

## S.C. Nanobiotecnologie

### Bioinformatica e biologia strutturale in oncologia

*Linea di ricerca:* 2 - Interazioni Tumore-Ospite

*Programma:* c - Studi preclinici per lo sviluppo di test diagnostici e terapie biologiche antitumorali

*Responsabile scientifico:* Domenico Bordo

*Altro personale della struttura partecipante al progetto:* Paola Bisignano

*Anno di inizio:* 2009

*Durata:* 36 mesi

*Parole chiave:* bioinformatica strutturale; biologia strutturale; nanotecnologie; modeling molecolare; cristallografia

*Altre strutture IST partecipanti:* S.S. Mutagenesi Molecolare e Riparazione del DNA (G. Fronza)

*Altri Enti coinvolti:* Dip. di Fisica, Università di Genova (U. Valbusa); Dip. di Medicina Sperimentale, Università di Genova (C. Bottino, C. Cantoni); Istituto G. Gaslini, Genova (L. Varesio); European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, Germany (P. Bork)

*Tipologia progetto:* preclinica

*Area di interesse:* terapeutica/quality of life

*Soggetti cofinanziatori:* Ministero della Salute / Regione Liguria

#### *Background*

Il numero di proteine di cui è stata elucidata la struttura tridimensionale è a tutt'oggi di circa 15.000. Di esse, 4600 sono di mammiferi, e circa 1500 sono umane. Questo dato, unitamente alla aumentata qualità degli strumenti di modellazione e di analisi molecolare rende possibile sia la costruzione "in silico" di modelli tridimensionali affidabili di mutanti di proteine a struttura nota, che la modellazione di proteine di interesse oncologico a struttura non nota, a partire dalla struttura di proteine omologhe la cui struttura tridimensionale è già stata determinata (homology building). Inoltre, il sequenziamento completo di un largo numero di genomi consente spesso di estrapolare informazioni a partire da proteine omologhe già studiate in altri organismi modello (ad es. topo).

Ai metodi di analisi "in silico" sopra descritti si affiancano quelli sperimentali della biocristallografia, già utilizzati dallo scrivente nel corso degli ultimi quindici anni di attività scientifica.

In questo contesto tecnologico si prevedono le seguenti attività:

#### (1) Identificazione di geni coinvolti nell'ipossia (sovraespressi o inibiti).

Lo studio verterà sul confronto dell'espressione genica osservata in tessuti normali ed in linee di neuroblastoma, allo scopo di identificare un sottoinsieme di geni la cui espressione sia associata al fenomeno dell'ipossia in neuroblastoma. Lo studio sarà condotto su una lista di geni (alcune centinaia) identificati dal laboratorio di Biologia Molecolare dell'Istituto Gaslini, e consisterà in un approccio integrato utilizzando sia informazioni di tipo funzionale (systems biology, gene ontology), che strutturale (UniProt, PDB) (Collaborazione con il dott. L. Varesio, IRCCS G. Gaslini – Genova).

#### (2) Analisi delle interazioni proteina-farmaco.

Una recente analisi (Campillos, Kuhn, Gavin, Jensen & Bork, Science, 321, 263-266, 2008) ha evidenziato come gli effetti collaterali osservati in molti dei circa 800 farmaci commercializzati possano essere indicatori di target alternativi per specifiche molecole farmacologiche. L'utilizzo di molecole già preventivamente approvate dalla FDA su nuove patologie, noto anche come repurposing, è di rilevante interesse per le compagnie farmaceutiche. In questo contesto è stata stabilita una collaborazione con il gruppo di Bork formalizzata attraverso un accordo (Secrecy Agreement) a tutela degli interessi di IST ed EMBL. Le attività previste nel contesto di questo progetto sono l'analisi delle interazioni proteina-farmaco in casi specifici indicati dal gruppo dell'EMBL, allo scopo di stabilire, dal punto di vista molecolare, le basi della cross-reattività che stanno alla base degli effetti collaterali (Collaborazione con il dott. P. Bork, Laboratorio Europeo di Biologia Molecolare – Heidelberg).

#### (3) Studi strutturali sul recettore DNAM-1

Uno dei recettori costitutivamente espressi dai linfociti T e coinvolti nell'attivazione della risposta immunitaria è DNAM-1 (DNAX accessori molecole-1). Si tratta di una proteina a singolo segmento transmembrana e costituita, nella parte recettoriale, da due domini IG-like. Allo scopo di ottenere informazioni sui meccanismi molecolari che stanno alla base dell'attivazione dei linfociti T si opererà per determinare la struttura cristallografica delle parte recettoriale di DNAM-1. La proteina è già stata clonata in E. coli, ove è espressa sotto forma di corpi inclusi. Tuttavia, non è ancora stato possibile ottenere la proteina nella sua forma nativa in quantità e concentrazione adeguate. I metodi che si utilizzeranno saranno quelli consueti della cristallografia di proteine. Il primo passo sarà l'ottenimento di cristalli proteici, per procedere in seguito alla raccolta dei dati di diffrazione, che sarà effettuata sia sul generatore di raggi X operante presso l'istituto, che presso uno dei sincrotroni europei (Collaborazione con proff. C. Cantoni e C. Bottino, Università di Genova).

## Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

### (4) Analisi su mutanti di p53 e p63

Studio della correlazione struttura – funzione di mutanti di p53 e di p63, associati rispettivamente a predisposizione tumorale (sindrome di Li-Fraumeni) e a displasie ectodermiche (EEC, ADULT). Si utilizzeranno metodi di homology modeling basati sulla complesso p53-DNA di cui è stata recentemente elucidata la struttura tridimensionale, allo scopo di analizzare l'influenza di mutanti puntiformi sulla stabilità del complesso quaternario. I risultati saranno confrontati con le analisi in vitro condotte dalla S.S. Mutagenesi Molecolare dell'Istituto (Collaborazione con dott. G. Fronza e dott. A. Inga).

### (5) Effetto della presenza di nanotubi di carbonio trattati sulla crescita e sulla morfologia di colture cellulari.

Immagini di colture cellulari esposte a concentrazioni crescenti di nanotubi, soggetti preventivamente a distinti precondizionamenti, saranno acquisite in formato elettronico ed analizzate con procedure di pattern recognition, allo scopo di descrivere la morfologia della rete con un numero discreto di parametri rappresentativi. Lo scopo dell'analisi sarà quello di determinare il tipo e l'entità dell'influenza dei nanotubi sulla morfologia e sulla crescita di colture cellulari in vitro (Collaborazione con il prof. U. Valbusa – Università di Genova).

