG2, Rorc, IL23R e Arts1); nel Diabete di Tipo 1 verrà approfondito lo studio del gene FOXP3.

Organizzazione di una piattaforma di sistemi modello (lievito, *C. elegans*, *Drosophila*, *Xenopus laevis*) con altri gruppi del Dipartimento Scienze della Vita nell'ambito del Progetto Interdipartimentale Farmaco.



Punti critici e azioni da svolgere

Necessità di reperire risorse finanziarie.

Difficoltà nella reperibilità di campioni di DNA di controlli sardi HLA-B*2705 positivi.

Difficoltà nel reperimento di un alto numero di campioni di DNA gnomico di casi e controlli. La collaborazione con i medici clinici interessati, permetterà l'ampliamento delle coorti utili a questo tipo di studio.

Competenze, tecnologie e tecniche di indagine

Per la natura multidisciplinare dell'approccio proposto è richiesta esperienza in molte aree distinte. Il lavoro svolto negli ultimi anni dai componenti di questa commessa ha portato da una parte all'acquisizione di una competenza di eccellenza in discipline quali la biologia molecolare e cellulare, l'immunologia la genetica, dall'altra alla disponibilità di un vasto numero di regenti molecolari e cellulari che saranno estremamente utili negli studi qui proposti.

Strumentazione

Sintetizzatore di oligonucleotidi; Luminometro; Microscopio a fluorescenza e confocale; Citofluorimetro; Sequenziatore capillare ABI Prism 310; 7500 Fast Real Time PCR System; Phosphor Imager, Storm 8600.

Tecniche di indagine

Propagazione e conservazione di colture cellulari in sospensione ed aderenti. Studio del ciclo cellulare mediante tecniche citofluorimetriche. Sincronizzazione cellulare in G1 e G2/M. Tecniche di immunofluorescenza, microscopio confocale. Tecniche di rivelazione di geni apoptotici. Identificazione mediante microscopia ottica e citofluorimetria di cellule apoptotiche. Tecniche di estrazione e purificazione di RNA totale. Analisi dei trascritti mediante Northern blotting e RT-PCR. Ibridazione in situ su colture cellulari. Tecniche di clonaggio del DNA, mutagenesi, trasformazione batteri. Caratterizzazione di regioni genomiche. Metodi di trasfezione di cellule eucariotiche. Produzione di proteine ricombinanti in sistemi procariotici ed eucariotici. Frazionamenti cellulari. Saggi di pull down con proteine ricombinate (prodotte in E. coli o mediante trascrizione e traduzione in vitro) ed estratti cellulari. Immunoprecipitazione ed ELISA. Saggi di luciferasi.

Tecnologie

Tecnologia del DNA ricombinante per produrre nuovi potenziali agenti terapeutici, molecole che regolino positivamente o negativamente segnali cellulari. Produzione di retrovirus e lentivirus.

Ricerca di proteine interagenti mediante le tecnologie Yeast Two hybrid system e » phage display. Tecniche di analisi di micro-RNA con PCR quantitativa. Screening di librerie di siRNA su cellule.

Collaborazioni (partner e committenti)

La commessa si avvale di numerose collaborazioni con istituzioni italiane e straniere: INMM-CNR (Roma); IC-CNR (Trieste); Università La Sapienza, Dipartimento di Biologia Cellulare (Roma); Università di Tor Vergata (Roma); IDI (Roma); Istituto Superiore di Sanità (Roma); Istituto Regina Elena (Roma); Istituto FIRC di Oncologia Molecolare (Milano); DIBIT (Milano); Università di Udine; National Cancer Institute, (Bethesda, USA), Roswell Park Cancer Hospital (Buffalo, USA).

Iniziative per l'acquisizione di ulteriori entrate

I Ricercatori afferenti alla commessa hanno presentato Progetti di Ricerca al PRIN e all'Associazione Francese per le Miopatie. Sono previste domande di fondi ad Associazioni private quali Telethon ed AIRC.

Finalità

Obiettivi

Studio dei regolatori negativi dei recettori tirosin-chinasi e loro ruolo nella trasformazione tumorale e nel differenziamento. Definizione dei meccanismi di controllo del citoscheletro di actina e ruolo dei complessi giunzionali cellula-cellula nella proliferazione e trasformazione di cellule epiteliali. Caratterizzazione del controllo post-trascrizionale di geni tessuto-specifici. Meccanismi di regolazione della funzione delle proteine FADD e TRADD nell'apoptosi, proliferazione, ciclo cellulare ed immunità. Caratterizzazione funzionale di polimorfismi associati a patologie umane quali il diabete di tipo I e la spondilite anchilosante.

Risultati attesi nell'anno

Analisi a livello genetico e biochimico dell'endocitosi regolata da RALT sia dell'EGFR che degli altri recettori ErbB. Capitalizzando sull'abilità di RALT di interagire con proteine implicate nell'endocitosi dell'EGFR, verranno delineati i meccanismi molecolari implicati nella piattaforma di endocitosi coordinata da RALT. Identificazione di alcuni geni bersaglio dei miRNA modulati nel differenziamento muscolare, normale o alterato dalla presenza della tirosina chinasi v-Src, e identificazione dei processi biologici in cui essi sono implicati. Caratterizzazione di nuovi meccanismi di regolazione della funzione di FADD. Associazione statisticamente significativa delle malattie in studio con alcuni dei geni presi in esame.



Potenziale impiego

- per processi produttivi

Non si prevedono impieghi in processi produttivi

- per risposte a bisogni individuali e collettivi

I progetti di ricerca in corso nell'ambito della commessa dovrebbero fornire risultati con potenziali ricadute applicative nell'ambito della caratterizzazione genetica di malattie umane. Gli strumenti molecolari e cellulari generati, quali sequenze geniche, virus, anticorpi, linee cellulari e modelli animali, saranno messi a disposizione della comunità scientifica per il loro uso nella ricerca di base e per applicazioni innovative in campo farmaceutico, diagnostico e della medicina molecolare.

Moduli

Modulo: Trasduzione del segnale e malattie multifattoriali

Istituto esecutore: Istituto di biologia cellulare

Luogo di svolgimento attività: Sede principale Istituto

Risorse commessa 2008

Pers. tempo ind/det	Funz.+ Invest.	Spese da Fonti Esterne	Spese per Infrastrutt. tecn.-scient a gestione accentrata	Totale	Risorse da esercizi precedenti	Massa Spendibile	Costi figurativi	Spese generali accentrate	Valore Effettivo
1	2	3	4	5=1+2+3+4	6	7=2+3+6	8	9	10=5+6+8+9
408	0	0	287	695	46	46	26	N.D.	767

valori in migliaia di euro

<i>Unità di personale di ruolo*</i>	
ricercatori	Totale
6	6

*equivalente tempo pieno

<i>Unità di personale non di ruolo</i>									
associato	dottorando	borsista	assegnista	specializzando	incaricato di ricerca	professore visitatore	collaboratore professionale	altro	Totale
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

<i>Richiesta nuove unità di personale</i>			
tempo determinato	tempo indet	non di ruolo*	Totale
3	2	0	5

*dottorati, borse di studio, assegni di ricerca



Segnali cellulari critici nella biologia della cellula neoplastica

Dati generali

Progetto:	Meccanismi molecolari e segnali nel controllo di proliferazione, differenziamento e morte cellulare
Tipologia di ricerca:	Progetti relativi a linee tematiche a carattere strategico
Istituto esecutore:	Istituto di biomedicina e immunologia molecolare 'Alberto Monroy'
Sede principale svolgimento:	Sede principale Istituto
Dip. di prevista afferenza:	Scienze della Vita
Responsabile indicato:	MELCHIORRE CERVELLO

Elenco dei partecipanti

	liv.		liv.		liv.
Azzolina Antonina	VIII	Di Blasi Francesco	III	Sanzone Sabrina	VII
Barbieri Giovanna	III	Geraci Domenico	I	Scatassa Valentina	VII
Cavoli Francesca	VII	Lampiasi Nadia	III	Spera Donatella	VII
Cervello Melchiorre	II	Parisi Pietrina	V	Tarantino Provvidenza	VII
Costa Maria Assunta	III	Riccobono Daniela	VII	Turatto Rosa	VII

Temi

Tematiche di ricerca

Ci proponiamo di esaminare l'attività antitumorale di inibitori di diverse vie di sopravvivenza e proliferazione (NF-kB, Akt, Raf/MEK/ERK), o di attività enzimatiche (aromatasi, COX-1, COX-2, proteasoma) sicuramente implicate nella biologia della cellula neoplastica. Saranno analizzati il signalling delle molecole MHC II nelle cellule di melanoma e l'interazione tra TCR e MHC II, così come il pathway apoptotico attivato nelle cellule di melanoma dal trattamento con alcuni derivati dell'organotin (IV).

Stato dell'arte

L'incidenza del CPF è aumentata negli ultimi anni, dovuta alla diffusione dei virus dell'epatite C e B, diventando una delle dieci neoplasie più frequenti nel mondo. In Sicilia, dove la diffusione dei virus epatitici è tra le più alte d'Italia, oltre 500 persone/anno muoiono a causa del CPF. L'estrema resistenza del melanoma ai trattamenti terapeutici, ha determinato lo studio dell'immunoterapia e l'identificazione di target molecolari critici per l'individuazione di nuovi agenti chemioterapici.

Azioni

Attività da svolgere

Valuteremo in linee cellulari di epatocarcinoma umano in coltura, l'attività antitumorale e pro-apoptica di inibitori specifici di differenti vie di sopravvivenza e proliferazione (COX-2, Raf/MEK/ERK, proteasoma) tutte potenzialmente implicate nella biologia e nella farmacoresistenza del carcinoma epatico. Studieremo inoltre i meccanismi alla base degli effetti antitumorali analizzando eventuali modificazioni molecolari a livello sia di mRNA sia proteico di proteine IAP, proteine della famiglia Bcl-2, COX-2 e mdr-1. Inoltre, studieremo il coinvolgimento dello stress ossidativo e di proteine implicate nella risposta allo stress del reticolo endoplasmatico. Inoltre è nostra intenzione stabilire l'eventuale associazione delle molecole di classe II con i recettori di adesione tra cui le integrine nella frazione delle raft lipidiche delle cellule di melanoma stimulate. Inoltre è nostra intenzione studiare in cellule di melanoma gli effetti del trattamento con concentrazioni ridotte dei complessi (Bu₃Sn)₄TPPS e (Bu₂Sn)₂TPPS sulla mobilità e l'interazione cellula-cellula allo scopo di stabilire il ruolo di queste sostanze nella regressione dello stato metastatico delle cellule di melanoma.

Punti critici e azioni da svolgere

La programmazione sperimentale, le azioni da svolgere e la loro fattibilità sembrano appropriate ai risultati che ci si propone di ottenere. Tuttavia, rimangono alcuni problemi che frenano lo sviluppo dell'attività di ricerca:

1. gran parte della strumentazione è obsoleta e andrebbe sostituita;
2. carenza di personale in formazione (borsisti e assegnisti);
3. impossibilità di avere nuovi collaboratori a tempo indeterminato. Queste ultime due condizioni limitano moltissimo una programmazione della ricerca in termini pluriennale.

Inoltre, rimane il problema della mancanza di una 'facility' per stabulare animali da esperimento, cosa che darebbe la possibilità alla commessa di effettuare studi 'in vivo' con conseguente salto di qualità della ricerca.



Competenze, tecnologie e tecniche di indagine

La Commessa si avvale delle competenze di biochimica, biologia molecolare e cellulare possedute dai componenti del gruppo di ricerca.

Strumentazione

cappe a flusso laminare, incubatori CO₂, microscopi a fluorescenza, citofluorimetro, luminometro, centrifughe, ultracentrifughe, termociclatore, apparecchi per elettroforesi di proteine e acidi nucleici

Tecniche di indagine

culture cellulari, western blot, RT-PCR, PCR, immunofluorescenza indiretta, immunisto chimica, immunoprecipitazione, frazionamenti cellulari, citofluorimetria, trasfezioni cellulari.

Tecnologie

Collaborazioni (partner e committenti)

Collaborazioni con Istituti Nazionali ed Internazionali: Dipartimento Medicina Clinica e delle Patologie Emergenti, Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Istituto di Anatomia Patologica, Dipartimento di Chimica Inorganica e Analitica, Università di Palermo; ISMETT, Palermo; U624 Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale (INSERM), Marseille, France; Institut Biomédical des Cordeliers Università Paris 7, Parigi, France.

Iniziativa per l'acquisizione di ulteriori entrate

Abbiamo partecipato, come Unità Operativa, al Bando PRIN per l'anno 2007 (fondi acquisibili nel 2008). Abbiamo presentato, come Unità Operativa, un progetto nell'ambito del Programma per la Ricerca Sanitaria 2007 - Regione Siciliana (fondi acquisibili nel 2008). Presenteremo una nuova richiesta di rinnovo del progetto di ricerca dell'Associazione per la Ricerca sul Cancro (AIRC: call for proposal 2008) e dell'Association for International Cancer Research (AICR: April 2008 round). Abbiamo in corso un Progetto dell'Agenzia Spaziale (ASI) che prevede nuove entrate per l'anno 2008.

Finalità

Obiettivi

L'obiettivo del progetto è l'acquisizione di nuove conoscenze riguardanti i meccanismi molecolari responsabili dell'acquisizione e del mantenimento del fenotipo trasformato, allo scopo di individuare target molecolari per lo sviluppo di nuove opzioni terapeutiche, e per l'ottimizzazione dell'immunoterapia, nel trattamento del carcinoma epatico e del melanoma umano.

Risultati attesi nell'anno

La ricerca proposta potrà chiarire il ruolo di alcune vie di segnalazione che controllano la sopravvivenza e proliferazione delle cellule di epatocarcinoma umano. L'approccio della terapia di combinazione, riducendo le dosi di ciascun inibitore necessarie per ottenere gli effetti antitumorali, può ridurre le gli effetti collaterali associati alle monoterapie ad alte dosi. In considerazione del fatto che ciascuno dei farmaci che saranno utilizzati in questo studio è già in uso clinico, la ricerca proposta potrà essere utile ai fini sviluppare nuove strategie terapeutiche per il trattamento del carcinoma epatico. Tramite esperimenti di coimmunoprecipitazione sarà possibile identificare i recettori di adesione, tra cui probabilmente le integrine, associati alle molecole di classe II nella frazione delle raft lipidiche delle cellule di melanoma stimulate. Inoltre, tramite esperimenti di "in vitro wound repair", probabilmente sarà possibile osservare una marcata inibizione della mobilità cellulare e dell'interazione cellula-cellula nelle cellule di melanoma trattate con i complessi (Bu₃Sn)₄TPPS e (Bu₂Sn)₂TPPS usati alla concentrazione rispettivamente di 80nM e 500nM.

Potenziale impiego

- per processi produttivi

chemoterapici: protocolli di ottimizzazione di "targeted therapy".

- per risposte a bisogni individuali e collettivi

potenziamento dell'immunoterapia e della chemioterapia tramite lo studio del cross-talk tra cellule tumorali e del sistema immunitario e identificazione di target molecolari critici per la crescita delle cellule tumorali.



Moduli

Modulo: Segnali cellulari critici nella biologia della cellula neoplastica
Istituto esecutore: Istituto di biomedicina e immunologia molecolare 'Alberto Monroy'
Luogo di svolgimento attività: Sede principale Istituto

Risorse commessa 2008

Pers. tempo ind/det	Funz.+ Invest.	Spese da Fonti Esterne	Spese per Infrastrutt. tecn-scient a gestione accentrata	Totale	Risorse da esercizi precedenti	Massa Spendibile	Costi figurativi	Spese generali accentrate	Valore Effettivo
1	2	3	4	5=1+2+3+4	6	7=2+3+6	8	9	10=5+6+8+9
276	34	36	71	417	30	100	38	N.D.	485

valori in migliaia di euro

<i>Unità di personale di ruolo*</i>	
ricercatori	Totale
5	6

*equivalente tempo pieno

<i>Unità di personale non di ruolo</i>									
associato	dottorando	borsista	assegnista	specializzando	incaricato di ricerca	professore visitatore	collaboratore professionale	altro	Totale
0	0	0	0	0	0	0	0	3	3

<i>Richiesta nuove unità di personale</i>			
tempo determinato	tempo indet	non di ruolo*	Totale
1	3	2	6

*dottorati, borse di studio, assegni di ricerca



Sviluppo, Differenziamento e Trasformazione Cellulare

Dati generali

Progetto:	Meccanismi molecolari e segnali nel controllo di proliferazione, differenziamento e morte cellulare
Tipologia di ricerca:	Progetti relativi a linee tematiche a carattere strategico
Istituto esecutore:	Istituto di neurobiologia e medicina molecolare
Sede principale svolgimento:	Sede principale Istituto
Dip. di prevista afferenza:	Scienze della Vita
Responsabile indicato:	FELICE TIRONE

Elenco dei partecipanti

	liv.		liv.		liv.
Baron Livio	IV	Farioli Vecchioli Stefano	III	Moretti Fabiola	III
Bracci Laudiero Luisa	III	Febbraro Cardello Vincenzo	VIII	Papa Pamela	VII
Caruso Maurizia	II	Levi Andrea	I	Salvatore Anna Maria	III
Dominici Roberto	V	Maresci Americo	IV	Tirone Felice	II

Temi

Tematiche di ricerca

Isolamento di cellule staminali emopoietiche, muscolari e neurali. Analisi dei parametri del ciclo cellulare tramite citometria a flusso. Interazioni DNA-proteina nel contesto cromatinico e analisi di espressione genica. Sviluppo di sistemi di RNA interference in linee cellulari, di peptidi e di mutanti dominanti-negativi per il blocco selettivo della funzione delle proteine studiate e/o per fattori che ne regolano l'espressione o l'attività. Creazione di modelli animali di tumorigenesi.

Stato dell'arte

Durante lo sviluppo di un organismo, le cellule embrionali acquistano uno specifico destino cellulare, differenziano e cessano di proliferare. Questi processi sono indotti da segnali extracellulari che regolano fattori trascrizionali tessuto-specifici la cui attività è strettamente associata al controllo del ciclo cellulare. L'alterazione di queste regolazioni è all'origine della tumorigenesi, ove la cellula perde la capacità differenziativa e acquista un illimitato potenziale proliferativo.

Azioni

Attività da svolgere

- 1) Studio dei meccanismi molecolari tramite cui la ciclina D3 regola il differenziamento miogenico. Proseguimento della caratterizzazione dei processi molecolari tramite cui pRb induce l'espressione di fattori di rimodellamento della cromatina durante la miogenesi.
- 2) studi sulla funzione di TLQP-21, studi sul ruolo di HIF-1 nella crescita di tumori cerebrali
- 3) Studio delle funzioni differenziate neuronali del gene PC3 e della sua possibilità di utilizzo nella terapia del medulloblastoma
- 4) Studio del ruolo del gene PC4/IFRD1 nella rigenerazione del muscolo.
- 5) Misura della internalizzazione/recycling/degradazione del recettore per l'EGF in cellule epiteliali silenziate per p120; studio in queste cellule della macropinosi regolata da Rac1.
- 6) Creazione di un topo transgenico esprime un nuovo oncogene identificato precedentemente nel nostro gruppo, HDMX211.
- 7) Studio del ruolo proapoptotico di MDM4 in diverse condizioni di danno cellulare: a tal scopo verranno utilizzati dei modelli animali transgenici per MDM4 in collaborazione con la Dr.ssa Lozano (University of Texas).

Punti critici e azioni da svolgere

- 1) Identificazione di cellule responsive a TLQP-21; inibizione di HIF-1 tramite RNAi in linee di glioblastoma
- 2) Problematiche legate alla produzione di mutanti murini (transgenici e knock out, i quali sono essenziali alla definizione della funzione biologica dei geni): tempi lunghi e costi elevati, per produrli e analizzarli.

Competenze, tecnologie e tecniche di indagine

I partecipanti alla commessa hanno elevate competenze di biologia molecolare e cellulare, di biologia dello sviluppo, di biochimica delle proteine, microscopia ottica e confocale. Hanno inoltre competenza nella produzione e analisi di modelli animali per studi preclinici.



Strumentazione

- Real time PCR;
- Facility per la stabulazione di topi e apparecchiature per la produzione e utilizzo di animali transgenici e knock out
- Microscopia a fluorescenza e confocale
- Imaging system per visualizzazione e quantificazione di acidi nucleici e proteine (Odissey e Geldoc Biorad)
- Spettrofluorimetro, luminometro e citofluorimetro
- Laboratorio radioisotopi; strumentazione per la misurazione di traccianti radioattivi (beta e gamma counter)
- Autoclavi, stufe, lavastoviglie
- Camere sterili per colture cellulari a livello di sicurezza P2
- Agitatori per crescita batteri
- Supercentrifughe e ultracentrifuga
- Freezers a -80 C
- Camere termostate a +37 C e +4 C
- Facility di neuro-genomica funzionale in collaborazione con EBRI (strumentazione per ibridare e analizzare microarrays Agilent);
- Facility per la criopreservazione in azoto liquido

Tecniche di indagine

- Tecniche di ingegneria genetica per l'isolamento e la modificazione di geni
- Tecniche di biologia molecolare per l'analisi dell'espressione genica (PCR quantitativa; quantificazione di espressione genica mediante saggi con geni reporter (mediante radioattività e/o luminescenza)
- Tecniche per esprimere geni in cellule ed animali tramite vettori virali (lentivirus; retrovirus; adenovirus)
- Tecniche di genomica funzionale (immunoprecipitazione della cromatina; microarray analysis; PCR quantitativa su array di geni [Applied Biosystem])
- Metodi per l'analisi molecolare e morfologica a livello microscopico (immunoistochimica)
- Microscopia confocale

Tecnologie

- Studi per la produzione di modelli animali e cellulari per terapia genica

Collaborazioni (partner e committenti)

Dip. di Ematologia e Banca del Sangue Placentare, Ospedale S.Eugenio,
Universita' di Tor Vergata, Roma. Dipartimenti di Ematologia, di Immunologia, di Neurochirurgia e di Patologia.
Clinica dell'Universita' Cattolica del S. Cuore, Roma.
Casa di Cura S. Raffaele, Roma.
Ist. Tumori Regina Elena, Roma
Univ. di Chieti - Sezione di Patologia Molecolare Diagnostica.
Istituti Ortopedici Rizzoli -
Lab di Ricerca Oncologica, Roma.
Dip. di Medicina Sperimentale e Patologia, Univ. La Sapienza, Roma.
Dept. of Cell and Animal Biology
The Hebrew University of Jerusalem, Alexander Silberman Institute of Life Sciences, Israel.
ENEA, Casaccia, Biotec.

Iniziative per l'acquisizione di ulteriori entrate

Partecipazione a PRIN 2007, a bandi 2007-2008 di A.I.R.C., Telethon, e dei progetti Europei FP7.

Finalità

Obiettivi

Obiettivo generale di questo progetto è la comprensione dei meccanismi che regolano l'espressione genica tessuto-specifica in modelli differenziativi di derivazione ectodermica e mesodermica, e delle alterazioni occorrenti nel corso della trasformazione neoplastica. Le conoscenze acquisite verranno utilizzate per sviluppare strategie di controllo del differenziamento e della neoplasia.



Risultati attesi nell'anno

- 1) Identificazione della funzione svolta dalla ciclina D3 a livello molecolare e progressi nella comprensione di ulteriori processi molecolari indotti da pRb durante il differenziamento dei precursori miogenici.
- 2) Identificazione di almeno una linea cellulare che risponde a TLQP-21; caratterizzazione della risposta all'ipossia in cloni di glioblastoma con ridotta espressione di HIF-1
- 3) Contributo alla definizione della relazione esistente tra neurogenesi adulta nell'ippocampo e processi di apprendimento e memorizzazione.
- 4) Comprensione del significato funzionale della interazione p120-EPS8 ed identificazione di un possibile ruolo di p120 e delle caderine nel regolare la risposta cellulare alla stimolazione con EGF.
- 5) Creazione del modello transgenico per HDMX211

Potenziale impiego

- per processi produttivi

Le ricerche in corso hanno portato e porteranno alla produzione di proteine biologicamente attive di potenziale utilità clinica e di reagenti che potranno essere testati in trial pre-clinici per la terapia genica di malattie degenerative.

- per risposte a bisogni individuali e collettivi

Si prevede che le ricerche in corso portino alla identificazione di geni ad attività antitumorale e/o pro-differenziativa nel sistema nervoso, muscolare ed in altri tessuti, alla produzione di reagenti da testare in trial pre-clinici per la terapia genica di malattie degenerative e alla creazione di banche dati per un approccio farmacologico personalizzato.

Moduli

Modulo: Sviluppo, Differenziamento e Trasformazione Cellulare
Istituto esecutore: Istituto di neurobiologia e medicina molecolare
Luogo di svolgimento attività: Sede principale Istituto

Risorse commessa 2008

Pers. tempo ind/det	Funz.+ Invest.	Spese da Fonti Esterne	Spese per Infrastrutt. tecn.-scient a gestione accentrata	Totale	Risorse da esercizi precedenti	Massa Spendibile	Costi figurativi	Spese generali accentrate	Valore Effettivo
1	2	3	4	5=1+2+3+4	6	7=2+3+6	8	9	10=5+6+8+9
401	0	164	0	565	15	179	25	N.D.	605

valori in migliaia di euro

Unità di personale di ruolo*	
ricercatori	Totale
5	7

*equivalente tempo pieno

Unità di personale non di ruolo									
associato	dottorando	borsista	assegnista	specializzando	incaricato di ricerca	professore visitatore	collaboratore professionale	altro	Totale
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Richiesta nuove unità di personale			
tempo determinato	tempo indet	non di ruolo*	Totale
0	0	0	0

*dottorati, borse di studio, assegni di ricerca



Nuovi bersagli molecolari per il controllo di crescita, invasività cellulare ed angiogenesi nella trasformazione neoplastica

Dati generali

Progetto:	Meccanismi molecolari e segnali nel controllo di proliferazione, differenziamento e morte cellulare
Tipologia di ricerca:	Progetti relativi a linee tematiche a carattere strategico
Istituto esecutore:	Istituto di genetica e biofisica 'Adriano Buzzati Traverso'
Sede principale svolgimento:	Sede principale Istituto
Dip. di prevista afferenza:	Scienze della Vita
Responsabile indicato:	PASQUALE VERDE

Elenco dei partecipanti

	liv.		liv.		liv.
Aliperti Anna Maria	VII	Desideri Carmela	IV	Porzio Concetta	VII
Andone Silvia	V	Di Giacomo Alfredo	VII	Ragosta Giuseppe	VII
Barba Pasquale	VI	Esposito Bruno	IV	Rallo Claudia	VI
Beato Antonio	IV	Franco Alfredo	VII	Rocco Rosaria	VII
Bellopede Annunziata	VII	Fusco Ciro	IV	Rossi Sergio	V
Cavaliere Daniela	V	Iaccarino Idelson Ingram	III	Russo Alessandra	VII
Cossu Simone	VI	Iaccarino Maria Rosaria	IV	Sarracino Fabiana	VIII
Cozzuto Luigi	VIII	Lauro Pasquale	VII	Secondulfo Antonietta	VI
D'Esposito Maurizio	II	Manna Filomena	V	Sepe Gennaro	VII
De Angioletti Maria	III	Miele Elia	VI	Sicilia Giuseppina	VIII
De Falco Antonio	VI	Mignoli Emiliana	VII	Stoppelli Maria	I
De Falco Sandro	II	Moscatiello Francesco	VII	Torelli Raimondo	V
De Falco Vincenzo	VII	Navarra Gerardo	VII	Vado Luciano	V
De Luise Bruno	IV	Noviello Ciro	V	Verde Pasquale	I
Del Pozzo Giovanna	III	Pellicano' Domenico	VIII		

Temi

Tematiche di ricerca

- Fattori trascrizionali del complesso AP-1 nel controllo di proliferazione cellulare ed oncogenesi: ruolo dell'oncoproteina nucleare Fra-1 (Verde).
- Modificazioni epigenetiche nella trasformazione neoplastica e progressione tumorale: ruolo della metilazione del DNA (D'Esposito).
- Ruolo di repressori trascrizionali della famiglia Polycomb nella tumorigenesi e dedifferenziamento associato alla trasformazione neoplastica (Orlando).
- Regolazione e ruolo di molecole MHC di classe II nella progressione tumorale dei melanomi (Del Pozzo).
- Meccanismi antiapoptotici mediati dalla proteina mitocondriale Bcl-xL e dai suoi partners d'interazione in cellule neoplastiche (Stoppelli, Iaccarino).
- Ruolo del protooncogene c-myc nella regolazione della migrazione cellulare e sensibilità ad apoptosi (Stoppelli, Iaccarino).
- Il sistema uPA/uPAR nel controllo di migrazione e proliferazione cellulare nella tumorigenesi (Stoppelli)
- Sistema PlGF/VEGF e rispettivi recettori (Flt-1 Flk-1) nel controllo dell'angiogenesi tumorale (De Falco).
- Vettori lentivirali esprimenti shRNAs per l'inibizione post-trascrizionale di proteine oncogeniche in leucemie APL (PML-RAR e PLZF-RAR) (DeAngioletti).

Stato dell'arte

Recenti contributi dei gruppi partecipanti alla commessa:

- Regolazione dell'oncoproteina Fra-1, e suo ruolo come bersaglio nucleare di RAS (Verde).
- Metilazione del DNA e struttura della cromatina, nella regione pseudo-autosomale di cromosomi sessuali e nella regolazione di geni implicati nella progressione tumorale (D'Esposito).
- Repressori trascrizionali della famiglia Polycomb nei meccanismi epigenetici alla base dell'identità cellulare, in *D. melanogaster* e nel differenziamento di cellule muscolari murine (Orlando).
- Regolazione traduzionale di MHCII mRNA in cellule dendritiche (Del Pozzo).
- Identificazione di nuovi partners d'interazione implicati nella funzione antiapoptotica del protooncogene Bcl-xL (Iaccarino).
- Identificazione della funzione antiapoptotica del recettore per l'urochinasi (Stoppelli, Iaccarino) e di nuovi inibitori della migrazione ed invasione tumorale (Stoppelli).



- Identificazione di varianti di PIGF attive come inibitori della crescita tumorale dipendente da VEGF (De Falco).
- Sistemi virali e metodologie di trasduzione di cellule staminali ematopoietiche e leucemiche (De Angioletti).

Azioni

Attività da svolgere

Analisi di bersagli trascrizionali dell'oncoproteina Fra-1.

Analisi delle conseguenze fenotipiche a seguito di 'perdita di funzione' delle proteine EZH1 e SuZ12 in cellule muscolari terminalmente differenziate. Identificazione pathway di signalling che regolano l'espressione delle protein PcG.

Inibizione dell'espressione di geni MHC mediante silenziamento del transattivatore CIITA in linee cellulari di melanoma.

Studio del 'cross-talk' tra uPAR ed EGFR in carcinomi polmonari e degli effetti di alcuni inibitori farmacologici dell'EGFR sul movimento cellulare. Analisi dell'effetto di nuovi inibitori del movimento cellulare che agiscono attraverso i recettori integrinici.

Analisi immunohistochemica dei tumori generati inoculando cellule tumorali stabilmente trasfettate con la variante PIGF-DE, e come controllo PIGF wild type ed il vettore vuoto, per valutare il grado di vascolarizzazione dei tumori.

Ulteriore caratterizzazione di vettori lentivirali esprimenti shRNA verso proteine di fusione oncogeniche (PML-RAR-alfa, TMPRSS2-ETS family) per la reversione del fenotipo neoplastico.

Punti critici e azioni da svolgere

Identificazione di microRNA soggetti a regolazione trascrizionale da parte di fattori AP-1/Fra-1 nella trasformazione neoplastica.

Costruzione di vettori reporter per l'analisi del promotore di Bcl-xL. Analisi fenotipica di linee cellulari con aumentata e/o diminuita espressione di JM4.

Dissezione funzionale dell'integrina avb5 come possibile mediatore dell'inibizione del movimento cellulare da parte della uPA pseudofosforilata e di nuove molecole da essa derivate. Studio dell'interazione fisica e funzionale tra uPAR ed EGFR in carcinomi polmonari che può essere utilizzata a scopo terapeutico.

Esperimenti in vivo per determinare il grado di vascolarizzazione di tumori esprimenti stabilmente varianti di PIGF.

Ottenimento di linee prostatiche esprimenti KRAB per l'espressione reversibile di vettori esprimenti shRNA inibitori di vari oncogeni.

