



**BANDO “PROMUOVERE LA RICERCA D’ECCELLENZA”
PROGETTO DI RICERCA - MODELLO A**

Anno 2009

1 - Titolo del Progetto di Ricerca (Max. 500 caratteri) da compilarsi in Italiano e Inglese

Applicazioni della nanomedicina in malattie modello associate all’invecchiamento: attivazione di una piattaforma tecnologica in grado di affrontare aspetti fondamentali di patogenesi, diagnosi e terapia.

Nanomedicine in ageing-associated prototypic diseases: activation of a scientific and technological platform challenging seminal aspects of pathogenesis, diagnosis and therapy.

2 - Durata del Progetto di Ricerca 24 Mesi

3 – Ente di ricerca di riferimento: Università di Pavia

4 - Dipartimenti di Ricerca coinvolti

Vedi punto 12.

5 - Aree Scientifico –disciplinari

Area (*)	05	40% di afferenza
Area	06	25% di afferenza
Area	03	15% di afferenza
Area	02	10% di afferenza
Area	09	10% di afferenza

(*) – area prescelta ai fini della valutazione



FONDAZIONE
ALMA MATER TICINENSIS

6 - Coordinatori scientifici della ricerca (Project Manager)

1. Elena Giulotto, GLTLNE50S48G388H, Professore ordinario, nata l'8 novembre 1950, Dipartimento di Genetica e Microbiologia, Università degli Studi di Pavia, tel. 0382 985541, fax 0382 528496, E-mail: elena.giulotto@unipv.it
2. Piercarlo Mustarelli, MSTPCR59L03I968S, Professore associato, nato il 3 luglio 1959, Dipartimento di Chimica Fisica, Università degli Studi di Pavia, tel. 0382 987205, fax 0382 987575, E-mail: Piercarlo.mustarelli@unipv.it

7 - Abstract del Progetto di Ricerca (Max. 8.000 caratteri) da compilarsi in Italiano e Inglese

(Italiano)

Background La crescente longevità dell'uomo è un evento di straordinaria importanza che riguarda soprattutto le popolazioni più ricche ed evolute dove l'attesa di vita sopravanza, di circa trent'anni, quella dei paesi più poveri. Questo straordinario fenomeno ha un impatto globale sulla vita del pianeta e propone questioni fondamentali su aspetti ambientali, sociali e sulla stessa qualità della vita dei singoli individui. Una conseguenza del prolungamento medio della vita è sicuramente l'espansione molto importante di patologie associate all'invecchiamento. Queste patologie, conosciute a livello clinico da molti decenni, erano in passato definite rare mentre ora sono temute per il loro enorme impatto socio-economico, tale da condizionare pesantemente in futuro tutte le politiche economiche e socio-sanitarie. La medicina si sta cimentando al confine tra invecchiamento fisiologico e malattie associate all'invecchiamento, sia per distinguere le due condizioni, sia soprattutto con l'obiettivo di ritardare il primo e curare le seconde. In questo contesto un ruolo particolare è svolto dalla medicina molecolare che nasce dalla convergenza di fisica-chimica-biologia e medicina clinica. Proprio nelle malattie associate all'invecchiamento la sensibilità e la specificità degli strumenti di analisi e di manipolazione del sistema sono fondamentali per capire il ruolo patologico del singolo componente biologico ed evitare di interferire negativamente con elementi già biologicamente predisposti a rallentare i processi degenerativi. Allo sviluppo della medicina molecolare sta contribuendo in modo sostanziale la nanotecnologia molecolare, che ha la capacità di creare materiali e dispositivi con precisione molecolare e di penetrare il sistema biologico con la possibilità di studiare e manipolare la singola cellula, il singolo gene o la singola proteina. **La nanomedicina si configura perciò come la branca della scienza più adatta per affrontare questo tipo di patologie.** Nella comunità scientifica pavese sono presenti gruppi di ricerca che hanno affrontato a livello molecolare aspetti patogenetici, diagnostici e terapeutici di alcune malattie tipicamente associate ai processi di invecchiamento, quali le malattie da *misfolding* proteico e malattie mielodisplastiche, così come esistono gruppi leader in campo internazionale su aspetti biologici-fisiologici dell'invecchiamento e differenziazione cellulare. Accanto a questi gruppi di area bio-medica si sono affermate competenze chimiche, fisiche ed ingegneristiche nelle tecnologie di preparazione di nanomateriali, nelle analisi microscopiche e spettroscopiche delle singole molecole, nonché nella preparazione di dispositivi adatti alla analisi e manipolazione di oggetti di dimensioni nanometriche e micrometriche.



FONDAZIONE
ALMA MATER TICINENSIS

Obiettivi. Il progetto, che consideriamo pienamente realizzabile attraverso la piattaforma di ricerca che abbiamo costituito e che abbiamo collaudato in una esperienza precedente, si pone 2 obiettivi specifici e ambiziosi:

1. apportare un contributo alle conoscenze sulla patogenesi di due categorie nosologiche associate all'invecchiamento;
2. sviluppare per queste patologie nuovi strumenti diagnostici e terapeutici.

Strategia e organizzazione del progetto. Il progetto è sviluppato in modo multidisciplinare e si realizza attraverso 4 attività principali nei seguenti settori: A) ricerca clinica su pazienti affetti da patologie “prototipo” associate all'invecchiamento; B) studi di struttura e funzione di geni e proteine coinvolti nei meccanismi patogenetici di queste malattie; C) biologia delle cellule implicate nella malattia e potenziale uso terapeutico di cellule manipolate in vitro; D) sviluppo di sistemi biologici complessi, intesi come modelli di malattia, per studi pre-clinici. Le 4 attività medico-biologiche sono sostenute da una piattaforma tecnologica costituita da 4 azioni principali: α) preparazione e caratterizzazione di nanomateriali, applicazioni di microelettronica nello sviluppo di nuovi strumenti diagnostici e terapeutici associati alle genomica e proteomica, a supporto principalmente dell'attività A; β) Spettroscopia e microscopia di (nano)materiali organici e biologici a supporto principale di B e C; γ) Nuovi nanomateriali e bio-ingegneria per lo sviluppo di bio-reattori e riparazione di tessuti, a supporto principale delle attività C e D; δ) Farmacologia e tossicologia dei prodotti di possibile uso clinico, a supporto delle attività pre-cliniche C e D.

Risultati attesi. I risultati attesi sono di due tipi:

1. Avanzamento delle conoscenze biologiche sulle due malattie considerate e la messa a punto di approcci più efficaci per la diagnosi precoce e la terapia;
2. Sviluppo di dispositivi e materiali utilizzabili negli studi bio-medici specifici, ma esportabili ad altri settori della ricerca biologica e biomedica.

Per quanto riguarda le patologie causate dal *misfolding* proteico ci si attende una caratterizzazione strutturale e funzionale di stati di aggregazione delle proteine patologiche che mantengono una relativa solubilità e diffusibilità nel sistema biologico. Sarà possibile contestualizzare la bio-attività di queste proteine all'interno della complessità genetica e metabolica del singolo individuo e testare sia nuovi strumenti analitici, sia nano-materiali interagenti con le molecole patologiche. Per quanto riguarda le sindromi mielodisplastiche, ci si attende un forte avanzamento delle capacità di analisi delle anomalie cellulari associate alle trasformazioni cellulari associate alla malattia. Sarà possibile per ogni singolo paziente valutare il contributo del *background* genetico, inclusa la stabilità del sistema telomerico nella differenziazione e proliferazione cellulare, così come nella funzionalità di sistemi cellulari modello. Le nanotecnologie a disposizione permetteranno di ricostruire un sistema che mima il microambiente midollare, dove ricreare le fondamentali interazioni cellule-matrice e verificare in tempo reale con specifici sensori gli effetti biologici di modificazioni dell'ambiente chimico-fisico.

(Inglese)

Background The increasing longevity of mankind is an extraordinary event, mainly involving the richest part of the planet where the life expectancy exceed by more than 30 years that of the poorest countries. This impressive social and biological phenomenon has a global impact on the life of the



FONDAZIONE
ALMA MATER TICINENSIS

planet and poses urgent and unmet demands for the environmental and social implications, as well for the quality of life for each single individual. A negative effect of the expansion of longevity is certainly the increasing number of patients suffering of diseases typical of the old age. Most of the ageing associated diseases are known by more than a century, but never before they had such a medical attention because considered rare pathological events. However, in the new scenario of the population ageing, these diseases will have a tremendous impact on sustainability of social and health politics. Medicine and medical research is struggling in defining the pathological and physiological interdependent process associated with ageing, in order to prolong the life expectancy and efficiently counteract the inevitable increase of morbidity. Molecular medicine that is strongly sustained by technologies suitable for the dissection of pathological events at the level of single cell, protein or gene, does seem more and more adequate to intervene on these diseases. Very high sensitivity and specificity are required in the analytical (diagnostic) phase and in the manipulation (therapy) of these pathological processes in order to be effective, selective and to avoid negative side effects. Molecular medicine is now strongly supported by molecular nanotechnology that provide material and devices presenting a molecular precision capable of penetrating the biological system, thus breaking previous limits in the analysis and the manipulation of the single biological entity. Such an effective fusion of the two disciplines into nanomedicine is particularly appropriate in facing the multiple medical problems posed by these diseases. The scientific community of Pavia can rely on a few medical groups that have based on molecular medicine their approach on selected diseases associated to ageing such as diseases caused by protein misfolding, and myelodysplastic syndromes. Moreover, our scientific community can count upon groups leading the international research on physiologic mechanism of cellular differentiation and ageing. The bio-medical team is supported in the project by a technological platform created by physicists, chemists and biophysicists, fully committed to provide their competence and technology in the science of materials and micro-electronics to push forward the analytical and manipulative limits.

Objectives: The project has two main general objectives:

1. contribute to the elucidation of key pathogenic aspects of two prototypic diseases associated to physiologic ageing;
2. offering new sensitive diagnostic and effective therapeutic tools tailored on the pathogenic basis of the diseases.

The confidence we have in considering fully achievable our general and specific objectives is based on the outstanding performance of this team in working together at a previous multidisciplinary project funded by Regione Lombardia (From Materials Science to Molecular Biomedicine (2007-2009), web site www.unipv.it/reglom06)

Project strategy and organization. The organization of the project is inspired by the strategic choice to fully exploit a multidisciplinary approach. We have identified 4 bio-medical activities: A) clinical and pathological research on patients affected by the “prototypic diseases” in which the ageing contributes to the pathogenesis; B) investigation of structure-function relation on genes and proteins involved (directly or indirectly) in the pathogenesis; C) biological studies on cells directly responsible for the diseases and on cells eligible for substitutive therapies; D) establishment of models of the diseases presenting different grade of complexity from simple cellular model, to pluricellular organisms, to mammalian (mouse) models of the diseases. These models are necessary for all pre-clinical studies aimed to validate new therapeutic approaches. These 4 bio-medical activities are supported by the “technological



FONDAZIONE
ALMA MATER TICINENSIS

platform” acting in three different activities. α) preparation and characterization of nanomaterials and applications of micro-electronic devices in preparing new diagnostic tools for proteomic and genomic studies. This activity is mainly designed in support of the A activity. β) Spectroscopy and microscopy of organic and biologic nanomaterials supporting the activity A and B. γ) Exploitation of new nanomaterials and bio-engineering in developing bio-reactors aimed to prepare artificial tissues applicable to the reparative and regenerative medicine. These actions are mainly in support of activity C and D. δ) Pharmacological and toxicological studies on products of potential clinical use supporting all the activities that are transferrable into a clinical practice (in particular C and D expected products).

Expected results. We are expecting two types of results:

1. Progress in the basic knowledge on disease pathogenesis and setting up of more effective diagnostic and therapeutic procedures.
2. Discovery of new materials and devices exploitable in the analysis and manipulation of the specific pathological system and also translatable to other pathological problems.

Regarding the diseases caused by protein misfolding, we are expecting for a detailed structural and functional characterization of intermediate states of aggregation, still soluble and diffusible in the tissue, but highly prone to further polymerization and precipitation. The bioactivity of these proteins will be evaluated in the context of the complex biological system that is affected by the intrinsic cytotoxicity of this material and that contemporary activate a protective system of detoxification and degradation of this material. The capacity of new nanomaterials (i.e. nanoparticles) to modulate the metabolism and degradation of the toxic proteins will be properly established. In myelodysplastic syndromes we are expecting for a significant progress in our capacity to establish genetic and cellular abnormalities of the pathologic clones. At a first instance in the cellular models, and furthermore in every single patient, we envisage the concrete possibility to evaluate the contribution of the genetic background and the stability of the telomeric function in cell proliferation and differentiation. Available nano- and micro-technological devices will be assembled in order to create a system mimicking the bone marrow environment. In such a model we wish to re-create and modulate the interactions between the cells and the extra-cellular matrix, and monitor, in real time, the biological effects of minimal chemical physical changes properly registered through a new generation of specific biosensors.

8 - Parole chiave

(È obbligatorio inserire almeno 3 parole chiave) da compilarsi in Italiano e Inglese

Invecchiamento, degenerazione, patologie, nano materiali, nanotecnologie, diagnosi, terapia, medicina rigenerativa.

Ageing, degeneration, pathology, nanomaterials, nanotechnology, diagnosis, therapy, regenerative medicine.



9 - Curriculum scientifico dei Coordinatori della ricerca e dei Responsabili delle Unità Operative (Max. 4.000 caratteri) da compilarsi in Italiano e Inglese

Elena Giulotto

Elena Giulotto è Professore ordinario di Biologia Molecolare presso la Facoltà di Scienze dell'Università di Pavia e responsabile del laboratorio di Biologia Molecolare e Cellulare del Dipartimento di Genetica e Microbiologia. E' coordinatrice del Corso di laurea specialistica in lingua inglese: Molecular Biology and Genetics.

Si è laureata in Scienze Biologiche con lode all'Università di Pavia e si è specializzata in Genetica nella stessa Università. Ha poi lavorato come "post-doc" presso il Biochemistry Department, Stanford University, Stanford, USA (1980-1983) e l'Imperial Cancer Research Fund, London, UK (1984-1986).

Elena Giulotto ha dedicato la sua attività di ricerca alla biologia cellulare e molecolare delle cellule di mammifero, studiando in particolare alcuni meccanismi di instabilità cromosomica come l'amplificazione genica, la riparazione del DNA e l'evoluzione dei centromeri. Di specifica rilevanza per questo progetto sono i risultati ottenuti recentemente sulla funzione dei telomeri. E' stata coordinatore o partner di numerosi progetti di ricerca finanziati da diversi enti internazionali e nazionali fra cui la Comunità Europea, Euratom, Fondazione Cariplo, Ministero dell'Università e della Ricerca (PRIN, FIRB), AIRC, CNR e Compagnie biotecnologiche.