### *Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari*

#### (1) Identificazione di geni coinvolti nell'ipossia (sovraespressi o inibiti).

Identificazione di una serie di biomarkers che abbiano valore prognostico/diagnostico nel neuroblastoma.

#### (2) Analisi delle interazioni proteina-farmaco.

Analisi delle interazioni molecolari proteina-farmaco nei casi in cui esse siano state determinate ed depositate nella banca dati PDB. Si focalizzerà lo studio sui target preventivamente individuati dal gruppo del Laboratorio Europeo di Biologia Molecolare.

#### (3) Studi strutturali sul recettore DNAM-1

Determinazione della struttura cristallografica della parte recettoriale di DNAM-1, ed identificazione dei siti putativamente coinvolti nel legame con i ligandi a tutt'oggi noti (Nectina 2 e PRV).

#### (4) Analisi su mutanti di p53 e p63.

Identificazione di correlazioni tra mutanti di p53 e p63, stabilità dal punto di vista termodinamico del complesso p53/p63 – DNA, e fenotipo, quest'ultimo identificato dal gruppo del laboratorio di Mutagenesi Molecolare dell'IST.

#### (5) Effetto della presenza di nanotubi di carbonio trattati sulla crescita e sulla morfologia di colture cellulari.

Determinazione quantitativa dell'influenza della presenza di nanotubi, pre-trattati chimicamente con agenti distinti, sulla crescita e sulla morfologia di colture ottenute da linee cellulari. Quantificazione della tossicità dei nanotubi in relazione al trattamento subito dagli stessi

### *Impatto assistenziale certo o potenziale*

Tutte le linee di ricerca sopra delineate hanno carattere preclinico e trasversale. Ciascuna di esse ha una potenziale rilevanza a livello clinico in presenza di risultati scientifici significativi.

### *Risultati e prodotti 2009*

In relazione al conseguimento degli obiettivi di progetto di RC 2009-2011, si specifica quanto segue:

#### (1) Identificazione di geni coinvolti nell'ipossia (sovraespressi o inibiti).

Il laboratorio di Biologia Molecolare del Gaslini ha fornito una lista di geni differenzialmente espressi in linee cellulari di neuroblastoma in condizioni normossiche e ipossiche. Sono stati anche individuati, associati alle stesse condizioni sperimentali, alcuni miRNA. Nell'ipotesi di una correlazione tra un ridotto livello di espressione genica ed una incrementata presenza di miRNA, sono stati sviluppati appropriati strumenti di analisi informatiche sulle banche dati genomiche. Le analisi sono tutt'ora in corso.

#### (2) Analisi delle interazioni proteina-farmaco.

E' in fase di sviluppo una serie di programmi e scripts PERL allo scopo di confrontare siti di legame di specifiche molecole di interesse farmacologico su target proteici, nei casi in cui la struttura tridimensionale del complesso proteina-piccola molecola sia nota. Il lavoro è svolto in coordinamento con il gruppo di Heidelberg che sviluppa in parallelo altri aspetti non strutturali.

#### (3) Studi strutturali sul recettore DNAM-1.

I tentativi di purificazione della proteina ad un livello di purezza necessario per intraprendere esperimenti di cristallizzazione non hanno ancora avuto successo, presumibilmente a causa della propensione della proteina stessa a formare aggregati.

#### (4) Analisi su mutanti p53 e p63.

E' stato costruito un modello tridimensionale di p63 a partire dall'omologo p53. In tale modello sono state mappate le mutazioni osservate sperimentalmente dal gruppo di Mutagenesi Molecolare dell'Istituto. E' stata anche simulata l'acetilazione del residuo Lys120 di p53, il cui fenotipo è al momento oggetto di intensa investigazione da parte della stessa equipe. Le conseguenti alterazioni strutturali sembrano correlare con alcune delle caratteristiche fenotipiche individuate.

#### (5) Effetto di nanotubi di carbonio sulla crescita e sulla morfologia di colture cellulari.

E' ancora in fase di messa a punto, da parte del personale del gruppo del prof. Valbusa, del set up sperimentale che consenta di campionare con acquisizione fotografica la crescita di linee cellulari HUVEC.

## Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

### *Pubblicazioni*

Bocciardi R.-Bordo D.-Di Duca M.-Di Rocco M.-Ravazzolo R.  
Mutational analysis of the ACVR1 gene in Italian patients affected with fibrodysplasia ossificans progressiva: confirmations and advancements.  
Eur. J. Hum. Genet. 17: 311-318, 2009

Mukhopadhyay R.-Bisacchi D.-Zhou Y.-Armirotti A.-Bordo D.  
Structural Characterization of the As/Sb Reductase LmACR2 from Leishmania major.  
J. Mol. Biol. 386: 1229-1239, 2009

### *Attività previste e risultati attesi nel 2010*

Nel dettaglio dei vari obiettivi secondari, nel corso del corrente anno si prevede:

(1) Geni associati all'ipossia.

Identificazione di un gruppo di geni significativamente associati ai fenomeni ipossici, da utilizzare quali marcatori su linee cellulari di neuroblastoma, nella prospettiva di formulare in futuro un set di geni con valenza prognostica su biopsie provenienti da pazienti affetti da neuroblastoma.

(2) Interazione proteina-farmaco.

Si prevede di ultimare la stesura dei programmi software e passare, nella seconda parte del 2010 alla raccolta ed all'analisi di risultati. Tali analisi saranno in un primo tempo di tipo top-down, cioè scansioni su tutta la banca dati di farmaci DrugBank. Successivamente si effettueranno studi su molecole specifiche, in collaborazione con ricercatori sperimentali e clinici quali: dr. Seri – Univ. di Bologna, dr. Roncella - ASL La Spezia; dr. Grossi - IST, prof. Ravazzolo - Osp. Gaslini).

(3) Determinazione della struttura cristallografica di DNAM-1.

Si procederà ad ulteriori tentativi di purificazione di DNAM-1, utilizzando varianti dei protocolli sin qui utilizzati.

(4) Mutanti di p53 e p63.

