

S.C. Nanobioteconologie

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, A. Inga)

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).

Programmazione 2009-2001

(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.

Attività programmate 2009-2011 e risultati attesi

Le attività ed i risultati attesi per le linee di ricerca sono in parte anticipati nell'introduzione. Quelli delineabili con maggior accuratezza nel corso del primo anno di attività sono i seguenti:

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

Scrittura di script PERL, PHYTON e C++ appropriate per l'identificazione dei geni differenzialmente espressi nelle varie condizioni normale – neuroblastoma, in considerazione della variabilità osservata nelle singole linee cellulari di neuroblastoma considerate nello studio.

(2) Analisi delle interazioni proteina-farmaco.

Stesura di script in PERL e PYTHON per l'estrazione di informazione strutturale dai complessi proteina – farmaco inclusi nella banca dati PDB ed in DrugBank.

(3) Studi strutturali sul recettore DNAM-1.

Produzione di proteina (5 – 10 mg) e messa a punto di un protocollo di purificazione, refolding e concentrazione della proteina a partire da corpi inclusi. Se questa prima parte sarà ottenuta in tempo utile, si procederà immediatamente alla successiva messa in opera di trias di cristallizzazione.

(4) Analisi su mutanti di p53 e p63.

Generazione ed analisi di modelli tridimensionali di mutanti di p53 e di p63 in complesso con DNA. Calcolo dell'energia libera di interazione di ciascun complesso.

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

Analisi della morfologia di colture cellulari in vitro su piastra di Petri (nel primo anno linee di fibroblasti). Messa a punto di strumenti di analisi quantitativa della morfologia tramite l'uso di pacchetti software quali LabView e stesura di scripts appropriate.

Programmazione 2009-2001

Track record

- Bisacchi D.-Zhou Y.-Rosen B.P.-Mukhopadhyay R.-Bordo D.
Crystallization and preliminary crystallographic characterization of LmACR2, an arsenate/antimonate reductase from *Leishmania major*.
Acta Crystallogr. F 62:976/979, 2006
- Gangemi R.M.-Daga A.-Muzio L.-Marubbi D.-Cocozza S.-Perera M.-Verardo S.-Bordo D.-Griffero F.-Capra M.C.-Mallamaci A.-Corte G.
Effects of Emx2 inactivation on the gene expression profile of neural precursors.
Eur. J. Neurosci. 23:325/334, 2006
- Degiorgio D.-Colombo C.-Seia M.-Porcaro L.-Costantino L.-Zazzeron L.-Bordo D.-Coviello D.A. Molecular characterization and structural implications of 25 new ABCB4 mutations in progressive familial intrahepatic cholestasis type 3 (PFIC3).
Eur. J. Hum. Genet. 15:1230/1228, 2007
- 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
- Grossi F.-Bordo D.-Spizzo R.-Aita M.-Morelli A.-Pronzato P.-Consiglieri C.-Valent F.-Cacitti M.-Follador A.-Rossetto C.-Deferrari C.-Fasola A.-Cerchia T.-Feltrami C.A.-Belvedere O.
Stage IIA non-small cell lung cancer prognostic stratification by hierarchical clustering analysis of tissue microarray immunostaining data. An ATOM group study.
Ann. Oncol., submitted

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 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 "traghettare" 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

Programmazione 2009-2001

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 monomerica 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.

Attività programmate 2009-2011 e risultati attesi

Nel triennio 2009-2011 prevediamo di sviluppare le prime molecole da utilizzare in diagnostica ed in clinica, come "vettori" per gli agenti di contrasto/farmaci da utilizzare in oncologia. In particolare la presente ricerca si concentrerà in particolare sullo sviluppo di macrocicli e dendrimeri. Queste molecole verranno utilizzate sia come monomeri che quali costituenti di strutture polimeriche, al fine di caratterizzarne le proprietà e valutarne l'eventuale tossicità in vitro ed in vivo. Si provvederà poi a definire metodi atti all'incorporazione all'interno di queste macromolecole degli agenti di contrasto/farmaci considerati, e verranno svolti esperimenti per testare l'attività dei risultanti sistemi farmaci-vettori. Analogamente si testeranno e si valideranno le nanoparticelle contenenti gli agenti di contrasto da utilizzare in diagnostica e per l'imaging. Al fine di renderle idrosolubili e non aggredibili dalle difese naturali dell'organismo, le nanoparticelle da noi utilizzate verranno ricoperte da opportuni polimeri (ad esempio PEG); se lo si riterrà opportuno, in alcuni casi si provvederà alla funzionalizzazione delle nanoparticelle, coniugando anticorpi specifici sulla loro superficie.