Elena Giulotto is Full Professor in Molecular Biology at the University of Pavia, Faculty of Sciences and head of the Molecular and Cellular Biology Laboratory in the Department of Genetics and Microbiology. She is coordinator of a 2-year Master Programme, entirely taught in English, in Molecular Biology and Genetics.

She obtained a degree in Biology cum laude at the University of Pavia and was postgraduate student in Genetics in the same University. She was postdoctoral fellow in the Biochemistry Department, Stanford University, Stanford, USA (1980-1983) and at the Imperial Cancer Research Fund, London, UK (1984-1986).

Elena Giulotto has dedicated her research activity to the cellular and molecular biology of mammalian cells, addressing particularly the mechanisms of chromosomal instability, such as gene amplification, DNA repair and centromere evolution. Of specific relevance for the present project are her recent achievements in the study of telomeres. She was principal investigator or partner of several research projects funded by international and national agencies, including the European Community, Euratom, Cariplo Foundation, Ministry of Education (PRIN, FIRB), AIRC, CNR and Biotechnological companies.

Piercarlo Mustarelli

Mustarelli (n. 1959) si è laureato in Fisica nel 1983, ha conseguito il diploma di perfezionamento in Fisica della Materia nel 1987 e il Dottorato di Ricerca in Scienze Chimiche nel 1992. Dal 1993 al 1998 è stato ricercatore CNR. E' attualmente Professore Associato di Chimica Computazionale presso la Facoltà di Scienze MM.FF.NN. E' Responsabile Scientifico del Laboratorio NMR del Centro Grandi Strumenti dell'Università di Pavia, e responsabile del Laboratorio Film Sottili del Dipartimento di Chimica Fisica.

Dal 1983 al 1990 Mustarelli si è principalmente occupato di sviluppi hardware e software di strumentazione NMR, sviluppando in particolare sonde a singola e doppia risonanza e bobine di superficie. A partire dal 1988 si è interessato dello studio delle proprietà chimico-fisiche, strutturali e di trasporto di solidi sia cristallini sia amorfi, con particolare riferimento agli elettroliti vetrosi e polimerici, utilizzando principalmente la spettroscopia NMR sia statica sia all'angolo magico (MAS), oltre a varie altre tecniche termiche (DSC, MDSC, DEA, TGA), spettroscopiche (IR, EXAFS) e diffrattometriche (RX). Recentemente ha avviato una linea di ricerca riguardante la sintesi e la caratterizzazione di materiali per sensori, principalmente a base di silice, sia in forma massiva (preparati via xerogel o aerogel), sia in forma di film sottile. I più recenti interessi scientifici riguardano materiali per celle a combustibile e (nano)biomateriali. E' autore o coautore di circa 140 pubblicazioni su riviste internazionali e di oltre 250 comunicazioni a Congressi nazionali e internazionali.

Mustarelli received his degree in Physics in 1983, a "Diploma di Perfezionamento in Fisica della Materia" (Master in Condensed Matter) in 1987, and a PhD in Chemical Sciences in 1992. From 1993 to 1998 he joined as a Researcher the "Centro di Studio per la Termodinamica e l'Elettrochimica" of Italian CNR. In 1998 he became Researcher at the Department



FONDAZIONE
ALMA MATER TICINENSIS

of Physical Chemistry of the University of Pavia, where he is now Associate Professor of Computational Chemistry and Physical Chemistry. He is Responsible of the NMR Laboratory at "Centro Grandi Strumenti" of the University of Pavia, and leader of the Thin Film Laboratory at the Department of Physical Chemistry.

At the beginning of his research activity, Mustarelli contributed to the developing of both hardware (probes and transceivers) and software for NMR instrumentation. Later he started to study the physico-chemical, structural and transport properties of disordered solids, chiefly polymer and glassy electrolytes. To this aim, he used NMR spectroscopy, both static and at the magic angle (MAS), thermal techniques (DSC, MDSC, DEA, TGA), IR and EXAFS spectroscopies, X-rays diffraction. Later, he has been developing a new research activity in the field of materials for sensing and photonics, chiefly based on silica, both prepared in massive form by sol-gel routes (xerogel and aerogel), and as thin films. The most recent interests include materials for fuel cells and (nano)biomaterials. He is Author or co-Author of about 140 publications on international journals, and of more than 250 communications at both national and international Conferences.

Alessandra Balduini (Dipartimento di Biochimica)

Ha una vasta esperienza nella ricerca sulle cellule staminali e la biologia dei megacariociti, negli aspetti clinici delle patologie correlate alle piastrine e nei processi di coagulazione. La sua ricerca si focalizza sullo studio dei meccanismi dell'emopoiesi, differenziamento dei megacariociti e rilascio piastrinico in condizioni fisiologiche e patologiche, analizzando in particolare come i differenti componenti del microambiente midollare regolano questi processi. Recentemente ha scoperto un nuovo ruolo funzionale della GP1b nella sindrome Bernard Soulier di tipo Bolzano.

Carlo Balduini (Dipartimento di Medicina Interna)

Da molti anni uno dei campi di ricerca maggiormente coltivati dal prof. Carlo L. Balduini include i disordini dell'emopoiesi, con particolare riguardo alle alterazioni per eccesso o per difetto della megacariocitopoiesi. Per quanto riguarda le malattie mieloproliferative, ha indagato in larghe casistiche di pazienti la funzione piastrinica con metodiche innovative al fine di definire i meccanismi patogenetici ed identificare parametri predittivi del rischio trombotico ed emorragico caratteristico di queste forme. Più recentemente, ha esteso la propria ricerca alle malattie con difetto della produzione piastrinica, dedicandosi allo studio degli aspetti patogenetici e clinici delle piastrinopenie su base genetica. L'attività di ricerca è stata sostenuta da finanziamenti da parte di diverse Istituzioni ed è stata prevalentemente svolta in collaborazione con numerosi centri sia nazionali che di altri paesi.

Vittorio Bellotti (Dipartimento di Biochimica)

Vittorio Bellotti è laureato in medicina e si è occupa da oltre 20 anni di aspetti clinici, patologici e biochimici delle malattie causate da misfolding proteico e aggregazione. E' professore ordinario di Biochimica all' Università di Pavia e visiting professor all' University College di Londra dove è inserito stabilmente in progetti di ricerca del "Amyloid National Centre". Il suo gruppo di ricerca di Pavia è inserito in progetti di ricerca sulle amiloidosi finanziate dalla unione europea (progetto EURAMY) e da istituzioni italiane pubbliche (MIUR) e private (CARIPLO). Nell'ambito del progetto si occuperà della caratterizzazione di aspetti dinamici della struttura e della funzione di proteine associate alla deposizione amiloide. Il suo gruppo parteciperà all'attivazione di uno studio clinico atto a validare l'efficacia terapeutica di alcune tetracicline nel trattamento dell'amiloidosi associata ad emodialisi cronica

Bice Conti (Dipartimento di Chimica Farmaceutica)

Bice Conti si è laureata in Chimica e Tecnologia Farmaceutica nel 1981 ed è divenuta ricercatrice nel 1984. Negli anni 1987-1988 ha lavorato presso la School of Pharmacy, University of Kentucky, U.S.A. Nel 1992 è diventata professore associato presso l'Università di Catania dove ha lavorato tra il 1992 e il 1995. Dal 2007 è professore ordinario. L'attività di ricerca di Bice Conti in Chimica Farmaceutica riguarda la formulazione di sistemi per *drug delivery* basati su polimeri biodegradabili. I principali interessi di ricerca sono rivolti a sistemi micro- e nano-particolati basati su polimeri come acido polilattico, acido polilattico-co-poli-glicolico, chitosano e suoi derivati. L'attenzione è stata focalizzata anche verso i liposomi. Al momento, le sue ricerche riguardano la caratterizzazione di nuovi biopolimeri ed il loro comportamento in seguito a irraggiamento gamma, formulazioni di sistemi per drug delivery basati su micro e nano particelle e film caricati con proteine.



Ilaria Cristiani (Dipartimento di Elettronica)

Ilaria Cristiani è nata a Pavia il 4 ottobre 1969 e ha conseguito la Laurea cum laude in Ingegneria Elettronica presso l'Università di Pavia nel 1994. Ha svolto l'attività scientifica relativa al dottorato di ricerca interamente presso i laboratori di Ricerca Avanzata della Società Pirelli Cavi e Sistemi in stretta collaborazione con la Fondazione Bordini (Roma) e nel 1998 ha ricevuto il titolo di Dottore di Ricerca dall'Università di Pavia. A partire da Novembre 1999 è Ricercatrice presso il Dipartimento di Elettronica dell'Università di Pavia. L'attività scientifica di IC si è rivolta principalmente allo studio sperimentale di fenomeni ottici in strutture guidate e recentemente si è concentrata sullo studio e sullo sviluppo di dispositivi in ottica integrata per applicazioni biofotoniche. IC è coautore di circa 50 articoli pubblicati su riviste internazionali con revisore (banca dati -ISI) e ha contribuito a diverse presentazioni su invito a conferenze internazionali. IC è coautore di tre brevetti ed è stata invitata a tenere lezione presso scuole di dottorato Nazionali e Internazionali. Ha contribuito a 4 libri e svolge servizio di revisore per le più importanti riviste internazionali nel campo della fotonica. IC è anche coordinatore di un Master in Scienza dei Materiali presso l'Istituto Universitario di Studi Superiori (IUSS) di Pavia

Maurizio Fagnoni (Dipartimento di Chimica Organica)

Maurizio Fagnoni, nato nel 1968, si è laureato in chimica all'Università di Pavia nel 1992. Durante il periodo di dottorato ha lavorato in parte presso l'Università di Münster (Germania) e ha usufruito nell'anno 1996 di una borsa di studio dell'Istituto Superiore della Sanità sullo studio della fotodegradazione dei farmaci. E' ricercatore dal 1998 presso il Dipartimento di Chimica Organica dell'Università di Pavia. Nell'ambito della ricerca, si occupa principalmente di reazioni di alchilazione radicalica fotoindotta e di reazioni dei cationi arilici. Nel primo caso i radicali vengono generati per reazione di trasferimento fotoindotto sia di elettrone che di idrogeno e poi utilizzati in reazioni di alchilazione di varie olefine elettronpovere. Nel secondo caso l'irraggiamento di opportuni alogenuri o esteri aromatici porta alla formazione dei cationi arilici. Questi potenti elettrofili così ottenuti sono stati studiati sia da un punto di vista meccanicistico sia dal punto di vista dell'applicabilità sintetica. Recentemente si è interessato alla funzionalizzazione e successiva applicazione di nanotubi al carbonio. E' coautore di circa 100 pubblicazioni scientifiche su riviste internazionali (tra cui 8 capitoli di libri), aventi principalmente per oggetto reazioni di sintesi organica per via fotochimica.

Silvia Garagna (Dipartimento di Biologia Animale)

E' esperta di cellule staminali. In particolare, si è recentemente dedicata allo studio della citotossicità dell'oligomero del peptide amiloidegenico A β 42 in diversi tipi cellulari, tra i quali cellule staminali ematopoietiche, cellule staminali embrionali di topo e linee cellulari (SHSY5Y e H-END). Il risultato più rilevante della ricerca è stato l'aver individuato una sensibilità differenziale dei diversi tipi cellulari al peptide amiloidegenico A β 42. Nelle cellule staminali non è stato evidenziato alcun segno di apoptosi cellulare o perturbazione della proliferazione. I risultati suggeriscono una resistenza delle cellule staminali contro il peptide amiloidegenico e aprono nuove vie di indagine sul potenziale uso di queste cellule nella malattia di Alzheimer o di altre patologie associate all'invecchiamento. Nella nostra unità di ricerca lo studio della citotossicità è da anni esteso anche ad altre molecole quali ad esempio il bentazone o la diossina di cui abbiamo dimostrato gli effetti sulla spermatogenesi o sulle cellule staminali embrionali di topo.

Luigi Manzo (Dipartimento di Medicina Interna)

Prof. Luigi Manzo. Laureato in Medicina e Chirurgia presso l'Università degli Studi di Pavia. Professore ordinario di Tossicologia nella Facoltà di Medicina e direttore della Scuola di Specializzazione in Tossicologia Medica nella stessa Università. Coordinatore del Master Universitario di II livello "Valutazione e Controllo del Rischio Tossicologico da Inquinanti Ambientali". Già direttore della Scuola di Specializzazione in Anestesia e Rianimazione. Responsabile della Classe Accademica di Scienze Biomediche nella Scuola Universitaria Superiore (IUSS) di Pavia. Presso il Centro Medico di Pavia dell'IRCCS Fondazione Maugeri, è responsabile dell'Unità di Tossicologia, comprendente il Centro Nazionale di Informazione Tossicologica - Centro Antiveneni e il Centro Ricerche di Tossicologia Occupazionale e Ambientale. Membro della Commissione Nazionale Referenti delle Scuole di Specializzazione di Area Sanitaria presso il MIUR. E' autore di oltre 400 pubblicazioni e di vari libri riguardanti temi di tossicologia medica, neurotossicologia e medicina ambientale, parte dei quali pubblicati negli Stati Uniti e in Gran Bretagna. Ha coordinato progetti scientifici finanziati dalla Commissione Europea (EU EV5V CT910005 e ENV4-CT96-0273, QLK4-CT-1999-01356, QLK4-CT-2001-00186, FOOD-CT-2003-506543), dal MIUR (PRIN 2004), dal Ministero della Salute, Consiglio Nazionale delle Ricerche e del



FONDAZIONE
ALMA MATER TICINENSIS

Dipartimento della Protezione Civile. Membro del comitato editoriale di varie riviste scientifiche internazionali. Collabora da diversi anni con l'Istituto Karolinska di Stoccolma e con l'Università di Washington a Seattle.

Andrea Mattevi (Dipartimento di Genetica)

Nell'ambito del progetto le competenze di Andrea Mattevi riguardano due sistemi enzimatici che producono perossido di idrogeno nell'ambito di contesti biologici distinti. In particolare, esse comprendono, per una parte del progetto, la caratterizzazione strutturale mediante cristallografia a raggi X delle monoammina ossidasi eucariotiche (MAO) che catalizzano la deaminazione ossidativa di neurotrasmettitori quali la dopamina e la serotonina. Per quanto riguarda l'altro sistema enzimatico, le competenze sono l'espressione in batteri e la purificazione della forma ricombinante della istone demetilasi lisino-specifica 1 (LSD1) umana, nonché la sua caratterizzazione funzionale e strutturale mediante tecniche spettrofotometriche e cristallografiche.