Saranno costruiti tutti i modelli tridimensionali delle varianti geniche delle due proteine sin qui identificate sperimentalmente, e si condurranno simulazioni molecolari al fine di fornire una chiave di lettura in termini strutturali e meccanicisti dei fenotipi osservati in vitro dal gruppo di Mutagenesi Molecolare. Ove appropriato, si includerà il DNA e si costituirà un complesso quaternario del tetramero p53/p63 – DNA.

(5) Si procederà alla messa a punto di un sistema di analisi della conformazione del reticolo in diverse fasi della crescita ed a diverse concentrazioni di nanotubi, sia pristini che trattati. L'identificazione di una correlazione tra concentrazione di nanotubi e caratteristiche morfologiche della conformazione reticolare sarà il maggiore obiettivo nel corso del presente anno.

### **Nuove classi di nanoparticelle per il delivery intelligente di agenti diagnostici e terapeutici in oncologia**

*Linea di ricerca:* 2 - Interazioni Tumore-Ospite

*Programma:* c - Studi preclinici per lo sviluppo di test diagnostici e terapie biologiche antitumorali

*Responsabile scientifico:* Camillo Rosano

*Anno di inizio:* 2009

*Durata:* 36 mesi

*Parole chiave:* drug delivery; dendrimeri; macrocicli; polimeri; nanotecnologie

*Altre strutture IST partecipanti:* S.C. Trasferimento Genico (R. Favoni); S.C. Terapia Immunologica (M. Fabbi)

*Altri Enti coinvolti:* Dipartimento di Chimica Organica, Università di Messina (F.H. Kohnke); Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università di Genova (S. Cafaggi); Dipartimento di Fisica, Università di Genova (U. Valbusa); Istituto G. Gaslini, Genova (M. Ponzoni); Dipartimento Farmaco-Biologico, Università della Calabria (M. Maggiolini); Polish Academy of Sciences, Lodz, PL (C. Cierniewski); Imperial College, University of London, UK (A. Miller)

*Tipologia progetto:* preclinica

*Area di interesse:* terapeutica/quality of life

### *Background*

L'applicazione medica delle nanotecnologie viene spesso definita come una disciplina propria: la nanomedicina. Questa nuova disciplina si occupa di tutte quelle conoscenze e quelle tecnologie che abbiano un utilizzo in medicina e che abbiano dimensione dell'ordine di grandezza dei nanometri (1 nanometro=1 miliardesimo di metro=1 milionesimo di millimetro). Lavorando a tali dimensioni la nanotecnologia altera la tradizionale distinzione tra biologia, chimica e fisica facendo della nanomedicina una disciplina ad elevato grado di multidisciplinarietà. Gli studi attualmente in corso in nanomedicina vanno dall'uso medico di materiali nanostrutturati, alla formulazione di nuovi sistemi per la

## Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

somministrazione dei farmaci (è già in sperimentazione clinica il delivery di farmaci altamente tossici quale la doxorubicina attraverso i liposomi), ai nanobiosensori, al possibile utilizzo futuro della nanotecnologia molecolare. Un altro attivo campo di ricerca sono le interfacce neuro-elettroniche. La nanomedicina può costituire un nuovo metodo di applicazione delle molecole scoperte con la genomica e con la proteomica. Infatti tramite opportune nanoparticelle (vettori) è possibile "traghetare" all'interno del corpo umano quelle molecole, ioni o agenti di contrasto ad oggi non utilizzate perché altamente tossiche, idrofobiche o di sfavorevole farmacocinetica e che, per queste caratteristiche negative, vengono attualmente scartate dall'impiego in clinica. Le nanoparticelle possono essere "guidate" verso le cellule tumorali mediante due diverse tipologie di trasporto: il "delivery attivo" ed il "delivery passivo". Nel delivery attivo alle nanoparticelle "vettori" verranno opportunamente coniugati in superficie degli anticorpi diretti verso antigeni specifici delle cellule che si intende bersagliare. Il delivery passivo sfrutta invece l'effetto EPR (Enhanced Permeability and Retention): Contrariamente all'endotelio normale, quello tumorale presenta ampie "finestrature" le cui dimensioni superano i 100 nm. Nanoparticelle di queste dimensioni quindi sono in grado di extravasare nell'endotelio tumorale mentre vengono trattenute in circolo dall'endotelio normale, in questo modo i farmaci trasportati nelle nanocapsule si accumulano solo nella zona colpita dal tumore.

Attualmente un importante problema della nanomedicina riguarda la comprensione della tossicità e dell'impatto ambientale dei nanomateriali. E' da segnalare come la nanomedicina costituisca una grande industria, il cui fatturato è arrivato a 6,8 miliardi di dollari nel 2004, con oltre 200 compagnie e 38 prodotti già presenti nel mondo. Inoltre ogni anno si investono in questo settore circa 4 miliardi di Euro per lo sviluppo e la ricerca. In considerazione della crescita dell'industria della nanotecnologia, è ragionevole aspettarsi un impatto significativo anche nell'economia.

La S.C. Nanobiotecnologie prevede di indirizzare parte della sua attività istituzionale nel settore del "drug delivery"; il presente progetto di ricerca è focalizzato sullo studio e la sintesi di nuovi vettori di dimensioni nanometriche per il trasporto di ioni e agenti di contrasto da utilizzare in diagnostica e di piccole molecole ed altri farmaci, anche "non-classici" (siRNA, peptidi, PNAs etc), da utilizzare per la terapia del cancro. In particolare contiamo di sviluppare, in collaborazione con il Dipartimento di Chimica Organica, Università di Messina (Prof. Franz Heinrich Kohnke) nuove nanoparticelle basate su macrocicli e dendrimeri (molecole altamente ramificate caratterizzate per la loro perfetta simmetria) che possano fungere da vettori per il trasporto attivo (a seguito di funzionalizzazione con anticorpo specifico per il tumore considerato) e/o passivo (sfruttando l'effetto "EPR") diretto verso le cellule tumorali di farmaci. Inizialmente il nostro interesse sarà diretto verso studi di tossicità dei nuovi vettori, successivamente prevediamo di incapsulare farmaci già esistenti ed oggi poco utilizzati per le loro caratteristiche sfavorevoli (elevata idrofobicità o tossicità, farmacocinetica sfavorevole etc.) all'interno delle nostre nanoparticelle, infine utilizzeremo questi vettori per il trasporto di farmaci da noi progettati, siano essi piccole molecole o farmaci non classici. Un'ulteriore collaborazione, con il Dr. Mirco Ponzoni (Istituto Giannina Gaslini di Genova) riguarda il campo di ricerca sui liposomi e lo studio di nuovi materiali (Idrogel) per il rilascio locale controllato di farmaci a seguito della rimozione di tumori tramite operazioni chirurgiche.