Durante il primo anno di attività si procederà con la sintesi e le prove di tossicità in vitro di alcuni vettori macrociclici, in collaborazione con il Dipartimento di Chimica Organica dell'Università di Messina. Valuteremo inoltre la possibilità di incorporare farmaci già esistenti (Iressa, Doxorubicina) all'interno dei nuovi vettori da noi sintetizzati.

Track record

Pierotti M.-Lombardo C.-Rosano C.

Nanotechnology: going small for a giant leap in cancer diagnostic and therapeutics.

Programmazione 2009-2001

Tumori 94:191/196, 2008

Cesarini S.-Spallarossa A.-Ranise A.-Schenone S.-Rosano C.-La Colla P.-Sanna G.- Busonera B.-Loddo R.
N-acylated and N,N'-diacylated imidazolidine-2-thione derivatives and N,N'-diacylated tetrahydropyrimidine-2(1H)-
thione analogues: synthesis and antiproliferative activity.
Eur. J. Med. Chem. 44(3):1106/1118, 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. Nutr. Food Res. 53(7):845/858, 2009

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-deacetilbaccatina 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

Programmazione 2009-2001

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 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.

Attività programmate 2009-2011 e risultati attesi

- Analisi dei principali metaboliti e caratterizzazione chimica dei composti di interesse

La definizione della struttura molecolare risulta indispensabile per la ricerca scientifica di base ed applicata nell'ambito di diversi settori di indagine (chimico, biologico, farmacologico, ambientale, medico, biotecnologico, ecc.). La caratterizzazione delle proprietà biologiche di molti dei composti derivati e delle formulazioni intermedie di prodotti naturali gioca un ruolo fondamentale nella farmacologia.

Mediante tecniche di separazione gas-cromatografica e/o di cromatografia liquida accoppiate alla spettrometria di massa e saggi immunologici (ELISA) saranno individuate le molecole correlate alla famiglia dei tassani. Tali molecole verranno caratterizzate in ambito strutturale e chimico-fisico e ne verrà quindi determinato un preliminare profilo biochimico-farmacologico attraverso l'attività integrata di caratterizzazione biochimica, immunologica e citogenetica. Verranno sviluppati protocolli metodologici per l'analisi qualitativa e quantitativa delle suddette molecole.

- Clonaggio e sequenziamento di geni espressi nelle specie diverse dal tasso

La capacità di manipolare ed inserire geni eterologhi in organismi ospiti ha drasticamente contribuito allo sviluppo delle biotecnologie, consentendo di utilizzare composti che altrimenti sarebbero disponibili solo in quantità limitata oppure che richiedono processi di purificazione lunghi, costosi e rischiosi. Le concentrazioni di uno o più metaboliti di interesse farmaceutico nei vari tassani dipende dalla presenza ed espressione di specifici alleli di geni che codificano per determinati enzimi e dalla regolazione della loro espressione. L'isolamento ed il sequenziamento di geni codificanti per proteine coinvolte in processi metabolici di interesse farmaceutico fanno parte di un programma più generale che comprende sia il concetto di "genomics" che "proteomics".

Nell'ambito di questo progetto si prevede di clonare parte dei geni coinvolti nella biosintesi dei tassani in cellule di specie diverse dal tasso. A tale scopo si identificheranno le sequenze nella banca dati degli EST (Expressed Sequence Tag) del tasso ed utilizzate come marcatori di ibridazione per il DNA estratto dalle specie da noi individuate.