Giampaolo Merlini (Dipartimento di Biochimica-Policlinico San Matteo)

Medico, Professore Ordinario di Biochimica Clinica e Presidente della International Society of Amyloidosis. Ha istituito il Centro per lo Studio e la Cura delle Amiloidosi Sistemiche e la rete nazionale dei Centri dedicati a queste malattie. Ha contribuito in modo sostanziale alla scoperta di una nuova famiglia di molecole in grado di inibire la formazione di amiloide e di promuoverne il riassorbimento e ha sviluppato l'uso di biomarcatori per la misura del danno d'organo prodotto dall'amiloide. Le ricerche sono finanziate dalla unione europea (progetto EURAMY) e da istituzioni italiane pubbliche (MIUR, Ministero della Salute) e private (CARIPLO). Il contributo dei ricercatori del Centro per lo Studio e la Cura delle Amiloidosi Sistemiche a questo progetto riguarda lo studio della citotossicità e dei meccanismi di danno d'organo causati dalle proteine amiloidogeniche.

Piersandro Pallavicini (Dipartimento di Chimica Generale)

Ricercatore e docente di Chimica Generale e Inorganica e Chimica Supramolecolare. Ha esperienza nella sintesi di Nano Particelle e di NanoRods di Ag, Au e di Ossidi di Fe (SPION) con controllo delle dimensioni, della distribuzione dimensionale, e della aspect-ratio.

Per la realizzazione di questo progetto metterà a disposizione la sua esperienza nella funzionalizzazione omo-molecolare o multipla di NP e NR, per l'ottenimento di nano-oggetti destinati all'uso di imaging e terapia in vivo. È esperto nel campo correlato della funzionalizzazione di superfici bulk inorganiche con SelfAssembledMonolayers molecolari e di nanoparticelle, capaci di rilasciare cationi metallici antibatterici e/o farmaci in modo controllato. Ha inoltre una lunga esperienza nell'ottenimento di dispositivi multi-molecolari micellari, in grado di valutare le capacità di carico, di trasporto e di rilascio dei carrier micellari nel drug delivery, di valutare le caratteristiche delle molecole d'interesse farmaceutico (lipofilità, pKa) e di valutare con un segnale fluorescente il pH locale in ambiente fisiologico.

Maddalena Patrini (Dipartimento di Fisica "A. Volta")

Ricercatore confermato, svolge attività di ricerca presso il Laboratorio di Spettroscopia Ottica ed attività didattica in corsi di Chimica e Tecnologia Farmaceutiche e Biotecnologie. Il gruppo di ricerca a cui collabora possiede consolidate competenze, sia sperimentali sia teoriche, nell'indagine di materiali micro- e nano-strutturati, e delle loro proprietà ottiche ed elettroniche. Oltre a caratterizzare la composizione e funzionalità dei materiali, vengono studiati sistemi fotonici e plasmonici al fine di controllare l'emissione e la rivelazione di luce e realizzare dispositivi avanzati. Le competenze specifiche per il presente progetto riguardano tre aspetti:

- Studio e progettazione di materiali e dispositivi per diagnostica *in-vitro* e per veicolazione di farmaci. In particolare, vengono utilizzate micro- e nano-strutture fotoniche e plasmoniche, nanoparticelle metalliche e polimeriche.
- Sviluppo e caratterizzazione di biosensori per soluzioni di analiti e cellule. Adottando superfici funzionali e sistemi micro- e nano-strutturati, si progettano e studiano innovative metodologie per biosensori ad elevata sensibilità, valutandone specificità a differenti analiti.
- Caratterizzazione strutturale e funzionale *in-vitro* di materiali e dispositivi coinvolti negli studi di progetto, mediante microscopia a forza atomica e spettroscopie ottiche (e.g. FTIR, ATR, SPR, fluorescenza, e Raman scattering).



Antonella Profumo (Dipartimento di Chimica Generale)

Laureata in Chimica presso l'Università di Pavia nel 1981, ha svolto tutta la sua attività scientifica e didattica presso l'Università di Pavia, dal 1983 come Ricercatrice, dal 1988 come Professore associato e dal marzo 2006 come Professore Straordinario di Chimica Analitica. Ha tenuto numerosi corsi di aggiornamento e di specializzazione al di fuori dell'ambito universitario e conferenze a invito su argomenti di chimica ambientale. L'attività scientifica, i cui risultati sono riportati in una settantina di pubblicazioni a stampa su riviste nazionali ed internazionali e in un centinaio di comunicazioni a congressi, riguarda principalmente la determinazione e la speciazione di metalli in matrici ambientali quali acque e aria. Su tali argomenti ha collaborato anche con gruppi di ricerca Stranieri (Universitat Politecnica de Catalunya). Recentemente si occupa della preparazione e caratterizzazione di elettrodi modificati (SAM) mediante assemblaggio su superfici d'oro di monostrati di tioli e di nanotubi al carbonio, opportunamente funzionalizzati per la determinazione di metalli in acque naturali a diversa salinità. Partecipa con altri gruppi di ricerca dell'Università di Pavia in un progetto riguardante l'impiego di nanotubi al carbonio opportunamente derivatizzati e chimicamente caratterizzati, da impiegare per il rilascio di farmaci a cellule e organi bersaglio

Antonio Rossi (Dipartimento di Biochimica)

Professore associato di Biochimica. Ha competenze nella caratterizzazione biochimica e molecolare delle proteine della matrice extracellulare in condizioni normali e in patologie ereditarie che coinvolgono la cute, la cartilagine e l'osso. Tali studi sono mirati sia a chiarire il rapporto struttura-funzione delle proteine della matrice sia a definire la patogenesi a livello molecolare delle patologie connettivali nei tessuti citati sopra. Il gruppo di ricerca ha competenze: a) nell'allestimento di modelli di studio *in vitro* (colture cellulari); b) nell'espressione di proteine ricombinanti in sistemi procariotici ed eucariotici; c) nella generazione di modelli murini di malattie umane (topi transgenici); d) nella caratterizzazione a livello molecolare, biochimico e morfologico di tali modelli animali.

Maria Enrica Tira (Dipartimento di Biochimica)

M.Enrica Tira è nata a Cremona nel 1950 ed ha conseguito la laurea in Scienze Biologiche nel 1974 presso l'Università di Pavia con la massima votazione e lode. Titolare di assegni di ricerca dal 1975 è diventata Ricercatore nel 1980 presso il Dipartimento di Biochimica dell'Università di Pavia (sezione di Scienze). Professore Associato dal 1992 a tutt'oggi, presso la stessa sede, svolge i corsi di Enzimologia per studenti in Scienze Biologiche e Biotecnologie, di Chimica Biologica per le lauree di area Chimica, di Biochimica Medica per la laurea Magistrale in Biologia Umana e scienze Biomediche e di Biochimica Generale per la Scuola di Specializzazione in Biochimica Clinica. Nel suo lavoro scientifico M. Enrica Tira si è occupata di macromolecole della matrice extracellulare, in particolare di proteoglicani, in condizioni normali e patologiche, delle loro interazioni con il collagene e dei loro ruoli cellulari (agonisti piastrinici e mediatori di proliferazione cellulare). Ha fatto parte di UR nell'ambito di programmi Murst 40% e 60% e nel 2003, 2005 e 2007 è stata Responsabile Scientifico di Unità Operativa. E' membro della Società Italiana per lo Studio del Connettivo (SISC) e della Società Italiana di Biochimica (SIB).

Mauro Torti (Dipartimento di Biochimica)

Il prof. Torti ha conseguito comprovate competenze ed esperienze scientifiche nell'ambito della tematica della trasduzione del segnale e della comunicazione intercellulare attraverso anni di lavoro e studio sui meccanismi biochimici e molecolari della funzionalità delle piastrine circolanti. In particolare i suoi interessi di ricerca hanno riguardato principalmente i seguenti aspetti: studio dei meccanismi di riorganizzazione del citoscheletro piastrinico e della interazione di proteine coinvolte nella traduzione del segnale con i filamenti di actina; meccanismi biochimici per l'attivazione e regolazione delle proteine GTP-leganti a basso peso molecolare Rap1B e Rap2B; ruolo del recettore P2Y₁₂ dell'ADP accoppiato alla proteina Gi nell'attivazione piastrinica; meccanismi di controllo dell'attivazione delle protein chinasi e dei processi di fosforilazione in tirosina; analisi dei processi di trasduzione del segnale innescati dal legame del fattore von Willebrand al recettore piastrinico GPIIb-IX-V; ruolo della fosforilazione ed attivazione degli immunorecettori contenenti sequenze ITAM; processi di trasduzione del segnale innescati dall'adesione piastrinica mediata dalle integrine $\alpha 2 \beta 1$ e $\alpha \text{IIb} \beta 3$. Analisi biochimica della funzionalità e del citoscheletro di piastrine di pazienti affetti da macrotrombocitopenia ereditaria causata da mutazioni del gene per la catena pesante della miosina non muscolare IIA; caratterizzazione dei megacariociti differenziati da cellule staminali da sangue di cordone o sangue periferico come modello per lo studio della funzionalità piastrinica. Studio



del metabolismo della proteina precursore di amiloide nelle piastrine quiescenti e stimulate. Le competenze ed esperienze maturate attraverso questi studi sono documentate dalle pubblicazioni su riviste scientifiche internazionali.

Livia Visai (Centro di Ingegneria Tissutale, CIT).ù

Ha conseguito la laurea con lode in Scienze Biologiche nel 1985. Nel periodo 1985-1987 ha lavorato alla University of Alabama a Birmingham sul problema della adesione batterica alle proteine della matrice extracellulare (ECM). Dal 1994 è ricercatrice presso la facoltà di Medicina dell'Università di Pavia. Nel 2001 ha trascorso alcuni mesi al "Center for Extracellular Matrix Biology" at the Institute of Biosciences and Technology of the Texas A&M University System Health Science Center, Houston, Texas (U.S.A.). E' membro del consiglio direttivo della Società Italiana di Biomateriali e vicedirettore del CIT. Dal 2006 è anche componente dell'Editorial Board di "The Open Biomedical Engineering Journal". I principali interessi scientifici di Livia Visai sono: a) analisi delle proprietà biochimiche ed immunologiche dell'adesione batterica alla ECM; b) l'interazione di biomateriali con cellule eucariotiche come osteoblasti, fibroblasti, piastrine e macrofagi umani (studi di biocompatibilità e tossicità); c) studi di infezioni batteriche (*S.aureus*, *S.epidermidis* e *E.coli*) su biomateriali e strategie per evitare tali infezioni. E' titolare di 6 brevetti internazionali.

Orsetta Zuffardi (Dipartimento di Patologia Umana)

Professore ordinario di Genetica medica della Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università degli Studi di Pavia, dirige la Scuola di specialità in Genetica medica. E' stata Presidente dell'Associazione italiana di Citogenetica umana e consigliere della Società italiana di Genetica medica. Fa parte dell'editorial board di "Prenatal Diagnosis". E' editor dell'"European Journal of Human Genetics". Gli interessi di ricerca della prof.ssa Zuffardi riguardano principalmente la citogenetica umana con riferimento, ad esempio, ai meccanismi di formazione di riarrangiamenti complessi, all'associazione tra geni recettori dell'olfatto e riarrangiamenti cromosomici ricorrenti, alla presenza di fattori di suscettibilità che favoriscono alla meiosi il formarsi di anomalie cromosomiche sbilanciate.

10 - Pubblicazioni scientifiche più significative dei coordinatori della ricerca (max. 10) e dei gruppi partecipanti (max. 20 in totale)

(In ordine cronologico inverso e pubblicate dal 2002 in poi)

Elena Giulotto

1. Wade CM, Giulotto E, Sigurdsson S, Zoli M, Gnerre S et al. Genome sequence, comparative analysis and population genetics of the domestic horse (*Equus caballus*). *Science* (2009) 6 Nov in press.
2. Nergadze SG, Farnung BO, Wischniewski H, Khorauli L, Vitelli V, Chawla, Giulotto E, Azzalin C. CpG island promoters drive transcription of human telomeres. *RNA* (2009) Oct 22 [Epub ahead of print].
3. Salzano A, Kochiashvili N, Nergadze SG, Khorauli L, Smirnova A, Ruiz-Herrera A, Mondello C, Giulotto E. Enhanced gene amplification in human cells knocked down for DNA-PKcs. *DNA Repair* (2009) 8, 19-28.
4. Azzalin C.M, Reichenbach P, Khorauli L, Giulotto E, Lingner J. Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends. *Science* (2007) 318, 789-801.
5. Nergadze S.G, Santagostino M, Salzano A, Mondello C, Giulotto E.. Contribution of telomerase RNA retrotranscription to DNA double-strand break repair during mammalian genome evolution. (2007) *Genome Biology* 8, R260.
6. Rebuzzini P, Martinelli P, Blasco M, Giulotto E, Mondello C. Inhibition of gene amplification in telomerase deficient immortalized mouse embryonic fibroblasts. *Carcinogenesis* (2007) 28:553-9.
7. Carbone L, Nergadze S.G, Magnani E, Misceo D, Cardone M.F, Roberto R, Bertoni L, Attolini C, Piras M.F, De Jong P, Raudsepp T, Chowdhary B.P, Guerin G, Archidiacono N, Rocchi M, Giulotto E.. Evolutionary movement of centromeres in horse, donkey, and zebra. (2006) *Genomics* 87, 777-782.
8. Rebuzzini P, Khorauli L, Azzalin C.M, Magnani E, Mondello C, Giulotto E.. New mammalian cellular systems to study mutations introduced at the break site by non-homologous end-joining. (2005) *DNA Repair* 4,546-555.



FONDAZIONE
ALMA MATER TICINENSIS

9. Zongaro S, de Stanchina E, Colombo T, D'Incalci M, Giulotto E, Mondello C. Stepwise neoplastic transformation of a telomerase immortalized fibroblast cell line. *Cancer Res* (2005) 65:11411-8.
10. Nergadze S.G, Rocchi M, Azzalin C.M, Mondello C, Giulotto E. (2004). Insertion of telomeric repeats at intrachromosomal break sites during primate evolution. *Genome Research* 14, 1704-1710.