Competenze, tecnologie e tecniche di indagine

Strumentazione

Tecniche di indagine

Tecnologie

Collaborazioni (partner e committenti)

Institut Pasteur, Parigi (Verde/Yaniv); IGMM (Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier), CNRS, Montpellier (Verde/Piechaczyk); IFOM (Istituto FIRC di Oncologia Molecolare), Milano (Verde/Blasi). Cancer Research UK, London Research Laboratory (Iaccarino/Downward); Università degli Studi di Lecce (Iaccarino/Bucci). Istituto Tumori Milano (De Falco/Zunino); Sigma-Tau (De Falco/Pisano). Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York (De Angioletti/Pandolfi), Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Genova (DeAngioletti/Notaro), King's College, Londra (Stoppelli/Ridley).



Iniziative per l'acquisizione di ulteriori entrate

Verranno presentate nuove richieste di finanziamento alle seguenti agenzie:

7 Programma Quadro: European Union, FP7 Integrated Training Networks (ITN) Richiesta: 200.000j in tre anni.

ERC, European Research Council: Advanced Investigator Grants.

MIUR: PRIN (Progetti di Ricerca d'Interesse Nazionale).

Assessorato alla Ricerca Scientifica - Regione Campania.

AIRC, Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro.

AICR (UK), Association for International Cancer Research.

Finalità

Obiettivi

- Ruolo del complesso AP-1/Fra-1 nella trasformazione neoplastica: interazioni regolative tra il fattore trascrizionale AP-1 e microRNA (Verde).
- Profili stadio-specifici di metilazione del DNA (metiloma), correlazione con modificazioni istoniche (epigenoma) e siti bersaglio per MBPs (Methyl Binding Proteins), nella progressione di linee tumorali (DEsposito).
- Meccanismi di perdita d'identità cellulare mediati da proteine Polycomb nella trasformazione neoplastica (Orlando).
- Uso del melanoma come sistema modello per l'interferenza dell'espressione dell'MHC di classe II (Del Pozzo).
- Ruolo di nuovi partners molecolari (interattori) e vie di trasduzione implicati nella funzione anti-apoptotica di Bcl-xL (Iaccarino).
- Isolamento di nuovi inibitori della migrazione cellulare e caratterizzazione della loro attività anti-metastatica in modelli cellulari ed animali (Stoppelli)
- Relazione biochimica tra PIGF/VEGF ed i due recettori Flt-1 e KDR (De Falco).
- Differenziamento dei cloni leucemici indotto da RNAi verso geni di fusione oncogenici (PML-RARA e PLZF-RARA) (De Angioletti).

Risultati attesi nell'anno

Identificazione di sequenze bersaglio per AP-1/Fra-1 nel promotore di microRNA indotti dall'oncogene RAS.

Induzione del dedifferenziamento dei nuclei delle cellule muscolari terminalmente differenziate.

Identificazione di chinasi e fattori di trascrizione che regolano l'espressione dei geni Ezh2 e SuZ12.

Identificazione di pathways di trasduzione del segnale responsabili dell'overespressione di Bcl-xL in cellule cancerose. Elucidazione del ruolo di JM4 nella trasformazione tumorale.

Inibizione del movimento cellulare da parte di peptidi derivanti da regioni dell'uPA e da parte di farmaci anti-tumorali. Associazione fisica e funzionale uPAR/EGFR nella cancerogenesi polmonare.

Correlazione tra l'over-espressione della variante PIGF-DE e la riduzione della neo-angiogenesi tumorale VEGF-dipendente in modelli di tumori xenograft.

Caratterizzazione dell'abilità degli shRNA identificati nell'indurre la reversione del fenotipo neoplastico.

Potenziale impiego

- per processi produttivi

Possibile ricaduta sulla produzione di nuovi farmaci anti-tumorali:

inibitori farmacologici di migrazione ed invasione tumorale; varianti di PIGF per l'inibizione dell'angiogenesi patologica.

- per risposte a bisogni individuali e collettivi

Questi studi produrranno informazioni sulla biologia della cellula tumorale che potranno tradursi in strumenti innovativi, sia per la classificazione della malattia neoplastica (diagnostica e definizione della prognosi), sia per l'identificazione di bersagli molecolari per terapie mirate.



Moduli

Modulo: Nuovi bersagli molecolari per il controllo di crescita, invasività cellulare ed angiogenesi nella trasformazione neoplastica
Istituto esecutore: Istituto di genetica e biofisica 'Adriano Buzzati Traverso'
Luogo di svolgimento attività: Sede principale Istituto

Risorse commessa 2008

Pers. tempo ind/det	Funz.+ Invest.	Spese da Fonti Esterne	Spese per Infrastrutt. tecn.-scient a gestione accentrata	Totale	Risorse da esercizi precedenti	Massa Spendibile	Costi figurativi	Spese generali accentrate	Valore Effettivo
1	2	3	4	5=1+2+3+4	6	7=2+3+6	8	9	10=5+6+8+9
440	0	143	1	584	131	274	189	N.D.	904

valori in migliaia di euro

<i>Unità di personale di ruolo*</i>	
ricercatori	Totale
4	8

*equivalente tempo pieno

<i>Unità di personale non di ruolo</i>									
associato	dottorando	borsista	assegnista	specializzando	incaricato di ricerca	professore visitatore	collaboratore professionale	altro	Totale
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

<i>Richiesta nuove unità di personale</i>			
tempo determinato	tempo indet	non di ruolo*	Totale
0	0	0	0

*dottorati, borse di studio, assegni di ricerca



Identificazione di regolatori del differenziamento, della motilità e dell'apoptosi delle cellule staminali

Dati generali

Progetto:	Meccanismi molecolari e segnali nel controllo di proliferazione, differenziamento e morte cellulare
Tipologia di ricerca:	Progetti relativi a linee tematiche a carattere strategico
Istituto esecutore:	Istituto di genetica e biofisica 'Adriano Buzzati Traverso'
Sede principale svolgimento:	Sede principale Istituto
Dip. di prevista afferenza:	Scienze della Vita
Responsabile indicato:	EDUARDO JORGE PATRIARCA

Elenco dei partecipanti

	liv.		liv.		liv.
Aliperti Anna Maria	VII	Esposito Bruno	IV	Patriarca Eduardo Jorge	I
Andone Silvia	V	Filosa Stefania	III	Pellicano' Domenico	VIII
Barra Adriano	VI	Franco Alfredo	VII	Porzio Concetta	VII
Beato Antonio	IV	Fusco Ciro	IV	Ragosta Giuseppe	VII
Bellopede Annunziata	VII	Iaccarino Idelson Ingram	III	Rallo Claudia	VI
Caputo Emilia	III	Iaccarino Maria Rosaria	IV	Riccio Anna	IV
Cossu Simone	VI	Lauro Pasquale	VII	Rocco Rosaria	VII
Cozzuto Luigi	VIII	Manna Filomena	V	Russo Alessandra	VII
De Cesare Dario	II	Matarazzo Maria Rosaria	III	Sarracino Fabiana	VIII
De Falco Antonio	VI	Miele Elia	VI	Secondulfo Antonietta	VI
De Falco Sandro	II	Mignoli Emiliana	VII	Sepe Gennaro	VII
De Falco Vincenzo	VII	Minchiotti Gabriella	III	Sicilia Giuseppina	VIII
De Luise Bruno	IV	Moscatiello Francesco	VII	Stoppelli Maria	I
Desideri Carmela	IV	Navarra Gerardo	VII	Torelli Raimondo	V
Di Giacomo Alfredo	VII	Noviello Ciro	V	Vado Luciano	V

Temi

Tematiche di ricerca

- medicina rigenerativa
- biologia cellulare
- cellule staminali
- differenziamento, motilità ed apoptosi cellulare
- modelli cellulari
- sistema robotico per l'analisi di colture cellulari
- repertori/librerie molecolari
- espressione genica, metiloma, microtrascrittoma ed architettura nucleare

Stato dell'arte

Le cellule staminali essendo sorgente di diversi tipi cellulari possono compensare l'incapacità dell'organismo adulto di riparare i tessuti danneggiati. Nonostante ciò, la disponibilità di molecole in grado di controllare la loro proliferazione, il loro differenziamento, la loro motilità, etc. è ancora molto limitata. In gran parte, ciò è dovuto:

- alla complessità dei meccanismi molecolari che regolano tali funzioni;
- alle limitazioni degli approcci sperimentali utilizzati.



Azioni

Attività da svolgere

Nel corso del 2008 saranno saggiati:

-gli effetti dei peptidi tetramericici identificati (capaci di inibire l'interazione Cripto/ALK4 o l'interazione PIGF/VEGFR-1 rispettivamente) su:

- 1) modelli murini del morbo di Parkinson, con particolare attenzione alla formazione dei teratomi.
- 2) la neo-vascolarizzazione della cornea e sulla inibizione della crescita tumorale.

Inoltre saranno identificati nuovi regolatori (molecole/geni) del differenziamento delle cellule ES mediante:

- 1) screening di librerie di composti singoli (metaboliti e sostanze redox) per identificare quelli capaci di indurre/inibire il differenziamento neurale e/o cardiaco delle cellule ES.
- 2) screening di librerie di siRNA per identificare nuovi geni coinvolti nel differenziamento neuronale e/o cardiaco delle cellule ES.

-messa a punto di un protocollo in mono-step per differenziare le cellule ES in cardiomiociti.

Infine saranno analizzati:

- l'effetto di Cripto in modelli murini di danno muscolare.
- gli effetti dei geni identificati nel differenziamento delle cellule ES.
- l'architettura nucleare in Neural Stem Cells selvatiche e da modelli murini per la sindrome di Rett

Punti critici e azioni da svolgere

Sistema robotico:

-ridurre gli effetti solvente e cornice (evaporazione e scambio termico nei campioni lungo i bordi) sulla riproducibilità dei risultati ottenuti durante gli screening.

Validazione delle molecole già isolate:

-messa a punto di nuovi protocolli per l'analisi della capacità terapeutica delle molecole identificate.

Identificazione di nuove linee cellulari/molecole/geni:

- saggiare l'effetto di almeno una libreria di composti singoli (incluso metaboliti) e di almeno una libreria di siRNA sul differenziamento delle cellule ES in cardiomiociti e neuroni.
- Derivazione di Neural Stem Cells da cervello adulto

Competenze, tecnologie e tecniche di indagine

La fattibilità della proposta è garantita:

-dalle competenze specifiche dei ricercatori coinvolti:

E.J. Patriarca (sistemi robotici, coordinamento)

D. De Cesare, S. Filosa, G. Minchiotti (differenziamento cellule staminali, generazione modelli cellulari, messa a punto di nuovi protocolli di differenziamento delle cellule staminali).

S. De Falco (chimica combinatoriale, angiogenesi).

V. Orlando (microtrascrittoma e architettura nucleare).

M.P. Stoppelli (migrazione cellulare).

I. Iaccarino (apoptosi).

M.D'Esposito (epigenetica, neural stem cells)

-le competenze dei partecipanti sono garantite dalle loro pubblicazioni su riviste internazionali tra cui:

Ambati et al. Nature 2006; Gigante et al. FASEB J 2006; Tarsitano et al. FASEB J 2006; Pizzo et al. JBC 2006; Carninci et al. Nat Genet 2006; Marasco et al. Proteins 2006; Calvanese et al. J Med Chem 2006; Minchiotti et al. Methods Mol Biol 2006; Parisi et al. J Stem Cell 2007; Franco et al. J Cell Sci 2006; Alfano et al. J Biol Chem 2006; Parish et al. Stem Cells 2005; Fico et al. Cell Death Diff 2006.

Strumentazione

Sistema robotico innovativo, co-sviluppato con la 'Hamilton Robotics' che permette di analizzare simultaneamente, in sterilità ed in completa automazione, l'effetto di migliaia di composti (librerie chimiche) sul differenziamento delle cellule staminali coltivate in micropiastre da 96 pozzetti.

Configurazione del sistema:

-stazione robotica di pipettamento MICROLAB STAR a 8 canali di dispensazione indipendenti e testata da 96 canali a dispensazione simultanea;

-braccio robotico di trasferimento esterno ML-SWAP 420;

-incubatori THERMO CYTOMAT per terreni e colture cellulari (micropiastre da 96 pozzetti);

-lettore multisegnale (fluorescenza, luminescenza e assorbanza) per micropiastre SYNERGY HT BIOTECH

-l'intero sistema è controllato dal MICROLAB VECTOR SOFTWARE.

Inoltre sono disponibili tutte le altre facilities richieste: DNAmicroarray, Realtime PCR, FACS-Cell Sorter, Microscopia e Time-lapse videomicroscopy, Software analisi immagini. Cappe a flusso laminare ed incubatori dedicati.



Tecniche di indagine

Il sistema robotico sviluppato dallo Stem Cell Fate Laboratory nell'ambito della commessa consente di eseguire in sterilità, in completa automazione e su larga scala:

- protocolli di proliferazione e differenziamento di cellule staminali
- screening di librerie (composti sintetici e naturali, anticorpi, ad RNA o DNA) per l'identificazione di modulatori della proliferazione e/o il differenziamento cellulare.

Inoltre permetterà:

- di verificare il grado di automazione dei protocolli di differenziamento delle cellule staminali in micropiastre da 96 pozzetti, precedentemente messi a punto nell'ambito della commessa.
- lo screening di librerie chimiche (a singoli composti o combinatoriali) per l'identificazione di modulatori del differenziamento, della proliferazione cellulare, della motilità, dell'apoptosi, etc.

Tecnologie

La tecnologia di automazione sviluppata (sistema robotico per l'analisi delle colture cellulari) garantisce:

- riduzione significativa dell'intervento manuale
- riduzione del rischio di contaminazione
- standardizzazione dei metodi
- elevata riproducibilità
- elevato numero di campioni processabili simultaneamente (sino a 4000 composti singoli)

Inoltre i modelli cellulari generati permettono di monitorare attraverso tecniche di rilevazione della fluorescenza (lettore multiseinale per micropiastre) il differenziamento delle cellule staminali in diversi tipi cellulari.

Definizione di nuovi protocolli per il differenziamento di cellule staminali in diversi tipi cellulari.

Collaborazioni (partner e committenti)

- Fondazione Telethon (committente progetto di ricerca NCGP0115 Identification and characterization of molecules involved in neural differentiation of stem cells: improving the use of cell-based therapy in neurodegenerative disorders)
- TIGEM Institute of Genetics and Medicine (collaborazione per lo sviluppo dello STEM CELL FATE Laboratory).
- Hamilton Robotics, Italia; (committente: sviluppo del software 'Microlab Vector Software' che gestisce il sistema robotico per l'analisi delle colture cellulari)
- EUROCLONE SPA, Italia (committente: validazione/certificazione terreni di coltura per cellule staminali)
- Regione Campania; (committente nell'ambito del Centro Regionale di Competenza Diagnostica e Farmaceutica Molecolari e della Legge Regionale LR5)
- MIUR (progetti FIRB)
- Fondazione AIRC (progetto di ricerca, Identification of modulators of the oncodevelopmental factor Cripto as target for cancer therapy)
- Istituto Tumori Milano (Sintesi e caratterizzazione funzionale di nuovi derivati delle camptotecine diretti contro specifici targets molecolari associati alla trasformazione neo-plastica)
- Sigma Tau (Identificazione di nuovi modulatori dell'attività di KDR (Vascular Endothelial Growth Factor 2))
- Celbio, Cell Biology (collaborazione per la realizzazione del corso teorico-pratico 'Stem Cell Differentiation Training Course' accreditato per 18 ECM dal Ministero della Salute)
- Thromb-X Biotech, Belgio;
- AXXAM (committente training personale protocolli differenziamento cellule staminali).

Iniziativa per l'acquisizione di ulteriori entrate

-Partecipare:

- Progetto Europeo nell'ambito del VII Programma Quadro (HEALTH-2007-2.2.1-7). Titolo del progetto: Cell transplantation for brain restoration in Parkinson's disease., durata 2008-2011 (richiesti Euro 525.000)
- Association Française contre les Myopathies (AFM), Unravelling the role of EGF-CFC Cripto in muscle regeneration (richiesta II anno, Euro 10.000)
- PRIN. Ruolo dei recettori del Vascular Endothelial Growth Factor VEGFR-1 and 2 nel differenziamento e nel recruitment delle cellule staminali coinvolte nel processo di neo-angiogenesi e riparazione vascolare. (Richiesti Euro 51.300)

Inoltre richiedere finanziamenti:

AIRC, Telethon, MIUR.



Finalità

Obiettivi

L'obiettivo finale è quello di identificare regolatori (geni, molecole) del differenziamento, la motilità, e l'apoptosi delle cellule staminali.

Questo scopo sarà raggiunto attraverso:

1. La automazione delle procedure di analisi del differenziamento delle cellule staminali coltivate in micropiastre;
2. La generazione di modelli cellulari ad hoc per il monitoraggio del differenziamento, dell'apoptosi, della migrazione, etc. delle cellule staminali;
3. La sintesi/acquisizione e stoccaggio di repertori/librerie molecolari;
4. La definizione di protocolli per l'analisi su larga scala HTS (high throughput screening) di colture cellulari in sterilità;
5. L'analisi delle variazioni della espressione genica, del metiloma, del microtrascrittoma (microRNA) e dell'architettura nucleare durante il differenziamento delle cellule staminali.

Risultati attesi nell'anno

- Individuare metaboliti (amino acidi, ecc) attivi sul differenziamento neurale o cardiaco delle cellule ES (preparazione e screening libreria di metaboliti);
- Individuare e caratterizzare geni coinvolti nel differenziamento delle cellule staminali in cardiomiociti e neuroni (acquisizione e screening di almeno una libreria di siRNA);
- Definire la capacità terapeutica del peptide tetramerico capace di inibire l'interazione Cripto/ALK4 (rescue Parkinson ed inibizione della formazione di teratocarcinomi).
- Identificare induttori/inibitori del differenziamento o della motilità cellulare o della capacità angiogenica o dell'apoptosi delle ES.
- Isolare e caratterizzare Neural Stem Cells da animali adulti.

Potenziale impiego

- per processi produttivi

Attività di servizio/consulenza.

A questo scopo nell'ambito della commessa è stato fondato presso IIGB di Napoli lo Stem Cell Fate Laboratory (SCF Lab).

Lo SCF Lab ha sviluppato una piattaforma tecnologica innovativa capace di analizzare in completa automazione ed sterilità colture di cellule staminali. Ciò permetterà allo SCF Lab. di diventare:

- laboratorio di validazione/certificazione dei lotti di terreni e/o siero, prodotti da potenziali committenti, per la coltura delle cellule staminali.
- laboratorio per l'analisi dell'effetto di repertori molecolari forniti da potenziali committenti (citotossicità, differenziamento e/o crescita cellulare, etc).

- per risposte a bisogni individuali e collettivi

Medicina rigenerativa.

Le proprietà intrinseche delle cellule staminali fanno sì che potenzialmente queste cellule si possano prestare ad un utilizzo terapeutico nell'ambito della medicina rigenerativa.

In teoria, data la loro capacità di differenziare, tali cellule possono venire utilizzate come sorgente di differenti tipi cellulari, compensando in tal modo l'incapacità dell'organismo adulto di riparare i danni a carico di tessuti che hanno perduto la capacità di rinnovarsi.

Le ripercussioni applicative delle metodiche volte al differenziamento controllato di cellule staminali sono dunque potenzialmente enormi, in quanto utilizzabili per la cura e la terapia di un ampio spettro di patologie.

Nell'ambito della commessa è stato dimostrato (Parish et al. Stem Cells 2005) che cellule embrionali staminali murine, delete del gene cripto, sono in grado di generare neuroni dopaminergici e recuperare il fenotipo Parkinsoniano in un modello di ratto, senza dare origine a tumori.

Tale risultato rappresenta un importante avanzamento nella ricerca dei fattori che determinano la formazione di tumori nel trapianto delle cellule staminali.



Moduli

Modulo: Identificazione di regolatori del differenziamento, della motilità e dell'apoptosi delle cellule staminali

Istituto esecutore: Istituto di genetica e biofisica 'Adriano Buzzati Traverso'

Luogo di svolgimento attività: Sede principale Istituto

Risorse commessa 2008

Pers. tempo ind/det	Funz.+ Invest.	Spese da Fonti Esterne	Spese per Infrastrutt. tecn.-scient a gestione accentrata	Totale	Risorse da esercizi precedenti	Massa Spendibile	Costi figurativi	Spese generali accentrate	Valore Effettivo
1	2	3	4	5=1+2+3+4	6	7=2+3+6	8	9	10=5+6+8+9
436	0	107	1	544	168	275	189	N.D.	901

valori in migliaia di euro

<i>Unità di personale di ruolo*</i>	
ricercatori	Totale
5	9

*equivalente tempo pieno

<i>Unità di personale non di ruolo</i>									
associato	dottorando	borsista	assegnista	specializzando	incaricato di ricerca	professore visitatore	collaboratore professionale	altro	Totale
0	4	0	3	0	0	0	0	7	14

<i>Richiesta nuove unità di personale</i>			
tempo determinato	tempo indet	non di ruolo*	Totale
2	7	6	15

*dottorati, borse di studio, assegni di ricerca



Analisi cellulare e molecolare della risposta immunitaria indotta da vaccini sintetici

Dati generali

Progetto:	Meccanismi molecolari e segnali nel controllo di proliferazione, differenziamento e morte cellulare
Tipologia di ricerca:	Progetti relativi a linee tematiche a carattere strategico
Istituto esecutore:	Istituto di genetica e biofisica 'Adriano Buzzati Traverso'
Sede principale svolgimento:	Sede principale Istituto
Dip. di prevista afferenza:	Scienze della Vita
Responsabile indicato:	GIOVANNA DEL POZZO

Elenco dei partecipanti

	liv.		liv.		liv.
Aliperti Anna Maria	VII	Di Giacomo Alfredo	VII	Pellicano' Domenico	VIII
Andone Silvia	V	Esposito Bruno	IV	Porzio Concetta	VII
Baiano Salvatore	VII	Franco Alfredo	VII	Prisco Antonella	III
Barba Pasquale	VI	Fusco Ciro	IV	Ragosta Giuseppe	VII
Beato Antonio	IV	Iaccarino Maria Rosaria	IV	Rallo Claudia	VI
Bellopede Annunziata	VII	Lauro Pasquale	VII	Rocco Rosaria	VII
Caputo Emilia	III	Maffei Antonella	II	Russo Alessandra	VII
Cossu Simone	VI	Manna Filomena	V	Sarracino Fabiana	VIII
Cozzuto Luigi	VIII	Miele Elia	VI	Secondulfo Antonietta	VI
De Falco Antonio	VI	Mignoli Emiliana	VII	Sepe Gennaro	VII
De Falco Vincenzo	VII	Morelli Francesco	III	Sicilia Giuseppina	VIII
De Luise Bruno	IV	Moscatiello Francesco	VII	Torelli Raimondo	V
Del Pozzo Giovanna	III	Navarra Gerardo	VII	Vado Luciano	V
Desideri Carmela	IV	Noviello Ciro	V		

Temi

Tematiche di ricerca

- 1.Valutazione della proliferazione in vivo dei linfociti T CD8 della memoria nel midollo osseo, rispetto a quella in altri organi linfoidi ed extra-linfoidi quale presupposto per la la progettazione di vaccini efficaci. Sviluppo e validazione di modelli matematici per la simulazione dei meccanismi di proliferazione e morte delle memoria immunitaria - Sintesi ed utilizzi in vitro e in vivo di vaccini sintetici
- 2.Studio della regolazione post-trascrizionale e della struttura dell'RNA codificante per gli antigeni MHC di classe II al fine della modulazione della risposta immune.
- 3.Studio dei meccanismi di induzione della tolleranza immunitaria in sindromi autoimmuni associate a stimoli ambientali.

Stato dell'arte

Alcuni dei principali argomenti trattati attualmente in campo internazionale dall'immunologia di base e applicata sono tra le tematiche della commessa. Studio della risposta immunitaria cellulo-mediata di tipo citolitico che si instaura nel corso di un'infezione intracellulare o di un tumore; studio della risposta immunitaria di tipo anticorpale e dei suoi effetti neutralizzanti e/o terapeutici in particolari situazioni patologiche quali il morbo di Alzheimer; le malattie allergiche; i meccanismi cellulari che regolano l'instaurarsi della memoria immunologica; sintesi di vaccini ricombinanti nei confronti di epitopi immunodominanti di patogeni o di proteine tumorali;l'analisi delle cause dei meccanismi di autoimmunità per la prevenzione e la cura delle sindromi derivate da tale fenomeno. Sviluppo di una tecnologia non invasiva per la determinazione del progresso della sindrome diabetica in modelli animali e pazienti.

Azioni

Attività da svolgere

Punti critici e azioni da svolgere



Competenze, tecnologie e tecniche di indagine

Le competenze rientrano nelle seguenti tematiche:

Allergie: Ruffilli, Cassese

Malattie autoimmuni e diabete : Harris, Maffei

Immunologia dei tumori: Morelli, Caputo

Immunologia di base e vaccini: Del Pozzo, Di Rosa, Prisco, Pisapia

Competenze di Biologia molecolare sono comuni alla maggior parte dei partecipanti alla commessa

Strumentazione

Stabulario

Attrezzature per la biologia molecolare. Real time PCR

FACS-Cell sorter

Cappe e flusso laminare e incubatori.

Lettore ELISA

Lettore ELISPOT utilizzato presso IISA d Avellino

Attrezzatura harvester e contatore beta per micropiastre utilizzato presso IIBP di Napoli

Tecniche di indagine

Tecnologie

Utilizzo di complessi modelli di roditori per lo studio dell'avanzamento del Diabete Mellito, sia in vivo che ex vivo (in isolette pancreatiche purificate).

Collaborazioni (partner e committenti)

Le collaborazioni in corso sono:

De Berardinis P., IBP-CNR; Ezio Ricca, Univ. Napoli Federico II, Angela Santoni, Università La Sapienza, Roma; Borrello L., John Hopkins University, Baltimore, USA; Andreas Radbruch, Deutsches Rheuma-Forschungszentrum, Berlin; Guido Grandi, Chiron s.r.l., Siena M. Carteni Dip di Medicina Sperimentale Seconda Università Napoli; V. Santagada Facoltà . Di Farmacia Università Federico II Napoli; Fraco Bonagurio Istituto per la Cura dei Tumori Fondazione Pascale Napoli Mark A. Hardy, New York Regional Islet Cell Resource Center at New York Presbyterian Hospital, Columbia Presbyterian Campus.

Committenti:

MIUR-FIRB, ISS, Telethon, EC, NIH,

Iniziativa per l'acquisizione di ulteriori entrate

-Partecipare:

-Progetto Europeo nell'ambito del VII Programma Quadro (HEALTH-2007-2.2.1-7). Titolo del progetto: Cell transplantation for brain restoration in Parkinson's disease., durata 2008-2011 (richiesti Euro 525.000)

-Association Française contre les Myopathies (AFM), Unravelling the role of EGF-CFC Cripto in muscle regeneration (richiesta II anno, Euro 10.000)

-PRIN. Ruolo dei recettori del Vascular Endothelial Growth Factor VEGFR-1 and 2 nel differenziamento e nel recruitment delle cellule staminali coinvolte nel processo di neo-angiogenesi e riparazione vascolare. (Richiesti Euro 51.300)

Inoltre richiedere finanziamenti:

AIRC, Telethon, MIUR.

Finalità

Obiettivi

Monitoraggio, mediante valutazione della risposta immunitaria in vivo e in vitro, dell'uso di batteriofagi ricombinanti per l'espressione di : a) epitopi CD8 e CD4 del citomegalovirus umano, B) epitopi in grado di indurre una risposta anticorpale contro la proteina beta amiloide responsabile della malattia di Alzheimer, e valutazione dell'effetto anti aggregante degli anticorpi generati.

Sintesi di vaccini basati su costrutti a DNA esprimenti epitopi dell'allergene maggiore della Parietaria e validazione su un sistema modello murino

Sviluppo di nuovi carrier vaccinici basati su ceppi batterici attenuati di Salmonella e utilizzo di costrutti a DNA per l'espressione di antigeni tumorali in vivo

Valutazione dell'effetto di citochine (IL-7, IL-15, etc.) sull'attivazione, sopravvivenza e proliferazione dei linfociti T CD8 della memoria purificati dal midollo osseo.

Sviluppo di un software matematico per la previsione della proliferazione e morte dei CD8



Risultati attesi nell'anno

Potenziale impiego

- per processi produttivi
sintesi di vaccini ricombinanti

produzione di ligandi specifici per la misura della massa delle cellule beta pancreatiche con il PET

- per risposte a bisogni individuali e collettivi

Utilizzo di vaccini ricombinanti

Utilizzo di ligandi specifici per la misura della massa delle cellule beta pancreatiche con il PET

Moduli

Modulo: Analisi cellulare e molecolare della risposta immunitaria indotta da vaccini sintetici

Istituto esecutore: Istituto di genetica e biofisica 'Adriano Buzzati Traverso'

Luogo di svolgimento attività: Sede principale Istituto

Risorse commessa 2008

Pers. tempo ind/det	Funz.+ Invest.	Spese da Fonti Esterne	Spese per Infrastrutt. tecn.-scient a gestione accentrata	Totale	Risorse da esercizi precedenti	Massa Spendibile	Costi figurativi	Spese generali accentrate	Valore Effettivo
1	2	3	4	5=1+2+3+4	6	7=2+3+6	8	9	10=5+6+8+9
376	0	99	1	476	152	251	185	N.D.	813

valori in migliaia di euro

<i>Unità di personale di ruolo*</i>	
ricercatori	Totale
4	8

*equivalente tempo pieno

<i>Unità di personale non di ruolo</i>									
associato	dottorando	borsista	assegnista	specializzando	incaricato di ricerca	professore visitatore	collaboratore professionale	altro	Totale
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

<i>Richiesta nuove unità di personale</i>			
tempo determinato	tempo indet	non di ruolo*	Totale
0	2	0	2

*dottorati, borse di studio, assegni di ricerca



Controllo di proliferazione, differenziamento e morte cellulare

Dati generali

Progetto:	Meccanismi molecolari e segnali nel controllo di proliferazione, differenziamento e morte cellulare
Tipologia di ricerca:	Progetti relativi a linee tematiche a carattere strategico
Istituto esecutore:	Istituto di biologia e patologia molecolari
Sede principale svolgimento:	Sede principale Istituto
Dip. di prevista afferenza:	Scienze della Vita
Responsabile indicato:	ANGELA SANTONI

Elenco dei partecipanti

	liv.		liv.		liv.
Allegria Vanda	IV	Granato Teresa	III	Petrangeli Elisa	III
Antolini Rachele	V	Iani Paola	V	Pistolesi Gabriella	IV
Barile Giuseppe	I	Marconi Luca	VIII	Ravenna Linda Ester	IV
De Blasi Angelina	IV	Marotti Federico	IV	Rodino' Paola	III
Di Rosa Francesca	III	Nicotra Maria Rita	IV	Romeo Giovanna	III
Fiorucci Gianna	III	Passananti Claudio	III	Ruscitti Rosa Generosa	V

Temi

Tematiche di ricerca

L'attività di ricerca riguarda lo studio dei meccanismi molecolari coinvolti nel controllo del differenziamento, dell'omeostasi, della proliferazione e dell'apoptosi in diversi modelli cellulari normali e patologici. In particolare comprende l'identificazione e la caratterizzazione di proteine che interagiscono con la RNA polimerasi II; l'analisi delle alterazioni dell'espressione genica in neoplasie umane della prostata, della mammella e della tiroide; lo studio dei meccanismi antiproliferativi dell'interferone beta in tumori solidi; lo studio della funzione di geni mediante l'impiego di animali geneticamente modificati. Vengono messi a punto ed utilizzati sistemi, tecnologie e approcci sperimentali diversi quali interazioni proteina/proteina, RNA interference, ecc.

Stato dell'arte

Proliferazione, differenziamento e morte cellulare programmata negli organismi pluricellulari sono processi biologici fondamentali frutto di una rete complessa di regolazioni che governa vere e proprie cascate geniche sia durante lo sviluppo di un organismo sia durante il suo mantenimento. La scelta di una cellula di attuare uno specifico programma dipende dal suo microambiente; l'alterazione di uno di questi programmi dà luogo a stati patologici come neoplasie o malattie degenerative.

