

Tabella riepilogativa rapporto iscritti/addottorati nei cicli precedenti:

Ciclo	Iscritti	Dottori	Entro il 28/2	Entro il 30/9	In proroga	%	Abbandoni/ Rinunce/ Sospensioni	%	Distribuzione	Motivazioni
XXXIII	12	-	-	-	-	-	0	0%		
XXXII	13	-	-	-	-	-	0	0%		
XXXI	11	-	-	-	-	-	1	9,09%	2° anno: 1	sospensione: 1
XXX	15	14	15	0		93,33%	1	6,67%	1° anno: 1	lavoro: 1
XXIX	13	13	13	0		100%	0	0%		
XXVIII	13	10	-	-		76,92%	3	23,08%	1° anno: 2 2° anno: 1	senza borsa: 1
XXVII	12	12	-	-		100%	0	0%		

**Relazione attività di ricerca anno precedente**

<p>Relazione attività di ricerca anno precedente (rispetto ai dottorandi del I anno):</p>	<p><b>BIANCONI VALERIA:</b> Titolo della tesi: "Epigenetic drugs as potential pharmacological approach in Duchenne Muscular Dystrophy". Screening e caratterizzazione di composti inibitori delle metiltransferasi istoniche e inibitori delle deacetilasi istoniche in vitro su linee cellulari muscolari e cellule primarie isolate da tessuto muscolare di topi wild type e distrofici tramite FACS. Inizio esperimenti in vivo su topi wild type giovani sottoposti a danno muscolare e a trattamenti con gli inibitori testati durante il primo trimestre. Studio dell'impatto dei trattamenti (con differenti dosi) sui tessuti muscolari prelevati dai topi trattati per analisi morfo-istologica ed analisi proteica. Analisi delle popolazioni cellulari isolate tramite FACS ed estratte dai muscoli scheletrici prelevati tramite colture ex vivo. Inizio esperimenti in vivo su topi distrofici giovani, modello della malattia distrofia muscolare di Duchenne, sottoposti a trattamenti con gli inibitori testati durante il primo trimestre. Studio dell'impatto dei trattamenti sui tessuti muscolari prelevati dai topi trattati per analisi morfo-istologica ed analisi proteica. Analisi di marker diagnostici serici della malattia. Conclusione dell'analisi morfo-istologica dei campioni di muscolo scheletrico prelevati negli ultimi studi in vivo in topi distrofici e conclusione dell'analisi della creatin chinasi serica. Inizio analisi del profilo di trascrizione (mRNA) dei campioni prelevati dagli esperimenti in vivo.</p> <p><b>CAMPONESCHI Ilaria.</b> Titolo della tesi: "Effects of environmental factors on carbon metabolism in Kluyveromyces lactis." Esperimenti di immunoprecipitazione della cromatina e qRT-PCR per lo studio della regolazione ipossica del gene RAG1 in Kluyveromyces lactis (lavoro in preparazione). Studi di vitalità e longevità del ceppo GDK-ΔKIMga2. Saggio di attività enzimatica delle superossido dismutasi. Sintesi delle cassette geniche per ottenere i ceppi con i geni CRZ1 e MSN2 fusi con il gene reporter GFP. Test fenotipici dei ceppi deleti per i geni CRZ1 e MSN2. Vari tentativi di trasformazione per ottenere i ceppi con i geni CRZ1 e MSN2 fusi con il gene reporter GFP. Tentativo di costruzione del ceppo con il gene RAG8 mutato ed il gene SCK1 fuso con il tag 6HA mediante incrocio. Studio della regolazione ipossica del fattore trascrizionale Sck1 mediante western blot. Saggio di attività enzimatica delle superossido dismutasi in terreno addizionato con una fonte di acidi grassi insaturi. Esperimento mediante crescita delle colture di lievito ai fermentatori ed induzione di ipossia per lo studio di Sck1. Sintesi della cassetta genica per ottenere il ceppo deleto per il gene KIMGA2. Inizio studio della percentuale di ceppi GDK-ΔKIMga2 revertenti per il fenotipo Rag-. Saggio di attività enzimatica delle catalasi in terreno con e senza l'aggiunta di una fonte di acidi grassi insaturi. Inizio della costruzione di una struttura "box-led" per eseguire gli esperimenti di buio-luce. Completamento della struttura "box-led" per gli esperimenti di buio-luce. Studio della percentuale di ceppi GDK-ΔKIMga2 revertenti per il fenotipo Rag- in risposta alla crescita in condizioni di luce e buio. Ottenimento dei ceppi trasformati con CRZ1 e MSN2 fusi con il gene reporter GFP. Tentativi di trasformazione per ottenere un secondo ceppo deleto per il gene KIMGA2. Inizio dell'esperimento di crescita di K. lactis a diversi tempi di buio e luce per successive analisi di espressione genica.</p> <p><b>CAPONE ALESSIA.