- Valutazione dell'attività antimitotica e citotossica e proapoptotica

Il Tassolo agisce a livello dei microtubuli, strutture formate da polimeri di tubulina, coinvolti in molti aspetti della biologia cellulare, dal metabolismo cellulare al trasporto intracellulare, alla mitosi. Il suo effetto si esplica sull'equilibrio tubulina-microtubuli, promuovendo sia la polimerizzazione della tubulina che la stabilizzazione dei microtubuli. Nelle cellule interfasiche causa la formazione di spessi fasci di microtubuli attraverso il citoplasma e la rottura del nucleo in micronuclei multipli. Per questi effetti sono necessarie dosi di Tassolo relativamente alte, mentre a basse concentrazioni il Tassolo sopprime la dinamica dei microtubuli senza influenzare la massa della tubulina polimerizzata. La distruzione della dinamica dei microtubuli interrompe la loro normale funzione, che include la mitosi, ed alla fine porta all'iniziazione dell'apoptosi.

Estratti da tessuti differenziati di diverse specie vegetali e/o provenienti da colture cellulari verranno saggiati su cellule tumorali al fine di verificare il blocco in metafase, l'induzione di aneuploidia, l'attività citotossica e proapoptotica.

- Sintesi di aptameri e nanoparticelle e disegno di analoghi al tassolo mediante simulazioni di docking

Gli aptameri sono corti frammenti di DNA o RNA, analoghi agli anticorpi monoclonali, che possono legarsi ad antigeni target con alta affinità e specificità. Le nanoparticelle terapeutiche sono veicoli disegnati per il trasporto di farmaci che possono essere incapsulati e rilasciati in modo predeterminato e regolato. Usando il cancro della prostata come modello tumorale è stato sviluppato un sistema di rilascio del farmaco molto specifico ed efficiente.

Programmazione 2009-2001

Nel presente progetto saranno sintetizzati aptameri specifici per i recettori di superficie PSMA e quindi coniugati con nanoparticelle contenenti Tassolo. Il complesso aptamero-nanoparticella-Tassolo sarà utilizzato per valutare la sua capacità di inibire selettivamente la replicazione di cellule tumorali che overesprimono l'antigene tumorale specifico per la prostata.

Sfrutteremo inoltre tecniche proprie dello structure-based drug design, in modo tale da ottimizzare le attività biologiche del tassolo, disegnandone analoghi sintetici di elevata affinità per il target di elezione (nel nostro caso la tubulina). A tale scopo si combineranno gli strumenti forniti dalla cristallografia a raggi X di macromolecole biologiche e dalle tecniche di "molecular modeling" e "molecular simulation". I composti da noi disegnati verranno quindi sintetizzati chimicamente e la loro affinità validata in vitro.

Durante il primo 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;
- Produzione di coniugati aptameri-Tassolo.

Track record

Bestoso F.-Ottaggio L.-Armirotti A.-Balbi A.-Damonte G.-Degan P.-Mazzei M.-Cavalli F.-Ledda B.-Miele M.

In vitro cell cultures obtained from different explants of *Corylus avellana* produce Taxol and taxanes.

BMC Biotechnol. 6: 45; 1/45; 11, 2006

Corazza A.-Rosano C.-Pagano K.-Alverdi V.-Esposito G.-Capanni C.-Bemporad F.-Plakoutsi G.-Stefani M.-Chiti F.-Zuccotti S.-Bolognesi M.-Vigilino P.

Structure, conformational stability and enzymatic properties of acylphosphatase from the hyperthermophile *Sulfolobus solfataricus*.

Proteins: Struct. Funct. Bioinform. 62:64/79, 2006

Rosano C.-Zuccotti S.-Sturla L.-Fruscione F.-Tonetti M.-Bolognesi M.

Quaternary assembly and crystal structure of GDP-D-mannose 4,6 dehydratase from *Paramecium bursaria* Chloroella virus.

Biochem. Biophys. Res. Comm. 339:191/195, 2006

Gemmi I.-Scotti C.-Cappelletti D.-Canonico P.L.-Condorelli F.-Rosano C.