### *Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari*

L'obiettivo primario del presente progetto è quello di progettare, sintetizzare e rendere disponibile un complesso nanovettore-farmaco (o nanovettore-agente di contrasto) debitamente funzionalizzato (o delle dimensioni idonee per sfruttare l'effetto EPR), pronto per l'utilizzo nella diagnosi e/o nella terapia del cancro. Obiettivi secondari saranno considerati:

1. Lo studio preliminare di tossicità delle nanoparticelle utilizzate come vettori, sia in vitro che in vivo
2. La progettazione e la sintesi di macrocicli e/o dendrimeri (sia in forma monomeriche che polimerica)
3. La stesura di protocolli per la realizzazione di vettori nanometrici (liposomi, macrocicli e dendrimeri)
4. La modifica strutturale di farmaci esistenti in modo da renderli incorporabili negli idrogel e nei liposomi. Qualora necessario, provvederemo anche alla bioconiugazione del farmaco con l'idrogel
5. L'incorporazione di nuovi agenti terapeutici in liposomi "stealth" già in uso in clinica
6. L'identificazione del migliore sistema di delivery per ciascun tumore che verrà considerato

### *Impatto assistenziale certo o potenziale*

La possibilità di incorporare composti antitumorali in vettori di dimensioni nanometriche consentirà di agire in maniera selettiva solo sulle cellule malate, risparmiando di colpire con elevati livelli di tossicità le cellule sane. Questo progresso porterà ad una più efficace terapia del cancro e risulterà di enorme beneficio per il paziente cui verranno risparmiati molti effetti collaterali tipici delle attuali chemioterapie. Il poter trasportare gli agenti di contrasto direttamente sul tumore, in maniera analoga, consentirà una definizione migliore dei margini tumorali nella diagnostica. La possibilità teorica di raggiungere e rendere "visibili" anche solo poche decine di cellule malate, renderà possibili diagnosi sempre più precoci aumentando le aspettative di vita dei malati oncologici.

### *Risultati e prodotti 2009*

Il presente progetto prevede lo studio, la progettazione e la sintesi di una nuova classe di vettori di scala nanometrica da utilizzare per il trasporto di farmaci e/o di agenti diagnostici direttamente sulle cellule tumorali. I nanovettori da noi considerati sono polimeri appartenenti alla classe dei macrocicli e dendrimeri che si sono già dimostrati eccellenti come recettori per anioni in altri settori di ricerca. Ad oggi abbiamo provveduto alla progettazione di alcuni nanovettori quattro dei quali sono stati sintetizzati presso l'Università di Messina. Successivamente alla loro sintesi, abbiamo svolto test di tossicità "in vitro" su questi composti ed i risultati promettenti raggiunti ci spingono a provare la loro coniugazione con farmaci già disponibili sul mercato (attualmente, grazie alla sua relativa semplicità di struttura, stiamo provando la coniugazione di due macrocicli con il 5-Fluorouracile). Ad oggi quindi possiamo ritenere parzialmente perseguiti i primi tre obiettivi secondari che ci eravamo proposti nella stesura del progetto.

Nei mesi di avvio di questo nuovo filone di ricerca abbiamo inoltre provveduto ad instaurare una nuova rete di collaborazioni che si è concretizzata nel "Large Scale Integrated Project" Nanocancer, presentato ed in corso di valutazione presso la Commissione Europea nell'ambito del VII programma quadro, progetto nel quale l'IST è presente nel management con il Dr. Camillo Rosano (Comitato Scientifico) e il Dr. Claudio Lombardo (Vice-coordinatore).

## Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

Nanocancer è un progetto ambizioso che raggruppa i migliori Centri di ricerca sulle nanotecnologie d'Europa e vede la partecipazione, fra le altre, di industrie quali General Electric, Roche, Sanofi-Aventis ed altre.

### *Attività previste e risultati attesi nel 2010*

Nel 2010 prevediamo di completare la sintesi di altri composti macrociclici da utilizzare come nanovettori di farmaci/agenti diagnostici e di iniziare la progettazione e successiva sintesi di una prima classe di dendrimeri. Completeremo inoltre i test di tossicità in vitro iniziati durante lo scorso anno e concluderemo, con le molecole identificate come non tossiche, alcuni farmaci comunemente utilizzati in oncologia per valutarne l'efficacia quando incapsulati nei nostri vettori.

### **Produzione di tassolo, identificazione di nuove molecole biologiche con attività simile al tassolo e sviluppo di nuove strategie per indirizzare i farmaci verso le cellule tumorali**

*Linea di ricerca:* 2 - Interazioni Tumore-Ospite

*Programma:* c - Studi preclinici per lo sviluppo di test diagnostici e terapie biologiche antitumorali

*Responsabile scientifico:* Camillo Rosano

*Anno di inizio:* 2009

*Durata:* 36 mesi

*Parole chiave:* tassolo; microtubuli; tubulina; drug design; bioinformatica

*Altre strutture IST partecipanti:* S.C. Anatomia e Citoistologia Patologica (P. Romano, L. Ottaggio)

*Altri Enti coinvolti:* Dip. di Scienze Farmaceutiche, Università di Genova (M. Miele); Istituto per la Floricoltura di Sanremo (A. Allavena, A. Giovannini); Arkansas University, USA (A. Lorence)