Piercarlo Mustarelli

1. Enrica Saino, Valentina Maliardi, Eliana Quartarone, Lorenzo Fassina, Laura Benedetti, Maria Gabriella Cusella De Angelis, Piercarlo Mustarelli, Livia Visai, *In vitro* enhancement of calcified matrix deposition by SAOS-2 cells onto 3D titanium scaffolds bioglass-coated by r.f. magnetron sputtering, *Tissue Engineering*, in press.
2. T. Coccini, E. Roda, D.A. Sarigiannis, P. Mustarelli, A. profumo, L. Manzo, The degree of functionalization affects in vitro cytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes (CNTs), *Toxicology Letters*, 189 (2009) S183-S184.
3. M. Bini, S. Grandi, D. Capsoni, P. Mustarelli, E. Saino, L. Visai, SiO₂-P₂O₅-CaO glasses and glass-ceramics with and without ZnO: relationships among composition, microstructure and bioactivity, *Journal of Physical Chemistry C*, 113(20) (2009) 8821-8828.
4. Maurizio Fagnoni, Antonella Profumo, Daniele Dondi, Daniele Merli, Piercarlo Mustarelli, and Eliana Quartarone, Water miscible liquid multi-walled carbon nanotubes, *Advanced Materials* 21 (2009) 1761-1765.
5. Laura Linati, Gigliola Lusvardi, Gianluca Malavasi, Ledi Menabue, M. Cristina Menziani, Piercarlo Mustarelli, Alfonso Pedone and Ulderico Segre, Medium range order in phospho-silicate bioactive glasses: insights from MAS-NMR spectra, chemical durability experiments and molecular dynamics simulations, *Journal of Non-Crystalline Solids* 354 (2008) 84-89.
6. E. Roda E, A.F. Castoldi, T. Coccini T, P. Mustarelli, E. Quartarone, A. Profumo, D. Merli, M. Fagnoni, L. Manzo, In vitro toxicity assessment of single- and multi-walled carbon nanotubes in human astrocytoma and lung carcinoma cells, *Toxicology Letters*, 172 (2007) S235-S236.
7. L. Linati, G. Lusvardi, G. Malavasi, L. Menabue, M.C. Menziani, P. Mustarelli, U. Segre, Qualitative and Quantitative Structure-Property Relationships (QSPR) analysis of multicomponent potential bioglasses, *Journal of Physical Chemistry B*, 109 (2005) 4989-4998.

Pubblicazioni dei partecipanti

1. F. De Angelis, G. Das, P. Candeloro, M. Patrini, M. Galli, A. Bek, M. Lazzarino, I. Maksymov, C. Liberale, L. C. Andreani, E. Di Fabrizio, Nanoscale chemical mapping using three-dimensional adiabatic compression of surface plasmon polaritons, *Nature Nanotechnology*, in press (2009).
2. Karytinis, A., Forneris, F., Profumo, A., Ciossani, G., Battaglioli, E., Binda, C., Mattevi, A. (2009) A novel mammalian flavin-dependent histone demethylase. *J. Biol. Chem.*, 284, 17775-17782.
3. Panaroni C, Gioia R, Lupi A, Besio R, Goldstein SA, Kreider J, Leikin S, Vera JC, Mertz EL, Perilli E, Baruffaldi F, Villa I, Farina A, Casasco M, Cetta G, Rossi A, Frattini A, Marini JC, Vezzoni P, Forlino A. In utero transplantation of adult bone marrow decreases perinatal lethality and rescues the bone phenotype in the knockin murine model for classical, dominant osteogenesis imperfecta. *Blood*. 2009 Jul 9;114(2):459-68.
4. Gresele P., Falcinelli E., Giannini S., D'Adamo P., D'Eustacchio A., Corazzi T., Mezzasoma AM, Di Bari F., Guglielmini G., Cecchetti L., Noris P., Balduini, C.L., Savoia A., Dominant inheritance of a novel integrin beta(3) mutation associated with a hereditary macrothrombocytopenia and platelet dysfunction in two Italian families, *HAEMATOLOGICA-THE HEMATOLOGY JOURNAL* 94 (2009) 663-669.
5. Pallavicini P, Diaz-Fernandez YA, Pasotti L, Micelles as nanosized containers for the self-assembly of multicomponent fluorescent sensors, *Coordination Chemistry Reviews*, 253, 2226-2240 (2009).
6. Manterola M, Page J, Vasco C, Berrios S, Parra MT, Viera A, Rufas JS, Zuccotti M, Garagna S, Fernández-Donoso R.:A high incidence of meiotic silencing of unsynapsed chromatin is not associated with substantial pachytene loss in heterozygous male mice carrying multiple simple robertsonian translocations. *PLoS Genet*. 2009 Aug;5(8):e1000625.



FONDAZIONE
ALMA MATER TICINENSIS

7. Canobbio I, Stefanini L, Cipolla L, Ciraolo E, Gruppi C, Balduini C, Hirsch E, Torti M. Genetic evidence for a predominant role of PI3Kbeta catalytic activity in ITAM- and integrin-mediated signaling in platelets. *Blood*. 2009, 114:2193.
8. Zuccotti M, Merico V, Sacchi L, Bellone M, Brink TC, Stefanelli M, Redi CA, Bellazzi R, Adjaye J, Garagna S. Oct-4 regulates the expression of Stella and Foxj2 at the Nanog locus: implications for the developmental competence of mouse oocytes. *Hum Reprod*. 2009 Sep;24(9):2225-37.
9. Rebuzzini P., Neri T., Mazzini G., Zuccotti M., Redi C.A., Garagna S.: Karyotype analysis of the euploid cell population of a mouse embryonic stem cell line revealed a high incidence of chromosome abnormalities that varied during culture. *Cytogenetics and Genome Research* 121: 18-24, 2008.
10. Lavatelli F, Perlman DH, Spencer B, Prokayeva T, McComb ME, Théberge R, Connors LH, Bellotti V, Seldin DC, Merlini G, Skinner M, Costello CE. Amyloidogenic and associated proteins in systemic amyloidosis proteome of adipose tissue. *Mol Cell Proteomics*. 2008 Aug;7(8):1570-83.
11. F. De Angelis, M. Patrini, G. Das, I. Maksymov, M Galli, L. Businaro, L.C. Andreani, E. Di Fabrizio, A hybrid plasmonic-photonic nanodevice for label-free detection of a few molecules, *Nano Letters* 8, 2321 (2008).
12. Ami D, Neri T, Natalello A, Mereghetti P, Doglia SM, Zanoni M, Zuccotti M, Garagna S, Redi CA.: Embryonic stem cell differentiation studied by FT-IR spectroscopy. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Jan;1783(1):98-106.
13. Binda, C., Wang, J., Li, M., Hubalek, F., Mattevi, A., Edmondson, D.E. (2008). Structural and mechanistic studies of arylalkylhydrazine inhibition of human monoamine oxidases A and B. *Biochemistry*, 47, 5616-5625.
14. Relini A, De Stefano S, Torrassa S, Cavalleri O, Rolandi R, Gliozzi A, Giorgetti S, Raimondi S, Rossi A, Stoppini M, Bellotti V. Heparin strongly enhances the formation of beta2-microglobulin amyloid fibrils in the presence of type I collagen. *J Biol Chem*. 2008 Feb 22;283(8):4912-20.
15. Sweeney SM, Orgel JP, Fertala A, McAuliffe JD, Turner KR, Di Lullo GA, Chen S, Antipova O, Perumal S, Alakokko L, Forlino A, Cabral WA, Barnes AM, Marini JC, San Antonio JD. Candidate cell and matrix interaction domains on the collagen fibril, the predominant protein of vertebrates. *J Biol Chem*. 2008, 283:283.
16. L. Fassina *et al.* Electromagnetic enhancement of a culture of human SAOS-2 osteoblasts seeded onto titanium fiber-mesh scaffolds. *JOURNAL OF BIOMATERIALS RESEARCH*, 87(3), 750-759, 2008.
17. Guidetti GF, Lova P, Bernardi B, Campus F, Baldanzi G, Graziani A, Balduini C, Torti M. The Gi-coupled P2Y12 receptor regulates diacylglycerol-mediated signaling in human platelets. *J Biol Chem*. 2008, 283:28795-805.
18. Dember LM, Hawkins PN, Hazenberg BP, Gorevic PD, Merlini G, Butrimiene I, Livneh A, Lesnyak O, Puéchal X, Lachmann HJ, Obici L, Balshaw R, Garceau D, Hauck W, Skinner M; Eprodisate for AA Amyloidosis Trial Group. Eprodisate for the treatment of renal disease in AA amyloidosis. *N Engl J Med*. 2007 Jun 7;356(23):2349-60.
19. C. Liberale, P. Minzioni, F. Bragheri, F. De Angelis, E. Di Fabrizio, I. Cristiani, Miniaturized all-fibre probe for three-dimensional optical trapping and manipulation", *Nature Photonics* 1, 723 (2007)
20. Pepys MB, Hirschfield GM, Tennent GA, Bellotti V, Hawkins PN, Myers RM, Smith MD, Polara A, Cobb AJ, Ley SV, Aquilina JA, Robinson CV, Sharif I, Gray GA, Sabin CA, Jenvey MC, Kolstoe SE, Thompson D, Wood SP, Targeting C-reactive protein for the treatment of cardiovascular disease. *Nature*. 2006 Apr 27;440(7088):1217-21.

11 - Elenco delle Unità di Ricerca (UR)

n°	Cognome e Nome	Qualifica	Istituzione	Dipartimento	Mesi/uomo
1	VITTORIO BELLOTTI	PO	UNIPV	Biochimica	2
2	GIAMPAOLO MERLINI	PO	"	Biochimica	2
3	CARLO BALDUINI	PO	"	Medicina Interna	2
4	ORSETTA ZUFFARDI	PO	"	Patologia umana	2
5	MAURO TORTI	PO	"	Biochimica	2
6	ELENA GIULOTTO	PO	"	Genetica	2
7	ANDREA MATTEVI	PO	"	Genetica	2
8	LUIGI MANZO	PO	"	Medicina Interna	2
9	ANTONELLA PROFUMO	PO	"	Chimica Generale	2



FONDAZIONE
ALMA MATER TICINENSIS

10	BICE CONTI	PO	“	Chimica Farmaceutica	2
11	ILARIA CRISTIANI	PA	“	Elettronica	2
12	MAURIZIO FAGNONI	PA	“	Chimica Organica	2
13	PIERCARLO MUSTARELLI	PA	“	Chimica Fisica	2
14	ENRICA TIRA	PA	“	Biochimica	2
15	ANTONIO ROSSI	PA	“	Biochimica	2
16	SILVIA GARAGNA	PA	“	Biologia animale	2
17	LIVIA VISAI	RU	“	CIT	2
18	PIERSANDRO PALLAVICINI	RU	“	Chimica Generale	2
19	MADDALENA PATRINI	RU	“	Fisica “A. Volta”	2
20	ALESSANDRA BALDUINI	RU	“	Biochimica	2

12 - Breve descrizione delle Unità di Ricerca

(Max. 16.000 caratteri)

Al progetto partecipano 19 unità di ricerca afferenti a 11 Dipartimenti dell'Università di Pavia: Fisica “A. Volta”, Chimica Fisica, Chimica Generale, Chimica Organica, Elettronica, Biochimica, Chimica Farmaceutica, Genetica, Biologia Animale, Patologia Umana e Medicina Interna. Una ventesima unità di ricerca appartiene al Centro Interdipartimentale di Ingegneria Tissutale (CIT) che riunisce ricercatori di nove Dipartimenti dell'Università di Pavia. Si tratta quindi di un progetto di natura fortemente multidisciplinare e interdisciplinare che riunisce e integra competenze fisiche, chimiche, ingegneristiche, farmacologiche, biologiche e mediche. Per maggiori dettagli sulle competenze delle unità di ricerca si vedano i curricula dei responsabili di unità operativa, di seguito riportati.

Il Laboratorio di Bioinformatica Translazionale del Centro per la Comunicazione e la Ricerca del Collegio Ghislieri di Pavia, presso la sede del Castello di Lardirago, collaborerà al progetto mettendo a disposizione le proprie strutture per le attività di ricerca e formazione che riguardano gli aspetti computazionali e di analisi dati computerizzata previsti nel progetto.

13 - Obiettivi finali che il progetto si propone di raggiungere

(Max 1 pagina = 8.000 caratteri)

Il **primo generale obiettivo** del progetto consiste nella realizzazione di un approccio multidisciplinare fisico-chimico-biologico e medico per rispondere a questioni fondamentali sulla patogenesi di due malattie prototipicamente associate all'invecchiamento. La realizzazione di questo obiettivo permetterà di proporre nuove tecniche diagnostiche e di sviluppare nuovi approcci terapeutici.

Il **secondo obiettivo** strategico del progetto sarà l'orientamento e focalizzazione delle competenze scientifiche e tecnologiche dei gruppi che si occupano di nanomateriali per applicazioni biomediche verso applicazioni nel campo dell'analisi e manipolazione delle proteine responsabili delle malattie da *misfolding* proteico e delle cellule patologiche che compaiono nelle sindromi mielodisplastiche.

Obiettivo specifico della ricerca sulle malattie da *misfolding* proteico sarà la caratterizzazione strutturale e funzionale e la sensibilità ai farmaci di aggregati solubili pre-fibrillari di proteine amiloidi



che sono presumibilmente responsabili degli effetti patologici della formazione del materiale amiloide in pazienti e in modelli cellulari/pluricellulari. Ci proponiamo di verificare la potenza analitica della strumentazione microscopico-spettroscopica a disposizione della piattaforma per studiare aspetti dinamici della singola molecola proteica e degli stati aggregati minimi.

Obiettivo principale della ricerca sulle sindromi mielodisplastiche è lo sviluppo di tecnologie che permettano di isolare singole cellule e trasferirle in un ambiente in cui possa essere mimato l'ambiente naturale dove le cellule proliferano e subiscono trasformazioni tali da cambiare la loro cinetica e la trasformazione cellulare. A questo obiettivo principale si associano due obiettivi specifici che riguardano rispettivamente: 1) valutazione del ruolo di singole componenti della matrice extracellulare nella biologia delle cellule patologiche; 2) determinazione del ruolo patogenico del *background* genetico e della stabilità telomerica nella trasformazione cellulare.