Expression, Purification and preliminary crystallographic studies on the catalytic region of the non receptor tyrosine kinase Fes.

Acta Crystallogr. F 63:18/20, 2007

Miele M.-Bestoso F.-Balbi A.-Mazzei M.-Piras D.-Ottaggio L.

New sources of Taxol and taxanes to be used as antimetabolic compounds.

Planta Med. 74:1113, 2008

Ottaggio L.-Bestoso F.-Armirotti A.-Balbi A.-Damonte G.-Mazzei M.-Sancandi M.-Miele M.

Taxanes from shells and leaves of *Corylus avellana*.

J. Nat. Prod. 71:58/60, 2008

Pierotti M.-Lombardo C.-Rosano C.

Nanotechnology: going small for a giant leap in cancer diagnostic and therapeutics.

Tumori 94:191/196, 2008

Romano P.-Manniello A.-Aresu O.-Armento M.-Cesaro M.-Parodi B.

Cell Line Data Base: structure and recent improvements towards molecular authentication of human cell lines.

Nucleic Acids Res. Epub Oct 15, 2008

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

N-acylated and N,N'-diacylated imidazolidine-2-thione derivatives and N,N'-diacylated tetrahydropyrimidine-2(1H)-thione analogues: synthesis and antiproliferative activity.

Eur. J. Med. Chem. 44(3):1106/1118, 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. Nutr. Food Res. 53(7):845/858, 2009

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

Programmazione 2009-2001

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

Programmazione 2009-2001

Attività programmate 2009-2011 e risultati attesi

Nel prossimo triennio, nell'ambito del presente progetto di ricerca, verranno svolti esperimenti di espressione, purificazione e cristallizzazione di diverse molecole ed analisi computazionali e di modelling di mutanti patogeni di proteine. In particolare verranno studiate:

- Proteine Tirosine Chinasi. Le tirosine chinasi sono enzimi in grado di trasferire gruppi fosfato da molecole donatrici ad alta energia (come l'ATP) a residui di tirosina in specifici substrati. Questa classe di proteine gioca un ruolo fondamentale nella trasduzione del segnale: i suoi membri sono connessi tramite una reciproca rete di controllo con le protein fosfatasi, enzimi deputati all'idrolisi del fosfato trasferito dalle chinasi alle proteine. Non è quindi sorprendente come molte malattie, tra cui il cancro, siano causate da un'aberrante espressione o attività di questi enzimi. Attualmente oltre la metà dei proto-oncogeni identificati codifica proteine tirosine chinasi. I nostri studi saranno inizialmente focalizzati su c-Fes: Il proto-oncogene *fes/fps* codifica per una tirosina chinasi non recettoriale (c-Fes) di caratteristiche strutturali uniche, condivise solo con l'altro membro proteico di questa famiglia di proteine chinasi (Fer). 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 e cristallizzati nel nostro laboratorio, in collaborazione con l'Università di Lodz (PL): il dominio N-terminale "FCH", ed il dominio C-terminale chinasi. La proteina in forma intera è stata recentemente clonata nei laboratori del DISCAFF di Novara dal Prof. F. Condorelli. I risultati ottenuti mediante le analisi cristallografiche sui domini FCH e chinasi (KD), verranno combinati con i risultati a bassa risoluzione degli esperimenti SAXS/SANS che verranno effettuati sulla proteina intera, presso il sincrotrone DESY/EMBL di Amburgo (D) al fine di descrivere la struttura atomica della proteina, possibilmente nei diversi stati attivato/inattivato in modo tale da fornire indicazioni sulle variazioni conformazionali indotte sulla proteina dal legame con agenti endogeni ed esogeni. In parallelo, verranno disegnati, sintetizzati e testati in vitro alcuni potenziali inibitori della proteina, in collaborazione con il Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università di Genova (Dott. A. Spallarossa). Le molecole più promettenti oltre ad essere valutate in vitro, verranno ulteriormente migliorate tramite lo studio cristallografico del complesso da esse formato con la chinasi in oggetto. Altre proteine dall'attività tirosin-chinasi, coinvolte direttamente o indirettamente in processi correlati al cancro, potranno essere studiate strutturalmente nel triennio in considerazione.