*Tipologia progetto:* preclinica

*Area di interesse:* terapeutica/quality of life

*Soggetti cofinanziatori:* Compagnia di San Paolo

### *Background*

Il Tassolo, molecola naturale scoperta nel 1967 nella corteccia del Tasso del Pacifico (*Taxus brevifolia*), risulta essere in grado di inibire la mitosi cellulare bloccando il processo di depolimerizzazione della tubulina. Commercializzato con il nome di paclitaxel, il Tassolo è un farmaco antineoplastico impiegato nel trattamento di numerose patologie tumorali, quali il carcinoma ovarico e della mammella, il melanoma ed il tumore al colon. Fin da quando il Tassolo venne approvato come farmaco antitumorale dalla FDA nel 1992, esistono problemi di disponibilità di tale composto. Nonostante i numerosi tentativi per rendere il prodotto disponibile su larga scala, la produzione di Tassolo non sembra soddisfare le richieste cliniche, rimanendo inaccessibile a molti pazienti a causa del costo elevato. La maggior parte del Tassolo utilizzato in terapia viene ottenuto per semisintesi, a partire da un precursore biologico (10-deacetylbaconina III) ottenuto con buona resa dalle foglie di *T. baccata*. Il metodo per la semisintesi del Tassolo viene utilizzato anche per la produzione del Tassotere, un composto di sintesi utilizzato in alternativa al Tassolo. Sebbene il Tassolo sia sempre stato considerato un prodotto peculiare del metabolismo del tasso, recentemente è stato messo a punto dal nostro gruppo di ricerca, un sistema per la produzione di Tassolo e tassani da colture cellulari di specie diverse. Le piante considerate sono largamente diffuse nel nostro Paese e possiedono una velocità di crescita, sia in vitro che in vivo, superiore al tasso. Quindi piante a maggiore diffusione e più facilmente coltivabili in vitro rispetto al tasso potrebbero diventare nuove fonti commerciali di Tassolo e/o tassani da utilizzare come nuovi agenti terapeutici o nuovi precursori per la semisintesi del Tassolo e Tassotere. Il presente progetto si propone principalmente di individuare nuove specie vegetali per la produzione di Tassolo e di tassani. I metaboliti secondari estratti dai tessuti differenziati vegetali saranno caratterizzati mediante indagine spettrometrica ed immunologica. Dagli stessi tessuti, attraverso la coltura in vitro, verranno selezionate linee cellulari in grado di produrre una maggiore quantità di Tassolo e tassani. In particolare, questa parte della ricerca permetterà di sviluppare il brevetto depositato dal gruppo proponente relativo alla definizione di un nuovo metodo per la produzione di Tassolo e tassani da colture cellulari di *Corylus avellana*. Le molecole tassaniche prodotte in maggiore quantità dalle nostre colture cellulari saranno sottoposte a test biologici per individuare analoghi con attività farmacologica simile al Tassolo. In parallelo saranno condotte simulazioni di "docking" e di dinamica molecolare al computer (structure-based drug design) al fine di identificare quegli analoghi che, in silico, dimostrano affinità migliori ai target d'elezione. Esperienze di questo tipo ci consentiranno di modificare chimicamente le molecole identificate al fine di ottimizzarne le caratteristiche farmacologiche (affinità, solubilità, farmacocinetica etc.).

Infine, verranno sintetizzati aptameri per l'antigene tumorale specifico per la prostata (PSMA) e quindi coniugati con Tassolo ed altri eventuali tassani farmacologicamente attivi. Sarà anche presa in considerazione la possibilità di trasportare il Tassolo all'interno delle cellule bersaglio tramite nanoparticelle legate agli aptameri. In termini generici le nanoparticelle terapeutiche (50-200 nanometri) sono veicoli disegnati per il trasporto che possono incapsulare farmaci e rilasciarli in modo predeterminato e regolato che può variare da un rilascio simultaneo ad un lento rilascio fino ad un periodo di diversi anni. Usando il cancro della prostata come modello tumorale è stato sviluppato un sistema di rilascio del farmaco molto specifico ed efficiente: una volta legato alle cellule del tumore prostatico i bioconiugati

## Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

aptamero/nanoparticella vengono internalizzate rendendo possibile il rilascio della molecola citotossica direttamente all'interno della cellula tumorale. Questo approccio rende possibile una terapia precisa che è più efficace e più sicura di quella utilizzata finora.

### *Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari*

1. Quantificare i singoli tassani contenuti nei tessuti differenziati e nelle colture di cellule indifferenziate delle specie vegetali individuate,
2. selezionare linee cellulari con elevata velocità di crescita e stabilità di produzione,
3. isolare e caratterizzare nuove molecole con meccanismo d'azione simile al Tassolo ed identificare nuovi precursori per la semisintesi del Tassolo e Tassotere,
4. individuare nuovi tassani biologicamente attivi su cellule resistenti al Tassolo,
5. disegnare e sintetizzare analoghi del Tassolo sulla base dell'analisi cristallografica dei complessi target-inibitore,
6. valutare l'attività antimitotica, citotossica e proapoptotica dei composti isolati, su cellule in vitro,
7. valutare la tossicità in vitro/in vivo delle nanoparticelle singole o contenenti tassani, coniugate con aptameri e determinare la DL50,
8. determinare il ciclo di vita del bioconiugato in vivo in animali tumor-free e tumor-bearing tramite monitoraggio MRI,
9. sintetizzare aptameri specifici per PSMA e coniugarli con nanoparticelle contenenti Tassolo e/o tassani e valutare l'attività antitumorale dei coniugati su cellule di carcinoma prostatico,
10. raccogliere ed analizzare con metodi bioinformatici i dati relativi ai diversi organismi procarioti ed eucarioti produttori di tassolo al fine di definire l'evoluzione molecolare dei geni che codificano per gli enzimi-chiave della biosintesi dei tassani.

### *Impatto assistenziale certo o potenziale*

L'iniziativa è rivolta alla preparazione di sostanze che risolverebbero patologie a rilevante impatto sociale quali le malattie tumorali. La possibilità di ottenere tassani in quantità rilevanti e a basso costo e risulterà di enorme beneficio per i pazienti affetti da patologie tumorali i quali avranno un accesso facilitato a questo tipo di farmaco. Il poter incorporare i tassani in vettori nanometrici per un trasporto intelligente risulterà in un sistema di rilascio del farmaco molto specifico ed efficiente e costituirà un valore aggiunto al progetto.