14 - Stato dell'arte (Max 8.000 caratteri)

L'uomo sta diventando più longevo e nell'ultimo secolo l'aspettativa di vita è aumentata nei paesi occidentali con un'accelerazione mai vista in precedenza, così da raddoppiare dai circa quaranta anni dell'inizio del '900 ai circa ottanta dell'inizio del nuovo secolo. Anche se l'espansione della longevità è attualmente una conquista delle popolazioni della parte più ricca del pianeta, dove l'attesa di vita sopravanza di circa trent'anni quella dei paesi più poveri, il processo in corso ha un impatto globale e propone questioni fondamentali su aspetti ambientali ed economico-sociali, nonché sulla stessa qualità della vita dei singoli individui. Una conseguenza del prolungamento medio della vita è sicuramente l'espansione molto importante di patologie associate all'invecchiamento. Queste patologie sono conosciute a livello clinico da molti decenni e in passato sono state definite rare. Ora, al contrario, esse sono molto temute per l'enorme impatto socio-economico, tale da condizionare pesantemente in futuro tutte le politiche socio-sanitarie. La medicina si sta cimentando al confine tra invecchiamento fisiologico e le malattie associate all'invecchiamento, sia per distinguere le due condizioni, sia soprattutto con l'obiettivo di ritardare il processo fisiologico e curare al meglio le patologie relative. In particolare, la medicina molecolare, che nasce dalla convergenza di fisica-chimica-biologia e medicina clinica, sta acquisendo gli strumenti per distinguere le due condizioni e intervenire in modo appropriato. Proprio nelle malattie associate all'invecchiamento, la sensibilità e specificità degli strumenti di analisi e di manipolazione del sistema sono fondamentali per capire il ruolo patologico del singolo componente biologico ed evitare di interferire negativamente con elementi biologicamente predisposti a rallentare i processi degenerativi. Allo sviluppo della medicina molecolare sta contribuendo in modo sostanziale la nanotecnologia molecolare, che ha la

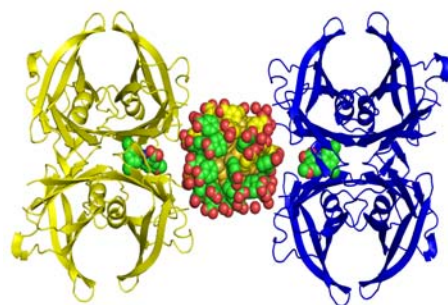


Fig 1 Complesso TTR-T4 legata a nanoparticella d'oro



FONDAZIONE
ALMA MATER TICINENSIS

capacità di creare materiali e dispositivi con precisione molecolare e di penetrare il sistema biologico, con la possibilità di studiare e manipolare la singola cellula, il singolo gene o la singola proteina. In questo contesto la nanomedicina si configura quindi come la branca della scienza più adatta per affrontare questo tipo di patologie. Nella comunità scientifica pavese sono attivi gruppi di ricerca che hanno affrontato a livello molecolare aspetti patogenetici, diagnostici e terapeutici di alcune malattie tipicamente associate ai processi di invecchiamento quali le malattie da misfolding proteico (Merlini & Bellotti N Engl J Med 2003 349:583-96.) (Bellotti V & Chiti F 2008,6:771-9.) e le malattie mielodisplastiche (Barosi G & Rosti V Barosi G, Rosti V. Curr Opin Hematol. 2009, 2:129-34.), così come esistono gruppi leader in campo internazionale su aspetti biologici-fisiologici dell'invecchiamento (Nergadze SG et al, RNA. 2009 in press) e differenziazione cellulare (Redi CA et al Endocr Dev. 2007;11:145-51.). Accanto a questi gruppi si sono affermate competenze nella preparazione e caratterizzazione di nanomateriali (Conti B et al J Morphol. 2009 in press), nelle tecnologie di analisi microscopica e spettroscopica (De Angelis F et al Nano Lett. 8:2321-7), nella preparazione di dispositivi adatti alla manipolazione di oggetti di dimensioni a livello cellulare (C. Liberale et al., Nature Photonics 2007;1:723). Molti di questi gruppi hanno già attivato un percorso di stretta collaborazione multidisciplinare nell'ambito di un progetto cofinanziato dalla Regione Lombardia (Dalla Scienza dei Materiali alla Biomedicina Molecolare), le cui attività sono ben documentate nel sito web www.unipv.it/reglom16, e che ha lo scopo di generare una forte sinergia intellettuale e tecnologica per risolvere alcuni problemi fondamentali che queste patologie propongono. Nel campo delle patologie da *misfolding* proteico e' unanimemente considerato di cruciale importanza definire la struttura e funzione di stati intermedi di associazione delle proteine aggregate (Luheshi LM Curr Opin Chem Biol. 2008,1:25-31) che contribuiscono in modo molto significativo al manifestarsi della malattia in specifici organi bersaglio (Bellotti V & Chiti F 2008,6:771-9). La definizione del meccanismo di azione patologico degli aggregati proteici solubili e bio-disponibili richiede anche una estesa caratterizzazione della matrice tissutale in cui sono situate le cellule bersaglio di queste malattie, così come la caratterizzazione di strutture macromolecolari del sistema di detossificazione che fronteggia il *misfolding* proteico e il danno ossidativo a questo correlato. L'avanzare delle conoscenze sulla struttura, funzione e metabolismo degli aggregati proteici permette di identificare nuovi punti di intervento terapeutico quali: i) la stabilizzazione da ligandi, ii) il cambiamento del metabolismo per interazione con nanoparticelle e iii) la solubilizzazione per rottura di ponti-idrogeno intermolecolari. Il contributo della nanotecnologia molecolare si concretizza nella messa a disposizione di tecniche spettroscopiche NMR e FTIR su piccoli volumi e di tecniche di microscopia ad elevata definizione (SEM, TEM e AFM). In particolare, appare prospetticamente di grande interesse l'uso della combinazione di microscopia AFM e spettroscopia Raman (Chou IH. Nano Lett. 2008, 8:1729-35) che è resa disponibile dai gruppi di area fisica afferenti al progetto. I ricercatori di area fisica, chimica e biofisica sono in grado di preparare nanoparticelle di oro o silicio con dimensioni che variano da pochi a decine di nanometri e che possono

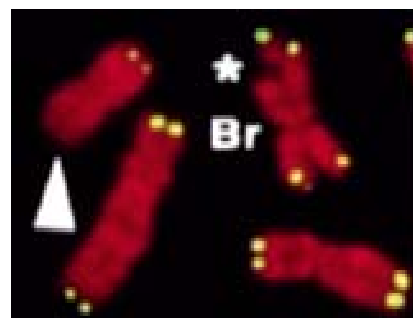


Figura 2: Instabilità telomerica indotta dall'aumento di molecole di TERRA. I telomeri sono marcati in giallo, la freccia indica la perdita di un telomero, l'asterisco una rottura.



FONDAZIONE
ALMA MATER TICINENSIS

essere facilmente ingegnerizzate così da poter diventare interattrici delle proteine patologiche per modificarne il metabolismo e i meccanismi di degradazione. Nella figura 1 è rappresentato un complesso realmente ottenuto nei nostri laboratori in collaborazione con UCL di Londra tra la proteina amiloidogenica transtiretina e una nanoparticella di oro (fornita dal Prof Kornberg) ingegnerizzata con un ligando della transtiretina, così da costituire una forma ottamerica rapidamente degradabile e detossificabile dall'organismo.

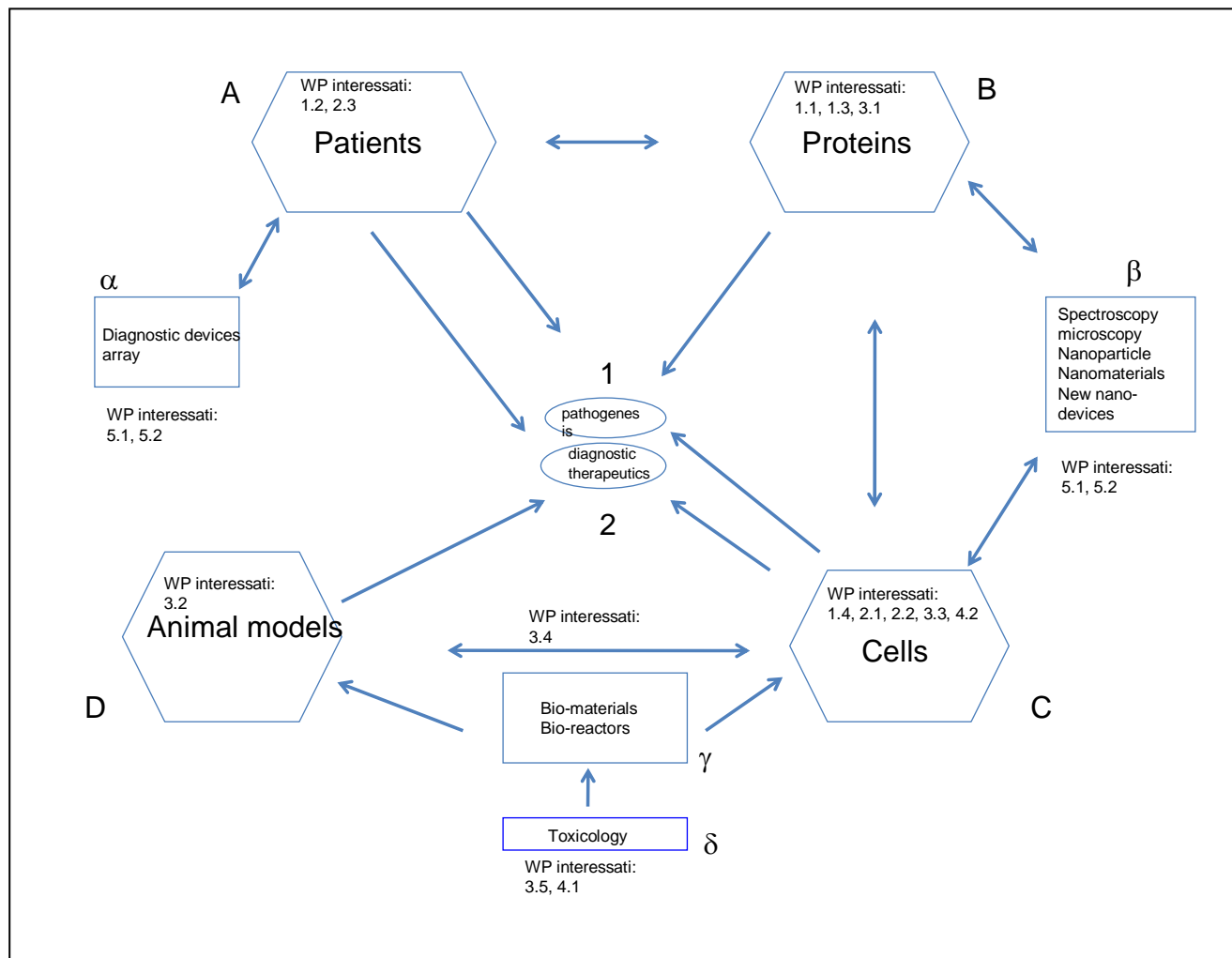
Le sindromi mielodisplastiche (MDS) costituiscono il secondo tipo di patologie su cui si concentrerà il progetto e rappresentano un modello diverso, e complementare al primo, di malattia associata all'invecchiamento. Infatti, tale patologia è concentrata nella fascia di età tra i 60 e i 75 anni e ha come fenotipo biologico un'abnorme proliferazione cellulare. La malattia nasce da una successione e accumulo di eventi molecolari complessi a carico di geni coinvolti nel controllo del ciclo cellulare, nel riparo del DNA, nella stabilità dei telomeri, e nella differenziazione e maturazione cellulare. Alcuni dei fattori associati all'invecchiamento fisiologico sono anche coinvolti nello sviluppo delle sindromi mielodisplastiche e si deve ipotizzare che eventi più specificamente legati all'invecchiamento fisiologico o alle MDS condizionino selettivamente lo svilupparsi delle due condizioni. Per scoprire e caratterizzare questi eventi è necessario accedere ad ampie e ben caratterizzate casistiche cliniche, quali quella allestita dal prof. Gianni Barosi che gestisce il registro italiano delle mielofibrosi e metaplasia mieloide e che parteciperà al progetto. Altro strumento fondamentale di lavoro è la disponibilità di un modello cellulare semplificato su cui studiare gli eventi molecolari patologici: tale modello può essere fornito dal sistema della megacariocitopoiesi e produzione piastrinica. La disponibilità di un modello cellulare in coltura e cellule emopoietiche direttamente prelevate da pazienti permette di studiare una delle problematiche fondamentali che riguarda la relazione tra matrice extracellulare (ECM) del sistema midollare e le metalloproteasi che ne rimodellano la struttura e la proliferazione e differenziazione cellulare. Il gruppo proponente questa ricerca include alcuni ricercatori che sono leader internazionali nello studio strutturale e funzionale delle ECM e sarà pertanto possibile affrontare il ruolo delle modificazioni della ECM associate all'*aging* nel condizionare l'annidamento cellulare sulla matrice e la capacità della matrice di accumulare e rilasciare in dosi efficaci le citochine necessarie alla fisiologica proliferazione e differenziazione cellulare. Su un modello in vitro che mima la struttura stromale del midollo osseo che è utilizzabile nella nostra piattaforma tecnologica sarà possibile studiare il differenziamento dei megacariociti e la formazione delle piastrine partendo da cellule embrionali staminali (ES) e da cellule staminali pluripotenti indotte (iPS) derivate da pazienti affetti da MDS.

(vedi pagina seguente)

15 - Articolazione del progetto e tempi di realizzazione

(Max 16.000 caratteri)

Lo schema generale del progetto è riportato in Figura 1.



Al centro dello schema sono posti gli obiettivi principali del progetto: 1) apportare un contributo alle conoscenze sulla patogenesi di alcune patologie associate all'invecchiamento fisiologico; 2) sviluppare nuovi strumenti diagnostici e terapeutici.

Il progetto si realizza attraverso 4 attività principali nei seguenti settori:

- A) ricerca clinica su pazienti affetti da patologie “prototipo” associate all'invecchiamento;
- B) studi di struttura e funzione di proteine coinvolte nei meccanismi patogenetici di queste malattie;
- C) biologia delle cellule implicate nella malattia e potenziale uso terapeutico di cellule manipolate in vitro;



FONDAZIONE
ALMA MATER TICINENSIS

D) sviluppo di sistemi biologici complessi, intesi come modelli di malattia, per studi pre-clinici.

Le 4 attività medico-biologiche sono strutturate in programmi specifici di lavoro (*Workpackage*, WP, vedi seguito) che si integrano reciprocamente e sono sostenute da una piattaforma tecnologica costituita da 4 azioni, anch'esse strutturate in WP:

α) nanomateriali e microelettronica nello sviluppo di nuovi strumenti diagnostici e terapeutici associati alle genomica e proteomica, a supporto principalmente dell'attività A;

β) Spettroscopia e microscopia di (nano)materiali organici e biologici a supporto principale di B e C;

γ) Nuovi nanomateriali e bio-ingegneria per lo sviluppo di bio-reattori e riparazione di tessuti a supporto principale delle attività C e D;

δ) Farmacologia e tossicologia dei prodotti di possibile uso clinico, a supporto delle attività pre-cliniche C e D.