- B7H3. B7H3 è un recettore specifico delle cellule Natural Killer ed è coinvolto nel riconoscimento e nella risposta citotossica verso cellule tumorali umane e di cellule infettate da virus. Al fine di studiare razionalmente l'interazione di questi recettori con i ligandi naturali, intraprenderemo l'espressione e la purificazione del frammento extracellulare di questi recettori al fine di condurre successivi studi strutturali.

- G-protein Coupled Receptor 30 (GPR30). GPR30 è un recettore di membrana costituito da una singola catena polipeptidica composta da 375 residui aminoacidici. Strutturalmente GPR30 è composta da 7 alfa-eliche transmembrana, simili a quelle che si trovano nei canali ionici, da un dominio extracellulare N-terminale di circa 50 residui di lunghezza e da un dominio intracellulare C-terminale. Le GPRs vengono divise in tre distinte famiglie che condividono la stessa struttura eptaelicale ma differiscono per vari aspetti, principalmente per la lunghezza della sequenza N-terminale e la localizzazione del sito di legame per l'agonista.

- La famiglia A, a cui appartiene la rodopsina, è di gran lunga la più numerosa e comprende la maggior parte dei recettori per le monoamine e i neuropeptidi.

- La famiglia B è costituita dai recettori della secretina, del glucagone e della calcitonina.

- La famiglia C è costituita principalmente dai recettori metabotropici del glutammato e dai recettori sensibili al Ca^{2+} .

GPR30 appartiene alla famiglia A. Recentemente abbiamo costruito un modello tridimensionale di questo recettore sulla base della sua omologia di sequenza con la rodopsina. L'importanza di questa proteina in oncologia risiede nel fatto che è stata recentemente caratterizzata come recettore per gli estrogeni "a rapida risposta"; è stato dimostrato come questo recettore di membrana giochi un ruolo importante nei processi di crescita cellulare, nella proliferazione e nell'apoptosi. In collaborazione con l'Università della Calabria di Rende (CS) e con l'Università di Genova, la S.C. Nanobiotecnologie disegnerà e sintetizzerà piccole molecole agoniste ed antagoniste di GPR30 e, parallelamente, provvederà alla sua espressione e purificazione in quantità e qualità sufficienti per successivi esperimenti di cristallizzazione.

- Recettore Estrogenico alfa ($ER\alpha$). Gli estrogeni sono piccole molecole idrocarburiche apolari che vengono prodotti a partire da una molecola di colesterolo. Sono molto diversi dagli altri ormoni più grandi, come l'insulina e l'ormone della crescita, che vengono riconosciuti da recettori posti sulla superficie della cellula. Gli estrogeni possono passare direttamente all'interno delle cellule e qui venire riconosciuti dai recettori estrogenici presenti nel nucleo. Quando un estrogeno entra nel nucleo e si lega al recettore degli estrogeni, ne causa la dimerizzazione. Il dimero così formato poi è in grado di legarsi ad un gran numero di siti specifici nel DNA, posti strategicamente vicino ai geni che hanno bisogno di essere attivati. Infine il recettore legato al DNA attiva l'apparato di lettura del DNA ed avvia la produzione di RNA messaggero. Pur costituendo un'essenziale categoria di regolatori fisiologici, gli estrogeni possono essere associati con diverse patologie quali il cancro alla mammella, il carcinoma ovario ed il carcinoma dell'endometrio. Risulta quindi importante caratterizzare i meccanismi molecolari che governano l'attività dei recettori estrogenici al fine di poter prevenire l'insorgenza di tali patologie. Nella S.C. Nanobiotecnologie mediante l'utilizzo di simulazioni di docking molecolare verranno valutati gli effetti di alcuni ligandi su questa classe di recettori. In particolare si studieranno gli effetti di ligandi endogeni quale l'estradiolo ed il 25-idrossicolesterolo e di altre piccole molecole quali il resveratrolo (molecola naturale presente nel vino rosso) e suoi derivati.