Azioni

Attività da svolgere

L'attività di ricerca da svolgere sarà finalizzata allo studio dei meccanismi molecolari coinvolti nel controllo della proliferazione, del differenziamento, della morte cellulare programmata e dell'omeostasi, in diversi modelli cellulari normali e patologici. Le principali tematiche che verranno affrontate includono: caratterizzazione delle interazioni proteina/proteina che coinvolgono la RNA polimerasi II, in particolare studio del ruolo di eEF1-gamma e Hax1; il ruolo di NF-kB e recettori estrogenici nelle neoplasie della prostata, della mammella e della tiroide, caratterizzazione di cellule staminali nel cancro della prostata; lo studio dei meccanismi antiproliferativi dell'interferone beta in tumori solidi; identificazione di differenze funzionali e molecolari tra linfociti T della memoria localizzati in diversi ambienti fisiologici e patologici. A questo scopo verranno utilizzate diverse metodologie e approcci sperimentali, quali RNA interference e microRNA, protocolli volti a caratterizzare interazioni proteina/proteina, microarray e creazione di modelli cellulari e/o animali.

Punti critici e azioni da svolgere

I punti critici dovuti alle normali difficoltà sperimentali verranno affrontati, sviluppando la capacità di interfacciarsi con nuove tecnologie e nuove collaborazioni sia interne al CNR che con altri enti di ricerca. Inoltre sarà particolarmente curato il continuo potenziamento del know-how delle risorse umane disponibili. Questo sarà ottenuto attraverso corsi teorici e pratici, congressi e scambi di ricercatori con altri laboratori di ricerca nazionali e internazionali.



Competenze, tecnologie e tecniche di indagine

Le principali competenze sono di biologia molecolare e cellulare, genomica e proteomica con possibilità di applicazioni diagnostiche e terapeutiche.

Strumentazione

La ricerca si avvale della strumentazione di base per studi di biologia molecolare, biologia cellulare, genomica e proteomica. Le attrezzature di particolare rilievo sono: Agilent Bioanalyzer, scanner Micro-Array, Gel-Doc Biorad, luminometro, Real-time PCR, microscopi a fluorescenza, microscopio confocale, sistema per analisi di immagini, micro iniettore.

Tecniche di indagine

Le principali comprendono: tecniche di immunistochimica diretta e indiretta (produzione di anticorpi, analisi con microscopio a fluorescenza e confocale; tecniche di indagine dell'espressione genica (macro- e micro- arrays, Real-time PCR); tecniche di indagine della funzione genica (dominanti negativi e positivi, mutanti con perdita di funzione, RNA interference); tecniche di micro-iniezione; tecniche di indagine dell'interazione proteina-proteina (phage display, yeast two hybrid).

Tecnologie

Le tecnologie principali sono: tecnologie del DNA ricombinante, produzione di proteine in batteri e in cellule di mammifero; Indagine dell'espressione genica mediante macro- e micro-arrays, Real-time PCR; Indagine della funzione genica mediante dominanti negativi e positivi, mutanti con perdita di funzione e RNA interference; micro-iniezione in cellule di mammifero; immunistochimica diretta e indiretta; tecnologie di produzione di anticorpi policlonali e monospecifici; analisi con microscopio a fluorescenza e confocale.

Collaborazioni (partner e committenti)

La commessa si avvale di molteplici collaborazioni: Istituti CNR della ex Area Roma 3 (INMM, IN) e IGB; Università di Milano Dipartimento di Biologia; Università Roma 2 Facoltà di Medicina; Istituto Superiore di Sanità; Università Roma 'La Sapienza' Dipartimento di Medicina Sperimentale e Patologia; Istituti Fisioterapici Ospitalieri (IFO) di Roma; Istituti Ortopedici Rizzoli di Bologna; Istituto Oncologico di Bari; Istituto Galeazzi di Milano, Department of Human Anatomy University of Oxford, UK.

Iniziativa per l'acquisizione di ulteriori entrate

Sono state avanzate richieste di finanziamento a diversi Enti.

Finalità

Obiettivi

Gli studi sono volti a chiarire i meccanismi alla base di processi biologici fondamentali e di loro alterazioni ed hanno una ricaduta applicativa per l'identificazione di percorsi innovativi diagnostici e terapeutici. Utilizzando competenze di biologia molecolare e cellulare, gli studi intrapresi permetteranno di chiarire meccanismi ed interazioni alla base di patologie neoplastiche e degenerative e di individuare nuovi indicatori prognostici e valide associazioni terapeutiche.

Risultati attesi nell'anno

Le attività di ricerca programmate nell'arco di questo anno produrranno pubblicazioni scientifiche e soprattutto modelli molecolari, cellulari e animali che potranno essere oggetto di possibili brevetti. Tali modelli potranno chiarire eventuali alterazioni di meccanismi e fini regolazioni che sono alla base di patologie neoplastiche e/o degenerative e di suggerire nuovi indicatori prognostici e valide associazioni terapeutiche. Saranno inoltre messe a punto diverse metodologie innovative come ad esempio 'MicroRNA Expression Profiles' che permettano la rapida identificazione e relativa caratterizzazione di MicroRNAs e la RIP-ChIP allo scopo di isolare RNA (mRNAs, microRNAs) da specifici complessi ribonucleoproteici.

Potenziale impiego

- per processi produttivi

Non si prevedono impieghi in processi produttivi

- per risposte a bisogni individuali e collettivi

Il potenziale impiego della progettazione, costruzione e caratterizzazione di nuove molecole consiste soprattutto nella produzione di modelli molecolari, cellulari e animali che potranno essere oggetto di specifici brevetti. Tali modelli saranno utilizzati per la validazione di farmaci e per porre le basi di protocolli di terapia genica mirata.



Moduli

Modulo: Controllo di proliferazione, differenziamento e morte cellulare
Istituto esecutore: Istituto di biologia e patologia molecolari
Luogo di svolgimento attività: Sede principale Istituto

Risorse commessa 2008

Pers. tempo ind/det	Funz.+ Invest.	Spese da Fonti Esterne	Spese per Infrastrutt. tecn-scient a gestione accentrata	Totale	Risorse da esercizi precedenti	Massa Spendibile	Costi figurativi	Spese generali accentrate	Valore Effettivo
1	2	3	4	5=1+2+3+4	6	7=2+3+6	8	9	10=5+6+8+9
676	14	0	0	690	15	29	68	N.D.	773

valori in migliaia di euro

<i>Unità di personale di ruolo*</i>	
ricercatori	Totale
8	15

*equivalente tempo pieno

<i>Unità di personale non di ruolo</i>									
associato	dottorando	borsista	assegnista	specializzando	incaricato di ricerca	professore visitatore	collaboratore professionale	altro	Totale
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

<i>Richiesta nuove unità di personale</i>			
tempo determinato	tempo indet	non di ruolo*	Totale
0	0	0	0

*dottorati, borse di studio, assegni di ricerca



Meccanismi molecolari del ciclo cellulare e della mitosi

Dati generali

Progetto:	Meccanismi molecolari e segnali nel controllo di proliferazione, differenziamento e morte cellulare
Tipologia di ricerca:	Progetti relativi a linee tematiche a carattere strategico
Istituto esecutore:	Istituto di biologia e patologia molecolari
Sede principale svolgimento:	Sede principale Istituto
Dip. di prevista afferenza:	Scienze della Vita
Responsabile indicato:	MAURIZIO GATTI

Elenco dei partecipanti

	liv.		liv.		liv.
Allegría Vanda	IV	Guarguaglini Giulia	III	Polani Stefania	V
Antolini Rachele	V	Iani Paola	V	Ricordy Ruggero	II
Bonaccorsi Silvia	II	Lavia Patrizia	II	Salviati Vincenzo	IV
Cundari Enrico	II	Lucarelli Paola	II	Scacchi Renato	III
De Salvia Rosella	III	Palena Antonella	VII	Sellitto Daniele	V
Degrassi Francesca	II	Perticone Paolo	III	Somma Maria Patrizia	III
Fiore Mario	IV	Pistolesi Gabriella	IV	Vitagliano Eleonora	IV
Giansanti Maria Grazia	III				

Temi

Tematiche di ricerca

Il sequenziamento del genoma umano e dei genomi di organismi modello, quali topo, *S. cerevisiae* e *D. melanogaster*, permette oggi di analizzare il ciclo e la divisione cellulare mediante approcci di genomica funzionale comparativa. Con questi approcci vengono studiati la regolazione ed i checkpoints del ciclo cellulare, l'organizzazione del cromosoma e il mantenimento della sua integrità, la struttura e funzione di centromeri e telomeri, la composizione ed il ruolo biologico dei centrosomi, la formazione del fuso, la segregazione dei cromosomi e la citochinesi. Vengono identificati e caratterizzati a livello funzionale i prodotti genici coinvolti nel ciclo cellulare e in vari aspetti della mitosi. Viene determinata la localizzazione intracellulare di queste proteine sia mediante immunocolorazione che analisi in vivo dopo espressione di costrutti chimerici con la Green Fluorescent Protein, GFP. Si studiano inoltre le interazioni molecolari tra proteine coinvolte nel ciclo cellulare e nella mitosi.

Stato dell'arte

La mitosi ed il ciclo cellulare sono processi biologici intensamente studiati e la letteratura scientifica su questi argomenti è immensa. Pur essendo impossibile riassumere qui il contesto internazionale e lo stato attuale delle ricerche su questi temi, vanno tuttavia sottolineati due fatti. In questi ultimi anni, studi su organismi modello hanno permesso l'identificazione e la caratterizzazione funzionale di numerosi geni che controllano questi processi, mettendone in luce la grandissima conservazione evolutiva. Parallelamente è stato scoperto che la trasformazione tumorale è causata da mutazioni che alterano il ciclo cellulare o la mitosi. E' pertanto evidente che lo studio dei meccanismi molecolari del ciclo cellulare e della mitosi, oltre a contribuire alla comprensione di un processo biologico fondamentale, potrà anche fornire importanti informazioni sulla carcinogenesi.

Azioni

Attività da svolgere

Nel prossimo triennio IIBPM intende continuare gli studi sui meccanismi molecolari del ciclo cellulare e della mitosi. In particolare, intende sviluppare questa linea di ricerca lungo sette direttrici principali:

- (1) lo studio del ruolo della GTPasi RAN e dei suoi regolatori nell'assemblaggio del fuso e nella divisione mitotica;
- (2) l'analisi della struttura e funzione dei centrioli e dei centrosomi;
- (3) lo studio delle interazioni tra microtubuli e cinetocori e dei meccanismi di segregazione cromosomica;
- (4) l'analisi genetico-molecolare della stabilità telomerica;
- (5) la dissezione genetico-molecolare della citochinesi;
- (6) lo studio del controllo mitotico da parte dei meccanismi cellulari di sorveglianza (checkpoints);
- (7) l'analisi del ruolo degli RNA associati all'apparato mitotico. Queste ricerche verranno condotte principalmente su cellule umane in coltura e sul sistema modello della *Drosophila*.



Punti critici e azioni da svolgere

I principali punti critici nello svolgimento del programma di ricerca riguardano il limitatissimo tasso di reclutamento di giovani ricercatori e la scarsità di personale tecnico. Va inoltre sottolineata la carenza di moderna strumentazione e la mancata sostituzione di apparecchiature ormai obsolete. Le ovvie azioni da svolgere consisterebbero nel reclutamento di ricercatori e tecnici e nell'erogazione di fondi adeguati per l'acquisto di attrezzature.

Competenze, tecnologie e tecniche di indagine

Sono integrate competenze scientifiche e tecnico-metodologiche e l'utilizzo di strumentazione avanzata per studi di biologia cellulare.

Il personale CNR coinvolto si avvale anche delle competenze e delle attrezzature disponibili presso il Dipartimento di Genetica e Biologia Molecolare dell'Università di Roma 'La Sapienza', che ospita numerosi ricercatori dell'IBPM.

Il personale ha competenze di genetica formale di *Drosophila*, genetica delle cellule somatiche, biologia molecolare degli acidi nucleici, biologia cellulare con particolare riguardo all'analisi dei cromosomi e della divisione cellulare.

Sotto il profilo metodologico, il personale utilizza le tecniche più avanzate di immunocolorazione e microscopia ottica per l'analisi di materiale fissato e di cellule viventi.

Strumentazione

Le principali apparecchiature a disposizione, comprendendo anche quelle del Dipartimento di Genetica e Biologia Molecolare dell'Università di Roma 'La Sapienza', sono:

- FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter) Facstar plus S/4.
- Microscopio confocale Leica TCS.
- 5 microscopi a fluorescenza dotati di CCD camera.
- 2 postazioni per analisi di cellule in vivo, una dotata di sistema Metamorph per acquisizione ed analisi delle immagini.
- Gene Amp 5700 per real time PCR.

Tecniche di indagine

Le principali tecniche utilizzate comprendono:

- Induzione, isolamento e mappatura di mutazioni che alterano la mitosi in *Drosophila*.
- Mutagenesi sito-specifica.
- Trasformazione della linea germinale di *Drosophila* e creazione di linee transgeniche.
- Clonaggio genico in vari tipi di vettori.
- Trasfezione di cellule in coltura di mammifero e di *Drosophila*.
- Espressione di proteine marcate con GFP in cellule di mammifero e di *Drosophila*.
- Espressione di proteine in batteri per la produzione di anticorpi.
- Immunofluorescenza indiretta per la localizzazione subcellulare di proteine.
- Tecniche per filmare il comportamento di proteine marcate con GFP in cellule viventi.
- Separazione di differenti popolazioni cellulari mediante FACS.
- RT PCR e Western blotting.
- Co-immunoprecipitazione e 'GST pulldown'.
- Tecnica del doppio ibrido in lievito.

Tecnologie

Fra le diverse tecnologie utilizzate in questa ricerca, ha assunto un ruolo preminente quella dell'inattivazione genica mediante RNA interference in cellule in coltura di *Drosophila* e di mammifero. Questa moderna tecnologia comprende la progettazione la sintesi di RNA a doppia elica, l'uso di varie tecniche di trasfezione cellulare e l'analisi in vivo e su materiale fissato dei fenotipi causati dall'inattivazione genica.

Collaborazioni (partner e committenti)

I ricercatori che operano nell'ambito della Commessa collaborano con diverse Istituzioni italiane e straniere, tra cui:

Dipartimento di Genetica e Biologia Molecolare e Centro di Eccellenza BEMM dell'Università di Roma 'La Sapienza'; Fondazione Mario Cesalpino (Roma); Istituto Regina Elena; (Roma); Rome Oncogenomic Center (ROC) Roma; Università di Pavia; Università di Lecce; Cornell University (USA); Stanford University (USA); University of North Carolina (USA); University of Cambridge (UK); University of Leeds (UK); University of Oxford (UK); Max Planck Institute of Biochemistry, (Monaco, Germania); National Institutes of Health (Bethesda, USA); Technion (Haifa, Israele); Istituto Weizmann, Rehovot (Israele).



<i>Richiesta nuove unità di personale</i>			
tempo determinato	tempo indet	non di ruolo*	Totale
0	2	0	2

*dottorati, borse di studio, assegni di ricerca



Modelli animali per lo studio di processi fisio-patologici e del comportamento



Modelli biologici per lo studio di malattie del metabolismo ed autoimmunitarie: validazione di terapie innovative

Dati generali

Progetto:	Modelli animali per lo studio di processi fisio-patologici e del comportamento
Tipologia di ricerca:	Progetti di sviluppo competenze
Istituto esecutore:	Istituto per l'endocrinologia e l'oncologia sperimentale "Gaetano Salvatore"
Sede principale svolgimento:	Sede principale Istituto
Dip. di prevista afferenza:	Scienze della Vita
Responsabile indicato:	CLAUDIA MIELE

Elenco dei partecipanti

Cito Ciro	liv. V	Matarese Giuseppe	liv. II	Rastelli Daniela	liv. VIII
D'Esposito Mario	V	Miele Claudia	II	Romano Gennaro	V
De Simone Salvatore	V	Monticelli Antonella	III	Salzano Salvatore	V
Galiano Nicola	V	Montuori Nunzia	III	Speranza Giulia	VII
Galli Paolo	VI	Peluso Maria	VII	Ungaro Paola	III
Laezza Chiara	III	Ragno Pia	III	Valentino Rossella	II

Temi

Tematiche di ricerca

Il progetto verrà sviluppato attraverso le seguenti linee di ricerca:

Modulo 1 -

- 1.1 Ruolo degli ormoni dell'asse ipotalamo ipofisario nella risposta immunitaria e nell'autoimmunità;
- 1.2. Ruolo della leptina nella patogenesi e terapia del diabete tipo 1;
- 1.3. Studio della correlazione patogenetica tra leptina e sclerosi multipla: identificazione e caratterizzazione di sistemi terapeutici e diagnostici;

Modulo 2 -

- 2.1. Caratterizzazione di modelli animali per lo studio di geni coinvolti nella patogenesi del diabete;
- 2.2. Il ruolo dello stress del reticolo endoplasmico nel meccanismo patogenetico del diabete;
- 2.3. Il ruolo degli endocannabinoidi nella patogenesi del diabete;
- 2.4. Studio della regolazione dell'espressione e della funzione del gene ped/pea-15 con riferimento alle complicanze croniche del diabete;
- 2.5. Identificazione e caratterizzazione di leads per la cura e la prevenzione del diabete;
- 2.6. Ruolo della funzione gene ped/pea-15 a livello del Sistema nervoso centrale;
- 2.7. Il ruolo del gene PREP-1 nel meccanismo patogenetico del diabete

Stato dell'arte

L'uso di modelli biologici, cellulari ed animali, rappresenta oggi uno strumento irrinunciabile per lo studio di malattie autoimmunitarie e metaboliche con base genetica e per la validazione di terapie innovative. Il diabete tipo 2 (DM2) è determinato da alterazioni della secrezione e dell'azione insulinica. Tuttavia i geni responsabili dell'insorgenza di questi due difetti rimangono sconosciuti nella maggioranza dei pazienti. Nel nostro laboratorio abbiamo già identificato due geni potenzialmente coinvolti nella patogenesi del DM2: Ped/pea-15 e Prep-1. Restano, tuttavia, da chiarire i meccanismi molecolari che mediano gli effetti di Ped/pea-15 e di Prep-1 sul metabolismo del glucosio. Inoltre, abbiamo già dimostrato che la leptina è uno dei principali responsabili della patogenesi di patologie autoimmunitarie e delle alterazioni della funzione immunitaria in patologie infiammatorie associate all'obesità. Di qui emerge l'importanza di identificare, generare e caratterizzare modelli biologici appropriati per lo studio dell'espressione e della funzione di geni-candidato nella patogenesi del DM2 e per valutare il ruolo di ormoni e citochine nella patogenesi di malattie autoimmunitarie



Azioni

Attività da svolgere

Come già indicato nel PdCP 2007-2009, il progetto verrà sviluppato attraverso le seguenti linee di ricerca:

Modulo 1 –

- 1.1 Ruolo degli ormoni dell'asse ipotalamo ipofisario nella risposta immunitaria e nell'autoimmunità;
- 1.2. Ruolo della leptina nella patogenesi e terapia del diabete tipo 1;
- 1.3. Studio della correlazione patogenetica tra leptina e sclerosi multipla: identificazione e caratterizzazione di sistemi terapeutici e diagnostici;

Modulo 2 –

- 2.1. Caratterizzazione di modelli animali per lo studio di geni coinvolti nella patogenesi del diabete;
- 2.2. Il ruolo dello stress del reticolo endoplasmico nel meccanismo patogenetico del diabete;
- 2.3. Il ruolo degli endocannabinoidi nella patogenesi del diabete;
- 2.4. Studio della regolazione dell'espressione e della funzione del gene ped/pea-15 con riferimento alle complicanze croniche del diabete;
- 2.5. Identificazione e caratterizzazione di leads per la cura e la prevenzione del diabete;
- 2.6. Ruolo della funzione gene ped/pea-15 a livello del Sistema nervoso centrale;
- 2.7. Il ruolo del gene PREP-1 nel meccanismo patogenetico del diabete

Punti critici e azioni da svolgere

Modulo 1: è di cruciale importanza la generazione di nuove strategie terapeutiche volte all'espansione delle cellule T regolatorie per immunoterapia adottiva del T1D e della sclerosi multipla.

Modulo2:Un punto critico del progetto è completare la caratterizzazione degli animali knock-out, essenziale per poter stabilire il ruolo del gene Ped/pea-15 nello sviluppo del Diabete tipo 2 e valutare quali siano le alterazioni metaboliche e molecolari determinate dall'assenza del gene. La difficoltà principale incontrata è stata l'espansione della linea dei topi KOPed, per cui non si è ottenuto un numero di animali sufficiente ad effettuare tutti gli esperimenti. Cruciale è inoltre, la generazione di un modello animale transgenico per il gene Prep-1. Una volta dimostrata la capacità del D4 di migliorare la sensibilità insulinica in vivo, sarà estremamente importante la costruzione di molecole in grado di interferire con l'azione di Ped/pea-15 sulla base delle sequenze note d'interazione. Una volta compreso il meccanismo d'azione di Ped/pea-15, gli animali verranno adoperati come modelli sperimentali per testare le nuove molecole.

Competenze, tecnologie e tecniche di indagine

Sviluppo di linee cellulari geneticamente modificate e di modelli animali di diabete tipo 2; studio del metabolismo lipidico e glucidico in vivo, studi di espressione e funzione genica sia in vitro che in vivo, studio della regolazione dell'espressione genica nell'uomo; studi comportamentali per valutare l'effetto dell'espressione di geni sul cervello in modelli animali; studio degli effetti di glucotossicità e lipotossicità sulla sensibilità all'insulina in vitro e in vivo; Immunologia cellulare e molecolare sia in vitro che in vivo. Sviluppo di modelli animali di malattie autoimmunitarie del sistema endocrino e nervoso; sviluppo di modelli di obesità nel topo; studio del sistema immunitario in soggetti obesi. Sviluppo e caratterizzazione di nuove molecole, piccoli peptidi o peptido-mimetici, che possono interferire nella struttura e/o nella funzione di geni-candidato coinvolti nella patogenesi del diabete tipo 2 ed autoimmunitarie

Strumentazione

Thermocycler per PCR

IQCycler per real time PCR

Camere elettroforetiche per gel di agarosio e di poliacrilammide + power suppliers

Gamma-counter

Citofluorimetro

Cell sorter

Tecniche di indagine

Espressione di geni in linee cellulari mediante trasfezione e generazione di costrutti per l'espressione in vivo. Analisi mediante Northern blot, Southern blot e PCR per l'espressione genica e Western blot per l'espressione proteica. Caratterizzazione metabolica degli animali mediante test di tolleranza al glucosio (GTT), test di tolleranza all'insulina (ITT), test di secrezione insulinica, valutazione del trasporto del glucosio in vivo. Analisi dell'interazione proteina-proteina e proteina-DNA



Tecnologie

- Isolamento di cellule da tessuti umani e murini
 - Trasfezioni stabili e transienti mediante liposomi
 - Generazione di vettori eucariotici e vettori adenovirali
 - Estrazione di proteine, RNA e DNA da cellule e tessuti umani e murini
 - PCR e Real-time PCR
 - Saggi ELISA, saggi RIA, saggi per la misura dell'attività di: tirosino-chinasi, serino-treonino chinasi, fosfolipasi, diacilglicerolo chinasi, glicogeno sintetasi, piruvato deidrogenasi, fosfatidil inositolo chinasi.
 - Saggi di doppio ibrido in lievito, pull-down e co-immunoprecipitazione
- Saggi EMSA e Chromatin immunoprecipitation

Collaborazioni (partner e committenti)

Prof. Johan Auwerx, Institut Clinique de la Souris, Francia

-Prof. Fatima Bosch, CBATEG, Universitat Autònoma de Barcelona, Spagna

-Prof. Markku Laakso, Dept. of Medicine, University of Kuopio, Finlandia

-Dr. Nigel Levens, Biovitrum AB, Svezia

-Prof. Carlo Pedone, Istituto di Biostrutture e Bioimmagini del CNR

-Dr. Menotti Ruvo, Istituto di Biostrutture e Bioimmagini del CNR

-Prof. Giorgio Sesti, Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università di Catanzaro Magna Grecia

-Prof. Ulf Smith, Lundberg Laboratory for Diabetes Research, Dept. of Internal Medicine, Sahlgrenska Academy, Göteborg University, Svezia

-Prof. Emmanuel Van Obberghen, Inserm U145, Faculté de Médecine, Nizza, Francia

-Prof. Juleen R. Zierath, Karolinska Institutet, Section of Integrative Physiology, Dept. of Surgical Science, Svezia

-La maggiore collaborazione è con IIBB del CNR e con i Centri della Tecnogen S.C.p.A. e della Sigma Tau con cui è in corso un programma finanziato con fondi MIUR (legge 297)

Vi sono inoltre collaborazioni con: Prof. Antonio La Cava (University of California Los Angeles, USA)-Prof. Steve O'Rahilly (University of Cambridge, UK)-Prof. Christos Mantzoros (Harvard University, USA)-Prof. Richard Ross (University of Sheffield, UK)-Dr. Edward Leiter (The Jackson Laboratory, USA)

Committenti industriali: SERONO, AMGEN, SIGMA-TAU

Iniziativa per l'acquisizione di ulteriori entrate

Durante l'anno 2007 sono stati finanziati i seguenti progetti di ricerca:

1. 'Il ruolo del gene Ped/pea-15 nel controllo della funzione beta-cellulare e nel diabete tipo 2' Ricerca Spontanea a Tema Libero CNR

2. 'The role of endoplasmic reticulum stress in the insulin-resistance induced by chronic hyperglycaemia' European Foundation for the Study of Diabetes (EFSD) and GlaxoSmithKline Programme for the Study of Metabolic Toxicity in Diabetes.

Sottomissione di progetto NMSS americana sul ruolo della leptina nella patogenesi della sclerosi multipla; collaborazione con Asterion Ltd, UK, per la genesi di anticorpi anti recettore della leptina; sottomissione di progetto all'ITN (Immune Tolerance Network) americano per progetti di fase prima per l'uso del recettore bloccante della leptina nella terapia sclerosi multipla; collaborazione con la SERONO SpA, per la caratterizzazione degli effetti immunomodulatori degli ormoni ipotalamo-ipofisari. Sottomissione di un progetto al MIUR per giovani ricercatori.

Finalità

Obiettivi

L'obiettivo generale della commessa è l'identificazione di nuovi geni potenzialmente coinvolti nella patogenesi del diabete tipo 2 e delle malattie infiammatorie croniche ad eziologia autoimmune e la generazione di modelli animali e linee cellulari per lo studio della funzione di tali geni. In particolare, si vuole caratterizzare: il ruolo dei geni Ped/pea-15 e Prep-1 nel diabete di tipo 2 e chiarirne le interazioni con altri geni che causano insulino-resistenza, alterata secrezione insulinica ed alterazioni della funzione neuronale; il ruolo della leptina, come elemento comune coinvolto nella patogenesi di sclerosi multipla, diabete autoimmune e infiammazione legata all'obesità. L'obiettivo finale è la generazione di molecole farmacologiche in grado di regolare l'attività e/o l'espressione di tali geni, come potenziale approccio terapeutico innovativo per la cura del diabete di tipo 2 e di malattie autoimmunitarie

Risultati attesi nell'anno

Modulo 1: analizzeremo la capacità espansiva delle cellule T regolatorie derivate da pazienti con T1D e sclerosi multipla esposte ad autoantigeni e la loro capacità soppressoria in modelli murini di malattia.

Modulo 2: Completeremo la caratterizzazione dei topi KOPed e betaTgPed. Valuteremo il coinvolgimento di GLUT1 e GLUT4 e delle proteine del signalling insulinico nel meccanismo di alterazione del trasporto del



glucosio indotto da stress del reticolo endoplasmico. Studieremo i meccanismi molecolari coinvolti nella regolazione dell'espressione di PI3K da parte degli endocannabinoidi ed il loro ruolo nell'insulino-resistenza. Indagheremo i meccanismi coinvolti nella repressione dell'espressione del gene Ped/Pea-15 indotta da HNF4alpha. Continuerà l'analisi di polimorfismi del gene nell'uomo. Valuteremo l'effetto di alcuni composti sul trasporto del glucosio in cellule muscolari L6. Chiariremo i meccanismi molecolari attraverso cui Ped/Pea-15 regola l'espressione di tirosina-idrossilasi in cellule neuronali. Eseguiremo studi comportamentali sui topi KOPed. Chiariremo i meccanismi coinvolti nel miglioramento della sensibilità all'insulina nei topi ipomorfi per Prep-1.

Potenziale impiego

- per processi produttivi

Sviluppo e caratterizzazione di nuove molecole, piccoli peptidi o peptido- mimetici, che possono interferire nella struttura e/o nella funzione di geni-candidato coinvolti nella patogenesi del diabete di tipo 2 e di malattie autoimmunitarie. Produzione di antagonisti di ormoni e citochine o dei loro recettori (anticorpi monoclonali bloccanti, recettori solubili, molecole con azione antagonista)

- per risposte a bisogni individuali e collettivi

Generazione e caratterizzazione di modelli animali e linee cellulari per lo studio della funzione di geni potenzialmente coinvolti nella patogenesi del diabete tipo 2 e di malattie autoimmunitarie, nell'infiammazione cronica e nella terapia dell'obesità.

Tali aspetti potranno avere un grande impatto nelle problematiche di salute pubblica connesse a tali patologie

Moduli

Modulo: Correlazione tra sistema immunitario e sistema endocrino: modelli di alterata funzione del sistema immunitario come causa di patologie
Istituto esecutore: Istituto per l'endocrinologia e l'oncologia sperimentale 'Gaetano Salvatore'
Luogo di svolgimento attività: Sede principale Istituto

Modulo: Studio dell'espressione e della funzione di geni e proteine coinvolte nel diabete di tipo 2
Istituto esecutore: Istituto per l'endocrinologia e l'oncologia sperimentale 'Gaetano Salvatore'
Luogo di svolgimento attività: Sede principale Istituto

Risorse commessa 2008

Pers. tempo ind/det	Funz.+ Invest.	Spese da Fonti Esterne	Spese per Infrastrutt. tecn.-scient a gestione accentrata	Totale	Risorse da esercizi precedenti	Massa Spendibile	Costi figurativi	Spese generali accentrate	Valore Effettivo
1	2	3	4	5=1+2+3+4	6	7=2+3+6	8	9	10=5+6+8+9
630	0	831	0	1.461	500	1.331	217	N.D.	2.178

valori in migliaia di euro

Unità di personale di ruolo*	
ricercatori	Totale
8	16

*equivalente tempo pieno

Unità di personale non di ruolo									
associato	dottorando	borsista	assegnista	specializzando	incaricato di ricerca	professore visitatore	collaboratore professionale	altro	Totale
4	8	3	1	0	0	0	0	1	17

Richiesta nuove unità di personale			
tempo determinato	tempo indet	non di ruolo*	Totale
0	4	0	4

*dottorati, borse di studio, assegni di ricerca



Modelli Biologici dei Sistemi Cognitivi

Dati generali

Progetto:	Modelli animali per lo studio di processi fisio-patologici e del comportamento
Tipologia di ricerca:	Progetti relativi a linee tematiche a carattere strategico
Istituto esecutore:	Istituto di scienze e tecnologie della cognizione
Sede principale svolgimento:	Sede principale Istituto
Dip. di prevista afferenza:	Scienze della Vita
Responsabile indicato:	ELISABETTA VISALBERGHI

Elenco dei partecipanti

	liv.		liv.		liv.
Addressi Elsa	III	Natale Francesco	III	Spinozzi Maria Giovanna	II
Cecconi Federico	V	Neri Mario	V	Visalberghi Elisabetta	I
Fidanza Luigi	VI	Poti Patrizia	III	Vitali Isabella	VI
Mancuso Patrizia	V	Properzi Letizia	V		

Temi

Tematiche di ricerca

Studi sperimentali sull'organizzazione percettiva, sulla conoscenza dello spazio, sul ragionamento inferenziale e analogico, sulle capacità simboliche dei cebi dai cornetti e di altri primati. Le capacità simboliche sono studiate sia in un contesto di scambio che nel dominio spaziale. Studio dei processi di acquisizione e trasmissione dell'uso di strumenti nel cebo dai cornetti sia in natura, sia in laboratorio. Selezione degli strumenti in base alla loro funzionalità. Definizione della corretta stabulazione degli animali dedicati alla ricerca ed elaborazione di protocolli atti ad ottimizzarne il benessere psico-fisico. Studio del benessere della colonia di Cebus apella dell'I.S.T.C. con particolare riguardo allo studio dei valori ematologici al fine di ottenere i range normali di riferimento per la specie. Attività di formazione per personale del settore e attività didattica per studenti di ogni ordine e grado.

Stato dell'arte

Per comprendere l'evoluzione biologica, comportamentale e culturale della specie umana è necessario studiare il comportamento e le capacità cognitive dei primati non umani. La comparazione dei risultati ottenuti con quelli di analoghi studi effettuati sull'uomo, in particolare sui bambini, permette di identificare uguaglianze e differenze nell'organizzazione cognitiva delle diverse specie e di tracciare i percorsi evolutivi che hanno portato ad Homo sapiens.