Il progetto è strutturato nei seguenti WP, a loro volta suddivisi in *task*:

Workpackage 1 – Malattie da misfolding proteico

1. Basi molecolari delle malattie da misfolding e studio di nuovi approcci terapeutici
2. Ricerche traslazionali nelle malattie da *misfolding*
3. Espressione genica in neuroni riprogrammati da cellule iPS ottenute da fibroblasti di pazienti affetti da patologie neurodegenerative
4. *Target* farmacologici per malattie neurologiche e dell'invecchiamento
5. Le piastrine come modello di studio della malattia di Alzheimer

Workpackage 2 – Malattie ematologiche

1. Modelli per lo studio del differenziamento cellulare e delle sue alterazioni nell'invecchiamento
2. Cellule staminali pluripotenti: cellule embrionali staminali (ES) e “induced pluripotent stem-cell” (iPS)
3. Sindromi mieloproliferative e mielodisplasiche: individuazione di farmaci attivi sulla piastrinopoiesi

Workpackage 3 – Modelli animali e cellulari

1. Modificazioni dei componenti della matrice extracellulare nell'invecchiamento
2. Modelli animali di displasie scheletriche
3. Biologia dei telomeri nell'invecchiamento
4. Ingegneria tissutale
5. Modelli per lo studio della permeabilità e della funzione della barriera emato-encefalica

Workpackage 4 – Biosicurezza

1. Tossicità generale e organo-specifica; biocompatibilità
2. Modelli cellulari: piastrine, eritrociti, leucociti, megacariociti, preparati di cellule di derivazione nervosa, cellule del midollo emopoietico, modelli in vitro di cellule implicate nelle funzioni di biobarriera (ematoencefalica, cute, microcircolo cerebrale)

Workpackage 5 – Piattaforma tecnologica

1. Sviluppo di materiali micro- e nano strutturati e loro interazioni con strutture biologiche
2. Diagnostica avanzata mediante materiali micro- e nano strutturati e tecniche biofotoniche



Il progetto ha durata biennale. Occorre sottolineare che il progetto viene presentato con la logica del *seed*: la sua complessità è infatti tale da non rendere possibile la completa realizzazione nell'arco temporale e con il livello di finanziamento previsti dal bando. L'intenzione è quindi quella di utilizzare il finanziamento Alma Mater come base per la creazione di un pool di ricerca dedicato – attraverso l'attribuzione di assegni di ricerca o posizioni equivalenti – ed eventualmente come base per l'acquisizione di attrezzature e strumentazione di ricerca di uso comune. Questo finanziamento seed verrà utilizzato come piattaforma per la ricerca di fondi extramoenia (es.: Regione Lombardia, EU, etc.) per la realizzazione dell'intero progetto.

16 – Descrizione del progetto con particolare riferimento al ruolo di ciascuna unità operativa in funzione degli obiettivi previsti e relative modalità di integrazione e collaborazione, nonché ai risultati attesi dalla ricerca, il loro interesse per l'avanzamento della conoscenza e le eventuali potenzialità applicative
(Max 32.000 caratteri)

Il ruolo di ciascuna unità operativa e le modalità di collaborazione vengono riportati con riferimento alla struttura dei singoli WP.

Workpackage 1 – Malattie da misfolding proteico

In questo WP sono contenute le attività riguardanti aspetti di Genetica-Biochimica-Biologia Strutturale e Patologia Clinica delle malattie degenerative causate da *misfolding* proteico.

1.1 Basi molecolari delle malattie da *misfolding* e studio di nuovi approcci terapeutici (Bellotti)

Questo *task* si occuperà dell'inquadramento biochimico dei risultati ottenuti dagli studi clinici e genetici e contribuirà alla caratterizzazione chimica e microscopica dei depositi amiloidi naturali identificati in pazienti colpiti da varie forme di amiloidosi sistemica e che verranno forniti dal gruppo Merlini. La identificazione dei costituenti naturali dei depositi patologici è essenziale per riprodurre modelli sperimentali di malattia compatibili con le condizioni fisico-chimiche dei tessuti in cui la malattia si manifesta naturalmente. Poiché il deposito amiloide si concentra nello spazio interstiziale tissutale, la nostra attività sarà focalizzata sulla messa a punto di un sistema *in vitro* che contenga macromolecole costitutive della matrice extracellulare come le proteine fibrose (ad esempio collagene ed elastina), proteoglicani e glicosaminoglicani. Per questa attività sono previste intense collaborazioni con le attività del WP 3. Quando un modello di fibrillogenesi, biologicamente compatibile, sarà stato messo a punto per alcune delle proteine che stiamo studiando (β 2-m, catene leggere monoclonali, apolipoproteina A-I), proprio questo sistema diventerà uno strumento fondamentale per separare biochimicamente gli eventi responsabili dello sviluppo della malattia e per scoprire nuovi farmaci. L'analisi microscopica e spettroscopica della singola molecola esposta a eventi pro-amiloidogenici verrà condotta con le tecnologie messe a disposizione nel WP 5. Il progetto prevede anche la messa a punto del sistema di deposizione di fibre amiloidi di β 2-m nel modello del C-elegans che rappresenta oggi uno dei sistemi pluricellulari in cui le malattie associate all'invecchiamento e alla deposizione di materiale amiloide



sono meglio studiate. Questo modello è in fase avanzata di realizzazione in collaborazione con l'Istituto Carlo Besta di Milano, che lo utilizzerà come modello di malattia di Alzheimer, e con l'Istituto Mario Negri di Milano che ha già messo a disposizione del progetto nuove molecole ad attività anti-amiloidogena di potenziale applicazione terapeutica.

1.2 Ricerche traslazionali nelle malattie da misfolding (Merlini)

Questo *task* si occuperà di aspetti clinico-patologici, mettendo a disposizione del progetto una vasta casistica clinica raccolta dal centro di riferimento nazionale per la cura delle amiloidosi (<http://www.amiloidosi.it/>) e completerà la realizzazione di una bio-banca che raccolga fluidi biologici, cellule e tessuti di pazienti con amiloidosi sistemica. Questo materiale biologico è essenziale per studiare le basi molecolari del tropismo d'organo e della citotossicità indotta dall'amiloidosi. Grazie a proteine naturali ottenute dai pazienti a scopo diagnostico, verranno utilizzate tecniche di proteomica per studiare le interazioni tra le proteine amiloidogeniche ed i costituenti dei tessuti, in quanto tali interazioni potrebbero essere alla base della specificità tissutale della malattia che attualmente è imprevedibile. La metabonomica tissutale, condotta su prelievi biotici diagnostici, darà informazioni sulle alterazioni metaboliche che si associano alla deposizione di amiloide e contribuirà alla comprensione dei meccanismi coinvolti nella disfunzione tissutale. Gli stessi metodi saranno impiegati nello studio di un modello murino di cardiomiopatia amiloidotica causata da apolipoproteina AII. In questo modello, la deposizione di amiloide (tropismo tissutale) non si associa a disfunzione d'organo. L'analisi comparativa dei dati proteomici potrebbe facilitare l'identificazione di fattori coinvolti nella tossicità tissutale. Il miglioramento della conoscenza su questi due fondamentali fattori patogenici (tropismo tissutale e tossicità tissutale) aiuterà ad indirizzare lo sviluppo di nuove terapie. Inoltre, l'analisi proteomica dei tessuti infiltrati da amiloide permetterà di migliorare le tecniche per l'identificazione delle proteine amiloidogeniche a scopi diagnostici. La caratterizzazione biochimica clinica e proteomica dei singoli pazienti sarà arricchita da analisi genetiche, sia sui geni malattia, sia su geni potenzialmente coinvolti nella protezione-accelerazione della malattia.

1.3 Espressione genica in neuroni riprogrammati da cellule iPS ottenute da fibroblasti di pazienti affetti da patologie neurodegenerative (Zuffardi)

La diagnosi molecolare è considerata di primaria importanza per definire categorie di pazienti relativamente omogenee per difetto genetico e per studiare tali pazienti in tutte le loro sfaccettature cliniche e comportamentali a differenti età. A sua volta, ciò rende possibile una più consapevole gestione del paziente. Un altro punto importante è la possibilità di riprodurre la lesione genetica nei modelli animali in modo da evidenziare i *pathway* cellulari alterati e le possibili vie di approccio terapeutico. Fino ad ora l'approccio al rilevamento di mutazioni in patologie geneticamente eterogenee si è essenzialmente basato sul sequenziamento degli esoni associati a quella malattia, iniziando dal gene più frequentemente coinvolto nella popolazione in studio. Il *Next Generation Sequencing* permette di interrogare grosse porzioni di genoma e trascrittoma in tempi rapidi e a costo accettabili permettendo l'indagine contemporanea di tutti i geni le cui mutazioni sono associate a una certa malattia. Al fine di eseguire tale sequenziamento (*massively parallel sequencing*) nei geni associati alla malattia di Parkinson (PD) e di Alzheimer (AD), oggetto di questo studio, sarà eseguito un "exons partitioning". Questo metodo consiste nell'isolare specifici segmenti genomici che verranno sequenziati. Una libreria



FONDAZIONE
ALMA MATER TICINENSIS

di oligonucleotidi di RNA per target specifici verrà generata in modo da produrre sonde che catturino i segmenti di DNA genomico ad esse complementari (RNA capture probes; SureSelect, Agilent Technologies; Gnirke et al, 2009). Nel frattempo, i campioni genomici saranno frammentati casualmente e i frammenti con dimensioni di circa 300-400 paia di basi saranno legati ad adattori della ditta Illumina e poi amplificati. Il DNA legato agli adattatori verrà ibridato alle sonde di RNA biotinilate (baits) per la cattura dei target in soluzione. Questi “baits” saranno legati a beads magnetizzate ricoperte di streptavidina, a loro volta catturate attraverso un magnete. Il DNA arricchito per le regioni selezionate sarà sequenziato con l'uso dell'Illumina Genome Analyzer IIx (Solexa). Questo approccio consente di analizzare 4-5 Mb di DNA per volta. In questo modo noi dovremmo essere in grado di sequenziare tutti gli esoni dei geni selezionati in una singola corsa con un costo totale di circa 2400 euro per paziente, costo molto più conveniente rispetto al sequenziamento convenzionale. Ovviamente, tutte le sequenze di DNA saranno allineate all'assemblaggio genomico umano di riferimento (build 36.1, hg18) tramite appositi software gestiti dal team bioinformatico che lavora in stretto contatto con il gruppo. Le eventuali mutazioni puntiformi identificate saranno validate attraverso il sequenziamento convenzionale. Uno screening convenzionale su un numero adeguato di controlli convaliderà le nuove presunte mutazioni. I geni che intendiamo analizzare sono i seguenti: PARK1-3, PARK5-13 per PD e NCSTN, APP, AD2-4 e l' allele APOE per AS. Counseling genetico pre- and post-test sarà effettuato in tutti i pazienti; l'estensione delle indagini genetiche ai familiari asintomatici potrà essere effettuata ma solo in accordo alle linee-guida delle patologie neurodegenerative a esordio tardivo.

1.4 Target farmacologici per malattie neurologiche e dell'invecchiamento (Mattevi)

Questo *task* contribuirà alla definizione a livello atomico delle strutture proteiche bio-attive nella malattia che progressivamente verranno identificate attraverso le analisi istopatologiche-, genetiche e biochimiche. Il gruppo continuerà inoltre il suo impegno nella caratterizzazione strutturale delle monoammina ossidasi eucariotiche (MAO) che catalizzano la deaminazione ossidativa di ammine aromatiche primarie e secondarie ad imine, con la concomitante riduzione di ossigeno a perossido di idrogeno. Nei mammiferi sono state identificate due isoforme di questo enzima rispettivamente codificate da due prodotti genici chiamati MAO A e MAO B. Il ruolo fisiologico delle MAO dipende dalla natura dei loro substrati. I substrati della MAO B sono la benzilammina, feniletilammina e la 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP), mentre la serotonina è un substrato specifico della MAO A. La dopamina e l'epinefrina sono ossidate da entrambi gli enzimi con la stessa efficienza. Le MAO sono coinvolte in patologie neuronali quali il morbo di Parkinson e sono bersagli riconosciuti per il trattamento di queste patologie. Ci si propone di chiarire il meccanismo della specificità d'interazione con farmaci per ciascun isoenzima MAO. A questo scopo, si intende risolvere la struttura tridimensionale della MAO A umana al fine di svolgere uno studio comparativo con la già esistente struttura della MAO B risolta nel laboratorio del responsabile. Questo, insieme all'analisi che ci si propone di eseguire sui complessi tra la MAO B e suoi inibitori, permetterà di comprendere gli elementi stereochimici che determinano le rilevanti differenze farmacologiche tra le isoforme A e B.

1.5 Le piastrine come modello di studio della malattia di Alzheimer (Torti)

Questo *task* utilizzerà molte delle informazioni e tecnologie sopra descritte per studiare un modello cellulare semplice di secrezione di proteina amiloide (il peptide Ab 1-40). Le piastrine circolanti



FONDAZIONE
ALMA MATER TICINENSIS

rappresentano un eccellente modello per lo studio dei meccanismi alla base dell'insorgenza della malattia di Alzheimer, ed è in fase avanzata di realizzazione una metodologia che permette di indagare la regolazione del metabolismo della proteina precursore di amiloide (APP) nelle piastrine circolanti, di pazienti con diverso *background* genetico, al fine di individuare le specifiche condizioni che regolano l'equilibrio della proteolisi di APP attraverso la via amiloidogenica piuttosto che attraverso la via non-amiloidogenica. Le piastrine non solo rappresentano la principale fonte del peptide A β e di sAPPa nel sistema vascolare, ma il metabolismo di APP è fortemente alterato durante la progressione della malattia di Alzheimer, in modo analogo a quando riscontrato nei neuroni. Inoltre, il peptide A β rilasciato dalle piastrine è stato anche riscontrato accumularsi significativamente nelle placche aterosclerotiche. Pertanto analizzeremo come l'interazione delle piastrine con le principali componenti della matrice extracellulare possa influenzare il metabolismo di APP, attraverso la misurazione del rilascio dei frammenti sAPPa o A β , markers della via non-amiloidogenica ed amiloidogenica, rispettivamente. Questa analisi verrà condotta su piastrine adese a vari tipi di collagene, al fattore von Willebrand, al fibrinogeno, alla fibronectina ed alla laminina, le principali componenti della matrice sottoendoteliale. Potranno anche venir utilizzate matrici miste e complesse ed, eventualmente, singole proteine chimicamente modificate per riprodurre alterazioni della componente extracellulare associate con l'invecchiamento.