</b> Titolo della tesi "Study of the molecular pathways regulating pathogenicity of human Th17 cells". Esperimenti di immunoprecipitazione della cromatina e qRT-PCR per lo studio della regolazione ipossica del gene RAG1 in Kluyveromyces lactis (manoscritto in preparazione). Studi di vitalità e longevità del ceppo GDK-ΔKIMga2. Saggio di attività enzimatica delle superossido dismutasi. Sintesi delle cassette geniche per ottenere i ceppi con i geni CRZ1 e MSN2 fusi con il gene reporter GFP. Test fenotipici dei ceppi deleti per i geni CRZ1 e MSN2. Vari tentativi di trasformazione per ottenere i ceppi con i geni CRZ1 e MSN2 fusi con il gene reporter GFP. Tentativo di costruzione del ceppo con il gene RAG8 mutato ed il gene SCK1 fuso con il tag 6HA mediante incrocio. Studio della regolazione ipossica del fattore trascrizionale Sck1 mediante western blot. Saggio di attività enzimatica delle superossido dismutasi in terreno addizionato con una fonte di acidi grassi insaturi. Esperimento mediante crescita delle colture di lievito ai fermentatori ed induzione di ipossia per lo studio di Sck1. Sintesi della cassetta genica per ottenere il ceppo deleto per il gene KIMGA2. Inizio studio della percentuale di ceppi GDK-ΔKIMga2 revertenti per il fenotipo Rag-. Saggio di attività enzimatica delle catalasi in terreno con e senza l'aggiunta di una fonte di acidi grassi insaturi. Inizio della costruzione di una struttura "box-led" per eseguire gli esperimenti di buio-luce. Completamento della struttura "box-led" per gli esperimenti di buio-luce. Studio della percentuale di ceppi GDK-ΔKIMga2 revertenti per il fenotipo Rag- in risposta alla crescita in condizioni di luce e buio. Ottenimento dei ceppi trasformati con CRZ1 e MSN2 fusi con il gene reporter GFP. Tentativi di trasformazione per ottenere un secondo ceppo deleto per il gene KIMGA2. Inizio dell'esperimento di crescita di K. lactis a diversi tempi di buio e luce per successive analisi di espressione genica.</p> <p><b>CAVALLO ILARIA:</b> Titolo della tesi "Role of biofilm production and skin inflammatory molecules in supporting the growth and persistence of Propionibacterium acnes in acne vulgaris". Partecipato al campionamento effettuando tamponi cutanei su pazienti con acne vulgaris imparando ad identificare il microrganismo attraverso tecniche microscopiche e colturali. Messo a punto il Clinical Biofilm Ring test adattandolo al Propionibacterium acnes; analisi della capacità dei ceppi batterici isolati dai pazienti di produrre biofilm. Analisi del filotipo di tutti i ceppi di P. acnes isolati da pazienti con acne vulgaris attraverso un TouchDown PCR. Analisi del biofilm di P. acnes al microscopio confocale a scansione laser utilizzando il colorante Live/Dead.</p> <p><b>CAVINATO.</b> Titolo della tesi "Escaping the oxidative burst: dual role of the Pseudomonas aeruginosa superoxide dismutases". Misurazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) in macrofagi murini e umani infettati con il ceppo di laboratorio di Pseudomonas aeruginosa (PAO1) e i rispettivi mutanti nelle superossido dismutasi. Infezione su macrofagi murini con PAO1 e i mutanti nelle superossido dismutasi valutando la loro sopravvivenza intracellulare a tempi precoci dell'infezione. Infezione su macrofagi umani con PAO1 e i mutanti nelle superossido dismutasi valutando la loro sopravvivenza intracellulare a tempi precoci dell'infezione. Infezione su macrofagi umani e murini con PAO1 e il mutante nella superossido dismutasi valutando la loro sopravvivenza intracellulare a tempi tardivi dell'infezione</p> <p><b>COSTANTINI SARA.</b> Titolo della tesi "Identification and characterization of Arabidopsis Berberine-Bridge Enzyme-like (BBE-like) proteins for oxidation of cell wall derived damage-associated molecular patterns (DAMPs)". Attività di approfondimento bibliografico e analisi bioinformatiche sull'argomento di tesi per impostare il lavoro di ricerca. Intrapreso analisi di genetica inversa, ottenendo linee omozigoti di mutanti knockout della proteina oggetto di studio e del suo paralogo. Analisi della sua espressione con qRT-PCR. Per la caratterizzazione biochimica della proteina, sua espressione eterologa in Pichia pastoris. Effettuate analisi biochimiche quali western blot e saggi di attività enzimatica. Poiché il sistema Pichia pastoris non ha prodotto la proteina di interesse, intrapresa l'espressione transiente in Nicotiana tabacum, mediante agroinfiltrazione. Attraverso tecniche di clonaggio, sono state aggiunte come tag le sonde fluorescenti GFP e RFP per il rilevamento della proteina. Effettuate analisi western blot e saggi enzimatici per</p>