Azioni

Attività da svolgere

Saranno realizzate le attività sperimentali programmate nell'ambito dei progetti 'ANALOGY' e 'SOCCOP'. Verrà utilizzato il touch screen per la soluzione di compiti di matching to sample; proseguirà la raccolta dati sull'uso di strumenti in natura e inizierà lo studio di processi cognitivi di tipo analogico su cebi e scimpanzé. Si procederà alla modellizzazione di alcune reti neurali utile a approfondire il ruolo delle variabili rivelatesi significative nei test. Continueranno le osservazioni su antagonismo e cooperazione in natura e in cattività. Nell'ambito del Progetto 'SEDSU' si divulgheranno i risultati conseguiti e si proseguirà con la raccolta e l'analisi dei dati su: uso di oggetti simbolici in attività di scambio e rappresentazione del valore utilizzando sia cibi reali sia oggetti simbolici; uso simbolico dei riferimenti spaziali in Cebus apella; percezione dell'equivalenza fra oggetti reali e loro immagini bidimensionali ed effetto della colinearità di elementi figurati sul raggruppamento percettivo dei cebi e del ruolo dell'attenzione sull'elaborazione globale/locale degli stimoli visivi.

Benessere animale e controllo sanitario saranno alla base dell'attività di gestione

Punti critici e azioni da svolgere

Bisognerà individuare i supporti tecnologici più funzionali a risolvere i particolari problemi connessi alla sperimentazione su primati. Rinnovo della convenzione con la Fondazione Bioparco, che permette al Centro primati di essere ospitato gratuitamente all'interno del Bioparco, in cambio di una serie di servizi e consulenze che i ricercatori ISTC-CNR garantiscono. Sarà fondamentale operare al fine di garantire un'adeguata prospettiva occupazionale ad alcuni dei giovani collaboratori formati presso il centro, la cui professionalità si colloca su livelli di eccellenza ed è ormai una condizione irrinunciabile per la prosecuzione delle attività previste nella commessa. Essenziale per il programma di lavoro individuato è la disponibilità di



un costante ed adeguato finanziamento che permetta al Centro Primati dell'ISTC di funzionare al meglio, in modo da garantire una corretta stabulazione degli animali ospitati nel rispetto delle loro esigenze biologiche e comportamentali. Inoltre è necessario prevedere sbocchi occupazionali per nuovo personale di ricerca e tecnico e l'inserimento di un consulente statistico al fine di pianificare e analizzare al meglio le ricerche da condurre.

Competenze, tecnologie e tecniche di indagine

I ricercatori (biologi, naturalisti, psicologi, filosofi e neuroscienziati) cooperano nell'individuare i parametri comportamentali in grado di caratterizzare specifici comportamenti e capacità cognitive presenti nella varie specie di primati. Inoltre, mettono a punto disegni sperimentali in grado di sostenere specifiche ipotesi.

Strumentazione

La risorsa di base nell'attività della nostra commessa è rappresentata dal nostro Centro Primati, creato nel 1984 e situato all'interno del Bioparco di Roma. Tale centro, in cui è compreso anche un laboratorio dove vengono relizzate quasi tutte le attività sperimentali previste, ospita al momento 28 individui della specie *Cebus apella*. La presentazione di problemi e stimoli durante l'attività sperimentale avviene sia in modo diretto che attraverso procedure computerizzate.

Tecniche di indagine

Osservazione del comportamento spontaneo, stimolazione di particolari comportamenti attraverso modificazione del contesto sociale e fisico. La presentazione di problemi e stimoli avviene sia in modo diretto che attraverso procedure computerizzate.

Tecnologie

Utilizzo di Observer, Matlab, E-prime. Modellazione di reti neurali. Realizzazione di filmati in grado di consentire la microanalisi comportamentale.

Collaborazioni (partner e committenti)

Univ. of Kyoto, Giappone; Max-Planck Inst., Leipzig, Germania; Univ. of Georgia, Athens USA; Univ. of S. Paulo, Brasile; Goldsmiths College, UK; CNRS-Marseille, Francia; Univ. of Portsmouth, UK; Lund Univ., Svezia; Univ. of Leicester, UK; Princeton Univ. USA; Duke University, USA; Harvard University USA; Fundacao BioBrasil, Brasile; Univ. di Parma; Univ. di Padova; Univ. 'La Sapienza', Roma; Univ. Tor Vergata, Roma; Univ. Roma Tre, Roma; New Bulgarian University (Bulgaria); Université de Bourgogne, Dijon, Francia; University of Cambridge, UK; Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Germany; University College Dublin, Irlanda; University of Athens, Grecia; Birkbeck College, University of London, UK; University of British Columbia, Canada; Central European University, Ungheria; Santa Fe Institute, USA; Collegium Budapest and Eötvös Univ., Ungheria; Univ. di Siena; Univ. of Oxford, UK; Université de Pierre et Marie Curie, Francia; Univ. College of London, UK; Universitat Pompeu Fabra, Spagna; Univ. of Zürich, Svizzera; Humboldt University, Germania; Parco Faunistico Piano dell'Abatino (Rieti).

Iniziativa per l'acquisizione di ulteriori entrate

Verrà incassata la seconda tranche del finanziamento relativo al Progetto Europeo 'Analogy', che si articola su base triennale.

Verrà valutata la possibilità di proseguire il progetto SEDSU con gli stessi partner.

È stato presentato al competente Ministero un nuovo progetto per la divulgazione scientifica, che prevede la diffusione a un'ampio pubblico di tematiche inerenti la ricerca sui primati non umani e sull'evoluzione, allo scopo di promuovere una riflessione critica sugli aspetti etici connessi alla ricerca e ai giardini zoologici. Verrà incassata la prima tranche del finanziamento relativo al Progetto SOCCOP (TECT-ESF), che si articolerà su base triennale. Sugli stessi temi di questo progetto (trading and cooperation), e in collaborazione con alcuni dei partner in esso coinvolti, si cercherà inoltre di concorrere ai finanziamenti previsti nell'ambito del VII programma quadro.

Verrà presentata nel 2008 un progetto PRIN in collaborazione con l'Università di Parma e l'Università di Padova.

Finalità

Obiettivi

Identificazione di uguaglianze e differenze nell'organizzazione cognitiva di diverse specie di primati, compreso l'uomo. Esame comparativo dei comportamenti e delle capacità cognitive in cattività e in natura di diverse specie di Primati non umani. Ricostruzione del percorso evolutivo che ha portato all'emergenza della specie *Homo sapiens*. Divulgazione scientifica e ricaduta didattica dei risultati di ricerca. Corretta stabulazione di scimmie usate per la ricerca ed elaborazione di protocolli per aumentare il loro benessere psicofisico.



Risultati attesi nell'anno

Caratterizzazione dell'uso di strumenti dei cebi in natura e comparazione con i dati disponibili per le antropomorfe; analisi delle variabili ecologiche che influenzano il comportamento di uso di strumenti. Analisi della selezione di strumenti in base a caratteristiche funzionali e ragionamenti di tipo analogico in cebi (in natura e in laboratorio), scimpanzé e bambini. Dati sperimentali di comparazione fra scimpanzé e cebi sulla capacità di sfruttare l'informazione spaziale contenuta in modelli in scala per guidare una ricerca in ambiente reale... Configurazioni di riferimenti...

Dati sulla capacità dei cebi di comprendere relazioni tra relazioni e risultati di esperimenti effettuati con adulti di *Cebus apella* e bambini, in problemi di 'matching-to-sample'. Aggiornamento del database riguardante dati demografici, parametri fisiologici ed ematici, principali e/o più frequenti malattie nella nostra colonia di cebi e relative terapie veterinarie. Inoltre ci aspettiamo visite di studenti, di ogni ordine e grado, ed una maggiore interazione con i visitatori del Bioparco.

Potenziale impiego

- per processi produttivi

- per risposte a bisogni individuali e collettivi

Le conoscenze sulla cognizione animale informano ed influenzano le politiche di protezione e di promozione del benessere animale. In particolare, la conoscenza degli animali selvatici serve a promuovere e a favorire le politiche di conservazione nei paesi in via di sviluppo. I primati hanno inoltre un forte impatto emozionale e sono spesso usate con successo come specie-simbolo per proteggere la biodiversità di interi ecosistemi.

Una prospettiva comparativa, inoltre, può contribuire al dibattito corrente sull'efficacia di modelli impliciti versus modelli espliciti di insegnamento e apprendimento.

In più, una corretta interpretazione della relazione evolutiva fra l'uomo e gli altri primati consente di caratterizzare correttamente la natura stessa dell'intelligenza umana fungendo da potenziale argine contro politiche di discriminazione razziale.

Moduli

Modulo: Modelli Biologici dei Sistemi Cognitivi
Istituto esecutore: Istituto di scienze e tecnologie della cognizione
Luogo di svolgimento attività: Sede principale Istituto

Risorse commessa 2008

Pers. tempo ind/det	Funz.+ Invest.	Spese da Fonti Esterne	Spese per Infrastrutt. tecn.-scient a gestione accentrata	Totale	Risorse da esercizi precedenti	Massa Spendibile	Costi figurativi	Spese generali accentrate	Valore Effettivo
1	2	3	4	5=1+2+3+4	6	7=2+3+6	8	9	10=5+6+8+9
382	0	0	0	382	0	0	24	N.D.	406

valori in migliaia di euro

<i>Unità di personale di ruolo*</i>	
ricercatori	Totale
5	7

*equivalente tempo pieno

<i>Unità di personale non di ruolo</i>									
associato	dottorando	borsista	assegnista	specializzando	incaricato di ricerca	professore visitatore	collaboratore professionale	altro	Totale
1	0	1	2	0	0	0	0	0	4

<i>Richiesta nuove unità di personale</i>			
tempo determinato	tempo indet	non di ruolo*	Totale
0	4	3	7

*dottorati, borse di studio, assegni di ricerca



Modelli animali di deficit neurocomportamentale: meccanismi di adattamento a stress

Dati generali

Progetto:	Modelli animali per lo studio di processi fisio-patologici e del comportamento
Tipologia di ricerca:	Progetti relativi a linee tematiche a carattere strategico
Istituto esecutore:	Istituto di neuroscienze
Sede principale svolgimento:	Sede di Roma
Dip. di prevista afferenza:	Scienze della Vita
Responsabile indicato:	FRANCESCA ROMANA D'AMATO

Elenco dei partecipanti

	liv.		liv.		liv.
Battaglia Mario	IV	Luvisetto Siro	III	Pavone Flaminia	II
D'Amato Francesca Romana	II	Moles Anna	III	Populin Roberta	V
Ferri Alberto	III	Nucita Lorenzo	IV	Teule Anne Marie	I
Gorini Rosanna	II				

Tem

Tematiche di ricerca

L'utilizzo dei modelli animali per lo studio dei meccanismi di adattamento all'ambiente è fondamentale per la comprensione della fisiologia e della patologia di differenti sistemi, compreso il sistema neuro-comportamentale. Dal punto di vista dell'organismo l'adattamento assume forme diverse che sono alla base del concetto di plasticità nelle sue diverse forme, da quelle legate allo sviluppo, alla registrazione di nuove esperienze ai veri e propri meccanismi di adattamento allo stress.

Questa commessa si occupa della risposta comportamentale allo stress durante lo sviluppo e nell'età adulta. Oggetto di indagine sono sia i meccanismi molecolari che le risposte fisio-patologiche e comportamentali.

Stato dell'arte

La ricerca in questo campo ha utilizzato modelli animali prevalentemente murini per evidenziare il ruolo di fattori genetici e ambientali nella espressione del comportamento spontaneo e delle capacità cognitive dell'animale, utilizzando differenti approcci sperimentali. La manipolazione delle due componenti (genetica e ambientale) e della loro interazione, permetterà di effettuare interventi terapeutici di tipo farmacologico e/o ambientale nella modulazione della risposta dell'animale.

Inoltre modelli sperimentali murini hanno da tempo dimostrato un legame tra stress ossidativo e deficit cognitivi.

Azioni

Attività da svolgere

a. Studio dei meccanismi che mediano gli effetti dello stress nel topo. Saranno effettuate analisi su parametri neurobiologici e comportamentali nei piccioli e nella madre in fasi differenti dello sviluppo, in seguito a esposizione a stress acuto e/o cronico. Sarà valutato il ruolo di un deficit nel sistema oppioide sullo sviluppo del comportamento sociale. Saranno effettuati test comportamentali relativi ai disturbi della condotta alimentare negli animali stressati. Sarà valutato l'effetto di un ambiente arricchito durante lo sviluppo, su alcuni parametri comportamentali cognitivi, emozionali e affiliativi, negli animali in età adulta.

b. Studio delle alterazioni nel metabolismo dei ROS, con particolare riguardo ad alterazioni della funzionalità mitocondriale, in modelli murini transgenici per la forma umana dell'enzima antiossidante Cu,Zn-superossido dismutasi (SOD1), coinvolto in patologie neurodegenerative quali la SLA di tipo familiare e la sindrome di Down.

Punti critici e azioni da svolgere

a. Abbiamo intenzione di misurare il legame di attaccamento alla madre in topi che hanno sperimentato diversi trattamenti postnatali per verificare deficit durante le prime fasi di sviluppo e la loro relazione con disturbi alimentari, cognitivi e affiliativi nell'animale adulto. Stiamo mettendo a punto uno stress psicosociale da applicare negli animali durante la fase dell'adolescenza che si presenta di particolare vulnerabilità per i disturbi del comportamento alimentare e a rischio per l'obesità

b. Allo stato attuale abbiamo caratterizzato un legame tra SOD1 con mutazioni SLA localizzata nel comparto mitocondriale e un incrementato flusso di ROS all'interno del mitocondrio stesso. Inoltre abbiamo clonato in un opportuno vettore di espressione il cDNA codificante l'enzima antiossidante Glutazione Reduttasi (GR),



corredandolo della sequenza segnale per la localizzazione mitocondriale, abbiamo testato la bontà del sistema di espressione in colture cellulari e ci stiamo accingendo a generare un modello murino tr

Competenze, tecnologie e tecniche di indagine

Lo studio del comportamento di cui si occupa questa commessa è strettamente collegato ai correlati neurobiologici. Nell'ambito della commessa esistono le competenze necessarie sia per l'analisi dei fattori causali, ontogenetici e funzionali legati allo studio del comportamento e sia le competenze legate all'analisi dei suoi correlati neurobiologici. Anche l'approccio farmacologico fa parte delle competenze della commessa. Le numerose collaborazioni già in atto con altre unità operative ampliano ulteriormente la capacità di esplorare settori differenti e di effettuare analisi translazionali.

Inoltre lo studio dei meccanismi molecolari alla base dei processi neurodegenerativi si avvale di competenze nell'ambito della biologia molecolare e cellulare.

Strumentazione

Sono a nostra disposizione una serie di apparecchiature che permettono di effettuare uno screening del comportamento del topo di ampio raggio. Siamo in grado di effettuare analisi sofisticate e automatizzate del comportamento spontaneo e delle vocalizzazioni. Abbiamo l'attrezzatura sperimentale per analizzare i processi di apprendimento e memoria (test di evitamento attivo e passivo, labirinti radiali, labirinti a ST, labirinto ad acqua), per valutare l'emozionalità (labirinto a croce sopraelevata, test luce/buio, open field, test di esplorazione libera), la risposta al dolore (test del tail-flick, hot-plate, test della formalina), per misurare il comportamento alimentare (gabbie automatizzate per la misura dell'attività locomotoria e del consumo di cibo. Stereotassico.

Sono inoltre a disposizione una serie di apparecchiature per la biologia cellulare e molecolare: PCR, ultracentrifughe, apparecchi per elettroforesi, dispositivi per lettura di gel, macchina per HPLC ed FPLC, attrezzatura per colture cellulari, microscopio rovesciato, microscopio confocale, telecamere, criostato, vibratomo, ultramicrotomo, microscopi da dissezione, microscopi confocali, microscopi.

Tecniche di indagine

- Metodiche di raccolta automatizzata e manuale del comportamento animale;
- Tecniche di decodificazione del comportamento;
- Protocolli sperimentali di manipolazioni dei piccoli durante le prime due settimane di vita postnatale;
- Protocolli sperimentali di stress psicosociale;
- Protocolli sperimentali di valutazione dello sviluppo psicomotorio durante lo sviluppo;
- Analisi delle vocalizzazioni nella banda degli ultrasuoni
- Mantenimento e genotipizzazione di colonie di animali knockout
- Costruzione di vettori di espressione proteica da utilizzare per la trasfezione di colture cellulari.
- Costruzione di vettori di espressione per la costruzioni di modelli murini transgenici.

Tecnologie

Collaborazioni (partner e committenti)

Sono in corso una collaborazioni con differenti gruppi di ricerca presso

Università di Roma La Sapienza,

Università di Roma Tor Vergata,

Università di Parma,

Università di Sassari,

Istituto Superiore di Sanità

Istituto San Raffaele Milano.

EMBL Monterotondo.

Dept Animal Physiology, Univ Groningen, The Netherlands.

Dept Molecular Neuropharmacology, Krakow, Poland.

CNRS ESBS Univ Louis Pasteur Strasbourg

Dept Chemistry & Biochemistry, UCLA, Los Angeles

Iniziativa per l'acquisizione di ulteriori entrate

- Valutare la possibilità di effettuare una richiesta di fondi all'NIH in collaborazione con B Kieffer su 'Basic and Translational Research Opportunities in the Social Neuroscience of Mental Health (R01) [SF424 (R&R)]'.
- Partecipazione a progetti del VII PQ.
- richiesta fondi fondazioni diverse



Finalità

Obiettivi

L'obiettivo di queste ricerche è

- La comprensione dei meccanismi molecolari alla base del comportamento e del ruolo dei fattori genetici e ambientali nei meccanismi di adattamento a condizioni alterate dell'ambiente interno ed esterno all'organismo.
- La comprensione del ruolo delle specie radicaliche dell'ossigeno nei processi neurodegenerativi.
- Lo studio delle relazioni tra stress ossidativo e deficit neurocomportamentali in modelli animali di neurodegenerazione
- La costruzione di opportuni vettori di espressione in grado di veicolare in diversi compartimenti cellulari enzimi ad azione antiossidante con lo scopo di intercettare il danno ossidativo rilevabile in diverse patologie neurodegenerative
- Comprensione dei meccanismi molecolari alla base della vulnerabilità all'obesità

Risultati attesi nell'anno

a. Mettere in evidenza alterazioni nella fisiologia e nei comportamentali in seguito a stress neonatale. Comprendere il ruolo della madre nella risposta allo stress dei piccoli utilizzando animali knockout per il recettore 5HT_{1A} e μ -KO. Evidenziare fasi critiche sensibili allo stress durante lo sviluppo per i disturbi alimentari.

b. Costruzione del modello sperimentale murino transgenico per GR e caratterizzazione degli eventuali fondatori.

Potenziale impiego

- per processi produttivi

- Messa a punto di modelli animali per screening di farmaci che agiscono sia sul comportamento alimentare che sul metabolismo;
- Messa a punto di modelli animali per lo studio di terapie comportamentali e/o farmacologiche in grado di ridurre gli effetti di stress neonatali.
- Messa a punto di modelli di stress psicosociale cronico in età differenti dello sviluppo
- Studio di sostanze ad azione antiossidante con tropismo mitocondriale in grado di attenuare processi di stress ossidativo.
- Costruzione di vettori di espressione in grado di veicolare enzimi ad azione antiossidante provvisti di opportune sequenze leader per la localizzazione mitocondriale, utilizzabili per generare modelli cellulari o animali transgenici

- per risposte a bisogni individuali e collettivi

- Comprensione dei meccanismi di adattamento a stress e messa a punto di possibili terapie farmacologiche e/o comportamentali.
- Utilizzo dei costrutti sopra riportati per scopi terapeutici in patologie neurodegenerative, dove lo stress ossidativo sembra avere un ruolo chiave.
- Ricerca di deficit neurocomportamentali da usare come reperti diagnostici precoci in patologie neurodegenerative quali la sclerosi laterale amiotrofica, con lo scopo di intervenire con opportune terapie prima che la patologia mostri i sintomi in fase conclamata.
- Ruolo dello stress sulla vulnerabilità all'obesità in fasi differenti di sviluppo

Moduli

Modulo: Modelli animali di deficit neurocomportamentale: meccanismi di adattamento a stress - modelli animali
Istituto esecutore: Istituto di neuroscienze
Luogo di svolgimento attività: Sede di Roma

Modulo: Studio dei meccanismi molecolari di processi neurodegenerativi
Istituto esecutore: Istituto di neuroscienze
Luogo di svolgimento attività: Sede di Roma

Modulo: Valutazione del benessere animale e formazione del personale
Istituto esecutore: Istituto di neuroscienze
Luogo di svolgimento attività: Sede di Roma



Risorse commessa 2008

Pers. tempo ind/det	Funz.+ Invest.	Spese da Fonti Esterne	Spese per Infrastrutt. tecn.-scient a gestione accentrata	Totale	Risorse da esercizi precedenti	Massa Spendibile	Costi figurativi	Spese generali accentrate	Valore Effettivo
1	2	3	4	5=1+2+3+4	6	7=2+3+6	8	9	10=5+6+8+9
267	8	65	0	340	9	82	32	N.D.	381

valori in migliaia di euro

<i>Unità di personale di ruolo*</i>	
ricercatori	Totale
4	5

*equivalente tempo pieno

<i>Unità di personale non di ruolo</i>									
associato	dottorando	borsista	assegnista	specializzando	incaricato di ricerca	professore visitatore	collaboratore professionale	altro	Totale
0	4	0	0	0	1	0	1	0	6

<i>Richiesta nuove unità di personale</i>			
tempo determinato	tempo indet	non di ruolo*	Totale
1	3	0	4

*dottorati, borse di studio, assegni di ricerca



Modelli animali per applicazioni terapeutiche

Dati generali

Progetto:	Modelli animali per lo studio di processi fisio-patologici e del comportamento
Tipologia di ricerca:	Progetti relativi a linee tematiche a carattere strategico
Istituto esecutore:	Istituto di tecnologie biomediche
Sede principale svolgimento:	Sede principale Istituto
Dip. di prevista afferenza:	Scienze della Vita
Responsabile indicato:	PAOLO MARIA VEZZONI

Elenco dei partecipanti

	liv.		liv.		liv.
Carmarino Silvana	VI	Gambirasio Francesco	VII	Susani Lucia	VI
Costantino Elvira	II	Musio Antonio	III	Torti Mariagiovanna	VI
Di Carlo Michela	VI	Strina Dario	VI	Vezzoni Paolo Maria	II
Frattoni Annalisa	III				

Tem

Tematiche di ricerca

1. Produzione di animali transgenici 2. Screening e analisi di topi transgenici 3. Indagini su nuovi approcci terapeutici in modelli murini di malattie genetiche

Stato dell'arte

Negli ultimi anni, le tecnologie di modificazione del genoma in embrioni murini (transgenesi, ricombinazione omologa, trasferimento nucleare) ha acquisito un'importanza fondamentale nella ricerca biologica e medica. In particolare esse consentono di creare modelli animali di malattie umane, che possono poi venir utilizzate per lo studio della patogenesi delle malattie e/o per testare nuovi approcci terapeutici.

Azioni

Attività da svolgere

Ci proponiamo di continuare l'attività svolta utilizzando gli stessi modelli per studiare la possibilità di curare malattie genetiche attraverso l'uso di cellule staminali di varia origine. Nel topo *oc/oc*, modello di osteopetrosi ATP6a3-dipendente, valuteremo se l'utilizzo di cellule fetali o embrionali (ESC) produca risultati migliori di quelli ottenuti con cellule staminali ematopoietiche adulte. Nel topo *rankl^{-/-}*, modello di osteopetrosi con assenza di osteoclasti dovuto ad un difetto molecolare nel gene che codifica per la citochina RANKL, valuteremo l'utilizzo di cellule mesenchimali fetali. Ulteriori studi verranno effettuati nel topo *gl/gl*, affetto da osteopetrosi OSTM1-dipendente, e nel topo *twicher*, modello di sindrome di Krabbe, per comprenderne meglio la base patogenetica. ESC modificate nel gene SMC1 verranno inoltre studiate per comprendere meglio il difetto di sviluppo che è presente nella sindrome di Cornelia de Lange

Punti critici e azioni da svolgere

I punti più critici sembrano essere la cultura di cellule staminali mesenchimali per il trattamento del topo *rankl^{-/-}*, in quanto questo tipo di cellule risulta poco caratterizzato e sono spesso presentati discordanti in letteratura a proposito del loro potenziale differenziativo.

Competenze, tecnologie e tecniche di indagine

Competenze di biologia molecolare, genetica umana e manipolazione embrioni murini

Strumentazione

Strumentazione standard per ingegneria genetica e apparato per manipolazione murina

Tecniche di indagine

Tecnologie di ingegneria genetica

Tecnologie

Transgenesi e ricombinazione omologa in cellule staminali embrionali. Utilizzo di cellule embrionali e adulte a scopi terapeutici



Collaborazioni (partner e committenti)

1. CNR, Istituto di Biologia Cellulare e Centro EMMA di Monterotondo
2. Centro Comune di Ricerca di Ispra
3. Istituto Tumori di Milano
4. National Health Institutes di Bethesda
5. Albert Einstein University di New York

Iniziative per l'acquisizione di ulteriori entrate

Abbiamo fatto domanda all'interno di un PRIN e lo faremo alla Fondazione Telethon

Finalità

Obiettivi

1) Produrre modelli murini di malattie genetiche umane; 2) Definire nuovi approcci terapeutici per la terapia di malattie genetiche basati su metodiche di ingegneria genetica

Risultati attesi nell'anno

Ci attendiamo di ottenere risultati sulla fattibilità del trattamento con cellule fetali nei topi oc/oc, mentre per gli altri ceppi di topo dovremmo avere dati preliminari.

Potenziale impiego

- per processi produttivi

Gli animali transgenici sviluppati per studi tossicologici rispondono ad una necessità molto sentita dalle industrie chimiche che hanno la necessità di conoscere in tempi rapidi l'eventuale tossicità dei loro composti.

- per risposte a bisogni individuali e collettivi

La necessità di nuove terapie per la cura del cancro e delle malattie genetiche è un bisogno fondamentale nel settore della salute umana.

Moduli

Modulo: Modelli animali innovativi
Istituto esecutore: Istituto di tecnologie biomediche
Luogo di svolgimento attività: Sede principale Istituto

Modulo: Modelli per lo studio di fattori neuroprotettivi
Istituto esecutore: Istituto di tecnologie biomediche
Luogo di svolgimento attività: Sede principale Istituto

Risorse commessa 2008

Pers. tempo ind/det	Funz.+ Invest.	Spese da Fonti Esterne	Spese per Infrastrutt. tecn.-scient a gestione accentrata	Totale	Risorse da esercizi precedenti	Massa Spendibile	Costi figurativi	Spese generali accentrate	Valore Effettivo
1	2	3	4	5=1+2+3+4	6	7=2+3+6	8	9	10=5+6+8+9
288	19	225	0	532	218	462	70	N.D.	820

valori in migliaia di euro

<i>Unità di personale di ruolo*</i>	
ricercatori	Totale
3	6

*equivalente tempo pieno

<i>Unità di personale non di ruolo</i>									
associato	dottorando	borsista	assegnista	specializzando	incaricato di ricerca	professore visitatore	collaboratore professionale	altro	Totale
0	0	0	5	0	0	0	0	2	7

<i>Richiesta nuove unità di personale</i>			
tempo determinato	tempo indet	non di ruolo*	Totale
2	2	1	5

*dottorati, borse di studio, assegni di ricerca



Sviluppo e funzionamento dei sistemi complessi - Uso di modelli biologici

Dati generali

Progetto:	Modelli animali per lo studio di processi fisio-patologici e del comportamento
Tipologia di ricerca:	Progetti di sviluppo competenze
Istituto esecutore:	Istituto di genetica e biofisica 'Adriano Buzzati Traverso'
Sede principale svolgimento:	Sede principale Istituto
Dip. di prevista afferenza:	Scienze della Vita
Responsabile indicato:	SILVANA GARGANO

Elenco dei partecipanti

	liv.		liv.		liv.
Aliperti Anna Maria	VII	Di Giacomo Alfredo	VII	Moscatiello Francesco	VII
Andone Silvia	V	Di Porzio Umberto	I	Navarra Gerardo	VII
Arbucci Salvatore	VI	Digilio Filomena Anna	III	Noviello Ciro	V
Bazzicalupo Paolo	I	Eposito Bruno	IV	Pellicano' Domenico	VIII
Beato Antonio	IV	Franco Alfredo	VII	Porzio Concetta	VII
Bellopede Annunziata	VII	Fusco Ciro	IV	Ragosta Giuseppe	VII
Cavaliere Daniela	V	Gargano Silvana	II	Rallo Claudia	VI
Chiurazzi Maurizio	II	Gigliotti Silvia	III	Rocco Rosaria	VII
Cossu Simone	VI	Graziani Franco	I	Russo Alessandra	VII
Cozzuto Luigi	VIII	Iaccarino Maria Rosaria	IV	Sarracino Fabiana	VIII
De Falco Antonio	VI	La Volpe Adriana	II	Secondulfo Antonietta	VI
De Falco Vincenzo	VII	Lauro Pasquale	VII	Sepe Gennaro	VII
De Luise Bruno	IV	Manna Filomena	V	Sicilia Giuseppina	VIII
Defez Roberto	II	Miele Elia	VI	Torelli Raimondo	V
Desideri Carmela	IV	Mignoli Emiliana	VII	Vado Luciano	V

Temi

Tematiche di ricerca

L'uso di sistemi modello e' universalmente riconosciuto come un momento focale nello studio di meccanismi molecolari coinvolti nello sviluppo e differenziamento e di geni-malattia. Il continuo miglioramento degli approcci sperimentali ed il costante aggiornamento di banche dati dei sistemi modello costituiscono un imprescindibile attributo di una ricerca di alto profilo. La commessa raggruppa un insieme di ricercatori che si occupano di sistemi modelli che coprono la grande maggioranza di quelli usati nella moderna biologia: topo e ratto (di Porzio), Drosophila (Graziani, Gigliotti, Digilio), C. elegans (Bazzicalupo, La Volpe), funghi e lieviti (Gargano), Arabidopsis e L. japonicus (Chiurazzi), E. coli (Defez), culture cellulari di mammifero e di insetti (di Porzio, Graziani).

Stato dell'arte

Il genoma umano e' straordinariamente simile a quello di organismi evolutivamente antichi e le varie forme di vita sono accomunate molto più di quanto atteso sulla base della enorme varietà e complessità morfo-funzionale con cui esse si presentano. Questa scoperta ha fornito una base teorica e pratica per l'uso di modelli sperimentali sia nello studio dei meccanismi molecolari dei processi di differenziamento dei tessuti, organogenesi, funzionamento dei sistemi fisiologici, sia come modelli di malattie.

Azioni

Attività da svolgere

Per tutti i sistemi modello citati vengono costantemente aggiornate le procedure per la trasformazione genetica, le collezioni di ceppi mutanti o trasformati, di librerie specifiche, di sistemi di espressione omologa ed eterologa, di reagenti quali anticorpi, vettori e cloni, specifici per ogni sistema; viene inoltre curato il perfezionamento di particolari approcci sperimentali quali RNA interferenza e microarray analysis. Vi sono inoltre collaborazioni con gruppi presso l'Università, la Stazione Zoologica ed altre istituzioni per allargare l'offerta di sistemi modello, che questa commessa è in grado di offrire alla comunità scientifica (per lo zebra fish il dott. Paolo Sordino, per lo xenopus e il riccio di mare la prof. Chiara Campanella).



Punti critici e azioni da svolgere

La commessa è in grado di offrire consulenze tecnico-scientifiche garantite dalle competenze dei ricercatori partecipanti (Tot IF 2000-04: 905) e da strumentazioni, strutture e servizi necessari presenti all'IGB. Le numerose collaborazioni scientifiche con gruppi dentro e fuori il CNR e l'Italia, assicurano un continuo aggiornamento delle competenze. All'interno di queste attività, un ruolo importante sarà la formazione di giovani scienziati e tecnici in grado di portare avanti queste tematiche e competenze.

Competenze, tecnologie e tecniche di indagine

I partecipanti alla commessa sono esperti di Genetica classica e molecolare, di Biologia molecolare e Biologia cellulare.