Workpackage 2 – Malattie ematologiche

Studieremo patologie accomunate dalla presenza di alterazioni quantitative della piastrine circolanti e dall'interessamento prevalente della popolazione anziana: sindromi mieloproliferative e sindromi mielodisplastiche. La scelta di queste patologie come target della ricerca deriva sia dall'insoddisfacente livello di efficacia delle terapie oggi disponibili sia dalla possibilità di utilizzare le vaste casistiche di pazienti con queste malattie disponibili nell'ambito della Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo di Pavia. Si segnala a questo proposito come a questa Istituzione faccia capo il Registro Italiano Mielofibrosi con Metaplasia Mieloide coordinata dal dott. Barosi (collaboratore in questo progetto).

Obiettivi:

- 1) definire, in cellule di individui sani e di pazienti: a) l'influenza della struttura tridimensionale della matrice sul differenziamento dei progenitori emopoietici; b) come la densità e la distribuzione spaziale delle matrici regolano l'elasticità delle stesse e quindi il legame con le cellule (*task 1* dr Alessandra Balduini);
- 2) descrivere le tappe del differenziamento dei megacariociti e la maturazione e formazione delle piastrine in vitro a partire da cellule embrionali staminali (ES) e da cellule staminali pluripotenti indotte (iPS) derivate da pazienti affetti da trombocitopenie (*task 2*, prof. Silvia Garagna);
- 3) applicare alla ricerca farmacologica l'approccio personalizzato al singolo paziente studiando sia i principi farmacologici già in fase di sperimentazione nell'uomo, sia molecole non ancora sviluppate dal punto di vista farmacologico ma con chiare potenzialità terapeutiche. La possibilità di testare i composti in singoli pazienti caratterizzati in maniera esaustiva permetterà di identificare correlazioni tra le loro caratteristiche fenotipiche-genotipiche e l'effetto farmacologico, permettendo così di prospettare approcci terapeutici personalizzati (*task 3*, prof. Carlo Balduini). Gli obiettivi verranno raggiunti attraverso le seguenti attività:



2.1 Modelli per lo studio del differenziamento cellulare e delle sue alterazioni nell'invecchiamento (A. Balduini)

- Studio della regolazione dell'emopoiesi, della megacariopoiesi e del rilascio piastrinico all'interno del midollo osseo;
- studio di diverse matrici extracellulari;
- creazione di scaffolds e bioreattori che permettano la deposizione e l'organizzazione tridimensionale delle matrici;
- creazione di bioreattori che permettano lo sviluppo di gradienti di ossigeno e pH per studiare le conseguenti modificazioni di rilascio e di riorganizzazioni della matrice;
- allestimento di modelli di superfici con diverse geometrie ed elasticità su cui coltivare le cellule: ad esempio incorporando piccoli polimeri come poly(ethylene-oxide) (PEO) per creare crosslink;
- studio dell'interazione tra le diverse strutture e le cellule: distanza, angolatura, forza di adesione ecc. in relazione all'attivazione di specifiche cascate di segnalazione, differenziazione cellulare, cambiamento di forma e riorganizzazione del citoscheletro.

2.2 Cellule staminali pluripotenti: cellule embrionali staminali (ES) e “induced pluripotent stem-cell” (iPS) (Garagna)

- Generazione di cellule iPS da campioni derivati da tessuto umano di soggetti di controllo e da pazienti; verifica della corrispondenza tra le linee di cellule iPS e il donatore utilizzando la tecnica del fingerprinting;
- Differenziamento delle cellule iPS e cellule ES, come controllo, in megacariociti;
- Monitoraggio del differenziamento attraverso l'analisi del trascrittoma e del proteoma di megacariociti derivati sia da cellule iPS che ES.

2.3 Sindromi mieloproliferative e mielodisplasiche: individuazione di farmaci attivi sulla piastrinopoesi (Carlo Balduini)

Sui modelli cellulari dei pazienti con trombocitopenie ereditarie e patologie mieloproliferative verranno testate le seguenti molecole:

- trombopoietina umana (TPO) ricombinante. È la molecola di riferimento che riproduce il principale fattore di crescita fisiologico;
- composti non-peptidici con azione TPO-mimetica. Si legano allo stesso recettore cellulare della TPO umana (c-MPL), alcuni con sito di legame identico (AMG531), altri con sito di legame differente (Eltrombopag);
- sostanze che non utilizzano il recettore per la TPO. Hanno meccanismo d'azione non ben definito e sono potenzialmente in grado di esercitare effetto additivo a quello della TPO: 15d-PGJ2 (15-deoxy- Δ 12,14 prostaglandin J2) e BMP4 (bone morphogenetic protein 4);

Il *task 3* fornirà al *task 2* cellule di soggetti sani e di pazienti per derivare inizialmente le cellule iPS e successivamente i megacariociti, o i loro precursori, sui quali i *task 1* e *3* effettueranno le indagini indicate. Inoltre, il *task 2* fornirà al *task 1* le cellule ematopoietiche provenienti da pazienti.

Risultati attesi:



FONDAZIONE
ALMA MATER TICINENSIS

- sviluppo di modelli cellulari del differenziamento megacariocitario per lo studio delle trombocitopenie e delle malattie mieloproliferative;
- identificazione delle alterazioni delle tappe del differenziamento megacariocitario e della maturazione delle piastrine nei pazienti;
- ricostruzione del microambiente midollare, nel pieno controllo delle principali strutture molecolari che lo costituiscono, per la definizione del ruolo della matrice extracellulare nel differenziamento delle cellule staminali e dei progenitori ematopoietici;
- personalizzazione della terapia attraverso l'individuazione di composti per la cura di trombocitopenie ed eventuale estensione di questi risultati ad altre malattie ematologiche.

Workpackage 3 – Modelli animali e cellulari

3.1 Modificazioni dei componenti della matrice extracellulare nell'invecchiamento (Tira, Tenni)

La dinamica delle relazioni tra i componenti di matrice e le interazioni matrice-cellula regolano il rimodellamento tissutale durante il differenziamento, l'accrescimento, il riparo delle ferite e l'invecchiamento.

Questa unità di ricerca si occuperà della preparazione e caratterizzazione di collagene e proteoglicani, sia da tessuto che ricombinanti, dell'analisi delle loro interazioni specifiche e dell'effetto di mutazioni riscontrate in patologie umane.

Risultati attesi: **1.** preparazione e caratterizzazione di collagene fibrillari e di piccoli proteoglicani di matrice (SLRPs); **2.** Studio delle modifiche post-traduzionali in entrambe le classi di macromolecole; **3.** identificazione delle variazioni di dimensione delle catene di glicosaminoglicani negli SLRPs e delle quantità e dimensioni dei cores proteici; **4.** allestimento in vitro di modelli che simulino le matrici connettivali in condizioni di alterata degradazione tissutale.

3.2 Modelli animali di displasie scheletriche (Forlino, Rossi)

Il tessuto osseo e quello cartilagineo con l'invecchiamento vanno incontro ad uno sbilanciamento sempre più grave tra rimodellamento e sintesi delle loro componenti fondamentali, prime fra tutte il collagene ed i proteoglicani. Nel nostro laboratorio sono disponibili due modelli murini rispettivamente uno per lo studio della degenerazione della cartilagine articolare ed uno con ridotta densità minerale ossea e fratture spontanee. Tali modelli verranno studiati al fine di chiarire le basi molecolari della degenerazione degli elementi scheletrici ed in ultimo per identificare potenziali molecole target per lo sviluppo di innovativi approcci clinici/farmacologici.

Risultati attesi: **1.** definizione del complesso di proteine espresse durante lo sviluppo e degenerazione della cartilagine articolare sfruttando i modelli murini disponibili; **2.** individuazione del contributo offerto dalle cellule staminali nel riparo delle fratture ossee; **3.** definizione del complesso di geni/proteine attivato durante le fasi di riparo delle fratture.

3.3 Biologia dei telomeri nell'invecchiamento (Giulotto)

Nelle cellule somatiche l'assenza dell'attività della telomerasi causa, con l'invecchiamento, un progressivo accorciamento dei telomeri che attiva la morte cellulare. Abbiamo recentemente dimostrato che le regioni telomeriche sono attivamente trascritte (Azzalin et al, Science 318, 798, 2007) suggerendo



FONDAZIONE
ALMA MATER TICINENSIS

che la trascrizione influenzi la lunghezza e l'integrità dei telomeri ed abbia quindi un ruolo nell'invecchiamento e nelle patologie degenerative. Questa unità di ricerca studierà in maggiore dettaglio il ruolo della regolazione della trascrizione dei telomeri utilizzando come modello cellule normali e tumorali.

Risultati attesi: **1.** identificazione dei promotori e dei siti d'inizio della trascrizione di TELomeric repeat containing RNA (TERRA); **2.** identificazione dei suoi possibili regolatori; **3.** allestimento di vari modelli cellulari per correlare i livelli di TERRA e la lunghezza dei telomeri; **4.** caratterizzazione delle eventuali differenze riscontrate nella regolazione della trascrizione di TERRA in cellule normali e tumorali.

3. 4 Ingegneria tissutale (Visai, Conti)

L'ingegneria tissutale si identifica con la semina di cellule staminali adulte oppure staminali adulte riprogrammate (iPs) e loro molecole su strutture artificiali (scaffold), loro coltivazione in opportuni bioreattori fino alla colonizzazione dello scaffold ed alla produzione di nuovo tessuto. Al momento le principali applicazioni cliniche riguardano la ingegnerizzazione di tessuti quali pelle, cartilagine ed osso. Questa unità di ricerca intende sviluppare e caratterizzare nuovi scaffold e specifici bioreattori in cui le cellule possano differenziarsi e ricostruire il tessuto *in vitro*.

Risultati attesi: **1.** sviluppo e sintesi (e riempimento con molecole biologiche) di nuovi scaffold tridimensionali porosi, di diversa natura; **2.** messa a punto di bioreattori capaci di promuovere una colonizzazione ottimale degli scaffold prodotti; **3.** formazione di una banca di cellule staminali e di pluripotenti indotte (iPs); **4.** validazione dei precedenti modelli in vivo.

3.5 Modelli per lo studio della permeabilità e della funzione della barriera emato-encefalica (Manzo)

Lo studio delle interazioni tra barriera emato-encefalica (BBB) e nanoparticelle costituisce un presupposto importante per lo sviluppo di nanovettori che consentano il rilascio mirato di farmaci e diagnostici nel cervello il principale organo danneggiato in molte patologie associate all'invecchiamento. Tali studi verranno condotti *in vitro* utilizzando il principale modello di BBB costituito da una co-coltura di cellule endoteliali (BBCEC) ed astrociti ed *in vivo* utilizzando i topi transgenici APPSWE-Tg2576 con fenotipo simile al morbo di Alzheimer.

Risultati attesi: **1.** allestimento *in vitro* di un modello di BBB per la valutazione della permeabilità ed integrità di membrana endoteliale; **2.** valutazione applicativa di agenti nanostrutturati e nanovettori in situazioni fisiologiche o patologiche su animali transgenici portatori di alterazioni riscontrabili anche in malattie neurodegenerative dell'uomo; **3.** messa a punto delle analisi per la valutazione della permeabilità *in vivo* della BBB; **4.** determinazione nel siero degli animali della presenza della proteina S100 β quale indicatore di disfunzione precoce della barriera.

Workpackage 4 – Biosicurezza

4.1 Tossicità generale e organo-specifica (Manzo)

Si intende sviluppare e validare nuovi metodi di indagine tossicologica per migliorare il valore predittivo degli studi su sicurezza e biocompatibilità dei nanomateriali. La strategia di indagine prevede



FONDAZIONE
ALMA MATER TICINENSIS

l'uso di (a) speciali modelli in vitro, scelti in linea con recenti direttive comunitarie (b) tecniche molecolari (tossicogenomica, metabolomica, imaging molecolare ecc.) che consentiranno di migliorare l'efficacia e la precisione dell'indagine tossicologica su preparati di origine umana.

Ci si propone inoltre di: (i) applicare nuove procedure di *risk assessment* basate sul confronto ed estrapolazione di dati empirici animale-uomo, vitro-vivo e normale-patologico; saranno impiegati campioni ottenuti da pazienti con patologie dell'età avanzata o da animali (ceppi knock-out) scelti come modello di malattie neurologiche, (ii) offrire le basi scientifiche necessarie per lo sviluppo di piattaforme miniaturizzate (*lab-on-chip*) utilizzabili per la rapida esecuzione di studi tossicologici "ad alta resa".

La **biosicurezza**, dei nanomateriali oggetto di interesse nel programma proposto (v. WP5), sarà valutata mediante test di tossicità generale e organo-specifica, e biocompatibilità, in linea con i requisiti di base della tossicologia regolatoria e idonei per lo studio di endpoint molecolari e di un'ampia gamma di *toxicity pathways*. Saranno usati metodi "alternativi" all'animale, recentemente approvati dalla Comunità Europea (ECVAM), es. test di irritazione locale (*Episkin*) e di ematotossicità (*CFU-GM*). Citotossicità e danno d'organo saranno studiati su colture primarie e linee cellulari rappresentative, valutando (i) integrità di membrana e morfologia cellulare (*dye exclusion assay: Trypan blue, Calceina AM/Ioduro di propidio*), (ii) alterazioni della funzionalità cellulare (es. disfunzioni mitocondriali, processi energetici, sintesi proteica, con *MTT, Neutral Red Uptake, ATP*), e (iii) citolisi (*LDH*). Test clonogenici saranno usati per valutare gli effetti dei materiali su crescita e proliferazione cellulare.

Altri studi saranno effettuati in collaborazione con varie U.O per caratterizzare effetti non specifici classificabili come espressioni particolari di tossicità, es. effetti sul normale processo emostatico, promozione di fenomeni di *protein misfolding*, interazioni nel metabolismo della proteina precursore di amiloide (APP), capacità di modificare le proprietà meccaniche della membrana cellulare interferenze su parametri ormonali, ecc.

4.2 Modelli cellulari: piastrine, eritrociti, leucociti, megacariociti (Balduini C., Torti, Minetti, Guidetti, Balduini A., Manzo)

L'obiettivo è quello di studiare in vitro l'interazione delle sostanze test con cellule ematiche, quali indicatori di bio-compatibilità sistemica, per valutare la comparsa di danni strutturali e funzionali alle cellule stesse. I modelli cellulari sono selezionati tra i metodi di test che il NCI (National Cancer Institute, Bethesda, USA) sta sviluppando per determinare la tossicità e bio-compatibilità di nanomateriali destinati ad applicazioni cliniche e diagnostiche.