---	--

	<p>determinarne l'attività ed il substrato. Analisi al microscopio confocale. Al fine di caratterizzare il ruolo fisiologico della proteina, effettuata valutazione preliminare della percentuale di germinazione nei mutanti knockout/knockdown rispetto al controllo wild type.</p> <p>FASOLI ARIANNA: Titolo della tesi "Rapid Microbiological Method: Evaluation, validation and implementation of alternative and rapid microbiological method for pharmaceutical industry". Visione e studio dei principali metodi compendiali di microbiologia al fine di garantire il rispetto dei "Critical quality attribute" microbiologici in un probotto. Studio e valutazione dei metodi microbiologici rapidi, alternativa ai metodi compendiali, per il test di sterilità, di detenzione delle endotossine batteriche e per il test di bioburden. Riquadrifica degli strumenti al fine di garantirli che questi producano dei risultati attendibili. Stesura dei protocolli di studio e prove di fattibilità per i test di bioburden e Bacterial endotoxin test, al fine di valutare se il prodotto in esame interferisce con il metodo stesso. Test di fattibilità con il metodo microbiologico alternativo e validazione dei metodi per la sottomissione di un prodotto e per i controlli di processo.</p> <p>GIOIA ROBERTA. Titolo della tesi "Neural stem cell properties and adult hippocampal neurogenesis in a knock-in mice model, expressing an autism-associated mutation". Analizzato l'effetto della mutazione di R451C NLGN3 sulle proprietà dell'NSPC nei topi KI rispetto al tipo selvaggio (WT), Sono state ottenute NSC dal giro dentato (DG) dell'ippocampo o dalla zona subventricolare di topi due mesi di WT e KI. Gli NSPC derivati da topi KI hanno mostrato una drastica diminuzione dei livelli totali di proteina NLG3 rispetto alle cellule WT. Le cellule derivate dai tessuti dissezionati sono state coltivate in presenza di fattori di crescita, dando origine a aggregati chiamati neurosfere. Contati NSPC derivati da topi KI che contenevano un numero maggiore di cellule rispetto agli animali WT, in SVZ e SGZ. Analizzata anche la morte cellulare con il dosaggio TUNEL. Non vi sono differenze significative tra le cellule WT e KI. Valutata la capacità di differenziazione NSPC in vitro. Le cellule sono state indotte a differenziare per 7 e 10 giorni e poi fissate, colorate con un anti MAP2 e un anticorpo anti-NeuN. Valutata la proliferazione cellulare nell'ippocampo di topi WT e KI.</p> <p>LIMONGI CHIARA: Titolo della tesi "In vitro models to dissect gonococcal colonization and disease". Lettura di articoli scientifici per acquisire informazioni e una maggiore consapevolezza del progetto di ricerca. Training sulla manipolazione del patogeno. Scongellamento e amplificazione delle linee cellulari utilizzate come modello. Set-up del saggio di adesione. Definizione delle condizioni sperimentali ottimali per valutare la funzionalità di anticorpi vaccino-indotti nell'inibire l'adesione di gonococco alle cellule dell'ospite. Analisi dell'adesione del batterio ai modelli cellulari e definizione della migliore strategia di detection. Saggi di inibizione dell'adesione. Screening dell'attività inibente di specifici sieri. Analisi della formazione del biofilm su cellule endocervicali. Analisi dell'inibizione della formazione del biofilm mediante l'ausilio di specifici sieri. Interazione gonococco-PMN. Definizione di nuovi ambiti di sviluppo del progetto.</p> <p>LULY FRANCESCO RENATO. Titolo della tesi "MicroRNAs and pro-inflammatory phenotype of Cystic Fibrosis macrophages". Analisi dell'espressione dei microRNA differenzialmente espressi nei macrofagi di pazienti di fibrosi cistica (CF) e non donatori sani. Analisi dell'espressione del miR-146a e dei rispettivi target IRAK1 e TRAF6 nei macrofagi CF e non CF. Messa a punto di un protocollo ottimale di inibizione del miR-146a attraverso la trasfezione di specifici oligo LNA anti-miR, utilizzando diversi agenti trasfettanti e diverse concentrazioni di oligo. E' stato valutato l'effetto dell'inibizione del miR-146a, utilizzando oligo LNA anti-miR-146a, sui target IRAK1 e TRAF6 (effettori del signaling di Nf-kB via TLR4) e sull'interleuchina 6.