Strumentazione

In dotazione ai gruppi partecipanti sono centrifughe e ultracentrifughe; spettrofotometri; apparecchi per PCR e real-time PCR; apparecchi per elettroforesi e alimentatori; bagni e camere termostate; stereoscopi; microscopi diritti e invertiti, in campo chiaro e a fluorescenza, a deconvoluzione e confocale; microscopi per micromanipolazione e microiniezione.

Tecniche di indagine

Saranno utilizzate tecniche di clonaggio e sequenziamento dei geni prescelti. Attraverso la trasformazione degli organismi interessati, sarà studiata l'espressione; attraverso la microscopia sarà identificata la localizzazione proteica. Saranno effettuati esperimenti di Genetica diretta e inversa (RNA interference, animali transgenici) per l'analisi funzionale.

Tecnologie

Manipolazione sperimentale di organismi per testare ipotesi di funzionamento a livello molecolare, cellulare e di organismo attraverso tecniche di genetica inversa e diretta, analisi biochimica e cellulare.

Collaborazioni (partner e committenti)

Sono in corso collaborazioni e networks con i principali centri internazionali e nazionali di studio della biologia dei sistemi modello di cui il raggruppamento si occupa: Harvard, Helsinki, Leeds, Lund, Paris-sud, Toronto, Karolinska Inst, Erasmus MC Rotterdam, NRMC UK, Gulbenkian Lisboa, Emory U, TIGEM, BIOGEM, Arterra Bioscience Srl, Napoli.

Iniziative per l'acquisizione di ulteriori entrate

Richieste di finanziamenti alla Unione Europea e a Fondazioni pubbliche e private.

Finalità

Obiettivi

Costruzione di una consolidata rete di ricercatori in grado di offrire oltre agli organismi stessi, competenze, strutture, e servizi relativi ad una vasta gamma di sistemi modello sia per ricerca di base che applicativa. Obiettivo primario di questa rete è quello di fungere da punto di riferimento per i gruppi della comunità scientifica che intendano esplorare la possibilità di utilizzare sistemi modello per affrontare problematiche di proprio specifico interesse. Questo consentirebbe di accumulare quei dati preliminari senza i quali anche il finanziamento dei progetti è impossibile.

Risultati attesi nell'anno

Acquisizione e messa a punto di metodologie atte a migliorare l'approccio sperimentale nei sistemi modello e loro applicazione alle tematiche di ricerca attualmente sviluppate dai gruppi partecipanti. Identificazione e ottimizzazione dei protocolli di impiego di reagenti biologici necessari allo studio di interazioni cellulari, sviluppo, differenziamento, organogenesi dei sistemi descritti e loro alterazioni. Attivazione di nuove collaborazioni e contratti esterni per l'uso di questo insieme di risorse e competenze.

Potenziale impiego

- per processi produttivi

- per risposte a bisogni individuali e collettivi



Moduli

Modulo: Sviluppo e funzionamento dei sistemi complessi - Uso di modelli biologici

Istituto esecutore: Istituto di genetica e biofisica 'Adriano Buzzati Traverso'

Luogo di svolgimento attività: Sede principale Istituto

Risorse commessa 2008

Pers. tempo ind/det	Funz.+ Invest.	Spese da Fonti Esterne	Spese per Infrastrutt. tecn.-scient a gestione accentrata	Totale	Risorse da esercizi precedenti	Massa Spendibile	Costi figurativi	Spese generali accentrate	Valore Effettivo
1	2	3	4	5=1+2+3+4	6	7=2+3+6	8	9	10=5+6+8+9
491	0	17	1	509	41	58	193	N.D.	743

valori in migliaia di euro

<i>Unità di personale di ruolo*</i>	
ricercatori	Totale
4	8

*equivalente tempo pieno

<i>Unità di personale non di ruolo</i>									
associato	dottorando	borsista	assegnista	specializzando	incaricato di ricerca	professore visitatore	collaboratore professionale	altro	Totale
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

<i>Richiesta nuove unità di personale</i>			
tempo determinato	tempo indet	non di ruolo*	Totale
0	0	0	0

*dottorati, borse di studio, assegni di ricerca



Meccanismi molecolari e cellulari della determinazione neurale e patologia del sistema nervoso

Dati generali

Progetto:	Modelli animali per lo studio di processi fisio-patologici e del comportamento
Tipologia di ricerca:	Progetti relativi a linee tematiche a carattere strategico
Istituto esecutore:	Istituto di genetica e biofisica 'Adriano Buzzati Traverso'
Sede principale svolgimento:	Sede principale Istituto
Dip. di prevista afferenza:	Scienze della Vita
Responsabile indicato:	UMBERTO DI PORZIO

Elenco dei partecipanti

	liv.		liv.		liv.
Acampora Dario	II	Di Porzio Umberto	I	Pellicano' Domenico	VIII
Aliperti Anna Maria	VII	Esposito Bruno	IV	Porzio Concetta	VII
Andone Silvia	V	Franco Alfredo	VII	Prisco Antonella	III
Arbucci Salvatore	VI	Fusco Ciro	IV	Ragosta Giuseppe	VII
Barra Adriano	VI	Graziani Franco	I	Rallo Claudia	VI
Bazzicalupo Paolo	I	Iaccarino Maria Rosaria	IV	Rocco Rosaria	VII
Beato Antonio	IV	Lauro Pasquale	VII	Russo Alessandra	VII
Bellopede Annunziata	VII	Liguori Giovanna Lucia	III	Sarracino Fabiana	VIII
Cossu Simone	VI	Manna Filomena	V	Secondulfo Antonietta	VI
Cozzuto Luigi	VIII	Miele Elia	VI	Sepe Gennaro	VII
De Cesare Dario	II	Mignoli Emiliana	VII	Sicilia Giuseppina	VIII
De Falco Antonio	VI	Minchiotti Gabriella	III	Simeone Antonio	I
De Falco Vincenzo	VII	Moscatiello Francesco	VII	Torelli Raimondo	V
De Luise Bruno	IV	Navarra Gerardo	VII	Tuorto Francesca	III
Desideri Carmela	IV	Noviello Ciro	V	Vado Luciano	V
Di Giacomo Alfredo	VII				

Temi

Tematiche di ricerca

Delucidazione dei principi molecolari ed organizzativi dello sviluppo del cervello: studi genetici e molecolari di geni, segnali e meccanismi che regolano la specificazione e regionalizzazione del SNC; meccanismi molecolari e cellulari che controllano

- 1) differenziamento di cellule staminali neurali,
- 2) generazione di specifici sottotipi neuronali a partire da progenitori/cellule staminali totipotenti, in particolare neuroni dopaminergici mesencefalici (mDA),
- 3) sistemi sensoriali,
- 4) la crescita assonale, in modelli animali.

Studi genetici e molecolari delle patologie genetiche e degenerative del Sistema nervoso.

Approcci sperimentali:

Identificare i geni (ed i loro prodotti) la cui espressione è indispensabile per il differenziamento neuronale e mDA.

Analizzare le modificazioni epigenetiche di promotori specifici (immunoprecipitazione della cromatina, profili di metilazione e deacetilazione) durante la differenziazione neurale.

Analisi quantitative mediante RT-PCR e elettroforesi bidimensionale dei geni e delle proteine la cui espressione viene modificata durante lo sviluppo

Stato dell'arte

Alla base della neurogenesi dei mammiferi e della formazione di complessi circuiti funzionali c'è una fine regolazione della proliferazione e del differenziamento delle cellule neurali staminali (NSC)/progenitori. Meccanismi epigenetici sono anch'essi implicati, attivati da induttori morfogenetici e specifici eventi di trasduzione del segnale intracellulare. È di primaria importanza migliorare la conoscenza degli eventi che controllano le scelte che le NSC, e successivamente i progenitori pluripotenti, operano durante il passaggio dalla proliferazione al differenziamento. Negli ultimi anni in vari laboratori sono stati generati mutanti di topo, *Drosophila* e *C. elegans* e sistemi cellulari che hanno svelato nuove e fondamentali funzioni geniche e loro interazioni molecolari nello sviluppo del sistema nervoso. Studi recenti hanno individuato importanti meccanismi genetici ed epigenetici che controllano il differenziamento neurale di cellule staminali e la generazione e funzione di vari sistemi neuronali, incluso quello dopaminergico. Queste informazioni hanno



permesso di approfondire aspetti genetici e molecolari che sottendono importanti patologie del SNC dei mammiferi, uomo incluso.

Azioni

Attività da svolgere

Identificazione di meccanismi e interazioni cellulari alla base del differenziamento neurale in modelli animali (topo e ratto).

Studio del sistema sensoriale utilizzando modelli animali semplici come *C. elegans*. Caratterizzazione genetica molecolare degli interattori della proteina KAL-1 identificati negli anni precedenti.

Identificazione di componenti della via di segnale nella nocicezione in *C. elegans*

Sviluppo di nuovi modelli animali di malattie neurologiche e da dipendenza. Allestimento di modelli di neurodegenerazione in *C. elegans*. Identificazione di mutazioni capaci di modificare il fenotipo ovarico di femmine omozigoti per la mutazione nel gene parkin in *D.melanogaster*.

Identificazione di molecole e geni implicati nel differenziamento delle cellule staminali in specifici sottotipi neuronali.

Identificazione delle modifiche dell'architettura del DNA o alterazioni epigenetiche in vari stadi dello sviluppo e del differenziamento del sistema dopaminergico ed in stati di dipendenza da droghe d'abuso.

Effetto dell'espressione di geni mesodermici durante proliferazione e differenziamento di precursori neurali, identificazione di geni che switch tra 'fate' mes e neuro.

Punti critici e azioni da svolgere

Competenze, tecnologie e tecniche di indagine

I partecipanti alla commessa sono esperti di Neurobiologia, Genetica classica e molecolare, di Biologia molecolare e Biologia cellulare.

Strumentazione

In dotazione ai gruppi partecipanti vi sono: centrifughe e ultracentrifughe; spettrofotometri; apparecchi per PCR e real-time PCR; PhosphorImager per analisi quantitativa di immagini e gel radioattivi; apparecchi per elettroforesi ed alimentatori; FPLC per cromatografia; bagni e camere termostate; cappe e incubatori per colture cellulari; apparati stereotassici; citofluorimetro e cell sorter per l'analisi di espressione genica (livelli di proteine), del ciclo cellulare, e per l'isolamento di cellule con caratteristiche antigeniche specifiche ed omogenee; stereoscopi; microscopi diritti e invertiti, in campo chiaro e a fluorescenza, a deconvoluzione e confocale; microscopi per micromanipolazione e microiniezione.

Tecniche di indagine

Saranno utilizzate tecniche di clonaggio e sequenziamento dei geni prescelti, sarà studiata l'espressione cellulo- e differenziamento-specifica; attraverso la microscopia sarà identificata la localizzazione cellulare. Saranno messi a punto protocolli per isolamento e differenziamento di cellule staminali embrionali e/o adulte utilizzando marcatori fluorescenti (es Topi transgenici che esprimono la GFP sotto specifici promotori neurali o neuronali), isolamento di specifiche popolazioni neuronali e/o di cellule staminali/precursori neurali mediante tecniche di cell sorting. Saranno effettuati esperimenti di Genetica diretta e inversa (RNA interference, animali transgenici) per l'analisi funzionale, e studi di immunocitochimica e ibridizzazione in situ per analisi anatomiche.

Tecnologie

Manipolazione sperimentale di organismi per testare ipotesi di funzionamento a livello molecolare, cellulare e di organismo attraverso tecniche di genetica inversa e diretta, analisi morfologica, anatomica, biochimica e cellulare.

-

Collaborazioni (partner e committenti)

Sono in corso e saranno ulteriormente perseguite collaborazioni e networks con i principali centri internazionali e nazionali di studio dello sviluppo, differenziamento, modelli di malattia, cellule staminali del SNC, e centri clinici: Università di Alicante, Spagna; Harvard University, Boston, MA e Cornell Univ NYC, NY, USA; Montreal Neurological Institut e Toronto Univ., Canada; USA; Helsinki University and Institute of Biotechnology, Finland; Inst Psychiatry, King's College, London, e NRMC, UK; Erasmus MC Rotterdam The Netherlands; Gulbenkian Lisboa, Emory U, TIGEM, BIOGEM, DIBIT, CEINGE, Università di Bari, Bologna, Napoli, Roma, Torino

Imprese Biotecnologiche: NSGene Copenhagen, BIOPAT Caserta, PRIMM Milano.



<i>Richiesta nuove unità di personale</i>			
tempo determinato	tempo indet	non di ruolo*	Totale
1	0	0	1

*dottorati, borse di studio, assegni di ricerca



Funzioni del S.N./Neurotrofine

Dati generali

Progetto:	Modelli animali per lo studio di processi fisio-patologici e del comportamento
Tipologia di ricerca:	Progetti di sviluppo competenze
Istituto esecutore:	Istituto di neurobiologia e medicina molecolare
Sede principale svolgimento:	Sede principale Istituto
Dip. di prevista afferenza:	Scienze della Vita
Responsabile indicato:	LUIGI ALOE

Elenco dei partecipanti

	liv.		liv.		liv.
Aloe Luigi	I	Dominici Roberto	V	Papa Pamela	VII
Battaglia Massimo	II	Febbraro Cardello Vincenzo	VIII	Perretta Gemma	III
Bernardini Aurelio	VII	Fiorani Anna Rita	VIII	Riviello Maria Cristina	II
Bracci Laudiero Luisa	III	Galli Cinzia	III	Ruberti Francesca	III
Capozzoni Antonella	III	Maresci Americo	IV	Severini Cinzia	III
Casalbore Patrizia	III	Mattei Elisabetta	II	Tirassa Paola	III
Ciotti Maria Teresa	V	Mercanti Delio	I	Volonte' Cinzia	II
Di Luzio Anna	IV	Nunzi Biagio	IX		

Tem

Tematiche di ricerca

La tematica principale della ricerca è mirata alla identificazione e messa a punto

- di modelli animali in vivo e in vitro per studiare meccanismi patologici del sistema nervoso centrale e periferico, del sistema immunitario e del tessuto cutaneo;
- identificazione e utilizzo di metodologie innovative per approfondire le conoscenze sui meccanismi cellulari, biochimici e molecolari coinvolti in patologie di natura nervosa e neuroimmune, correlabili a disfunzioni di sintesi e/o utilizzo di fattori neurotrofici, in particolare NGF e altri mediatori biologici endogeni;
- produzione e purificazione della molecola NGF, del suo anticorpo e del recettore a bassa affinità;
- indagine sul potenziale risvolto terapeutico della molecola NGF su patologie del sistema nervoso e del tessuto cutaneo;
- identificare meccanismi molecolari che regolano gli effetti neurotossici del peptide Amiloide in modelli cellulari della malattia di Alzheimer e sviluppare terapie ad essa mirate

Stato dell'arte

Il fattore neurotrofico nerve growth factor (NGF) prototipo della famiglia molecolare delle neurotrofine, e i suoi recettori, TrkA, e p75, costituiscono un sistema biologico ad azione pleiotropica. La molecola NGF agisce particolarmente su cellule del sistema nervoso centrale e periferico regolandone il differenziamento, la crescita, la sopravvivenza e il recupero del danno neuronale a seguito di insulti tossici, chirurgici e patologici.

L'azione della molecola si estende anche al di fuori del sistema nervoso e cio' la rende una molecola chiave nelle complesse interazioni tra sistema nervoso, endocrino e immunitario. Alterazione della sintesi e/utilizzo di alcune neurotrofine, incluso l'NGF, caratterizzano alcune patologie a carico del sistema nervoso centrale (invecchiamento, sclerosi multipla), quello periferico (neuropatie periferiche) e di quello cutaneo (ulcere della cornea e della cute).

Il responsabile della commessa ha una consolidata conoscenza scientifica del ruolo e dei meccanismi della molecola NGF, possiede una estesa rete di rapporti nazionali e internazionali che ha come obiettivo il potenziale utilizzo della molecola NGF e/suoi regolatori di sintesi endogena.



Azioni

Attività da svolgere

Le attività previste per i prossimi anni sono raggruppabili in quattro grandi blocchi:

- a) Ampliare le conoscenze sul ruolo del NGF nei processi a carico dei neuroni del prosencefalo basale coinvolti nell'invecchiamento cognitivo e nella malattia di Alzheimer.
- b) Validare il potenziale clinico e terapeutico del NGF nelle patologie oculari
- c) approfondire lo studio del ruolo svolto dal NGF nel comportamento aggressivo ed in patologie psichiatriche.
- d) Elucidare i meccanismi ed i mediatori che regolano la produzione endogena di neurotrofine.

Rimane inoltre punto centrale della commessa la produzione NGF purificato da tessuti animale e possibilmente umano con metodologie ricombinante, i suoi anticorpi da utilizzare per promuovere collaborazioni tra la ricerca di base e la ricerca clinica.

Punti critici e azioni da svolgere

permangono come punti critici le risorse economiche ed umane che garantiscano e mantengano l'alto profilo professionale di cui necessita la commessa per raggiungere i suoi obiettivi.

Competenze, tecnologie e tecniche di indagine

I partecipanti alla commessa hanno consolidate competenze nel campo delle neurotrofine, neuropeptidi e nella purificazione della proteina NGF e del suo anticorpo. La disponibilità di NGF purificato e dei suoi anticorpi policlonali e monoclonali rappresentano degli strumenti sperimentali essenziali per il raggiungimento degli obiettivi della commessa. Inoltre tutto il personale non di ruolo ed i ricercatori che partecipano alla commessa possiedono alte competenze tecniche e teoriche per lo studio in vivo ed in vitro dei processi che sottendono e caratterizzano la fisiologia dei fattori neurotrofici nel sistema nervoso ed immunitario.

Strumentazione

L'Istituto di Neurobiologia & Medicina Molecolare (INMM) nella sua attuale sede di Via del Fosso di Fiorano è una struttura rinnovata in cui sono presenti servizi di stabularizzazione degli animali, camere operatorie, camere sterili e camere destinate alla manipolazione di materiale radiattivo di nuova costruzione. I laboratori sono anch'essi nuovi ed adeguatamente attrezzati per l'analisi istologica-strutturale e molecolare. In particolare l'istituto ha recentemente rinnovato parte del suo patrimonio strumentale con l'acquisizione ad esempio di sistema Real-time PCR, un microbeta system PerkinElmer, lunimetro, etc.

Sono inoltre presenti microscopi ottici, a fluorescenza e confocali dotati di sistema acquisizione ed analisi di immagine.

Tecniche di indagine

La nostra ricerca si avvale di tecniche e competenze di indagine acquisite in laboratori italiani, europei e americani, quali analisi cellulare in vitro e in vivo, conoscenze di neuroanatomia, interventi di macro e microchirurgia, analisi di natura biochimica, immunostochimica, molecolare e comportamentale. In collaborazioni di ricercatori clinici siamo in grado di intraprendere studi di natura preclinici e clinici mirati alla comprensione del ruolo terapeutico del NGF in patologie nervose e cutanee.

Tecnologie

Collaborazioni (partner e committenti)

Università 'La Sapienza', Roma, Università di Bologna, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma, Casa di Cura S. Raffele, Roma, Campus Biomedico, Roma Karolinska Institutet, Stockholm, Svezia. Varna Medical School, University of Varna, Bulgaria, Università Magna Graecia, Catanzaro, Policlinico Annunziata, Cosenza, Università di Milano Bicocca.

Iniziativa per l'acquisizione di ulteriori entrate

Il responsabile della commessa è attivamente coinvolto nella creazione dei network internazionali che mirano alla preparazione di progetti di ricerca aderenti al VII programma quadro della comunità europea. Si cercherà anche di presentare richieste di finanziamento a istituzioni internazionali e/o nazionali per progetti di ricerca mirati al raggiungimento di singoli obiettivi della commessa, ad esempio progetti sulle patologie oculari, disturbi psichiatrici, sullo stress cronico, etc.

La partecipazione ai progetti bilaterali con organizzazioni internazionali verranno inoltre favorite al fine di aumentare lo scambio tecnico e culturale con altri gruppi di ricerca che lavorano su tematiche affini e/o che utilizzino tecnologie ed approcci sperimentali di aiuto al raggiungimento degli obiettivi della commessa



Finalità

Obiettivi

L'obiettivo della commessa e' lo studio dei meccanismi che regolano l'azione a livello cellulare e sistemico dell' NGF e/o altre neurotrofine mirato a una maggiore comprensione delle interazioni cellulari nel sistema nervoso e tra questo e gli altri sistemi per un possibile utilizzo clinico. Un altro obiettivo della commessa e' identificare meccanismi molecolari che regolano gli effetti neurotossici del peptide Amiloide in modelli cellulari della malattia di Alzheimer e sviluppare terapie ad essa mirate. I ricercatori della commessa hanno una consolidata competenza in queste tematiche e rappresentano un punto di riferimento importante nella ricerca neurobiologica Nazionale e Internazionale.

Risultati attesi nell'anno

I risultati piu' rilevanti che si ritiene di raggiungere nei prossimi anni riguardano la caratterizzazione del ruolo della molecola NGF a seguito si stress cronico e in alcune patologie di natura neurocomportamentale, sia in modelli animali che nell'uomo.

La conclusione di esperimenti attualmente in corso utilizzando modelli di patologie oculari forniranno molto probabilmente dati significativi sul ruolo della molecola NGF in alcune patologie del sistema visivo.

Potenziale impiego

- per processi produttivi

La commessa ha la possibilità e le competenze di produrre in larga scala la molecola NGF e il suo anticorpo da inserire in processi produttivi per un eventuale utilizzo commerciale nei centri di ricerca e/o come prodotto per la ricerca di base nei laboratori e come prodotto per studi pre clinici o per animali domestici. Inoltre, la possibilità di comprendere attraverso quali strategie è possibile influenzare la produzione endogena di neurotrofine può fornire utili informazioni alla ricerca applicata indicando il potenziale farmacologico di gruppi di molecole che attivano le neurotrofine.

- per risposte a bisogni individuali e collettivi

La recente pubblicazione, in collaborazione con ricercatori clinici, di uno studio pilota che dimostra l'azione terapeutica della molecola NGF nelle ulcere neurotrofiche della cornea, nelle ulcere da decubito, e la collaborazione con l'Università di Milano 'Bicocca' per la produzione di NGF ricombinante umano, mirato a risvolti di natura terapeutica, può rivelarsi utili per bisogni individuali e collettivi.

Moduli

Modulo: Funzioni del S.N./Neurotrofine
Istituto esecutore: Istituto di neurobiologia e medicina molecolare
Luogo di svolgimento attività: Sede principale Istituto

Modulo: Regolazione della sintesi di neurotrofine nella depressione: studio sul modello animale di deprivazione sociale ed ambientale.
Istituto esecutore: Istituto di neurobiologia e medicina molecolare
Luogo di svolgimento attività: Sede principale Istituto

Modulo: Agopuntura e sintesi di neurotrofine: meccanismi di regolazione e potenzialità terapeutiche.
Istituto esecutore: Istituto di neurobiologia e medicina molecolare
Luogo di svolgimento attività: Sede principale Istituto

Risorse commessa 2008

Pers. tempo ind/det	Funz.+ Invest.	Spese da Fonti Esterne	Spese per Infrastrutt. tecn.-scient a gestione accentrata	Totale	Risorse da esercizi precedenti	Massa Spendibile	Costi figurativi	Spese generali accentrate	Valore Effettivo
1	2	3	4	5=1+2+3+4	6	7=2+3+6	8	9	10=5+6+8+9
535	0	13	0	548	42	55	33	N.D.	623

valori in migliaia di euro

Unità di personale di ruolo*	
ricercatori	Totale
7	9

*equivalente tempo pieno



<i>Unità di personale non di ruolo</i>									
associato	dottorando	borsista	assegnista	specializzando	incaricato di ricerca	professore visitatore	collaboratore professionale	altro	Totale
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

<i>Richiesta nuove unità di personale</i>			
tempo determinato	tempo indet	non di ruolo*	Totale
0	0	0	0

*dottorati, borse di studio, assegni di ricerca



Meccanismi di adattamento a stress e biodiversità



Basi molecolari dell'adattamento di cellule e proteine alle condizioni estreme: aspetti applicativi

Dati generali

Progetto:	Meccanismi di adattamento a stress e biodiversità
Tipologia di ricerca:	Progetti relativi a linee tematiche a carattere strategico
Istituto esecutore:	Istituto di biochimica delle proteine
Sede principale svolgimento:	Sede principale Istituto
Dip. di prevista afferenza:	Scienze della Vita
Responsabile indicato:	MARIA CIARAMELLA

Elenco dei partecipanti

Carginale Vincenzo	liv. III	D'Avino Rossana	liv. II	Manco Giuseppe	liv. II
Carrara Adriana	V	Febbraio Ferdinando	III	Nucci Roberto	I
CiarameLLa Maria	II	Maiello Aniello	VII	Raia Carlo Antonio	II

Temi

Tematiche di ricerca

Produzione, studio e strutture 3D di esterasi e fosfotriesterasi termofile Studio della cooperatività, deamidazione e termoinattivazione in ADH termofile Studio di polisaccaridasi da batteri anaerobi del tratto gastrointestinale Elucidazione dei meccanismi cellulari di risposta al danno al DNA Caratterizzazione della risposta 'ferita-attivata' in diatomee e produzione di molecole di interesse economico-scientifico- ambientale Identificazione di geni indotti da metalli pesanti in piante

Stato dell'arte

Le ricerche sugli estremofili sono attivamente finanziate negli Stati Uniti (da NSF, NASA, Environmental Protection Agency, National Cancer Institute, Department of Energy) e in Giappone (Marine Science and Technology Center). In Europa esse sono state finanziate nel Terzo, Quarto e Quinto Programma Quadro, oltre che livello nazionale, soprattutto in Francia, Regno Unito e Germania, interi Istituti e Dipartimenti dedicati. Noto e, in questi paesi, il coinvolgimento industriale.

Azioni

Attività da svolgere

Approfondimento della caratterizzazione delle due fosfotriesterasi termostabili (stabilità termica e dipendenza dell'attività dai metalli). Risoluzione della struttura di SacPox e studio di nuove esterasi non termofile.

Cristallizzazione della deidrogenasi/riduttasi di *Thermus thermophilus* e studio di processi di bioconversioni da essa catalizzati. Ricerca, clonaggio ed espressione di nuove deidrogenasi/riduttasi di organismi termofili.

Identificazione mediante confronto delle mappe proteiche bidimensionali e caratterizzazione biochimica delle proteine prodotte in pero in seguito a infezione con fitoplasma responsabile della moria del pero (Pear Decline).

Produzione di mutanti sito-specifici e di delezione delle due reverse girasi di *Sulfolobus solfataricus*. Caratterizzazione biochimica di ciascun mutante (analisi dell'attività topoisomerasica, elicastica, ATPasica). Studio dell'interazione fisica e funzionale della reverse girasi con altre proteine in vitro e/ o in vivo.

Sequenziamento, clonaggio ed espressione eterologa della galattolipasi da *T. rotula*. Confronto con banche dati allo scopo di definire una nuova classe di proteine con caratteristiche comuni.

Punti critici e azioni da svolgere

Bisogna segnalare ancora una volta le difficoltà dovute alla mancanza di piani di finanziamento a lungo termine, alla assenza di sbocchi occupazionali e al ritardo nei pagamenti di progetti già approvati.

E' auspicabile lo sblocco delle assunzioni di ricercatori vincitori di concorsi e l'attuazione di nuovi concorsi per l'assunzione di personale a tempo determinato e indeterminato.

La prosecuzione dell'attività di ricerca sulle galattolipasi resta subordinata all'acquisizione di ulteriori finanziamenti.



Competenze, tecnologie e tecniche di indagine

Le competenze richieste (in biochimica, biologia molecolare, microbiologia, genetica, bioinformatica, modellazione molecolare, chimica, chimico-fisica, biologia strutturale) sono in gran parte in possesso del personale della commessa

Strumentazione

Spettrofotometri, spettrofluorimetri, spettropolarimetri, FPLC, HPLC, Real-time PCR, dispositivi per elettroforesi, Phosphorimager, ChemiDoc, incubatori e fermentatori ad alta temperatura, centrifughe ed ultracentrifughe, elettroporatori, BiaCore, spettrometri di massa, sequenziatori di proteine, contatori di radiazioni beta, microarray spotter, cell sorter

Tecniche di indagine

Cromatografia, elettroforesi di acidi nucleici e proteine, sequenziamento di DNA e proteine, marcature radioattive, Southern blot, Northern blot, Western blot, immunoprecipitazioni, EMSA, saggi enzimatici, PCR, RT-PCR, modellazione molecolare, ricerche in banche dati, coltivazione di microorganismi ad alte e basse temperature.

Tecnologie

Identificazione, clonaggio, espressione eterologa e purificazione di proteine. Mutagenesi casuale e sito-diretta. Analisi quantitativa dei livelli di trascrizione. Analisi quantitativa dei livelli di espressione di proteine e di attività enzimatiche. Analisi delle interazioni proteina-proteina e DNA-proteina. Determinazione di cinetiche enzimatiche. Predizioni di struttura tridimensionale di proteine.

Collaborazioni (partner e committenti)

G. Barone e P. Del Vecchio Università Federico II Napoli C. Pedone e G. De Simone IBB-CNR Napoli G. Graziano Università di Benevento D. Ollis Università di Canberra Canada G. Maglione ISPAM-CNR Napoli H. J. Flint Aberdeen UK P. Forterre Institut Pasteur France M. F. White St Andrews UK M. Nadal Versailles France A. Cutignano ICB-CNR Napoli A. Fontana ICB-CNR Napoli G. Romano Stazione Zoologica A. Dohrn Napoli A. Zagari Università Federico II Napoli A. Basile Università Federico II Napoli

Iniziativa per l'acquisizione di ulteriori entrate

E' in corso la preparazione di proposte di progetti da sottoporre ad enti pubblici e privati regionali e nazionali.

Sono in corso contatti con società private interessate ai brevetti disponibili.

Finalità

Obiettivi

Identificazione dei determinanti di termostabilità, folding, termofilia e attività in esterasi, fosfotriesterasi, alcool deidrogenasi e polisaccaridasi da estremofili Elucidazione dei meccanismi cellulari di risposta al danno al DNA, ai metalli pesanti e alla predazione Le competenze richieste (in biochimica, biologia molecolare, microbiologia, genetica, bio-computing, molecular modelling, chimica, chimico-fisica, biologia strutturale) sono in gran parte in possesso del personale della commessa

Risultati attesi nell'anno

Struttura cristallografica della fosfotriesterasi termostabile SacPox. Identificazione di nuove esterasi. Informazioni sulla struttura-funzione di fosfotriesterasi termofile e non.

Protocolli di sintesi enantioselettive ottimizzate di sintoni aromatici chirali. Struttura 3D di una deidrogenasi/riduttasi termofila. Caratterizzazione di altre deidrogenasi/riduttasi termofile di interesse applicativo.

Estrazione delle proteine da piante sane e infette con PD per ottenere mappe proteiche mediante elettroforesi bidimensionale (2DE). Analisi comparativa delle mappe mediante software appositi. Identificazione delle proteine mediante spettrometria di massa e 'peptide mass fingerprinting'. Analisi bioinformatica per creare riferimenti incrociati tra i dati sulle proteine con le banche dati genomiche.

Mutanti di delezione e sito-specifici della reverse girasi. Informazioni sulla funzione di ciascun dominio della reverse girasi e identificazione di residui essenziali per la sua attività.

Sequenziamento della galattolipasi, determinazione dei parametri cinetici, individuazione di classi di proteine coinvolte nella risposta all'aggressione da predatori e parassiti.