Piastrine: verrà valutato l'effetto dei nanomateriali sull'adesione piastrinica alle diverse componenti della matrice extracellulare, tra cui fibronectina, collageni, e fattore von Willebrand, analizzando il loro impatto sull'attivazione e spreading delle piastrine stesse promosso dai vari recettori adesivi (integrine $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_{IIb}\beta_3$, GPIb-IX-V). Si cercheranno anche possibili differenze negli effetti indotti su matrici extracellulari a natura mista, eventualmente contenenti singole componenti recanti modificazioni chimiche tipicamente associate con l'invecchiamento. Inoltre sarà indagato l'effetto delle particelle nanostrutturate sul metabolismo amiloidogenico o non-amiloidogenico di APP nelle piastrine adese, al fine di verificare se e come l'esposizione a nanomateriali possa alterare la regolazione del rilascio del peptide A β e/o sAPP α indotta dall'interazione delle piastrine con la matrice extracellulare.



FONDAZIONE
ALMA MATER TICINENSIS

Granulociti neutrofili: sarà valutata la capacità dei nanomateriali di indurre l'attivazione dei neutrofili o di modularne la soglia d'attivazione da parte di agonisti fisiologici. L'attivazione cellulare sarà valutata misurando la produzione di anione superossido durante il *burst respiratorio* mediante un metodo basato sull'emissione di chemiluminescenza, e valutando il rilascio di proteine marker dei granuli dei neutrofili.

Eritrociti: sarà valutata la permeabilità della membrana cellulare ai composti test mediante caricamento degli stessi in "ghost" eritrocitari, e monitorandone la cinetica di efflusso nel mezzo extracellulare. Eventuali modificazioni della stabilità della membrana eritrocitaria saranno studiate mediante test di fragilità osmotica e di influenza sul rilascio di vescicole (note per avere effetti protrombotici). Si analizzeranno le proprietà dei "lipid rafts" ed il trasporto di anioni mediato dalla proteina della banda 3, e dei cationi monovalenti mediato dalla Na/K-ATPasi. Infine l'impatto dei vari composti sul bilancio redox della cellula sarà studiato esaminando lo stato del glutatione, degli enzimi redox eritrocitari e della perossidazione dei lipidi di membrana.

Progenitori emopoietici: verrà valutato l'effetto dei composti nanostrutturati sulla capacità di proliferare, differenziare e maturare dei progenitori emopoietici umani isolati da diverse fonti quali sangue di cordone ombelicale, sangue periferico e midollo osseo attraverso l'analisi della loro adesione e migrazione su diverse matrici extracellulari. In questo contesto, particolare attenzione verrà data allo studio della megacariopoiesi.

Workpackage 5 – Piattaforma tecnologica

5.1 Sviluppo di materiali micro- e nano strutturati e loro interazioni con strutture biologiche (Conti, Fagnoni, Mustarelli, Pallavicini, Patrini, Profumo, Quartarone, Zanoni)

Questo *task* contribuisce al progetto per ciò che riguarda la progettazione e la realizzazione di materiali e strutture artificiali distinti in due principali tematiche di ricerca:

1. materiali micro- e nano-strutturati per favorire la adesione e la proliferazione di proteine e cellule e rendere possibile la diagnostica in-vitro in funzione di parametri di preparazione o esterni;
2. materiali nano-strutturati che agiscano come vettori di target diagnostici o terapeutici. Questi verranno inizialmente studiati in-vitro, al fine di valutare le interazioni con colture cellulari, per poi eventualmente essere trasferiti in modelli ex-vivo ed in-vivo.

Tutti questi materiali vanno validati per citotossicità e biocompatibilità e biotossicità. In particolare, si intende perseguire lo sviluppo dei seguenti materiali e procedure:

1. materiali e strutture basate su Si, SiO₂, TiO₂, Si₃N₄, Au e Ag, quali film sottili, strutture fotoniche e plasmoniche, strutture micro- e nano-porose. Le strutture prevedono in molti casi la funzionalizzazione della superficie sia con marcatori (*quantum dots* e nanoparticelle) sia senza marcatori. Ciò ne rende possibile l'impiego sia come biosensori specifici sia come strumenti diagnostici per definire processi di organizzazione e mutazioni a livello molecolare o cellulare;
2. nanoparticelle metalliche di Au e Ag, loro funzionalizzazione ed eventuale aggregazione in superfici di Si e SiO₂ mediante *self-assembled monolayers* (SAM). I SAM terminano con molecole organiche funzionali, composti di coordinazione, molecole organometalliche redox;
3. trattamenti superficiali per il controllo dell'adesione di sistemi biologici e realizzazione di pattern cellulari e sistemi microfluidici;



FONDAZIONE
ALMA MATER TICINENSIS

4. liposomi veicolanti farmaci e intesi per somministrazione parenterale e/o nasale. Valutazione di differenti composizioni lipidiche utili alla formulazione di liposomi cationici, liposomi pegilati, liposomi rivestiti con chitosano, liposomi decorati con anticorpi per un efficiente direccionamento al sito d'azione. Studi di formulazione di sistemi liposomiali in funzione del farmaco che dovrà essere veicolato, preparazione e caratterizzazione dei sistemi liposomiali *in vitro* ed *ex vivo*;
5. altri materiali per *drug delivery* e diagnostica (nanotubi funzionalizzati, nanoparticelle *core shell*, nanoparticelle polimeriche). Studio di formulazione del *drug delivery system* colloidale in funzione del farmaco che dovrà essere veicolato, preparazione e caratterizzazione *in vitro* ed *ex vivo*.

Questo *task* costituirà una piattaforma tecnologica principalmente a supporto delle attività dei WP 2 e 3. Allo stesso tempo, i materiali e le procedure qui indicati saranno oggetto di validazione tossicologica come previsto dal WP 4.1.

Risultati attesi

1. conoscenza dei meccanismi biomolecolari nativi e mutati mediante riproduzione in vitro di differenti condizioni, in risposta a vari parametri interni ed esterni;
2. disponibilità di biomarcatori non-invasivi che possano essere valutati in maniera miniaturizzata con piattaforme lab-on-chip;
3. disponibilità e validazione di nanoparticelle e nanosistemi per teragnostica.
4. validazione di target funzionali e terapeutici.

5.2 Diagnostica avanzata mediante materiali micro e nano strutturati e tecniche biofotoniche (Cristiani, Degiorgio, Patrini, Galli)

Questo *task*, in stretta coordinazione con il *task* 5.1, si occupa di diagnostica avanzata mediante materiali micro- e nano-strutturati e tecniche di analisi e manipolazione biofotoniche, che offrano vantaggi in sensibilità e specificità rispetto ai metodi analitici tradizionali. Inizialmente, si privilegeranno analisi diagnostiche in-vitro atte ad evidenziare in modo non invasivo processi biomolecolari singoli. Si valuterà quindi la possibilità di simili analisi in configurazione parallela, del tipo microfluidico e lab-on-chip, ed infine di analisi ex-vivo. In particolare, le tecniche di analisi complementari disponibili per la caratterizzazione dei materiali e dei processi diagnostici possono essere sintetizzate nei seguenti aspetti:

1. caratterizzazione ottica spettroscopica dall'UV al lontano IR (microriflettanza, trasmittanza, ellissometria, interferometria in luce bianca), analisi di risonanze di plasmoni superficiali (SPR) e onde di superficie (BSW), riflettanza totale attenuata (ATR), nonlinearietà ottiche al secondo e terz'ordine, Raman Scattering e fluorescenza statica.
2. caratterizzazione morfologica di superfici mediante AFM, SEM e microscopia confocale.
3. caratterizzazione chimico-fisica con tecniche di NMR, diffrattometriche (XRD, sincrotrone), termiche (MDSC, hi-res TGA, DSC/TGA), di indagine microstrutturale (porosimetri BET e a mercurio), di analisi chimica tradizionale (HPLC, spettrofluorimetri, etc.).
4. caratterizzazione delle proprietà meccaniche di singole cellule

Risultati attesi

1. disponibilità di strutture fotoniche e plasmoniche che possano essere utilizzate in biosensori per la diagnostica *in vitro* di proteine, frammenti di DNA e oligonucleotidi, mediante il controllo



FONDAZIONE
ALMA MATER TICINENSIS

della risposta ottica nella regione spettrale del visibile o vicino infrarosso. Determinazione della risposta vibrazionale in ATR o Raman scattering e SERS sia dei marcatori funzionalizzati, sia del riconoscimento di specie native e mutate,

2. caratterizzazione ad alta sensibilità di analiti mediante generazione di segnali ottici nonlineari per mezzo di impulsi laser ultrabrevi al femtosecondo,
3. caratterizzazione di dispositivi micro- e opto-fluidici in silicio microlavorato, basati su cristalli fotonici; studio di metodi di interrogazione di biosensori ottici che incorporano tali dispositivi per il monitoraggio in vitro di interazioni fra biomolecole,
4. studio delle proprietà meccaniche delle membrane cellulari tramite un dispositivo *stretcher* ottico integrato. Un primo *set-up* sperimentale basato su fibre ottiche e un canale microfluidico esterno sono attualmente in fase di caratterizzazione. L'analisi delle proprietà meccaniche verrà combinata a *imaging* tramite fluorescenza dei campioni trattati.

17 - Elementi e criteri proposti per la verifica dei risultati raggiunti

(Max 4.000 caratteri)

Gestione del progetto

Data la elevata complessità del progetto e la numerosità dei partecipanti, verrà nominato un comitato di coordinamento, presieduto dai Coordinatori del progetto e costituito da un responsabile per ogni WP. Il comitato di coordinamento si riunirà tipicamente una volta al mese per la verifica dello stato di avanzamento del progetto nella sua interezza e per la messa a punto di eventuali correttivi. Workshop plenari dei gruppi partecipanti verranno effettuati in corrispondenza dello *start-up* e dei *Milestone*: 1) allo start-up, 2) dopo 12 mesi; 3) dopo 24 mesi (conclusione del progetto). Durante i workshop, che si svolgeranno lungo un'intera giornata, ogni gruppo partecipante relazionerà sullo stato di avanzamento della propria attività, con particolare riferimento al andamento delle interazioni interne e delle collaborazioni internazionali. Il workshop finale avrà dimensione nazionale.

I risultati del progetto non passibili di protezione brevettuale verranno disseminati attraverso un opportuno sito web. Verrà prevista la possibilità di connessione libera o mediante password per l'accesso a insiemi differenti di informazioni. I risultati sensibili dal punto di vista della brevettabilità e del trasferimento tecnologico verranno trattati secondo le regole della proprietà intellettuale fissate da UNIPV.

La gestione economica del progetto verrà affidata alla Segreteria amministrativa del CILSOMAF-UNIPV che ha già curato un precedente progetto di alta formazione cofinanziato da Università di Pavia e Regione Lombardia (Progetto Reglom06). Per quanto riguarda gli aspetti legati alla formazione dei giovani ricercatori, verranno organizzate le seguenti attività:

- cicli di seminari tenuti da esperti di UNIPV o di altre università;
- cicli di seminari tenuti dagli stessi giovani ricercatori inseriti nel progetto (nella seconda metà del periodo di svolgimento del progetto);
- scambi interlaboratorio;
- partecipazione a conferenze nazionali e internazionali.



Elementi e criteri di verifica dei risultati

Questo progetto si configura come la fase di *start-up* di una più ampio percorso di ricerca che dovrà necessariamente attingere ad altre fonti di finanziamento e svilupparsi su un arco temporale di medio termine (4-5 anni), cioè sensibilmente più lungo della durata preventivata dal bando della Fondazione. Più in particolare, lo stesso gruppo di ricerca intende presentare richiesta di finanziamento sullo stesso tema al centro Europeo di Nanomedicina, di cui l'Università di Pavia è socio fondatore. Inoltre, un progetto collegato è stato recentemente sottoposto alla Regione Lombardia nell'ambito di un bando per Accordi Istituzionali. Alcune unità di ricerca afferenti al progetto hanno inoltre presentato richieste di finanziamento per collaborazioni internazionali nell'ambito del bando ASTIL della Regione Lombardia. Trattandosi quindi di una richiesta a livello di *start-up*, non sono stati individuati prodotti specifici da portare in verifica ai *Milestone*. Il comitato di coordinamento, sulla base del livello di finanziamento disponibile e dell'andamento del progetto stesso, definirà un *set* di risultati considerati "minimi" per la verifica dopo 12 e dopo 24 mesi. In ogni caso, vengono indicati alcuni elementi generali per la valutazione del buon andamento del progetto:

- l'attivazione degli assegni di ricerca previsti dal progetto;
- le attività di formazione dei giovani ricercatori assunti nell'ambito del progetto;
- i rapporti interni;
- le pubblicazioni su riviste internazionali con processo di *peer-review* e gli eventuali brevetti.

18 - Mesi persona complessivi indicativi previsti per il Progetto di Ricerca

Numero	Disponibilità temporale indicativa prevista 1° anno 2° anno		Totale mesi persona
	100	100	200
Componenti della sede dell'Unità di Ricerca		30	
Componenti di altre Università / Enti vigilati			
Titolari di assegni di ricerca		10	
Titolari di borse	Dottorato		10
	Post-dottorato		
	Scuola di Specializzazione		
Personale a contratto	Assegnisti		
	Borsisti		
	Altre tipologie		
Altro Personale			
Totale persone coinvolte		50	



FONDAZIONE
ALMA MATER TICINENSIS

19 – Costo complessivo del progetto articolato per voci (Euro)

Voce di costo	Finanziamento Alma Mater	Fondi a disposizione
spese previste per l'acquisizione di personale	200.000	*
spese generali imputabili alla attività di ricerca	50.000	*
spese per l'acquisizione di strumentazione e apparecchiature	100.000	*
spese per missioni, stages, partecipazioni a congressi		*
altri costi di esercizio imputabili alle attività di ricerca		*
TOTALE	350.000	*

* Come già specificato, i gruppi partecipanti al progetto hanno presentato domande di finanziamenti aggiuntivi/integrativi a diversi Enti finanziatori, tra cui Fondazione CARIPLO e Regione Lombardia (Bando ASTIL e Bando Accordi Istituzionali). Verrà richiesto un finanziamento sullo stesso tema alla Fondazione Centro Europeo di Nanomedicina.

Il Finanziamento totale richiesto alla Fondazione Alma Mater è di Euro 350.000

Il progetto è stato chiuso alle ore 18 del giorno 29-10-2009. I dati contenuti nella domanda di finanziamento sono trattati esclusivamente per lo svolgimento delle funzioni istituzionali della Fondazione ALMA MATER TICINENSIS ai fini del bando “Promuovere la ricerca d’eccellenza”.

Certifico, sotto la mia personale responsabilità, di aver ottenuto tutte le autorizzazioni e approvazioni necessarie.

Firma dei Coordinatori della ricerca

Prof. Elena Giulotto

Prof. Piercarlo Mustarelli

Pavia, 29-10-2009