### *Risultati e prodotti 2009*

Gli estratti metanolici ottenuti dalla macerazione di foglie, semi e gusci di *C. avellana* e di una nuova specie sono stati purificati ed analizzati mediante ELISA e HPLC-MS. Al fine di identificare un metodo di analisi specifico per le specie vegetali prese in considerazione nella presente ricerca, gli estratti metanolici sono stati purificati con metodi differenti. La metodica ELISA è stata effettuata mediante l'uso di un apposito kit, specifico per l'identificazione dei tassani (Kit Anti-Taxane Immunoassay, Hawaii Biotech, Inc.) e caratterizzato da un anticorpo di tipo policlonale in grado di reagire con le diverse molecole tassaniche. La sensibilità del kit permette di rivelare concentrazioni di tassani comprese tra 0,5 e 90 ng/ml. Nonostante la metodica ELISA non permetta di identificare né quantificare i singoli tassani, viene generalmente impiegato per rilevare la presenza di tassani in diversi liquidi biologici. La caratterizzazione successiva dei singoli tassani mediante HPLC-MS ha evidenziato la presenza di diversi tassani sia in nei tessuti differenziati di nocciolo che dell'altra specie presa in considerazione. Gli estratti metanolici di *C. avellana* contenevano prevalentemente paclitaxel, baccatina III e 10-deacetilbaccatina III. La nuova specie sembra contenere baccatina III e 10 deacetilbaccatina III come principali tassani. Sono attualmente in corso analisi per una valutazione quantitativa della produzione dei singoli tassani in prodotti di scarto dell'industria alimentare (es. gusci di nocciole) per verificare la possibilità di impiegare tali prodotti di rifiuto come fonte di 10 deacetilbaccatina III o di altri nuovi tassani da impiegare nella semisintesi del Tassolo.

Nel corso del 2009 ci siamo inoltre concentrati sugli aspetti biocomputazionali del progetto. Sfruttando le informazioni derivanti dalla conoscenza della struttura atomica dell'eterodimero della tubulina a disposizione presso il Protein Data Bank (PDB), abbiamo svolto numerose simulazioni di docking molecolare identificando nuovi composti capaci di legare la tubulina e di impedirne la polimerizzazione ed identificando un potenziale nuovo sito di legame sulla molecola. Alcuni di questi composti sono stati validati in vitro; stiamo attivando dei contatti con il Dr. Raimond Ravelli (Istituto di Biologia Strutturale c/o ESRF Grenoble - F) al fine di poter cocristallizzare queste nostre molecole con la tubulina e identificare sperimentalmente i modi di legame tra proteina e piccole molecole.

### *Attività previste e risultati attesi nel 2010*

I metaboliti secondari estratti dai tessuti differenziati vegetali saranno caratterizzati mediante indagine spettrometrica ed immunologica. Dagli stessi tessuti, attraverso la coltura in vitro, verranno selezionate linee cellulari in grado di produrre una maggiore quantità di Tassolo e tassani. In particolare, questa parte della ricerca permetterà di sviluppare il brevetto depositato dal gruppo proponente relativo alla definizione di un nuovo metodo per la produzione di Tassolo e tassani da colture cellulari di *Corylus avellana*. Le molecole tassaniche prodotte in maggiore quantità dalle nostre colture cellulari saranno sottoposte a test biologici per individuare analoghi con attività farmacologica simile al Tassolo. In parallelo saranno condotte simulazioni di "docking" e di dinamica molecolare al computer (structure-based drug design) al fine di identificare quegli analoghi che, in silico, dimostrano affinità migliori ai target d'elezione. I candidati che in silico si dimostreranno promettenti, verranno presi in considerazione per una eventuale sintesi chimica e successive prove in vitro.

Durante il prossimo anno di attività, prevediamo di conseguire i seguenti risultati:

- Caratterizzazione chimica di specie vegetali che producono Tassolo e/o tassani;
- Identificazione dei tassani peculiari delle specie vegetali selezionate;
- Selezione di colture cellulari in grado di produrre Tassolo e/o tassani;
- Disegno razionale di molecole con attività simile a quella del tassolo.

## Studi strutturali e modellazione molecolare di oncoproteine e disegno razionale di farmaci

*Linea di ricerca:* 2 - Interazioni Tumore-Ospite

*Programma:* c - Studi preclinici per lo sviluppo di test diagnostici e terapie biologiche antitumorali

*Responsabile scientifico:* Camillo Rosano

*Anno di inizio:* 2009

*Durata:* 36 mesi

*Parole chiave:* struttura proteine; modelling; structure based drug design; biocristallografia; bioinformatica; diffrazione di raggi X

*Altre strutture IST partecipanti:* S.S. Biopolimeri e Proteomica (M. Rocco); S.C. Terapia Immunologica (S. Ferrini)

*Altri Enti coinvolti:* Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università di Pavia (L.A. Stivala, C. Scotti); DISCAFF, Facoltà di Farmacia, Università del Piemonte Orientale (F. Condorelli); Dipartimento di Scienze Biomolecolari, Università di Urbino (M. Magnani), Dipartimento di Ingegneria Elettronica, Laboratorio di Visione Artificiale, Università di Pavia (Ing. M. Piastra); Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università di Genova (A. Spallarossa); Istituto G. Gaslini, Genova (M. Filocamo); Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche, Università di Udine (A. Corazza); Dipartimento Farmaco-Biologico, Università della Calabria (M. Maggiolini); Max-Planck Institute Tuebingen, D, (K. Zeth); Polish Academy of Sciences, Lodz, PL (C. Cierniewski, E. Stec); MRC, University of Cambridge, UK (E. Gherardi)

*Tipologia progetto:* preclinica

*Area di interesse:* descrittiva a fini conoscitivi

### *Background*

In questi ultimi anni, anche grazie al progetto genoma, sono stati identificati numerosi geni responsabili di malattie genetiche e/o associati alla trasformazione neoplastica. La caratterizzazione strutturale dei prodotti genici corrispondenti, rappresenta l'ovvia fase scientifica successiva. In questo contesto, la biologia strutturale è una delle discipline più informative unendo studi computazionali e tecnologie di analisi "a bassa risoluzione" a studi ad alta risoluzione che possono rivelare dettagli a livello atomico delle macromolecole biologiche. Una tale precisione è necessaria al fine di apprendere processi fondamentali quali la traduzione del segnale, l'attivazione di un cammino metabolico, l'azione di un inibitore o le conseguenze di una mutazione sul funzionamento di un enzima. La biologia strutturale è altresì cruciale per la caratterizzazione molecolare di molte malattie tra cui il cancro ed è in grado di offrire una base di partenza per lo studio di terapie mirate quali il disegno razionale di farmaci. Nell'ambito dell'attività proposta saranno studiate e caratterizzate diverse proteine (e loro mutanti patogeni) utilizzando tecniche quali la diffrazione di raggi X da cristalli proteici, la risonanza magnetica nucleare (NMR), lo scattering di raggi X a basso angolo, le diverse tecniche di microscopia elettronica (TEM, SEM, cryoEM etc.), il dynamic light scattering ed il modelling molecolare. Le informazioni strutturali ottenute potranno consentire, in alcuni casi, il disegno razionale di inibitori ed una prima validazione e caratterizzazione di queste molecole utilizzando lo screening virtuale "in silico" tramite simulazioni di docking e di dinamica molecolare. Infine sarà possibile identificare alcuni meccanismi molecolari alla base dell'insorgenza di stati patogeni e procedere ad una loro più dettagliata caratterizzazione.