- 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. Da anni è attiva una collaborazione con il Laboratorio di Diagnosi pre-postnatale e Malattie

Programmazione 2009-2001

Metaboliche dell'Istituto G. Gaslini di Genova (Prof.ssa. M. Filocamo) che ha come obiettivo l'analisi degli effetti di mutazioni singole di aminoacidi su diverse proteine implicate nell'insorgenza di malattie metaboliche. Le nostre analisi biocomputazionali hanno permesso in passato di chiarire alcuni meccanismi molecolari che sono alla base dell'insorgenza di alcune di queste malattie. Nel corso del prossimo triennio continueremo questa collaborazione concentrandoci su malattie lisosomiali. Inoltre, in collaborazione con la Struttura Biopolimeri e Proteomica Strutturale di questo Istituto (Dr. M. Rocco), continueremo la collaborazione già attiva nel settore del modelling e successiva validazione di strutture macromolecolari di cui siano noti parametri idrodinamici, strutture a bassa risoluzione e coordinate atomiche di frammenti ad alta risoluzione, al fine di ottenere informazioni strutturali dettagliate. La metodologia utilizzata (Hybrid method) costituisce un approccio alla risoluzione di problemi complessi, all'avanguardia negli studi strutturali di macromolecole biologiche. Nel contesto di una collaborazione con l'Università di Urbino e con il Max-Planck Institute di Tuebingen (D), svolgeremo studi di modelling sul complesso formato dall'esochinasi con la porina mitocondriale VDAC1. E' stato dimostrato recentemente come la formazione di questo complesso protegga la cellula da fenomeni apoptotici dovuti alla rottura della membrana mitocondriale esterna. Tramite il disegno razionale di farmaci e simulazioni di docking molecolare al computer, disegneremo piccole molecole atte a rompere/prevenire la formazione di questo complesso nelle cellule cancerose favorendo, in questo modo, i naturali processi di morte programmata delle cellule malate. Infine, in collaborazione con il Dipartimento di Ingegneria Elettronica, Laboratorio di Visione Artificiale dell'Università di Pavia (Ing. M. Piastra) siamo in procinto di realizzare un nuovo software basato su algoritmi genetici per il "de novo" design di ligandi a proteine di struttura nota.

Durante il primo anno del presente progetto ci attendiamo i seguenti risultati:

- Proteine Tiroisine Chinasi: l'espressione, la purificazione e la cristallizzazione dei domini FCH e Chinasi (KD) della tirosina chinasi non recettoriale Fes. Quest'ultimo dominio, in particolare, verrà espresso in forma di corpi inclusi e successivamente "rinaturato" e purificato per la cristallizzazione. Entrambi i domini verranno cristallizzati da soli ed in presenza di piccole molecole potenziali ligandi che saranno sintetizzati presso l'Università di Genova sulla base del disegno razionale effettuato dal nostro laboratorio. La struttura tridimensionale del dominio FCH verrà studiata, in parallelo, tramite spettroscopia NMR presso l'Università di Udine, al fine di poter caratterizzare alcuni aspetti della sua dinamica molecolare in soluzione.

- B7H3: verrà provata l'espressione di questo recettore e ne verrà valutata la solubilità. Laddove questa proteina venisse espressa nei corpi inclusi, si provvederà a pianificare un protocollo per la sua espressione e la sua successiva rinaturazione.

- GPR30: durante il primo anno di attività provvederemo al disegno ed allo screening virtuale di ligandi (agonisti ed antagonisti), sulla base del modello tridimensionale di questa proteina di membrana realizzato presso questa Struttura Complessa. Provvederemo inoltre all'identificazione di possibili ligandi endogeni non ancora determinati ed alla caratterizzazione della loro attività in vitro. Cercheremo infine di clonare ed esprimere questa proteina per poter progettare futuri esperimenti di cristallizzazione.

- ER α : continueremo gli studi sul recettore estrogenico ER α focalizzando la nostra attività sullo screening virtuale di possibili ligandi naturali. Parallelamente cercheremo di valutare gli effetti del resveratrolo e di molecole ad esso analoghe quali ligandi di questa proteina.