Potenziale impiego

- per processi produttivi

- Nuovi farmaci

- Chimica fine

- Strumenti di diagnostica molecolare



- per risposte a bisogni individuali e collettivi

Nuovi biocatalizzatori per applicazioni biotecnologiche Produzione di composti chirali da utilizzare per la sintesi di farmaci, e sostanze ad alto grado di purezza Comprensione dei meccanismi di mutagenesi, cancerogenesi ed invecchiamento

Moduli

Modulo: DR.SSA CIARAMELLA: Basi molecolari dell'adattamento di cellule e proteine alle condizioni estreme: aspetti applicativi
Istituto esecutore: Istituto di biochimica delle proteine
Luogo di svolgimento attività: Sede principale Istituto

Risorse commessa 2008

Pers. tempo ind/det	Funz.+ Invest.	Spese da Fonti Esterne	Spese per Infrastrutt. tecn.-scient a gestione accentrata	Totale	Risorse da esercizi precedenti	Massa Spendibile	Costi figurativi	Spese generali accentrate	Valore Effettivo
1	2	3	4	5=1+2+3+4	6	7=2+3+6	8	9	10=5+6+8+9
243	0	154	0	397	0	154	82	N.D.	479

valori in migliaia di euro

<i>Unità di personale di ruolo*</i>	
ricercatori	Totale
3	4

*equivalente tempo pieno

<i>Unità di personale non di ruolo</i>									
associato	dottorando	borsista	assegnista	specializzando	incaricato di ricerca	professore visitatore	collaboratore professionale	altro	Totale
0	1	0	1	0	0	0	0	0	2

<i>Richiesta nuove unità di personale</i>			
tempo determinato	tempo indet	non di ruolo*	Totale
0	0	0	0

*dottorati, borse di studio, assegni di ricerca



Studio dei processi cellulari in estremofili

Dati generali

Progetto:	Meccanismi di adattamento a stress e biodiversità
Tipologia di ricerca:	Progetti relativi a linee tematiche a carattere strategico
Istituto esecutore:	Istituto di biochimica delle proteine
Sede principale svolgimento:	Sede principale Istituto
Dip. di prevista afferenza:	Scienze della Vita
Responsabile indicato:	FRANCESCA MARIA PISANI

Elenco dei partecipanti

	liv.		liv.		liv.
Cannio Raffaele	III	De Felice Mariarita	III	Pipola Beatrice	VI
Ciaramella Maria	II	Jesu Amedeo	IV	Pisani Francesca Maria	II
Cobucci Ponzano Beatrice	III				

Temi

Tematiche di ricerca

Il programma di ricerca prevede: analisi delle relazioni struttura- funzione e delle interazioni fisiche e/o fisiche di fattori di replicazione/riparazione/ricombinazione del DNA; studio della regolazione e funzione di geni implicati nella risposta ad agenti mutageni; messa a punto di sistemi genetici vettore/ospite per lo studio dell'espressione genica e la produzione di proteine omologhe ed eterologhe in via ricombinante; studio della regolazione traduzionale in *S. solfataricus*.

Stato dell'arte

La ricerca proposta e' in parte finanziata dal Progetto U. E. 'DNA replication and biotechnological applications' (VI Programma Quadro; Settore 'Quality of life'), nel cui ambito e' stata creata una rete di laboratori europei all'avanguardia nello studio della replicazione del DNA sia in organismi archeobatterici che eucariotici. Inoltre, tutti i ricercatori coinvolti hanno stabilito una ampia rete di collaborazioni con Universita' ed Istituti di Ricerca nazionali ed internazionali.

Azioni

Attività da svolgere

1. Analisi delle relazioni struttura-funzione della proteina MCM di *S. solfataricus*.
2. Caratterizzazione biochimica del complesso GINS e di altri fattori replicativi umani (DNA polimerasi, DNA topoisomerasi, proteine MCM 2-7, cdc45, MCM10, TIM-Tipin). Analisi della loro interazione reciproca.
3. Studio dei meccanismi di regolazione trascrizionale dipendente da danni al DNA e da altri tipi di stress in *S. solfataricus*. Analisi delle interazioni DNA-proteine mediante saggi in vitro e immuno-precipitazione della cromatina.
4. Analisi in vivo del meccanismo di -1 frame-shifting e studio della regolazione di alcuni dei geni interrotti di *S. solfataricus*.
5. Isolamento e caratterizzazione dei geni virali coinvolti nella replicazione e assemblaggio delle particelle dei virus SSV2 e pSSVx di *Sulfolobus*. Ottimizzazione dei sistemi di espressione nei ceppi isolati di *S. solfataricus* ed *islandicus*. Purificazione e caratterizzazione degli enzimi di interesse biotecnologico super-espressi.

Punti critici e azioni da svolgere

Si intende acquisire tecniche di modellamento genico per *S. solfataricus* (gene knock-out, ricombinazione genica sito-specifica). A questo scopo si intende instaurare rapporti di collaborazione e/o scambio con laboratori stranieri presso cui tali metodiche sono state messe a punto, quale quello della Dr Sonja Albers (University of Groningen, Groningen, Olanda).

Si intende mettere a punto protocolli per la produzione di proteine in cellule di insetto infettate da baculovirus ricombinanti. A questo scopo, si è programmato di allestire una cabina sterile dedicata alla coltivazione delle linee cellulari di insetto.

Competenze, tecnologie e tecniche di indagine

Biochimica, Biologia molecolare, Microbiologia



Strumentazione

French Press, Centrifughe ed ultracentrifughe, Dispositivi per elettroforesi, Sistemi per cromatografia AKTA, BiaCore, Phosphorimager, Thermal cycler per PCR, Spettrofluorimetri, Spettrofotometri, Incubatori ad alta temperatura per colture di batteri iper-termofili, Elettroporatore,

Tecniche di indagine

Tecniche cromatografiche. Tecniche per la produzione di proteine in forma ricombinante. Mutagenesi sito-specifica ed ingegneria proteica. Tecniche per la analisi della interazione proteina-proteina e proteina-acidi nucleici (co-immunoprecipitazione, "DNA-band shift assays", "Surface Plasmon Resonance"). Saggi enzimatici con l'utilizzo di precursori radioattivi. Sistemi per la manipolazione genetica di archeobatteri iper-termofili.

Tecnologie

Purificazione di proteine ricombinanti di interesse medico e/o biotecnologico. Produzione di anticorpi specifici contro proteine ricombinanti di interesse medico e/o biotecnologico. Predizione di modelli di struttura tri-dimensionale di proteine. Vettori per la manipolazione genetica di archeobatteri iper-termofili.

Collaborazioni (partner e committenti)

S. Onesti (Londra, Regno Unito); R. Ladenstein (Stoccolma, Svezia); T. Nohmi (Tokyo, Giappone); E. Mathur (San Diego, USA); P. Forterre (Parigi, Francia); M. F. White (St Andrews, Regno Unito); M. Nadal (Versailles, Francia); Q. She and R. A. Garrett (Copenaghen, Danimarca); G. Lipps (Bayreuth, Germania); C. Schleper (Darmstadt, Germania); D. Prangshvili (Parigi, Francia); D.Tsernoglou (Roma, Italia); P. Londei (Roma, Italia); P. Contursi, G. Fiorentino and S. Bartolucci (Napoli, Italia).

Iniziative per l'acquisizione di ulteriori entrate

La ricerca finora svolta si è avvalsa prevalentemente di finanziamenti esterni e della collaborazione di Borsisti e Dottorandi. Il raggiungimento dei risultati attesi dipenderà dal sostegno derivante da nuove fonti finanziarie.

Nel 2008 alcuni Ricercatori afferenti a tale Commessa intendono partecipare ai bandi per il finanziamento nell'ambito del VII Programma Quadro della Unione Europea, nonché a quelli del Ministero della Università e Ricerca, della Regione Campania e di altre agenzie nazionali ed internazionali.

Finalità

Obiettivi

La ricerca proposta richiede competenze avanzate in Biochimica, Biologia Strutturale, Biologia Molecolare, Microbiologia. Queste sono disponibili tra i ricercatori dell'Istituto coinvolti e/o i loro collaboratori esterni. Obiettivi proposti: studio dei meccanismi di replicazione/riparazione/ricombinazione del DNA; analisi della risposta ad agenti mutageni; messa a punto di sistemi genetici vettore/ospite e controllo della espressione genica in *S. solfataricus*.

Risultati attesi nell'anno

1. Analisi strutturale di forme tronche della proteina MCM di *S. solfataricus* (Sso MCM). Identificazione di residui aminoacidici di Sso MCM critici per il legame al DNA e/o la attività elicastica.
2. Protocolli per la produzione in forma ricombinante e purificazione di fattori replicativi umani (DNA polimerasi, DNA topoisomerasi, complesso GINS, proteine MCM 2-7, cdc45, MCM10, TIM-Tipin). Identificazione di interazioni fisiche e/o funzionali tra questi.
3. Identificazione di geni la cui espressione è regolata da agenti mutageni e stress in *S. solfataricus*. Identificazione di sequenze regolatrici in cis e dei fattori che con esse interagiscono in estratti cellulari.
4. Delucidazione del meccanismo di regolazione di geni interrotti di *S. solfataricus*.
5. Caratterizzazione funzionale di almeno uno dei geni coinvolti nella regolazione della replicazione e dell'assemblaggio dell'elemento pSSVx di *Sulfolobus*.

Potenziale impiego

- per processi produttivi

- per risposte a bisogni individuali e collettivi



Moduli

Modulo: DR.SSA PISANI: Studio dei processi cellulari in estremofili
Istituto esecutore: Istituto di biochimica delle proteine
Luogo di svolgimento attività: Sede principale Istituto

Risorse commessa 2008

Pers. tempo ind/det	Funz.+ Invest.	Spese da Fonti Esterne	Spese per Infrastrutt. tecn.-scient a gestione accentrata	Totale	Risorse da esercizi precedenti	Massa Spendibile	Costi figurativi	Spese generali accentrate	Valore Effettivo
1	2	3	4	5=1+2+3+4	6	7=2+3+6	8	9	10=5+6+8+9
230	0	60	0	290	0	60	81	N.D.	371

valori in migliaia di euro

<i>Unità di personale di ruolo*</i>	
ricercatori	Totale
3	5

*equivalente tempo pieno

<i>Unità di personale non di ruolo</i>									
associato	dottorando	borsista	assegnista	specializzando	incaricato di ricerca	professore visitatore	collaboratore professionale	altro	Totale
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

<i>Richiesta nuove unità di personale</i>			
tempo determinato	tempo indet	non di ruolo*	Totale
0	0	0	0

*dottorati, borse di studio, assegni di ricerca



Individuazione, recupero e conservazione della biodiversità dei lieviti siciliani e loro catalogazione territoriale.

Dati generali

Progetto:	Meccanismi di adattamento a stress e biodiversità
Tipologia di ricerca:	Progetti relativi a linee tematiche a carattere strategico
Istituto esecutore:	Istituto di biomedicina e immunologia molecolare 'Alberto Monroy'
Sede principale svolgimento:	Sede principale Istituto
Dip. di prevista afferenza:	Scienze della Vita
Responsabile indicato:	FRANCESCO DI BLASI

Elenco dei partecipanti

Bonura Angela	liv. III	Riccobono Daniela	liv. VII	Spera Donatella	liv. VII
Cavoli Francesca	VII	Sanzone Sabrina	VII	Tarantino Provvidenza	VII
Geraci Domenico	I	Scatassa Valentina	VII	Turatto Rosa	VII
Parisi Pietrina	V				

Temi

Tematiche di ricerca

La Sicilia e le sue isole minori costituiscono una immenso serbatoio di biodiversità e cio' grazie anche alla eterogeneità del suo territorio. Ad oggi in Sicilia non è stato realizzato alcun censimento microbiologico. L'uso continuo e massivo di fitofarmaci e di fertilizzanti chimici ha determinato una diminuzione della varietà dei lieviti di alcuni habitat. Si rende necessaria l'individuazione, il recupero e la conservazione di lieviti provenienti da diverse territori siciliani. Tali lieviti saranno caratterizzati con metodologie convenzionali e molecolari. Applicando sia analisi morfologiche che tecniche di analisi molecolari, si condurranno ricerche sull'impatto che differenti pressioni antropiche hanno sulla biodiversità dei lieviti. Sarà effettuato un inventario dei lieviti in funzione dell'habitat di riferimento che potrà essere utilizzato come bioindicatore di fattori di stress ambientali.

Stato dell'arte

Tra le varie forme di ricchezza di un Paese (materiale, culturale, biologica), quella biologica (biodiversità) è stata finora sottovalutata. Tale ricchezza consiste nell'enorme numero di informazioni genetiche possedute da ciascuna specie, anche la più piccola. La varietà della vita in tutte le sue forme e combinazioni, può essere rappresentata in varietà dei geni, delle specie e degli ecosistemi. Con la crescita dell'inquinamento e di conseguenza delle condizioni di stress diminuisce la varietà delle specie. I microorganismi ed in particolare i lieviti contribuiscono in modo fondamentale all'equilibrio di molteplici ecosistemi. Essi possono essere utilizzati come bioindicatori, ed inoltre influenzano direttamente la qualità di alimenti e bevande trasmettendo delle caratteristiche tipiche di un determinato territorio.

Azioni

Attività da svolgere

Saranno effettuati nuove campionature nello stesso habitat già analizzato, per valutare una eventuale differenza nella biodiversità dei ceppi in funzione del tempo. In particolare sarà effettuata una attenta analisi sulla popolazione dei *Saccharomyces cerevisiae* che ha già evidenziato una maggiore eterogeneità genetica. A tal fine contiamo di isolare circa 50 nuove colonie e di tali isolati sarà effettuata una analisi molecolare. Inoltre, per un potenziale utilizzo commerciale dei lieviti isolati, saranno effettuate ulteriori analisi dei caratteri tecnologici su alcuni individui isolati

Punti critici e azioni da svolgere

Un punto critico è l'esiguità dei finanziamenti ordinari ricevuti dalla commessa.

Altro punto di criticità è rappresentato dal personale di ruolo. Sarebbe necessario il contributo di almeno un Collaboratore Tecnico.

Competenze, tecnologie e tecniche di indagine

Competenze nel campo della biologia cellulare e molecolare, genetica molecolare, biotecnologie, microscopia, microbiologia generale, microbiologia enologica, tecniche di produzione enologica; conoscenza della realtà aziendale siciliana nel settore enologico.



Strumentazione

Apparecchi per elettroforesi del dna, citometria di flusso termociclatore, centrifughe, incubatori, microscopio ottico, apparato transUV per l'acquisizione e l'analisi delle immagini, autoclave, cabina di sicurezza microbiologica, congelatore -80 C.

Tecniche di indagine

Campionamenti in differenti habitat e crioconservazione. Analisi microbiologiche e molecolari. Analisi biochimiche e tecnologiche degli isolati. Saggi di produzione dell'enzima beta-glucosidasi

Tecnologie

PCR delle ITS-regions del DNA ribosomale; analisi dei polimorfismi della lunghezza dei frammenti di restrizione (RFLP) del DNA mitocondriale. Analisi elettroforetica su gel del DNA. Vinificazioni sperimentali.

Collaborazioni (partner e committenti)

Committente: Assessorato Agricoltura e Foreste della Regione Sicila;

Partner: Istituto di genetica vegetale (IGV)-CNR;

Dip. Biologia Cellulare e Sviluppo Università di Palermo;

Istituto Regionale della Vite e del Vino - Regione Sicilia

CNRS Bordeaux, France;

INRA Bordeaux, France.

Piccole e medie imprese

Iniziativa per l'acquisizione di ulteriori entrate

E' in fase avanzata di realizzazione la messa a punto di un protocollo di collaborazione con la Regione Siciliana che prevede la partecipazione al Programma di Sostegno alla Cooperazione Regionale. Si prevedono delle entrate per la partecipazione a tale programma.

Ulteriori contatti sono in corso con gli Assessorati della Regione Sicilia.

Finalità

Obiettivi

Isolamento di differenti colonie di lievito per habitat di riferimento.

Analisi quantitativa, morfologica e molecolare.

Elaborazione statistica ed analisi bioinformatica per identificare popolazioni di lieviti correlati a specifiche condizioni di inquinamento ambientale.

Utilizzo dei lieviti come biosensori.

Creazione di una 'microbanca' di lieviti a carattere territoriale.

Risultati attesi nell'anno

Saranno completate le analisi dei caratteri tecnologici degli isolati per un eventuale utilizzo commerciale nel campo vitivinicolo.

Saranno effettuate le caratterizzazioni molecolari degli individui isolati da una nuova campionatura.

Potenziale impiego

- per processi produttivi

Il potenziale impiego dei risultati della ricerca per processi produttivi sono rappresentate da: utilizzo di lieviti autoctoni per la produzione di alimenti ed in particolar modo di vini. L'impronta sensoriale del vino è di fondamentale importanza per la definizione della qualità del prodotto. A parità di altre condizioni, la vinificazione con diversi ceppi di lievito determina prodotti che si distinguono tra loro all'analisi sensoriale e chimica. Poichè una parte crescente del mercato richiede vini fortemente legati al territorio di produzione ed essendo i lieviti elementi importanti nel determinare le caratteristiche qualitative del prodotto finale, risulta chiaro l'interesse per le popolazioni di lieviti autoctoni responsabili delle fermentazioni in determinate aree geografiche. Possibilità di commercializzazione di ceppi di lievito e godimento delle relative royalty.

- per risposte a bisogni individuali e collettivi

Possibilità di utilizzo dei lieviti come bioindicatori degli equilibri naturali e delle condizioni di stress ambientale.



Moduli

Modulo: (SV.P12.003) Individuazione, recupero e conservazione della biodiversità dei lieviti siciliani e loro catalogazione territoriale.

Istituto esecutore: Istituto di biomedicina e immunologia molecolare 'Alberto Monroy'

Luogo di svolgimento attività: Sede principale Istituto

Risorse commessa 2008

Pers. tempo ind/det	Funz.+ Invest.	Spese da Fonti Esterne	Spese per Infrastrutt. tecn.-scient a gestione accentrata	Totale	Risorse da esercizi precedenti	Massa Spendibile	Costi figurativi	Spese generali accentrate	Valore Effettivo
1	2	3	4	5=1+2+3+4	6	7=2+3+6	8	9	10=5+6+8+9
37	34	0	71	142	2	36	23	N.D.	167

valori in migliaia di euro

<i>Unità di personale di ruolo*</i>	
ricercatori	Totale
0	1

*equivalente tempo pieno

<i>Unità di personale non di ruolo</i>									
associato	dottorando	borsista	assegnista	specializzando	incaricato di ricerca	professore visitatore	collaboratore professionale	altro	Totale
1	0	0	3	0	0	0	0	1	5

<i>Richiesta nuove unità di personale</i>			
tempo determinato	tempo indet	non di ruolo*	Totale
0	3	0	3

*dottorati, borse di studio, assegni di ricerca



Liberaazione, diffusione e deposizione delle componenti biologiche dell'atmosfera ed effetto sulla salute.

Dati generali

Progetto:	Meccanismi di adattamento a stress e biodiversità
Tipologia di ricerca:	Progetti relativi a linee tematiche a carattere strategico
Istituto esecutore:	Istituto di biomedicina e immunologia molecolare 'Alberto Monroy'
Sede principale svolgimento:	Sede principale Istituto
Dip. di prevista afferenza:	Scienze della Vita
Responsabile indicato:	Giovanni Duro

Elenco dei partecipanti

Albeggiani Giuseppe	liv. III	Parisi Pietrina	liv. V	Sciarrino Serafina	liv. III
Cavoli Francesca	VII	Riccobono Daniela	VII	Spera Donatella	VII
Duro Giovanni	III	Sanzone Sabrina	VII	Tarantino Provvidenza	VII
Geraci Domenico	I	Scatassa Valentina	VII	Turatto Rosa	VII

Temi

Tematiche di ricerca

E' in atto una collaborazione tra l'IBIM-CNR, l'ARPA Sicilia e l'UniPa, tesa a creare una rete di monitoraggio pollinico in Sicilia. La presenza nell'atmosfera di pollini derivanti dalla fioritura di piante ed erbe può causare manifestazioni allergiche in soggetti, il più delle volte predisposti, che accusano una serie di sintomi, dai più lievi (congiuntivite, rinite) ai più gravi (asma), incidendo profondamente sulla loro qualità di vita, con un importante risvolto in campo sociale e in termini di spesa sanitaria. L'interesse è oggi rivolto ai processi di rilascio, trasporto e deposito di particelle allergeniche, in modo da produrre conoscenze per interventi di prevenzione di malattie e riduzione dei rischi ambientali. Il contributo che l'Aerobiologia può dare con il monitoraggio in continuo dei pollini e delle particelle aerodisperse non è limitato soltanto al campo della medicina, e in particolare all'allergologia, con lo studio dei pollini e spore aerodiffuse, ma si estende anche ad altri settori quali l'agricoltura, la fitopatologia, la conservazione dei beni culturali nonché allo studio della biodiversità, del clima e dell'inquinamento atmosferico.

Stato dell'arte

La rete regionale di monitoraggio dei pollini allergenici, gestita dall'IBIM-C.N.R. in collaborazione con ARPA Sicilia, ed UniPA, è costituita da n 4 stazioni localizzate nella Sicilia Occidentale e n 4 nella Sicilia orientale. I campionatori pollinici sono stati situati in area urbana, rispettando lo standard operativo messo a punto dall'Associazione Italiana di Aerobiologia (AIA). Sono stati inoltre 'assunti' con contratti CNR, a tempo determinato 2005/08, tre biologi che lavoreranno al progetto.

Azioni

Attività da svolgere

- * Incremento della rete di monitoraggio pollinico siciliana inserendo nello studio 3 nuove stazioni di monitoraggio a Palermo e Catania, città ad altissimo tasso di inquinamento;
- * messa a punto tecniche per lo studio della vitalità pollinica, quale indice di inquinamento atmosferico;
- * saranno inoltre installate, nelle aree monitorate, altre centraline di rilevamento dei dati meteorologici.

Punti critici e azioni da svolgere

La quantità dei finanziamenti ordinari ricevuti (previsti) dalla commessa non consentirebbe alcuna attività di ricerca.

Inoltre gran parte dei finanziamenti esterni ottenuti deve essere destinato ad assegni di ricerca per poter svolgere l'attività di ricerca della commessa. Il potenziamento del personale a tempo indeterminato (e/o a contratto) consentirebbe di recuperare somme da investire nelle attività di ricerca ed incremento delle attrezzature.

Competenze, tecnologie e tecniche di indagine

Competenze nel campo della Biologia Molecolare: estrazione di DNA, RNA e proteine da cellule animali e vegetali; analisi e studi su DNA, RNA e PROTEINE utilizzando tecniche di Southern, Northern, SDS-PAGE elettroforesi e Western Blot; marcatura di DNA; preparazione di genoteche sia da DNA genomico che da cDNA (librerie di espressione); screening di librerie con DNA marcato; sequenze di DNA con la tecnica di Sanger sia in M13 che in vettori a doppio filamento; amplificazione di frammenti di DNA utilizzando la



tecnica della PCR ed RT-PCR; analisi polimorfismi; screening di libreria di espressione con anticorpi poly e monoclonali, IgE-binding; frammentazione di cloni ricombinanti e clonaggio in vettori di espressione (pMal C2, PQE, pET).

Competenze di botanica e di microscopia ottica, ricoscimento pollini e spore.

§ Purificazione di proteine: Purificazione di proteine di fusione tramite colonna di affinità; Esperimenti di immunoblotting (incubazione con sieri di soggetti allergici al polline di Paritaria IgE binding).

§ Mutazioni sito specifiche.

§ Verifica in vivo, Skin Prick Test, allergeni modificati.

; biologia cellulare; botanica; microscopia ottica

Strumentazione

Laboratorio attrezzato per biologia molecolare e altro laboratorio attrezzato studio monitoraggio aerobiologico (microscopi, software specifici, PC).

Tecniche di indagine

Tecniche di biologia molecolare come: estrazione di DNA; amplificazione di regioni specifiche (PCR); sequenza di DNA; digestione enzimatica; analisi ed elaborazione dati.

Tecniche riconoscimento pollini: trattamento campioni con procedure standard; microscopio ottico.

Tecnologie

Collaborazioni (partner e committenti)

committenti: Agenzia Regionale Protezione Ambiente della Sicilia (ARPA SICILIA). Assessorato Pubblica Istruzione Comune di Palermo. partner: Prof. G. De Leo e Prof. Riccardo Alessandro 'Dipartimento Biopatologia e Metodologie Biomediche' dell'Università di Palermo'. collaborazioni: Jeffrey A. Medin, PhD, Associate Professor Department of Medical Biophysics University of Toronto. Prof. Gabriele Di Lorenzo responsabile del 'Laboratorio di Malattie Allergiche presso il Policlinico di Palermo'; Comune di Alcamo (Tp; Banca di credito cooperativa DonRizzo; IZP di Catania; Comune di Agira (Enna); Comune di Leonforte (Enna).

Iniziative per l'acquisizione di ulteriori entrate

Proporre gli studi di aerobiologia in altri ambiti: beni culturali, monitoraggio indoor in musei e palazzi storici; sviluppare il progetto associando studi ambientali quali qualità dell'aria in ambiente indoor, all'interno delle scuole;

partecipazione ad un progetto europeo ATMOS net che ha come scopo l'incremento e lo sviluppo di reti di monitoraggio aerobiologico nell'Area Mediterranea.

Finalità

Obiettivi

Grazie agli studi di Aerobiologia, che vengono effettuati servendosi di attrezzature specifiche, i 'campionatori pollinici', è possibile identificare i pollini e le spore fungine, studiarne i periodi di presenza nell'atmosfera, quantificarne la concentrazione. I dati relativi al campionamento sono finalizzati alla redazione ed alla diffusione di un bollettino di analisi regionale che, previa interpretazione socio sanitaria, genetica ed epidemiologica, consenta di informare i soggetti allergici ed il personale Medico, con susseguenti risvolti pratici in termini di diagnosi, terapie preventive e sintomatiche. Inoltre le conoscenze acquisite potrebbero essere utilizzate per lo sviluppo di test diagnostici e terapie mirate.

Il progetto prevede inoltre:

- a) analisi proteomica di granuli pollinici per l'individuazione di nuovi allergeni (salvaguardia della biodiversità).
- b) studio dei polimorfismi genetici: variabilità individuale alla risposta immunitaria allergica.

Risultati attesi nell'anno

Associare qualità e quantità di polline alla clinica delle malattie allergiche, per una terapia preventiva mirata, più efficace e meno costosa.

incrementare lo studio della biodiversità

L'elaborazione dei dati (indicatori relativi alle fasi fenologiche di fioritura della vegetazione ed alla qualità delle polline delle specie usate in agricoltura al fine di pronosticare la produzione di semi e frutta, (realizzare, per esempio, sulla base della concentrazione pollinica rilevata, modelli previsionali utili per operatori di aziende agricole ed agricoltori impegnati nella coltivazione dell'ulivo, per ottenere stime per annata sul raccolto delle olive e sulle quantità dei derivati, olii).



*Potenziale impiego
- per processi produttivi*

- per risposte a bisogni individuali e collettivi

Moduli

Modulo: Nuovi pollini provenienti da coltivazioni OGM? studio della biodiversità
Istituto esecutore: Istituto di biomedicina e immunologia molecolare 'Alberto Monroy'
Luogo di svolgimento attività: Sede principale Istituto

Risorse commessa 2008

Pers. tempo ind/det	Funz.+ Invest.	Spese da Fonti Esterne	Spese per Infrastrutt. tecn.-scient a gestione accentrata	Totale	Risorse da esercizi precedenti	Massa Spendibile	Costi figurativi	Spese generali accentrate	Valore Effettivo
1	2	3	4	5=1+2+3+4	6	7=2+3+6	8	9	10=5+6+8+9
192	34	82	71	379	0	116	33	N.D.	412

valori in migliaia di euro

<i>Unità di personale di ruolo*</i>	
ricercatori	Totale
3	4

*equivalente tempo pieno

<i>Unità di personale non di ruolo</i>									
associato	dottorando	borsista	assegnista	specializzando	incaricato di ricerca	professore visitatore	collaboratore professionale	altro	Totale
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

<i>Richiesta nuove unità di personale</i>			
tempo determinato	tempo indet	non di ruolo*	Totale
0	0	0	0

*dottorati, borse di studio, assegni di ricerca



Stress Cellulare ed Ambiente

Dati generali

Progetto:	Meccanismi di adattamento a stress e biodiversità
Tipologia di ricerca:	Progetti relativi a linee tematiche a carattere strategico
Istituto esecutore:	Istituto di biomedicina e immunologia molecolare 'Alberto Monroy'
Sede principale svolgimento:	Sede principale Istituto
Dip. di prevista afferenza:	Scienze della Vita
Responsabile indicato:	VALERIA MATRANGA

Elenco dei partecipanti

	liv.		liv.		liv.
Cavoli Francesca	VII	Parisi Pietrina	V	Spera Donatella	VII
Costa Caterina	III	Riccobono Daniela	VII	Tarantino Provvidenza	VII
Geraci Domenico	I	Sanzone Sabrina	VII	Turatto Rosa	VII
Matranga Valeria	II	Scatassa Valentina	VII	Zito Francesca	III

Temi

Tematiche di ricerca

Lo studio è mirato a proporre il sistema modello del riccio di mare per l'individuazione dei meccanismi di risposta a perturbazioni ambientali chimiche, fisiche e bio-molecolari. In particolare saranno valutati:

- 1) gli effetti tossici di metalli pesanti (cadmio cloruro) in cellule ed embrioni di invertebrati marini (*Paracentrotus lividus*, *Asteria Rubens*);
- 2) gli effetti tossici di radiazioni in UV-B cellule ed embrioni di riccio di mare.

Stato dell'arte

La presenza in ambienti marini di molecole ad azione tossica è monitorata a livello nazionale ed europeo da commissioni tossicologiche che tuttavia incoraggiano la messa a punto di metodologie idonee ad identificare specifici 'bio-markers'. Ciò allo scopo di consentire l'individuazione delle prime reazioni a livello cellulare e molecolare, in modo che queste acquisiscano un valore predittivo in termini sia di protezione degli ecosistemi marini che di eventuale impatto sulla salute umana.

Azioni

Attività da svolgere

Saranno ulteriormente sviluppati gli studi riguardanti gli effetti di metalli pesanti (Cd) e nutrienti (Mn) rispettivamente su larve ed embrioni di riccio di mare, analizzando l'espressione di proteine da stress, pro- ed anti-apoptotiche, mediante Western blotting su estratti proteici ed immuno-istochimica su larve/embrioni interi. Inoltre saranno valutati i livelli di espressione/attivazione di alcune proteine 'target' attivate precocemente in embrioni esposti a raggi X. In particolare saranno esaminate proteine da stress (hsp60, hsp70 hsp90), pro- ed anti-apoptotiche (p38, p53, Bcl-2, BAG-3) e della senescenza (14.3.3).

Punti critici e azioni da svolgere

Le attività proposte non presentano particolari problematiche di natura tecnica. Si lamenta tuttavia la carenza di un generale ri-ammmodernamento del parco strumentazione e dei relativi finanziamenti per contratti di manutenzione e assistenza. Alcune grandi/medie apparecchiature la cui acquisizione è stata per anni ventilata sono di improrogabile necessità. Inoltre, la carenza di personale e la discontinuità negli assegni/contratti di ricerca ottenuti mediante fondi esterni all'ente penalizza le attività in corso. Si rende ormai improrogabile la stabilizzazione di personale precario che collabora alla commessa per la cui formazione l'ente ha investito nei passati 10 anni e la cui competenza specifica ne rende indispensabile l'assunzione a tempo indeterminato.

Competenze, tecnologie e tecniche di indagine

Tecniche di biochimica, biologia cellulare e molecolare.

Strumentazione

Centrifuga refrigerata, microscopio a fluorescenza, termociclature, apparecchi per elettroforesi su gel di poliacrilammide e di agarosio, apparecchi per immunoblot



Tecniche di indagine

culture di embrioni di invertebrati marini, culture cellulari, saggi di adesione, RT-PCR, immunofluorescenza diretta ed indiretta, immunoistochimica, ibridazione in situ, SDS-PAGE, western blot, cromatografia per affinità.

Tecnologie

Collaborazioni (partner e committenti)

Prof. Y.Yokota-Department of Applied Information Technology and Biological Laboratory-Aichi Prefectural University-Nagakute-Japan/Dr. M. Kiyomoto-Tateyama Marine Laboratory-Ochanomizu University-Tateyama- Japan/Prof. W. E.G. Müller-Abteilung Angewandte Molekularbiologie Institut für Physiologische Chemie-Johannes Gutenberg-Universität-Mainz- Germany/ Prof. C. Falugi-Dipartimento di Biologia Sperimentale Ambientale ed Applicata-Genova-Italia

Iniziativa per l'acquisizione di ulteriori entrate

Nell'ambito del PIAS, lanciato dai Dipartimenti di Medicina e Terra & Ambiente, è stata presentata una proposta progettuale per un triennio dal titolo 'Fattori di rischio per la salute ambientale ed umana: effetti dei metalli pesanti sul sistema ematopoietico', da sviluppare in collaborazione con colleghi di altre commesse IBIM e di altri Istituti CNR (IAMC, ISMAR), altri enti (ISS, ARPAS) ed Università (Genova, Palermo). E' in corso la valutazione di due progetti europei a cui partecipiamo come partner: 1) call FP7-PEOPLE-2007-1-1-ITN, Proposal reference number FP7 215507-2, che ha già superato lo 'Stage 1' (184 proposte selezionate su 905 presentate) e 2) call FP7-KBBE-2007-2A, reference number 222795-1 ancora in valutazione 'Stage 1'. In attesa di riscontro anche la partecipazione a bando sui progetti di ricerca di interesse nazionale PRIN 2007 (Decreto ministeriale n. 1175/ric del 18/09/2007), a cui partecipiamo come unità.