### *Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari*

Il presente progetto di ricerca ha come obiettivo primario lo studio e la determinazione delle strutture tridimensionali di alcune oncoproteine ed enzimi mediante analisi dei dati di diffrazione di raggi X da cristalli e mediante modelling molecolare, al fine di rendere possibile un disegno razionale di inibitori con elevato grado di specificità e selettività.

Obiettivi secondari del progetto saranno:

1. la determinazione dei meccanismi molecolari alla base dell'insorgenza di alcune patologie
2. la stesura di protocolli per il cloning, l'espressione e la purificazione di proteine coinvolte in processi patogeni
3. il disegno razionale di piccole molecole (lead compounds) che potranno dimostrare una potenziale capacità di interazione con i targets di interesse oncologico e che, in un prossimo futuro, potrebbero essere ottimizzati per un eventuale uso farmacologico
4. lo studio conoscitivo dei meccanismi di attivazione di proteine e complessi proteici (ad esempio le integrine) che sarà possibile grazie all'integrazione di studi strutturali ad alta e bassa risoluzione con i dati di proteomica e di modellistica molecolare
5. lo studio strutturale di proteine tirosine chinasi
6. lo studio strutturale del complesso HK:VDAC1
7. lo studio strutturale di proteine coinvolte in processi oncogenici.
8. la realizzazione di software dedicato per il "de novo" design di farmaci

### *Impatto assistenziale certo o potenziale*

La possibilità di realizzare nuovi composti antitumorali più selettivi ed efficaci di quelli oggi in commercio, costituirà un enorme beneficio per la popolazione. La completa descrizione dei siti attivi di enzimi e di oncoproteine renderà possibile un disegno razionale di farmaci "molecolari" ad altissima specificità per il target di elezione; molti dei farmaci attualmente in uso in oncologia, infatti, sono stati disegnati e sintetizzati grazie a questo tipo di indagini (es. Gleevec®). La conoscenza dei meccanismi molecolari alla base dell'insorgenza di alcune patologie, inoltre, potrà essere utilizzata in fase di prevenzione e di diagnosi precoce di tumori. Le industrie chimico-farmaceutiche presenti sul territorio potranno avere giovamento dai risultati di questa ricerca in quanto saranno anche in grado di sviluppare

## Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

terapie personalizzate, poco interessanti per le grandi multinazionali, ma essenziali per la cura di alcuni tumori considerati "rari".

### *Risultati e prodotti 2009*

Durante lo scorso anno sono stati svolti esperimenti di espressione purificazione e cristallizzazione di diverse molecole ed analisi computazionali e di modeling di mutanti patogeni di proteine.-In particolare sono stati condotti i seguenti studi:

- c-Fes: il proto-oncogene fes/fps codifica per una tirosina chinasi non recettoriale (c-Fes) di caratteristiche strutturali uniche).-Fes rappresenta un potenziale bersaglio per la regolazione della trasduzione del segnale in processi che variano dall'infiammazione alla differenziazione cellulare alla proliferazione tumorale.-Strutturalmente Fes è una proteina di 92 kDa composta da diversi domini due dei quali sono stati espressi purificati nel nostro laboratorio in collaborazione con l'Università di Lodz (PL): il dominio N-terminale "FCH" ed il dominio C-terminale chinasi.-FCH è stato anche cristallizzato ma gli esperimenti di diffrazione di raggi X condotti al sincrotrone ESRF di Grenoble (F) non hanno ancora permesso la determinazione della struttura terziaria di questo dominio a causa dello scarso potere diffrattivo dei cristalli.-Sono in corso nuovi screening per determinare differenti condizioni di cristallizzazione della proteina e in collaborazione con l'Università di Udine sono in corso esperimenti di NMR per determinare le proprietà dinamiche di questo dominio.-

- GPR30: durante questo primo anno di attività abbiamo da un lato provveduto a disegnare un modello tridimensionale di questo importante recettore dall'altro abbiamo iniziato il cloning in batteri per una successiva espressione in quantità sufficienti per poter effettuare esperimenti di cristallizzazione.-Sulla base del modello molecolare abbiamo disegnato e sintetizzato alcuni ligandi (agonisti ed antagonisti) e abbiamo identificato alcuni ligandi endogeni precedentemente non noti.

- ERalfa: da diverso tempo questa struttura è attiva negli studi sul recettore estrogenico ERalfa.-Nell'anno in considerazione abbiamo effettuati diversi screening virtuali "in silico" di possibili ligandi; abbiamo evidenziato gli effetti di molecole di origine naturale (quali il resveratrolo) e disegnato ligandi potenzialmente attivi che sono attualmente in corso di sintesi chimica.

- Modelling: in questo settore il primo anno di attività ci ha visto impegnati nello studio dei cambiamenti conformazionali dell'integrina Alfa1bBeta3 in seguito alla sua attivazione integrando i dati derivanti da studi di proteomica e di biofisica con i risultati dei nostri modelli.-Abbiamo modellato diverse strutture tridimensionali di proteine tra cui la Multidrug Resistance protein 1 (MDR1 o ABCB1) per successive simulazioni di docking molecolare che ci hanno permesso di determinare tra una "library" di molecole alcuni possibili inibitori.-Infine abbiamo mantenuto attiva la collaborazione con l'Istituto G.-Gaslini di Genova (dr.ssa M. Filocamo) nell'analisi degli effetti a livello proteico di mutazioni genetiche patogeno.