- Modelling: In questo settore, il primo anno di attività ci vedrà impegnati nello studio dei cambiamenti conformazionali dell'integrina $\alpha_{11b}\beta_3$ in seguito alla sua attivazione, integrando i dati derivanti da studi di proteomica e di biofisica, con i risultati dei nostri modelli. Inoltre continueremo la collaborazione con l'Istituto G. Gaslini di Genova (dr.ssa M. Filocamo) nell'analisi degli effetti a livello proteico di mutazioni genetiche patogene.

Track record

Biococche M.P.-Pasino M.-Rosano C.-Molinari A.M.-Della Valle E.-Lanza T.-Bottini F.-Acquila M.
Insight into molecular changes of the F IX protein in 21 patients with Haemophilia B.
Haemophilia 12:263/270, 2006

Corazza A.-Rosano C.-Pagano K.-Alverdi V.-Esposito G.-Capanni C.-Bemporad F.-Plakoutsi G.-Stefani M.-Chiti F.-Zuccotti S.-Bolognesi M.-Vigliano P.
Structure, conformational stability and enzymatic properties of acylphosphatase from the hyperthermophile Sulfolobus solfataricus.
Proteins Struct. Funct. Bioinf. 62:64/79, 2006

Rosano C.-Zuccotti S.-Sturla L.-Fruscione F.-Tonetti M.-Bolognesi-M.
Quaternary assembly and crystal structure of GDP-D-mannose 4,6 dehydratase from Paramecium bursaria Chlorella virus.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 339:191/195, 2006

Donnarumma M.-Regis S.-Tappino B. Rosano C.-Assereto S.-Corsolini F.-Di Rocco M.-Filocamo C.
Molecular analysis and characterization of nine novel CTSK mutations in twelve patients affected by pycnodysostosis.
Hum. Mutat. 28:524, 2007

Gemmi I.-Scotti C.-Cappelletti D.-Canonico P.L.-Condorelli F.-Rosano C.
Expression, Purification and preliminary crystallographic studies on the catalytic region of the non receptor tyrosine kinase Fes.

Programmazione 2009-2001

Acta Crystallogr. F 63:18/20, 2007

Grossi S.-Regis S.-Rosano C.-Corsolini F.-Uziel G.-Sessa M.-Di Rocco M.-Parenti G.-Deodato F.,Leuzzi V.-Biancheri R.-Filocamo M.

Molecular analysis of ARSA and PSAP genes in twenty-one Italian patients with metachromatic leukodystrophy. identification and functional characterization of 11 novel ARSA Alleles.
Hum. Mutat. 29:E220/E230, 2008

Pittis M.G.-Donnarumma M.-Montalvo A.L.-Dominissini S.-Kroos M.-Rosano C.-Stroppiano M.-Bianco M.G.-Donati M.A. Parenti G.-Ciana G.-Di Rocco M.-Reuser A.-Bembi B.-Filocamo M.

Molecular and functional characterization of eight novel GAA mutations in Italian Infants with Pompe disease.
Hum. Mutat. 29:E27/E36, 2008

Rocco M.-Rosano C.-Weisel J.W.-Horita D.A.-Hantang R.R.,

Integrin conformational regulation: uncoupling extension/tail separation from changes in the head region by a multi-resolution approach.
Structure 16:954/964, 2008

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

N-acylated and N,N'-diacylated imidazolidine-2-thione derivatives and N,N'-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

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. Nutrit. Food Res. 53(7):845/858, 2009

Persichetti E.-Chuzhanova NA.-Dardis A.-Tappino B.-Pohl S.-Thomas NS.-Rosano C.-Balducci C.-Paciotti S.-Dominissini S.-Montalvo AL.-Sibilio M.-Parini R.-Rigoldi M.-Di Rocco M.-Parenti G.-Orlacchio A.-Bembi B.-Cooper DN.-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 mucopolipidosis III gamma.
Hum. Mutat. 30(6):978/984, 2009

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

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. Epub Jul 6, 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. Epub Mar 4, 2009