Finalità

Obiettivi

- 1) Definizione dei meccanismi di base della risposta cellulare allo stress in invertebrati marini.
- 2) Analisi della correlazione tra stress causato da fattori ambientali esterni ed immunità.
- 3) Stress cellulare come fattore di sopravvivenza nello sviluppo e nella riproduzione.
- 4) Rapporto tra stress cellulare, molecole di adesione e traduzione del segnale. Le competenze da utilizzare riguardano tecniche acquisite di biologia cellulare e molecolare.

Risultati attesi nell'anno

Si prevede di ottenere informazioni sugli effetti dell'esposizione di larve ed embrioni rispettivamente a metalli pesanti (cadmio) e nutrienti (manganese) valutando: 1) morfogenesi embrionale mediante marcatori territoriali specifici (anticorpi monoclonali per ecto-, meso- ed endoderma) 2) modulazione delle proteine da stress (hsp 60, hsp 70, hsp90), 3) attivazione di proteine coinvolte nei processi di apoptosi e trasduzione del segnale (p53 e p38). Si valuteranno inoltre gli effetti dei raggi X su embrioni esposti in fase di segmentazione e prelevati dopo 24 e 48 ore analizzando: 1) livelli di espressione di proteine da stress (hsp60, hsp70 hsp90), 2) attivazione di proteine pro-apoptotiche (p38, p53), 3) livelli di espressione di proteine anti-apoptotiche (Bcl-2, BAG-3), 4) espressione di proteine del riparo e della senescenza (XPB/ERCC 14.3.3).

Potenziale impiego

- per processi produttivi

Protocolli d'uso; nuove tecnologie; brevetti; Test biomolecolari per il rilevamento dell'inquinamento ambientale marino; Test biomolecolari per il monitoraggio degli effetti di radiazioni

- per risposte a bisogni individuali e collettivi

Formazione di esperti; Corsi di Alta Specializzazione per esperti dell'ambiente marino; Conoscenze interdisciplinari relative all'ambiente marino; Editoria scientifica, divulgativa, didattica



Moduli

Modulo: Stress Cellulare ed Ambiente
Istituto esecutore: Istituto di biomedicina e immunologia molecolare 'Alberto Monroy'
Luogo di svolgimento attività: Sede principale Istituto

Risorse commessa 2008

Pers. tempo ind/det	Funz.+ Invest.	Spese da Fonti Esterne	Spese per Infrastrutt. tecn-scient a gestione accentrata	Totale	Risorse da esercizi precedenti	Massa Spendibile	Costi figurativi	Spese generali accentrate	Valore Effettivo
1	2	3	4	5=1+2+3+4	6	7=2+3+6	8	9	10=5+6+8+9
144	34	30	71	279	0	64	30	N.D.	309

valori in migliaia di euro

Unità di personale di ruolo*	
ricercatori	Totale
2	3

*equivalente tempo pieno

Unità di personale non di ruolo									
associato	dottorando	borsista	assegnista	specializzando	incaricato di ricerca	professore visitatore	collaboratore professionale	altro	Totale
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Richiesta nuove unità di personale			
tempo determinato	tempo indet	non di ruolo*	Totale
0	3	0	3

*dottorati, borse di studio, assegni di ricerca



Studio della variabilità intra e inter specie basata su geni e genomi mitocondriali nucleari nei metazoi

Dati generali

Progetto:	Meccanismi di adattamento a stress e biodiversità
Tipologia di ricerca:	Progetti relativi a linee tematiche a carattere strategico
Istituto esecutore:	Istituto di tecnologie biomediche
Sede principale svolgimento:	Sede di Bari
Dip. di prevista afferenza:	Scienze della Vita
Responsabile indicato:	CECILIA LANAVE

Elenco dei partecipanti

D'Elia Domenica	liv. III	Lanave Cecilia	liv. III	Tricarico Anita	liv. VII
-----------------	-------------	----------------	-------------	-----------------	-------------

Temi

Tematiche di ricerca

La presente commessa ha come scopo quello di mettere a punto metodologie di produzione di dati e nuovi strumenti di analisi bioinformatica per lo studio della diversità genetica.

Le linee di indagine in particolare sono:

- 1) Lo studio evolutivo di geni e famiglie geniche, passo essenziale per lo studio della biodiversità delle specie
- 2) Lo studio e la messa a punto di metodi per l'identificazione tassonomica su base molecolare nell'ambito dell'iniziativa internazionale del CBOL (Consortium for the Barcode of Life) applicata ad organismi di interesse agroalimentare.
- 3) Lo studio della diversità genomica attraverso il sequenziamento di geni e genomi di organismi di largo impatto nella sicurezza e qualità agroalimentare

Stato dell'arte

Lo studio e la tutela della biodiversità possono essere condotti a tre livelli: del gene, della specie e dell'ecosistema. Risulta quindi rilevante analizzare non solo le informazioni provenienti da approcci non molecolari (indagini tassonomiche-morfologiche su campo o su esemplari presenti nelle collezioni), ma soprattutto considerare i dati molecolari, che si sono rivelati estremamente utili come 'barcodes' per identificare in modo rapido ed efficace animali e piante tramite brevi sequenze di DNA. L'identificazione molecolare di specie diverse ha ricadute importantissime nella vita economica del paese. La sfida del mercato ha indirizzato le diverse filiere agro-alimentari (lattiero-casearia, vinicola etc.) verso l'utilizzo di sistemi innovativi in grado di garantire ed esaltare le caratteristiche qualitative e la tracciabilità dei prodotti agro-alimentari nel quadro di uno sviluppo agricolo-industriale sostenibile. Un altro aspetto importante riguarda la rintracciabilità del prodotto che sta diventando un requisito fondamentale per ottenere quel valore aggiunto necessario a vincere le nuove sfide del mercato.

Azioni

Attività da svolgere

La nostra Unità si interesserà dello studio dei Funghi del genere *Fusarium*. Gli isolati di *Fusarium*, provenienti dai campioni di materiale biologico, saranno estratti, amplificati e sequenziati, con metodica Sanger. La scelta del marcatore sarà fatta in base alla disponibilità di primers già sviluppati, e sottoposti al parere del gruppo specializzato nello studio dei funghi all'interno del 'Consortium of Barcode of Life', e ai dati preventivamente ottenuti dagli studi condotti nel nostro gruppo di ricerca per l'individuazione di un marcatore di 'barcode' fra i geni del gruppo Ascomycota. La nostra unità si occuperà in seguito di organizzare una banca dati corredata da un sistema di query specializzato che partendo da inferenze filogenetiche supportate da dati molecolari, assegnerà sequenze ignote alle specie rappresentate nella suddetta banca dati. Verrà poi effettuata una procedura di validazione incrociata. La nostra unità provvederà al pyrosequenziamento del campionamento ambientale preventivamente preparato in collaborazione con i ricercatori dell'ISPA-CNR Bari. Le sequenze ottenute saranno poi identificate e classificate sulla base della metodologia precedentemente validata.

Punti critici e azioni da svolgere

Durante l'attività di ricerca prevediamo due punti critici:

Il primo risiede nello sviluppo di primers efficienti ed universali nell'ambito del gruppo Ascomycota per i candidati mitocondriali di barcode in esame. Infatti i geni candidati mitocondriali sono caratterizzati da



grande variabilità. Il disegno dei primers verrà guidato dai multi-allineamenti anche con altri gruppi di funghi ascomicoti, differenti dai Fusarium, che si metterà a punto nella nostra ricerca bioinformatica. I candidati primers verranno provati e le loro condizioni di utilizzo ottimizzate in modo da poter scegliere la miglior coppia di primers.

Un secondo punto critico che si aspettiamo è la conferma sperimentale dell'assenza di introni nelle zone prescelte così come atteso dalle nostre indagini in bioinformatica. Infatti i marcatori mitocondriali di funghi sono caratterizzati da molti e variabili introni presenti. L'analisi della vasta collezione ITEM dell'ISPA, che include tutte le specie di fusarium e per molte molteplici ceppi, ci permetterà di validare il miglior marcatore come effettivamente privo di introni.

Competenze, tecnologie e tecniche di indagine

Le competenze del personale afferente alla presente commessa sono così distribuite:

Evoluzione Molecolare e analisi Filogenetiche (Modelli di sostituzione nucleotidica e dei codoni, analisi di variabilità genetica inter- e intra-specie)

Statistica Bayesiana e Frequentista applicata a studi di Biologia Molecolare.

Genetica di popolazione applicata alla definizione dei concetti di specie.

Sviluppo di strumenti di analisi Bioinformatica per la gestione e l'analisi delle biosequenze (programmazione in Python e R)

Biochimica e Biologia molecolare (esperienze di analisi molecolare condotte attraverso l'uso di tecnologie sperimentali di laboratorio)

Sviluppo di banche dati biologiche (banche dati relazionali in MySQL)

Strumentazione

Risorse software

Server Ensembl con 13 banche dati genomiche.

Banche dati pubbliche e specializzate tra le quali EMBL, SWISS-PROT, TREMBL, Refseq, GO, Ensembl, UTRdb, Mitonuc.

SRS (Sequence Retrieval System),

Pacchetti e programmi d'analisi (EMBOSS, BLAST, FASTA, PHYLIP, CLUSTALW, HAMMER etc..)

Risorse hardware

Server di calcolo Cluster Beowulf composto Nr. 15 SVR Biprocessore Xeon ognuno con 2 GB di RAM e SAN da 2,7 Terabyte

n 1 COMPAQ AlphaServer DS20e TRU64 UNIX, 3 cpu 667 Mhz, 6Gb RAM, 1 Tb HD;

Risorse Hardware remote:

piattaforma GRID sviluppata nell'ambito del progetto LIBI

Le risorse strumentali di Genomica comprendono strumentazioni di base e strumentazioni avanzate nel campo della ricerca bio-molecolare quali:

citofluorimetro FACS Calibur Becton Dickinson;

microscopio a fluorescenza ZEISS;

Real Time PCR, ABI PRISM® 7900 Sequence Detection System;

lettore ELISA, Versamax Softmax Pro;

luminometro TD-20/20, Turner Designs- Promega;

ChemiDoc, Biorad;

Sequenziatore ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer

Sequenziatore ABI PRISM 310 Genetic Analyzer

Microarray Applied Biosystems 1700

Sequenziatore GS20 della 454 Life Sciences



Tecniche di indagine

Normalizzazione di cDNA da campioni biologici.

Marcaggio nucleotidico differenziato per il riconoscimento di campioni multipli in analisi di pirosequenziamento massivo mediante l'utilizzo di nuove procedure sperimentali di DNA ricombinante sviluppate ad hoc.

Sequenziamento ad alta processività di geni e genomi nucleari e mitocondriali mediante l'utilizzo anche combinato del sequenziatore con metodologia Sanger, ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer, e del pirosequenziatore ad alta processività GS20 454 Life Sciences.

Modelli di sostituzione nucleotidica o di codoni e stima dei parametri mediante l'uso di programmi di analisi quali: MrBayes, PAUP, pacchetto MOLPHY (PAML, ProtML, NJdist).

Script in R per la determinazione dei modelli ottimali e delle distribuzioni a priori da usare in MrBayes per l'analisi evolutiva delle sequenze.

Script in Python per la costruzione di pipeline di analisi per l'assegnazione del barcode individuale alle diverse specie.

Tecnologie

Collaborazioni (partner e committenti)

IGV-CNR Bari; IGB-CNR Napoli; IBBA-CNR Milano; Dipartimento di Anatomia Patologica e di Genetica, Sezione di Genetica, Università di Bari; Dipartimento di Biochimica e Biologia Molecolare, Università di Bari; IPP-CNR Bari; ISPA-CNR Bari; IBM Innovation Center, Bari; collaborazioni nell'ambito del network per la biodiversità GBIF (<http://www.gbif.org>) e della federazione di banche dati Species 2000 (<http://www.species2000.org>).

Iniziative per l'acquisizione di ulteriori entrate

Attività di Networking per la partecipazione al VII Programma Quadro EU e a eventuali iniziative proposte a livello locale dalla Regione Puglia. Si prenderanno in esame tutte le programmazioni economiche che abbiano una ricaduta sulle possibili attività di ricerca nell'ambito della Biodiversità e sui funghi dato il nostro attuale interesse scientifico.

Finalità

Obiettivi

Obiettivo principale sarà lo studio della biodiversità molecolare.

La rapida identificazione di specie permetterà una più precisa mappatura geografica della biodiversità aprendo nuove prospettive di ricerca e applicative in diversi campi quali l'ecologia (interazione specie-specie), la genetica di popolazione, la tassonomia e l'agroalimentare in termini di tracciabilità e qualità.

Produzione di dati preliminari per lo sviluppo di sistemi innovativi di monitoraggio in tempo reale della biosicurezza delle materie prime e dei prodotti finiti.

Una banca dati sarà sviluppata allo scopo di gestire ed integrare dati di natura diversa (morfologici, fenotipi, geografici e genetici) ai dati di barcodes, per una precisa identificazione delle caratteristiche di specie come per esempio la tossigenicità, il sistema ospite, etc., e a dati più specificamente correlati all'espressione genica.

Risultati attesi nell'anno

Si attende di produrre nuovi lavori su riviste internazionali e banche dati primarie e specializzate.

Potenziale impiego

- per processi produttivi

L'assegnazione di un corretto barcode anche costituito da una o più sequenze, che univocamente identifichino le diverse specie, consentirà la progettazione di un chip DNA-DNA che permetterà una rapida identificazione degli organismi (es. patogeni o tossigeni) da campioni di materiale di interesse commerciale e sanitario.

- per risposte a bisogni individuali e collettivi

Nella società civile per poter gestire in maniera intelligente ed efficiente la biodiversità sia per fini commerciali che di conservazione c'è bisogno di un accesso facile, comprensibile e completo per tutti, alle caratteristiche proprie di ogni specie per una gestione ottimale dei sistemi biologici e dell'ambiente. A tutt'oggi le informazioni disponibili sono scarse e disperse tra diverse risorse (tassonomiche, genomiche, etc.). La banca dati che sarà sviluppata nell'ambito di queste attività di ricerca risponde a questa necessità andando ad integrare dati di sequenza-Barcodes, morfologici e tassonomici.



Moduli

Modulo: Studio della variabilità intra e inter specie basata su geni e genomi mitocondriali e nucleari nei metazoi
Istituto esecutore: Istituto di tecnologie biomediche
Luogo di svolgimento attività: Sede di Bari

Risorse commessa 2008

Pers. tempo ind/det	Funz.+ Invest.	Spese da Fonti Esterne	Spese per Infrastrutt. tecn.-scient a gestione accentrata	Totale	Risorse da esercizi precedenti	Massa Spendibile	Costi figurativi	Spese generali accentrate	Valore Effettivo
1	2	3	4	5=1+2+3+4	6	7=2+3+6	8	9	10=5+6+8+9
89	8	0	53	150	116	124	76	N.D.	342

valori in migliaia di euro

<i>Unità di personale di ruolo*</i>	
ricercatori	Totale
1	2

*equivalente tempo pieno

<i>Unità di personale non di ruolo</i>									
associato	dottorando	borsista	assegnista	specializzando	incaricato di ricerca	professore visitatore	collaboratore professionale	altro	Totale
0	0	0	0	0	0	0	2	0	2

<i>Richiesta nuove unità di personale</i>			
tempo determinato	tempo indet	non di ruolo*	Totale
0	0	0	0

*dottorati, borse di studio, assegni di ricerca



Bioinformatica e biologia computazionale



Identificazione di fattori genetici associati a malattie multifattoriali comuni tramite un originale approccio allo studio di isolati genetici

Dati generali

Progetto:	Bioinformatica e biologia computazionale
Tipologia di ricerca:	Progetti relativi a linee tematiche a carattere strategico
Istituto esecutore:	Istituto di genetica delle popolazioni
Sede principale svolgimento:	Sede principale Istituto
Dip. di prevista afferenza:	Scienze della Vita
Responsabile indicato:	MARIO PIRASTU

Elenco dei partecipanti

Casu Giuseppina	liv. VI	Frogheri Maria Laura	liv. III	Melis Paola Maria	liv. III
Casula Stefania	VI	Guiso Lucia Anna	V	Pirastu Mario	I
Doro Maria Grazia	III	Lamon Clelia Cristina	VIII	Pistidda Paola Matilde	III
Forabosco Paola	III	Maestrale Giovanni Battista	VI	Sanna Cosetta	VII

Temi

Tematiche di ricerca

L'identificazione di geni e varianti geniche associate a tratti complessi, sia qualitativi ("malattie") che quantitativi (per es. fenomeni fisiologici misurabili) è il primo passo per la cura e la prevenzione di malattie complesse comuni. La comprensione dell'interazione tra geni e ambiente sono fondamentali per migliorare le condizioni di vita dell'uomo in particolare nel campo della salute. Le malattie multifattoriali ed i tratti quantitativi richiedono peraltro un approccio particolare data la loro inerente complessità. Sono stati creati i "Parchi Genetici", cioè un modello di studio multidisciplinare di popolazioni isolate e del contesto ambientale in cui esse vivono. Tali popolazioni devono possedere peculiari caratteristiche: antiche origini, un numero molto ridotto di fondatori (poche decine), bassa immigrazione (tra 5 e 10%), lenta crescita demografica, alta endogamia (90%) e consanguineità (35%), possibilità di accurate ricostruzioni genealogiche per almeno 400 anni (fino a 17 generazioni), omogeneità ambientale e degli stili di vita. Anche dati correlate permettono l'integrazione di tutte queste informazioni.

Stato dell'arte

Nonostante per merito del grande progetto internazionale Hap-Map si conoscano milioni di varianti genetiche del genoma umano, si sono incontrate innumerevoli difficoltà nell'associare tali varianti con tratti complessi. Oltre alla complessità dei sistemi biologici in questione, vi si aggiunge la complessità derivata dalla disomogeneità dei campioni che si studiano. Pertanto la selezione da parte nostra di una decina di paesi isolati 'inbred' della regione Ogliastra nella Sardegna centro orientale si è rivelata la soluzione ideale per ottenere una popolazione modello da sottoporre a studi multidisciplinari. L'elevata omogeneità della popolazione oggetto di studio ed il suo alto grado di consanguineità facilita l'identificazione dei fattori genetici coinvolti in malattie complesse. La condivisa omogeneità ambientale e comportamentale di tali popolazioni offre un ulteriore vantaggio a tali studi.

Azioni

Attività da svolgere

Punti critici e azioni da svolgere

Competenze, tecnologie e tecniche di indagine

Per lo svolgimento dell'attività di ricerca sono necessarie diverse competenze, già presenti nel nostro Istituto o tra i nostri collaboratori: competenze cliniche ed epidemiologiche per una migliore definizione del fenotipo in studio; competenze informatiche, soprattutto nel settore dei database adattabili alla raccolta di dati eterogenei in appositi supporti elettronici; competenze biologico/molecolari nel settore dell'analisi del DNA e in genotipizzazione highthroughput, competenze biostatistiche per le analisi epidemiologiche, di linkage parametrico e non parametrico e di associazione per l'identificazione dei loci cromosomici e dei geni malattia; competenze nel settore della biologia cellulare necessarie per lo studio della funzione dei geni e del loro prodotto proteico.



Strumentazione

Sequenziatori automatici capillari, Thermacyclers, hardware e software, piattaforma Affymetrix Genechip per genotipizzazione highthroughput di SNPs e studi di espressione, gel bidimensionali

Tecniche di indagine

Sviluppo di nuovi tools bioinformatici per l'integrazione di dati e analisi statistiche e di dati altamente eterogenei per l'applicazione alla medicina personalizzata

Tecnologie

Collaborazioni (partner e committenti)

Il progetto si svolge in collaborazione con il Parco Genetico dell'Ogliastra S.C.a.R.L.: Consorzio formato da alcuni paesi ogliastrini ed enti pubblici e privati della Sardegna che svolgono funzioni di supporto logistico mettendo a disposizione spazi attrezzati, personale tecnico locale e persino investimenti effettuati a favore della ricerca. Il CNR ha firmato un Protocollo d'Intesa con la Società Shardna spa per lo sfruttamento economico dei risultati della ricerca al fine di sviluppare mezzi diagnostici e farmacologici per la cura e la prevenzione di malattie multifattoriali. La società Shardna agisce da partner privato nell'attuazione della commessa dell'IGP. Il committente della commessa è il MIUR attraverso il fondo per l'agevolazione della ricerca previsto dalla legge 297/99. Inoltre abbiamo intrapreso numerose collaborazioni con istituti pubblici, università e imprese di seguito elencate:

Università degli Studi di Cagliari: Dipartimento di Citomorfologia, Sez. di Anatomia patologica: Prof. Gavino Faa; Clinica Oculistica: Prof. Maurizio Fossarello; Dipartimento di Neuroscienze 'B.B. Brodie', Clinica Farmacologica: Prof.ssa Maria Del Zompo; Dipartimento di Tossicologia: Prof. Gaetano Di Chiara; Policlinico Universitario di Monserrato, UO Diabetologia e Sindrome Metabolica: Prof. Marco Baroni; Sez. Medicina Interna, Andrologia e Obesità: Prof. Andrea Loviselli; Dipartimento di Matematica e Informatica: Prof. Walter Racugno

Università degli Studi di Firenze, Dipartimento Endocrinologia e Malattie del Metabolismo: Prof.ssa Maria Luisa Brandi

Università Degli Studi Milano, Istituto di Statistica Medica e Biometria: Prof. Adriano Decarli

Department. of Human Genetics, UCLA School of Medicine, California: Dr Eric Sobel, Ph.D, Associate Adjunct Professor

Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto di Neuroscienze: Dott. Giancarlo Colombo

Axxam S.r.l.: Dott.ssa Paola Tarroni

Nurex S.r.l.: Prof. Franco Turrini

Iniziative per l'acquisizione di ulteriori entrate

Attività di Networking per la partecipazione al VII Programma Quadro EU e a eventuali iniziative proposte a livello locale dalla Regione Puglia. Si prenderanno in esame tutte le programmazioni economiche che abbiano una ricaduta sulle possibili attività di ricerca nell'ambito della Biodiversità e sui funghi dato il nostro attuale interesse scientifico.

Finalità

Obiettivi

Sviluppo di metodologie statistiche e computazionali per l'analisi di dati complessi con la finalità di identificare i fattori genetici ed ambientali associati a malattie multifattoriali comuni e fenotipi semplici e complessi. Tale obiettivo si otterrà attraverso l'utilizzo di una piattaforma tecnologica integrata comprendente sia i dati derivanti dallo studio di popolazioni omogenee sia dal punto di vista genetico che ambientale sia gli applicativi per detta analisi. Il sistema di informazioni integrato potrà essere utilizzato per la definizione di strategie e di gestione ottimale delle risorse e dei servizi per la salute attraverso l'individuazione di programmi sia di prevenzione che di diagnosi e terapia finalizzati alla massima efficienza ed al minimo costo. Potranno essere prodotti kit diagnostici e sistemi farmacologici personalizzati. Il progetto è modulare ed i paesi vengono studiati in sequenza dai vari team multidisciplinari di studio.

Risultati attesi nell'anno

Potenziale impiego

- per processi produttivi

L'integrazione dei dati in un complesso database interattivo permetterà di migliorare l'integrazione dei dati per condurre studi di 'system biology' e identificare i pathways biologici coinvolti nella patofisiologia delle malattie in studio. I tools bioinformatici e di data mining che saranno ulteriormente sviluppati permetteranno di analizzare relazioni non immediatamente evidenti tra i diversi sistemi coinvolti. Questo permetterà di identificare nuovi loci, quindi i geni presenti in tali loci e successivamente le varianti geniche



associate a patologie con grande impatto sociale, dando l'opportunità al CNR, insieme alla società Shardna di cui è partner, di depositare nuovi brevetti. Verranno perfezionati i tools di ricostruzione automatica e disegno degli alberi genealogici. Questo è un prodotto estremamente importante da raggiungere dato che viene continuamente richiesto anche da altri gruppi di ricerca per le sue innovative caratteristiche uniche sul mercato.

- per risposte a bisogni individuali e collettivi

Il progetto avrà importanti ricadute a livello locale in termini di azione di diagnostica e prevenzione in popolazioni che hanno un accesso abbastanza difficoltoso al sistema sanitario nazionale essendo molto decentrate. L'attuazione del programma di ricerca avrà anche una ricaduta in termini di 'educazione alla salute' visti i protocolli che si implementano per lo studio della nutrizione, degli stili di vita e la determinazione dei fattori di rischio non genetici. Il progetto ha già ispirato molti gruppi sia a livello nazionale che internazionale a condurre studi simili in popolazioni con caratteristiche paragonabili a quelle dell'Ogliastro. Il MIUR lo ha già indicato come progetto di eccellenza con importanti ricadute sia scientifiche che sociali.

Moduli

Modulo: Identificazione di fattori genetici associati a malattie multifattoriali comuni tramite un originale approccio allo studio di isolati genetici
Istituto esecutore: Istituto di genetica delle popolazioni
Luogo di svolgimento attività: Sede principale Istituto

Modulo: Identificazione di geni-malattia mediante genotipizzazione ad alta densità di popolazioni.
Istituto esecutore: Istituto di genetica delle popolazioni
Luogo di svolgimento attività: Sede principale Istituto

Risorse commessa 2008

Pers. tempo ind/det	Funz.+ Invest.	Spese da Fonti Esterne	Spese per Infrastrutt. tecn.-scient a gestione accentrata	Totale	Risorse da esercizi precedenti	Massa Spendibile	Costi figurativi	Spese generali accentrate	Valore Effettivo
1	2	3	4	5=1+2+3+4	6	7=2+3+6	8	9	10=5+6+8+9
611	76	524	0	1.211	486	1.086	109	N.D.	1.806

valori in migliaia di euro

<i>Unità di personale di ruolo*</i>	
ricercatori	Totale
6	12

*equivalente tempo pieno

<i>Unità di personale non di ruolo</i>									
associato	dottorando	borsista	assegnista	specializzando	incaricato di ricerca	professore visitatore	collaboratore professionale	altro	Totale
0	0	1	3	0	29	0	19	0	52

<i>Richiesta nuove unità di personale</i>			
tempo determinato	tempo indet	non di ruolo*	Totale
0	0	0	0

*dottorati, borse di studio, assegni di ricerca



Modellizzazione quantitativa di sistemi biologici complessi

Dati generali

Progetto:	Bioinformatica e biologia computazionale
Tipologia di ricerca:	Progetti relativi a linee tematiche a carattere strategico
Istituto esecutore:	Istituto per le applicazioni del calcolo "Mauro Picone"
Sede principale svolgimento:	Sede principale Istituto
Dip. di prevista afferenza:	Scienze della Vita
Responsabile indicato:	FILIPPO CASTIGLIONE

Elenco dei partecipanti

Adamo Massimiliano	liv. III	Gonnella Ilaria	liv. VI	Pedicini Marco	liv. III
Bernaschi Massimo	I	Natalini Roberto	I	Pontrelli Giuseppe	II
Castiglione Filippo	III	Pechini Cesare	VII		

Temi

Tematiche di ricerca

La commessa si articola in diverse attività. Queste adottano un diverso livello di descrizione (molecolare, intracellulare, cellulare) a seconda del sistema biologico che si intende studiare. La scelta di tali livelli di descrizione dipende sia dalla disponibilità di osservazioni sperimentali che da una certa convenienza nell'uso del metodo matematico scelto per rappresentare il sistema. È importante notare che esiste una naturale corrispondenza tra la conoscenza e le competenze sviluppate dai gruppi di ricercatori per le diverse attività. Per sottolineare la capacità di fare ricerca interdisciplinare è importante dire che tutte le attività dei ricercatori dell'IAC sono supportate da una collaborazione con biologi sperimentali o medici clinici e che tutte le attività iniziano la propria indagine da dati sperimentali. La commessa si articola nelle seguenti attività.

- (1) La risposta immunitaria in relazione a patologie virali e tumorali;
- (2) Dinamica molecolare intracellulare;
- (3) Comunicazione e interazione in sistemi biologici microscopici;
- (4) Dinamica di farmaci in arterie e nel tessuto biologico.

Stato dell'arte

La ricerca in biologia matematica vive un periodo di grande sviluppo a livello mondiale. Ciò è permesso dalla congiunzione di due fattori:

- 1) la grande disponibilità di dati ottenuti mediante strumenti di misura computerizzati (ivi inclusi i metodi derivanti dalla genomica);
- 2) l'enorme capacità di calcolo dei calcolatori moderni. Questi due fattori hanno creato le condizioni ideali per un rapido sviluppo della biologia matematica o computazionale. Le ricadute pratiche che ci si aspetta da questa area di ricerca sono enormi e coinvolgono tutti quegli aspetti legati alla comprensione dei fenomeni biologici in senso lato, alla salute, alla bio-tecnologia, all'ambiente, etc.

Azioni

Attività da svolgere

Punti critici e azioni da svolgere

Competenze, tecnologie e tecniche di indagine

Strumentazione

Risorse di calcolo

Tecniche di indagine

Simulazione, analisi numerica

Tecnologie



Collaborazioni (partner e committenti)

Istituti a carattere matematico o biologico: Ist Nazionale Malattie Infettive 'L. Spallanzani' Roma; Policlinico Monteluce, Univ Studi di Perugia; Sezione di Ematologia, Univ Studi di Foggia; Inst for Medical Bio-Mathematics, Tel Aviv, Israele; Harvard Medical School, Boston; Dip Biol, Univ 'Tor Vergata' Roma; Virginia Bioinf Inst, Blacksburg, USA; Tufts University, Boston; IML, CNRS, Marsiglia; PPS, CNRS, Parigi; Dip Informatica, Univ Bologna; Dip Genetica e Biol Molecolare, Univ 'La Sapienza' Roma; Dip Matematica, Politecnico di Torino; Ist Biologia e Patologia Molecolare CNR Roma; EPFL, Losanna, Svizzera; INRIA, Rocquencourt, Francia; Lab Ing Biomedica, Ist Sup di Sanita', Roma; MOX, Dip Matematica, Politecnico di Milano; Dip Strutture, Univ Roma III; DISAT, Facolta' Ingegneria, Univ dell'Aquila; School of Crystallography, Birkbeck College, Univ of London, UK; Center for Biol Sequence Analysis, Danmarks Tekniske Univ, Danimarca; Inst de la Genetique Humaine CNRS, Montpellier, Francia; Dip Patologia Sperimentale, Sez di Cancerologia, Univ Bologna; School of Land & Food Science, Univ Queensland, Brisbane, Australia; CINECA Bologna; Dip Matematica e Informatica, Univ Studi Catania

Iniziativa per l'acquisizione di ulteriori entrate

Attività di Networking per la partecipazione al VII Programma Quadro EU e a eventuali iniziative proposte a livello locale dalla Regione Puglia. Si prenderanno in esame tutte le programmazioni economiche che abbiano una ricaduta sulle possibili attività di ricerca nell'ambito della Biodiversità e sui funghi dato il nostro attuale interesse scientifico.

Finalità

Obiettivi

In relazione alle attività sopra elencate, si intende: 1) Affinare i modelli di simulazione per l'AIDS ed i tumori. Sviluppare metodi del controllo ottimo per l'allocazione ottimale delle sessioni immunoterapeutiche. Effettuare una analisi statistico-matematica della viremia in pazienti sieropositivi sottoposti a terapia antivirale con abilità predittive del suo fallimento. 2) Perfezionare la simulazione di protein-protein interaction networks per comprendere meglio la capacità della cellula di creare strutture funzionali organizzate; analizzare modelli di reazioni autocatalitiche per studiare la trasduzione di segnali intracellulari come onda di attivazione o come semplice diffusione. 3) Sviluppare un linguaggio logico di supporto alla modellizzazione di sistemi metabolici in presenza di conoscenza incompleta che sia di aiuto a rappresentare e simulare le complesse interazioni molecolari intracellulari. 4) Sviluppare modelli per il trasporto di farmaci nel sangue e rilascio da parte di materiali microstrutturati e modelli per la cinetica di un soluto disciolto nel sangue e assorbito da organi bersaglio per valutarne l'eventuale effetto retroattivo su altri organi.