### *Pubblicazioni*

Brookes E.-Demeler B.-Rosano C.-Rocco M.-

The implementation of SOMO (SOLUTION MODeller) in the UltraScan analytical ultracentrifugation data analysis suite: enhanced capabilities allow the reliable hydrodynamic modeling of virtually any kind of biomacromolecule.-  
Eur. Biophys. J. Epub Feb 21, 2009

Cesarini S.-Spallarossa A.-Ranise A.-Schenone S.-Rosano C.-La Colla P.-Sanna G.-Busonera B.-Loddo R.-

N-acylated and NN'-diacylated imidazolidine-2-thione derivatives and NN'-diacylated tetrahydropyrimidine-2(1H)-thione analogues: synthesis and antiproliferative activity.-  
Eur. J. Med Chem. 44(3):1106-1118, 2009

Fancello T.-Dardis A.-Rosano C.-Tarugi P.-Tappino B.-Zampieri S.-Pinotti E.-Corsolini F.-Fecarotta S.-D'Amico A.-Di Rocco M.-Uziel G.-Calandra S.-Bembi B.-Filocamo M.-

Molecular Analysis of NPC1 and NPC2 Gene in Thirty-Four Niemann-Pick C Italian Patients: Identification and Structural Modelling of novel mutations  
Neurogenetics 10(3):229-239, 2009

Lanciotti M.-Caridi G.-Rosano C.-Pigullo S.-Lanza T.-Dufour C.-

Severe congenital neutropenia: a negative synergistic effect of multiple mutations of ELANE (ELA2) gene.-  
Br. J Haematol. 146:573-582, 2009

Lappano R.-Rosano C.-Madedo A.-G.-Albanito L.-Plastina P.-Gabriele B.-Forti L.-Stivala L.A.-Iacopetta D.-Dolce Andò S.-Pezzi V.-Maggiolini M.-

Structure-activity relationships for binding of resveratrol and four analogues to estrogen receptor alpha in breast cancer cells  
Mol. Nut. Food Res. 53(7):845-858, 2009

Lappano R.-Rosano C.-De Marco P.-De Francesco E.M.-Pezzi V.-Maggiolini M.

Estrinol acts as a GPR30 antagonist in estrogen receptor-negative breast cancer  
Mol Cell Endocrinol, in press

Persichetti E.-Chuzhanova N.A.-Dardis A.-Tappino B.-Pohl S.-Thomas N.S.-Rosano C.-Balducci C.-Paciotti S.-Dominissini S.-Montalvo A.L.-Sibillo M.-Parini R.-Rigoldi M.-Di Rocco M.-Parenti G.-Orlacchio A.-Bembi B.-Cooper D.N.-Filocamo M.-Beccari T.-

Identification and molecular characterization of six novel mutations in the UDP-N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase gamma subunit (GNPTG) gene in patients with mucopolisidiosi III gamma.-  
Hum Mutat. 30(6):978-984, 2009

## Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

Tappino B.-Chuzhanova N.A.-Regis S.-Dardis A.-Corsolini F.-Stroppiano M.-Tonoli E.-Beccari T.-Rosano C.-Mucha J.-Blanco M.-Szlago M.-Di Rocco M.-Cooper D.N.-Filocamo M.

Molecular characterization of 22 novel UDP-N-acetylglucosamine-1-phosphate transferase alpha- and beta-subunit (GNPTAB) gene mutations causing mucopolipidosis types IIalpha/beta and IIIalpha/beta in 46 patients.

Hum Mutat 30(11):E956-E973, 2009

Viale M.-Cordazzo C.-de Toter D.-Budriesi R.-Rosano C.-Leoni A.-Ioan P.-Aiello C.-Croce M.-Andreani A.-Rambaldi M.-Russo P.-Chiarini A.-Spinelli D.

Inhibition of MDR1 activity and induction of apoptosis by analogues of nifedipine and diltiazem: an in vitro analysis.-

Invest New Drugs Epub Oct 30, 2009

Zanetti A.-Ferraresi E.-Picci L.-Filocamo M.-Parini R.-Rosano C.-Tomanin R.-Scarpa M.-

Segregation analysis in a family at risk for Maroteaux-Lamy syndrome conclusively reveals c.1151G>A (p.S384N) as to be a polymorphism.-

Eur J Hum Genet 17:1160-1164, 2009

### *Attività previste e risultati attesi nel 2010*

Nel 2010 ci aspettiamo i seguenti risultati:

- c-FES: Determinazione della struttura cristallografica del dominio FCH e sua caratterizzazione tramite NMR.- Purificazione e cristallizzazione del dominio chinasi in forma apo e in presenza di inibitori di tirosine chinasi noti e da noi prodotti.

- GPR30: Procederemo lungo due linee principali: da un lato cercheremo di clonare e purificare la proteina di membrana per successivi esperimenti di cristallizzazione.-Sapendo che questo obiettivo risulta molto ambizioso procederemo in parallelo con gli studi di modellistica che ci hanno consentito di sintetizzare due ligandi (un'agonista ed un'antagonista) validati presso l'Università della Calabria (CS) al fine di determinare molecole con sempre migliore affinità e specificità per questo recettore.

- ERalfa: Si procederà nelle valutazioni in silico di nuovi ligandi di origine naturale e sintetica.-Valuteremo inoltre la possibilità di clonare la proteina per possibili cocristallizzazioni con i ligandi da noi determinati al fine di poter ottenere informazioni utili ad un'ulteriore ottimizzazione di queste molecole.-

- Modelling di proteine e simulazioni di dinamica molecolare. La cristallizzazione delle proteine rivela talvolta difficoltà proibitive o talvolta insormontabili.-Nei casi in cui le coordinate atomiche di una proteina non siano note informazioni attendibili possono comunque essere recuperate mediante la modellazione molecolare sulla base dell'omologia con strutture conosciute.-Proseguiremo la collaborazione con il Laboratorio di Diagnosi pre-postnatale e Malattie Metaboliche dell'Ospedale G. Gaslini (Prof.ssa M. Filocamo) al fine di analizzare gli effetti di mutazioni singole di aminoacidi su diverse proteine.-Le nostre analisi biocomputazionali potranno infatti contribuire a chiarire alcuni meccanismi molecolari che sono alla base dell'insorgenza di diverse malattie metaboliche.-Inoltre proseguiremo la collaborazione con la Struttura Biopolimeri e Proteomica Strutturale di questo Istituto (Dr. M. Rocco) volta a costruire e validare modelli strutturali di alcune macromolecole di cui siano noti parametri idrodinamici strutture a bassa risoluzione e coordinate atomiche di frammenti ad alta risoluzione al fine di ottenere informazioni strutturali sempre più dettagliate.-La metodologia utilizzata (Hybrid method) costituisce un approccio alla risoluzione di problemi complessi all'avanguardia negli studi strutturali di macromolecole biologiche.