Risultati attesi nell'anno

Potenziale impiego

- per processi produttivi

Il lavoro svolto all'interno di questa commessa ha un grosso potenziale applicativo per i seguenti processi produttivi:

- Progettazione di software per industrie farmaceutiche per

*) sistema immunitario

*) protein-protein interaction networks

*) trasporto di farmaci nel sangue

*) linguaggi formali per su processi mobili definire reti metaboliche e di interazioni molecolari e cellulari

- per risposte a bisogni individuali e collettivi

Il lavoro svolto in questa commessa può fornire sostanziali contributi ai seguenti bisogni individuali e collettivi

- Ottimizzazione di tecniche di vaccinazione contro i tumori

- Ottimizzazione di protocolli clinici per la terapia antiretrovirale per HIV

- Ottimizzazione di interventi clinici per disturbi cardiovascolari



Moduli

Modulo: Modellizzazione quantitativa di sistemi biologici complessi
Istituto esecutore: Istituto per le applicazioni del calcolo "Mauro Picone"
Luogo di svolgimento attività: Sede principale Istituto

Risorse commessa 2008

Pers. tempo ind/det	Funz.+ Invest.	Spese da Fonti Esterne	Spese per Infrastrutt. tecn.-scient a gestione accentrata	Totale	Risorse da esercizi precedenti	Massa Spendibile	Costi figurativi	Spese generali accentrate	Valore Effettivo
1	2	3	4	5=1+2+3+4	6	7=2+3+6	8	9	10=5+6+8+9
218	13	12	24	267	140	165	19	N.D.	426

valori in migliaia di euro

<i>Unità di personale di ruolo*</i>	
ricercatori	Totale
3	5

*equivalente tempo pieno

<i>Unità di personale non di ruolo</i>									
associato	dottorando	borsista	assegnista	specializzando	incaricato di ricerca	professore visitatore	collaboratore professionale	altro	Totale
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

<i>Richiesta nuove unità di personale</i>			
tempo determinato	tempo indet	non di ruolo*	Totale
0	0	0	0

*dottorati, borse di studio, assegni di ricerca



Bioinformatica per la Genomica Funzionale e Comparata

Dati generali

Progetto:	Bioinformatica e biologia computazionale
Tipologia di ricerca:	Progetti relativi a linee tematiche a carattere strategico
Istituto esecutore:	Istituto di tecnologie biomediche
Sede principale svolgimento:	Sede di Bari
Dip. di prevista afferenza:	Scienze della Vita
Responsabile indicato:	GRAZIANO PESOLE

Elenco dei partecipanti

	liv.		liv.		liv.
D'Elia Domenica	III	Liuni Sabino	II	Tricarico Anita	VII
Grillo Giorgio	III	Sbisa' Elisabetta	II	Tullo Apollonia	III

Temi

Tematiche di ricerca

Progettazione e sviluppo di banche dati per la gestione, integrazione e annotazione funzionale di dati provenienti da progetti di sequenziamento e analisi di espressione prodotti nell'ambito delle attività della stessa proposta e di altri laboratori. Sviluppo di modelli statistici e algoritmi per analisi di dati genomici e trascrittomici per lo studio dei principali processi biologici e per la comprensione dei meccanismi alla base della regolazione dell'espressione genica, con validazione sperimentale. Analisi comparativa ed evolutiva di genomi. Progettazione e sviluppo di una piattaforma web-based per l'analisi dei dati di espressione genica. Applicazioni di tecnologia GRID. Caratterizzazione strutturale di motivi funzionali e studi d'interazione tra molecole biologiche. Analisi dell'espressione genica e studio del ruolo funzionale di geni coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare.

Stato dell'arte

Con la proliferazione della massa dei dati biologici, conseguenza del forte sviluppo dell'Information Technology in settori quali DNA Sequencing, DNA Microarray, High throughput screenings assistiamo ad un sempre più aumento del 'gap' tra la generazione dei dati rispetto alla crescita delle conoscenze. La gestione e l'analisi dei dati biologici rappresentano, quindi, dei punti critici di sviluppo nel campo della bioinformatica e biologia computazionale. Alla luce di queste esigenze c'è una chiara esigenza di sviluppare nuovi strumenti bioinformatici per la gestione, integrazione e caratterizzazione funzionale, mediante l'applicazione di nuove tecniche e metodologie di analisi.

Azioni

Attività da svolgere

Sviluppo di una piattaforma computazionale di Bioinformatica per lo studio e l'annotazione funzionale dei dati di Microarray Affymetrix Human Exon Array, applicata alle patologie tumorali. Potenziamento del database UTRdb, mediante l'integrazione dei dati genomici e proteici e del corrispondente database (UTRSite) degli elementi di regolazione. Progettazione e sviluppo di un 'Genome Browser' dei genomi vegetali. Realizzazione di un primo prototipo di Data Federation basato sul Middleware Information Integrator con le banche dati MitoRes, UTRRef, UTRSite e servizi remoti (Entrez) e locali Blast. Sviluppo e aggiornamento della banca dati specializzata p53FamTaG, con l'inserimento dei dati degli organismi modello: Topo, Drosophila e C. Elegans. Sviluppo di servizi poggiati sulla tecnologia GRID: Gene Ontology, programmi d'inferenza filogenetica Mr.Bayes e PAML.

Approcci di Multi Relational Data Mining (MRDM) applicati allo studio di motivi di regolazione conservati in regioni UTRs di trascritti nucleari per il mitocondrio.

Punti critici e azioni da svolgere

Punto critico fortemente condizionante riguarda la mancanza di personale strutturato sia per l'amministrazione che per la ricerca; difficoltà nel pronto utilizzo dei fondi dovuta ad una eccessiva burocratizzazione. Punto cruciale è l'ampliamento ed adeguamento degli spazi.

Competenze, tecnologie e tecniche di indagine

Database Specialist, Software Specialist, Bioinformatici, Biologi molecolari e cellulari con competenze nell'applicazione di moderne tecnologie di analisi sperimentale e bioinformatiche.



Strumentazione

- Risorse strumentali di Bioinformatica
- Risorse software
- Server Ensembl con 13 banche dati genomiche.
- Banche dati pubbliche e specializzate tra le quali EMBL, SWISS-PROT, TREMBL, Refseq, CO, Ensembl, UTRdb, Mitonuc.
- SRS (Sequence Retrieval System),
- Pacchetti e programmi d'analisi (EMBOSS, BLAST, FASTA, PHYLIP, CLUSTALW, HAMMER etc..)
- Risorse hardware
- Server di calcolo Cluster Beowulf composto Nr. 15 SVR Biprocessore Xeon ognuno con 2 GB di RAM e SAN da 2,7 Terabyte
- n 1 COMPAQ AlphaServer DS20e TRU64 UNIX, 3 cpu 667 Mhz, 6Gb RAM, 1 Tb HD;
- Le risorse strumentali di Genomica comprendono strumentazioni di base e strumentazioni avanzate nel campo della ricerca bio-molecolare quali:
- citofluorimetro FACS Calibur Becton Dickinson;
- microscopio a fluorescenza ZEISS;
- Real Time PCR, ABI PRISM® 7900 Sequence Detection System;
- lettore ELISA, Versamax Softmax Pro;
- luminometro TD-20/20, Turner Designs- Promega;
- ChemiDoc, Biorad;
- Sequenziatore ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer
- Sequenziatore ABI PRISM 310 Genetic Analyzer
- Microarray Applied Biosystems 1700

Tecniche di indagine

Nelle problematiche relative alla progettazione, sviluppo e gestione dei dati biologici al fine di facilitare il processo della integrazione tra le diverse banche dati si procederà alla definizione di appropriate ontologie per i dati biologici che definiscono la struttura semantica del dominio informativo. Saranno opportunamente analizzate le tecniche attualmente disponibili per la modellizzazione dei dati. Nell'ambito dello sviluppo degli algoritmi di analisi gli approcci metodologici saranno sostanzialmente diversi a seconda della natura e della tipologia del dato da trattare.

Nell'ambito della biologia molecolare e cellulare nel laboratorio della sede di Bari dell'ITB sono state messe a punto le seguenti metodologie sperimentali: one-hybrid system, EMSA, RT PCR, Western Blot, Luciferase assays, TUNEL, immunostaining, Chromatin immunoprecipitation (ChIp) analisi citofluorimetriche, trasfezioni in cellule di DNA e siRNA. Inoltre sono disponibili le linee cellulari e tutti i vettori reporter e di espressione che sono utili per la realizzazione delle tematiche di ricerca descritte.

Tecnologie

Collaborazioni (partner e committenti)

EMBL (The European Molecular Biology Laboratory) – Heidelberg – Germania
ULB (Université Libre de Bruxelles) – Bruxelles – Belgio
EBI (European Bioinformatics Institute) – Hinxton – UK
SPACI (Southern Partnership for Advanced Computational Infrastructures) - Lecce, Italia
INFN (Istituto Nazionale di Fisica Nucleare) - Bari - Italia
CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique) - Francia
SLU-LCB (Swedish University of Agricultural Sciences Linnaeus Centre for Bioinformatics) - Uppsala - Svezia
CASPUR (Consorzio interuniversitario per le applicazioni di supercalcolo per università e ricerca) - Roma - Italia
CINECA (Consorzio Interuniversitario per il Calcolo Automatico dell'Italia Nord Orientale) - Bologna - Italia
IBM Semea Sud, Java Technology Center, Bari
Dipartimento di Fisiologia e Biochimica Generali Università di Milano
CIRB Biocomputing Group, Università di Bologna
Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Padova
Ospedale "Casa Sollievo della Sofferenza" – IRCCS, San Giovanni Rotondo (FG)
Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Foggia
Facoltà di Scienze Biotecnologiche, Università di Bari
Istituto di Studi sui Sistemi Intelligenti per l'Automazione, CNR-Bari



Iniziativa per l'acquisizione di ulteriori entrate

Partecipazione a progetti di ricerca Internazionali, Nazionali e Regionali.

Finalità

Obiettivi

Sviluppo di metodologie innovative per la gestione e l'analisi massiva di biosequenze che comprendono:
I) sviluppo di banche dati biologiche specializzate;
II) progettazione di una piattaforma integrata per lo sviluppo di un sistema di 'Genome Browser';
III) applicazioni di tecnologia GRID; IV) progettazione e sviluppo di una piattaforma integrata di strumenti bioinformatici per la gestione, integrazione e analisi del profilo dell'espressione genica derivante da dati di microarray; V) Sviluppo di applicazioni bioinformatiche per la ricerca automatizzata di target funzionali in studi di genomica funzionale; VI) Produzione, analisi e gestione di dati di espressione genica per la caratterizzazione funzionale, comparata ed evolutiva di geni e famiglie geniche.

Risultati attesi nell'anno

Le metodologie, i programmi, le banche dati e le piattaforme sviluppate saranno messe a disposizione, mediante servizi Web Server, alla comunità scientifica nazionale e internazionale. Articoli e/o brevetti che descrivono i risultati delle suddette attività.

Potenziale impiego

- per processi produttivi

Con l'avvento dell'era post-genomica, la ricerca biologica va incontro a radicali mutamenti nei metodi e nelle prospettive. Le attività della presente commessa rispondono a questa sempre più emergente esigenza di coniugare competenze specialistiche nei diversi domini delle Life Sciences con una adeguata competenza nell'utilizzo degli strumenti propri della Information Technology.

Dal punto di vista tecnologico, è evidente l'attuale esigenza da parte della comunità scientifica ed industriale del settore di disporre di strumenti utili a formalizzare e gestire, anche in modo intelligente ed automatico e semi-automatico, flussi di lavoro bioinformatici complessi.

La produzione di dati biologici ottenuta grazie all'applicazione di metodologie bioinformatiche e di genomica funzionale e comparata, in particolare riguardanti lo studio dell'attività di espressione di geni di grande interesse per la regolazione del ciclo cellulare, rappresenta un importante risultato sia per l'integrazione delle metodologie sia per la disponibilità dei risultati biologici alla comunità scientifica

- per risposte a bisogni individuali e collettivi

Le competenze e le attività presenti nell'ambito della seguente proposta sono orientate alla gestione dei dati biologici attraverso lo sviluppo di banche dati e strumenti di analisi con particolare riferimento ai dati di Genomica e Trascrittomica. Gli strumenti di analisi e le banche dati sviluppati saranno resi disponibili alla comunità scientifica pubblica e privata mediante piattaforme 'web-based'.

Moduli

Modulo: Bioinformatica per la Genomica Funzionale e Comparata
Istituto esecutore: Istituto di tecnologie biomediche
Luogo di svolgimento attività: Sede di Bari

Modulo: Analisi di famiglie proteiche e predizione strutturale di proteine modello
Istituto esecutore: Istituto di biologia e patologia molecolari
Luogo di svolgimento attività: Sede principale Istituto

Risorse commessa 2008

Pers. tempo ind/det	Funz.+ Invest.	Spese da Fonti Esterne	Spese per Infrastrutt. tecn.-scient a gestione accentrata	Totale	Risorse da esercizi precedenti	Massa Spendibile	Costi figurativi	Spese generali accentrate	Valore Effettivo
1	2	3	4	5=1+2+3+4	6	7=2+3+6	8	9	10=5+6+8+9
227	67	74	53	421	234	375	85	N.D.	740

valori in migliaia di euro



<i>Unità di personale di ruolo*</i>	
ricercatori	Totale
4	4

*equivalente tempo pieno

<i>Unità di personale non di ruolo</i>									
associato	dottorando	borsista	assegnista	specializzando	incaricato di ricerca	professore visitatore	collaboratore professionale	altro	Totale
2	1	0	3	0	1	0	2	0	9

<i>Richiesta nuove unità di personale</i>			
tempo determinato	tempo indet	non di ruolo*	Totale
1	6	0	7

*dottorati, borse di studio, assegni di ricerca



Approccio multidisciplinare per la definizione di networks molecolari regolanti tratti ad eredità mendeliana e multifattoriale

Dati generali

Progetto:	Bioinformatica e biologia computazionale
Tipologia di ricerca:	Progetti relativi a linee tematiche a carattere strategico
Istituto esecutore:	Istituto di genetica e biofisica 'Adriano Buzzati Traverso'
Sede principale svolgimento:	Sede principale Istituto
Dip. di prevista afferenza:	Scienze della Vita
Responsabile indicato:	MARINA CIULLO

Elenco dei partecipanti

	liv.		liv.		liv.
Aliperti Anna Maria	VII	Di Porzio Umberto	I	Moscafiello Francesco	VII
Andone Silvia	V	Esposito Bruno	IV	Navarra Gerardo	VII
Angelini Claudia	III	Filosa Stefania	III	Noviello Ciro	V
Barra Adriano	VI	Floro Flores Patrizia	V	Pellicano' Domenico	VIII
Beato Antonio	IV	Franco Alfredo	VII	Porzio Concetta	VII
Bellopede Annunziata	VII	Franze' Annamaria	III	Ragosta Giuseppe	VII
Carfora Maria Francesca	III	Fusco Ciro	IV	Rallo Claudia	VI
Ciccodicola Alfredo	II	Iaccarino Maria Rosaria	IV	Rocco Rosaria	VII
Ciullo Marina	III	Lauro Pasquale	VII	Russo Alessandra	VII
Cossu Simone	VI	Liguori Giovanna Lucia	III	Sarracino Fabiana	VIII
Cozzuto Luigi	VIII	Maffei Antonella	II	Secondulfo Antonietta	VI
De Falco Antonio	VI	Manna Filomena	V	Sepe Gennaro	VII
De Falco Vincenzo	VII	Marra Stefania	VII	Sicilia Giuseppina	VIII
De Luise Bruno	IV	Miele Elia	VI	Torelli Raimondo	V
Desideri Carmela	IV	Mignoli Emiliana	VII	Vado Luciano	V
Di Giacomo Alfredo	VII				

Temi

Tematiche di ricerca

- 1) Analisi di linkage e di associazione per identificare loci e geni causativi dei fenotipi sotto analisi in popolazioni isolate;
- 2) analisi di database per definire relazioni tra i geni identificati e altri già noti; costruzione di grafi;
- 3) analisi fenotipica di topi mutanti (embrioni ed adulti)

Stato dell'arte

La disponibilità di banche-dati riguardanti: sequenze del DNA di uomo e topo; l'espressione genica di diversi tipi cellulari, di stadi di sviluppo embrionale, di tessuti normali e tumorali; i fenotipi e la variabilità genetica in topi transgenici, popolazioni umane; nonché la disponibilità di softwares sofisticati apre l'opportunità per uno approccio nuovo allo studio di tratti o fenotipi soggetti alla variabilità genetica dell'uomo o topo studiabili anche mediante ipotesi di networks (grafi).

Azioni

Attività da svolgere

Ampliamento del database mediante: 1. raccolta di nuovi tratti fenotipici (audiologia, misura densità ossea, visita oculistica e neurologica) a Campora e Gioi-Cardile;

2. genotipizzazione con 300K SNPs dei campioni di DNA disponibili (2044)

Fine mapping mediante genotipizzazione di specifici SNPs e successivi studi di associazione, del locus associato al BMI/obesità nelle popolazioni di Campora e Gioi, e della regione sul cromosoma 8 associata all'ipertensione a Campora.

Analisi epidemiologica e statistica di altri tratti quantitativi (sistema cardiovascolare) e di tratti qualitativi disponibili nel database

Determinazione dei livelli plasmatici di PIGF e VEGF a Campora e Gioi-Cardile per identificare eventuali associazioni con tratti fenotipici

Analisi della struttura della popolazione di Gioi-Cardile: definizione del numero di fondatori nella e analisi per definire le caratteristiche genealogiche e genetiche di questa popolazione

Sviluppo di metodologie di analisi adatte allo studio di popolazioni isolate



Punti critici e azioni da svolgere

Competenze, tecnologie e tecniche di indagine

Esistono competenze per l'analisi genetica di popolazioni umane (Ciullo) e per l'analisi di fenotipi murini (Liguori) nonché competenze in biologia molecolare acquisite da diversi anni. Recentemente sono state acquisite competenze per la costruzione e amministrazione di data base, l'uso di linguaggi di programmazione informatica e analisi statistica.

Strumentazione

- Server per la conservazione, gestione ed analisi dei dati composto da: 1 processore Intel Xeon 2.3 Ghz 2 Gb di Ram e 3 nodi di calcolo costituiti di 4 Opteron 800 dual core a 2.4 Ghz per un totale di 24 Core totali
- Robot Biomek-FX per la gestione di campioni di DNA in larga scala (diluizioni, preparazione di piastre per reazioni di PCR, genotipizzazione e sequenziamento)
- Real-Time PCR System per la genotipizzazione mediante la metodologia Taqman
- Nanodrop per la determinazione della concentrazione del DNA
- Altre attrezzature per la biologia molecolare
- stabulario

Tecniche di indagine

Tecnologie

Collaborazioni (partner e committenti)

Collaboratori con competenze di informatica, statistica, biologia molecolare, genetica, medicina e management. Sono in corso collaborazioni con istituzioni sanitarie del Mezzogiorno e con i principali centri di genetica e di modello di topo (Edimburgo, Montreal, Helsinki, Leuven, Napoli, Salerno, Ferrara, Roma, Genova), Neuromed (Isernia), TIGEM (Napoli), e DIBIT (Milano)

Iniziativa per l'acquisizione di ulteriori entrate

Richiesta di finanziamento triennale alla Regione Campania per il Progetto sulle popolazioni isolate del Cilento

Finalità

Obiettivi

- i) la costruzione di modelli di networks di geni di suscettibilità per le malattie multifattoriali (tumori, sistema cardiovascolare e nervoso) e i tratti complessi,
- ii) modelli di networks di geni coinvolti in sviluppo embrionale precoce (SEP)

Risultati attesi nell'anno

Pubblicazione dei dati relativi all'analisi sul BMI (Ciullo et al. submitted)

Pubblicazione dei dati sull'analisi dei mutanti murini dei geni cripto, nodal e cerberus (Liguori et al. in preparazione)

Fine mapping della regione del cromosoma 8 associata all'ipertensione a Campora

Potenziale impiego

- per processi produttivi

non si prevedono processi produttivi

- per risposte a bisogni individuali e collettivi

Oltre all'evidente utilità di un check up medico fatta alle popolazioni dei paesi in esame nel Cilento e UFITA, è da evidenziare la possibilità di definire nuovi SNPs causativi di o associati a tratti fenotipici caratteristici di alcune malattie umane da poter in seguito essere considerati in kit diagnostici.



Moduli

Modulo: Approccio multidisciplinare per la definizione di networks molecolari regolanti tratti ad eredità mendeliana e multifattoriale
Istituto esecutore: Istituto per le applicazioni del calcolo 'Mauro Picone'
Luogo di svolgimento attività: Sede di Napoli

Modulo: Approccio multidisciplinare per la definizione di networks molecolari regolanti tratti ad eredità mendeliana e multifattoriale
Istituto esecutore: Istituto di genetica e biofisica 'Adriano Buzzati Traverso'
Luogo di svolgimento attività: Sede principale Istituto

Risorse commessa 2008

Pers. tempo ind/det	Funz.+ Invest.	Spese da Fonti Esterne	Spese per Infrastrutt. tecn.-scient a gestione accentrata	Totale	Risorse da esercizi precedenti	Massa Spendibile	Costi figurativi	Spese generali accentrate	Valore Effettivo
1	2	3	4	5=1+2+3+4	6	7=2+3+6	8	9	10=5+6+8+9
326	9	625	1	961	158	792	182	N.D.	1.301

valori in migliaia di euro

<i>Unità di personale di ruolo*</i>	
ricercatori	Totale
3	3

*equivalente tempo pieno

<i>Unità di personale non di ruolo</i>									
associato	dottorando	borsista	assegnista	specializzando	incaricato di ricerca	professore visitatore	collaboratore professionale	altro	Totale
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

<i>Richiesta nuove unità di personale</i>			
tempo determinato	tempo indet	non di ruolo*	Totale
0	0	0	0

*dottorati, borse di studio, assegni di ricerca



Biodiversità molecolare



Biodiversità molecolare

Dati generali

Progetto: Biodiversità molecolare
Tipologia di ricerca: Progetti relativi a linee tematiche a carattere strategico
Istituto esecutore: Dipartimento Scienze della Vita
Sede principale svolgimento: Sede principale Istituto
Dip. di prevista afferenza: Scienze della Vita
Responsabile indicato: CECILIA SACCONI

Elenco dei partecipanti

Martini Giuseppe	liv. Dire	liv.	liv.
------------------	--------------	------	------

Temi

Tematiche di ricerca

Stato dell'arte

Azioni

Attività da svolgere

Punti critici e azioni da svolgere

Competenze, tecnologie e tecniche di indagine

Strumentazione

- Server per la conservazione, gestione ed analisi dei dati composto da: 1 processore Intel Xeon 2.3 Ghz 2 Gb di Ram e 3 nodi di calcolo costituiti di 4 Opteron 800 dual core a 2.4 Ghz per un totale di 24 Core totali
- Robot Biomek-FX per la gestione di campioni di DNA in larga scala (diluizioni, preparazione di piastre per reazioni di PCR, genotipizzazione e sequenziamento)
- Real-Time PCR System per la genotipizzazione mediante la metodologia Taqman
- Nanodrop per la determinazione della concentrazione del DNA
- Altre attrezzature per la biologia molecolare
- stabulario

Tecniche di indagine

Tecnologie

Collaborazioni (partner e committenti)

Iniziative per l'acquisizione di ulteriori entrate

Richiesta di finanziamento triennale alla Regione Campania per il Progetto sulle popolazione isolate del Cilento

Finalità

Obiettivi

Risultati attesi nell'anno



*Potenziale impiego
- per processi produttivi*

- per risposte a bisogni individuali e collettivi

Moduli

Modulo: Gestione Progetto Interdipartimentale Biodiversità Molecolare
Istituto esecutore: Dipartimento Scienze della Vita
Luogo di svolgimento attività: Sede principale Istituto

Risorse commessa 2008

Pers. tempo ind/det	Funz.+ Invest.	Spese da Fonti Esterne	Spese per Infrastrutt. tecn.-scient a gestione accentrata	Totale	Risorse da esercizi precedenti	Massa Spendibile	Costi figurativi	Spese generali accentrate	Valore Effettivo
1	2	3	4	5=1+2+3+4	6	7=2+3+6	8	9	10=5+6+8+9
19	118	0	0	137	0	118	1	N.D.	138

valori in migliaia di euro

<i>Unità di personale di ruolo*</i>	
ricercatori	Totale
0	0

*equivalente tempo pieno

<i>Richiesta nuove unità di personale</i>			
tempo determinato	tempo indet	non di ruolo*	Totale
0	0	0	0

*dottorati, borse di studio, assegni di ricerca



Progetto per CDS 505
Dipartimento Scienze della Vita



Commessa gestionale per istituti SV

Dati generali

Progetto:	Progetto per CDS 505 Dipartimento Scienze della Vita gestionale
Tipologia di ricerca:	Dipartimento Scienze della Vita
Istituto esecutore:	Sede principale Istituto
Sede principale svolgimento:	Scienze della Vita
Dip. di prevista afferenza:	GIUSEPPE MARTINI
Responsabile indicato:	

Elenco dei partecipanti

Allegria Leda	liv. IV	Mirizzi Maria Rosa	liv. VI	Subania Bruno	liv. VII
Armenise Annarita	VII	Procida Paola	VII	Vaccaro Domenico	VII
Casetti Michele	VIII	Ridolfi Alessandro	IV	Vaccaro Romeo Aldo	VII
De Cresci Patrizia	VII	Riviello Maria Cristina	II	Vetro Rita	V
Mirabelli Angela Maria	V				

Tem

Tematiche di ricerca

Stato dell'arte

Azioni

Attività da svolgere

Punti critici e azioni da svolgere

Competenze, tecnologie e tecniche di indagine

Strumentazione

Tecniche di indagine

Tecnologie

Collaborazioni (partner e committenti)

Iniziative per l'acquisizione di ulteriori entrate

Finalità

Obiettivi

Risultati attesi nell'anno

Potenziale impiego

- per processi produttivi

- per risposte a bisogni individuali e collettivi



Moduli

Modulo:	modulo gestionale-CdS004-SV
Istituto esecutore:	Istituto per le applicazioni del calcolo 'Mauro Picone'
Luogo di svolgimento attività:	Sede principale Istituto
Modulo:	modulo gestionale-CdS007-SV
Istituto esecutore:	Istituto di biochimica delle proteine
Luogo di svolgimento attività:	Sede principale Istituto
Modulo:	modulo gestionale-CdS011-SV
Istituto esecutore:	Istituto di biologia cellulare
Luogo di svolgimento attività:	Sede principale Istituto
Modulo:	modulo gestionale-CdS013-SV
Istituto esecutore:	Istituto di biologia e patologia molecolari
Luogo di svolgimento attività:	Sede principale Istituto
Modulo:	modulo gestionale-CdS014-SV
Istituto esecutore:	Istituto di biomedicina e immunologia molecolare 'Alberto Monroy'
Luogo di svolgimento attività:	Sede principale Istituto
Modulo:	modulo gestionale-CdS015-SV
Istituto esecutore:	Istituto di biomembrane e bioenergetica
Luogo di svolgimento attività:	Sede principale Istituto
Modulo:	modulo gestionale-CdS030-SV
Istituto esecutore:	Istituto per l'endocrinologia e l'oncologia sperimentale 'Gaetano Salvatore'
Luogo di svolgimento attività:	Sede principale Istituto
Modulo:	modulo gestionale-CdS038-SV
Istituto esecutore:	Istituto di genetica delle popolazioni
Luogo di svolgimento attività:	Sede principale Istituto
Modulo:	modulo gestionale-CdS039-SV
Istituto esecutore:	Istituto di genetica e biofisica 'Adriano Buzzati Traverso'
Luogo di svolgimento attività:	Sede principale Istituto
Modulo:	modulo gestionale-CdS040-SV
Istituto esecutore:	Istituto di genetica molecolare
Luogo di svolgimento attività:	Sede principale Istituto
Modulo:	modulo gestionale-CdS059-SV
Istituto esecutore:	Istituto di neurobiologia e medicina molecolare
Luogo di svolgimento attività:	Sede principale Istituto
Modulo:	modulo gestionale-CdS061-SV
Istituto esecutore:	Istituto di neuroscienze
Luogo di svolgimento attività:	Sede principale Istituto
Modulo:	modulo gestionale-CdS078-SV
Istituto esecutore:	Istituto di scienze e tecnologie della cognizione
Luogo di svolgimento attività:	Sede principale Istituto
Modulo:	modulo gestionale-CdS096-SV
Istituto esecutore:	Istituto per lo studio delle macromolecole
Luogo di svolgimento attività:	Sede principale Istituto



Modulo: modulo gestionale-CdS100-SV
Istituto esecutore: Istituto di tecnologie biomediche
Luogo di svolgimento attività: Sede principale Istituto

Risorse commessa 2008

Pers. tempo ind/det	Funz.+ Invest.	Spese da Fonti Esterne	Spese per Infrastrutt. tecn.-scient a gestione accentrata	Totale	Risorse da esercizi precedenti	Massa Spendibile	Costi figurativi	Spese generali accentrate	Valore Effettivo
1	2	3	4	5=1+2+3+4	6	7=2+3+6	8	9	10=5+6+8+9
271	1.646	0	339	2.306	279	1.925	161	N.D.	2.746

valori in migliaia di euro

Unità di personale di ruolo*	
ricercatori	Totale
1	7

*equivalente tempo pieno

Richiesta nuove unità di personale			
tempo determinato	tempo indet	non di ruolo*	Totale
0	0	0	0

*dottorati, borse di studio, assegni di ricerca



Programmazione e coordinamento attivita' del Dipartimento Scienze della Vita

Dati generali

Progetto:	Progetto per CDS 505 Dipartimento Scienze della Vita
Tipologia di ricerca:	Progetti relativi a linee tematiche a carattere strategico
Istituto esecutore:	Dipartimento Scienze della Vita
Sede principale svolgimento:	Sede principale Istituto
Dip. di prevista afferenza:	Scienze della Vita
Responsabile indicato:	GIUSEPPE MARTINI

Elenco dei partecipanti

Angelini Barbara	liv. III	Milelli Maria Luisa	liv. VI	Pizzoli Daniella	liv. V
Cinti Piera	IV	Narni Mancinelli Stefania	VI	Santi Oriana	VII
Jesu Donatella	VI	Nasi Sergio	II	Staempfli Federica	III
Martini Giuseppe	Dire				

Temi

Tematiche di ricerca

La commessa, compatibilmente con le risorse disponibili, fornisce supporto alla direzione di dipartimento per la programmazione e il coordinamento dei progetti di ricerca, produce il sito web del dipartimento e materiale illustrativo delle attivita' e dei prodotti, organizza convegni scientifici e manifestazioni per la valorizzazione dei risultati della ricerca e inoltre offre supporto alle stesse attivita' di ricerca per quanto riguarda relazioni internazionali, protezione della proprieta' intellettuale e trasferimento tecnologico.

Stato dell'arte

Azioni

Attività da svolgere

Punti critici e azioni da svolgere

Competenze, tecnologie e tecniche di indagine

Sono presenti competenze in relazioni internazionali e legislazione brevettuale. Sono in corso di sviluppo le competenze amministrativo-gestionali e contabili.

Strumentazione

Tecniche di indagine

Tecnologie

Collaborazioni (partner e committenti)

Iniziative per l'acquisizione di ulteriori entrate

Finalità

Obiettivi

Risultati attesi nell'anno



*Potenziale impiego
- per processi produttivi*

- per risposte a bisogni individuali e collettivi

Moduli

Modulo: Unità organizzativa di base del Dipartimento Scienze della Vita
Istituto esecutore: Dipartimento Scienze della Vita
Luogo di svolgimento attività: Sede principale Istituto

Modulo: Coordinamento e gestione delle attività internazionali - ENI
Istituto esecutore: Dipartimento Scienze della Vita
Luogo di svolgimento attività: Sede principale Istituto

Risorse commessa 2008

Pers. tempo ind/det	Funz.+ Invest.	Spese da Fonti Esterne	Spese per Infrastrutt. tecn.-scient a gestione accentrata	Totale	Risorse da esercizi precedenti	Massa Spendibile	Costi figurativi	Spese generali accentrate	Valore Effettivo
1	2	3	4	5=1+2+3+4	6	7=2+3+6	8	9	10=5+6+8+9
493	232	32	0	757	123	387	31	N.D.	911

valori in migliaia di euro

<i>Unità di personale di ruolo*</i>	
ricercatori	Totale
2	9

*equivalente tempo pieno

<i>Unità di personale non di ruolo</i>									
associato	dottorando	borsista	assegnista	specializzando	incaricato di ricerca	professore visitatore	collaboratore professionale	altro	Totale
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

<i>Richiesta nuove unità di personale</i>			
tempo determinato	tempo indet	non di ruolo*	Totale
0	0	0	0

*dottorati, borse di studio, assegni di ricerca