</p> <p>SAVIOZZI VALENTINA. Titolo della tesi "Analysis of the signalling pathway of cyclic nucleotides in models of primary Dystonia". Valutazione dell'espressione PDE10A nei gangli basali mediante analisi di immunoblot per confermare i risultati precedenti in un modello murino transgenico di distonia DYT1. Valutazione della distribuzione di PDE10A nei gangli basali mediante analisi immunostochimica in collaborazione con l'università di tor vergata. Espressione del recettore A2a di valutazione nei gangli basali mediante analisi e distribuzione immunoblot mediante immunostochimica.</p> <p>STEFANELLI ROBERTA. Titolo della tesi "Functional characterization and pharmacological validation of cell envelope systems essential for growth and drug resistance in Pseudomonas aeruginosa". Generazione di mutanti condizionali per valutare l'essenzialità di proteine componenti il sistema Lol in Pseudomonas aeruginosa, in particolare la componente citoplasmatica LoIC e della membrana esterna LoIB. Caratterizzazione della crescita dei mutanti condizionali delle componenti del sistema Lol, in particolare LoIC e LoIB, di Pseudomonas aeruginosa. Caratterizzazione dell'effetto dell'elevata salinità sulla crescita e sulla stabilità della parete in Pseudomonas aeruginosa in cellule deplete di LolA, componente periplasmatica del sistema Lol. Caratterizzazione dello spettro di attività di BBN149: valutazione del sinergismo con la colistina in isolati clinici colistina resistenti in Klebsiella pneumoniae e caratterizzazione della capacità inibitoria della crescita in Burkholderia cenocepacia.</p>
<p>Relazione attività di ricerca anno precedente (rispetto ai dottorandi del II anno):</p>	<p>BELFIORE MARCELLO: Sono stati studiati gli effetti neurotossici di monomeri e frazioni pre-fibrillari in colture primarie dall'ippocampo. Nei neuroni l'afflusso di calcio intracellulare era molto esacerbato rispetto alle cellule HT_22 e maggiore era la sensibilità alla tossicità degli amiloidi. Sono stati identificati i recettori implicati in questa elevazione di calcio intracellulare e la diminuzione della sopravvivenza cellulare era correlata al NMDAR. Sono stati terminati gli esperimenti di Potenziazione a lungo termine e l'analisi relativa dei segnali. E' stato elaborato un modello combinando l'eccitotossicità NMDAR e i paradigmi dei pori amiloidi. L'ipotesi è stata chiamata la "nave che affonda", basata sull'idea che gli amiloidi oligomeri pre-fibrillari ancorati alla superficie di RAFT producono piccoli pori, incapaci di uccidere le cellule in sé, ma in grado di innescare lo squilibrio delle sinapsi e l'eccitotossicità dipendente dal tempo. I dati sono stati presentati con il dottorando come primo co-autore, nel manoscritto "Native amyloid prefibrillar oligomers but not monomers induce membrane damage that activate NMDA-mediated Ca<sup>2+</sup>-influx, LTP impairment and neurotoxicity" (reference number: SREP-18-39484-T). In attesa di revisione.</p> <p>BIFERALI BEATRICE: Titolo della tesi: "H3K9 methylation controls Fibro-Adipogenic Progenitors identity and skeletal muscle repair". Analisi dei livelli di espressione delle metiltrasferasi specifiche per la mono- e la di-metilazione della Lisina (K) 9 dell'istone H3 (H3K9 KMTs) nei progenitori Fibro-Adipogenici, FAPs, e nelle cellule staminali muscolari, le cellule Satelliti, isolate dai topi WT C57Bl/10 mediante FACS sorting. Alcune H3K9 KMTs sono particolarmente arricchite nelle FAPs rispetto alle cellule Satelliti; di queste sono stati effettuati dei silenziamenti genici, mediante RNAi in vitro, per verificarne l'effetto, analizzando i risultati tramite Real-Time PCR, Western Blot, e Immunofluorescenza. Esperimenti di silenziamento genico anche sulle cellule isolate dai topi WT C57Bl/10 in cui però è stato effettuato, prima dell'isolamento mediante FACS sorting, un danno muscolare mediante la somministrazione intramuscolare di Cardiotossina; al fine di validare i nostri dati anche in un sistema di rigenerazione muscolare. I risultati sono stati analizzati mediante l'uso di Real-Time PCR, Western Blot, Immunofluorescenza, ChIP e Chromatin Fractionation. Analisi del ruolo che queste metiltrasferasi svolgono data la loro localizzazione specifica in zone perinucleari, e delle possibili interazioni fisiche tra le proteine d'interesse, mediante tecniche di immunoprecipitazione e saggi di PLA- Proximity ligation assay. Effettuati incroci specifici tra topi al fine di silenziare specificamente nelle FAPs, rivelatasi importante per regolare il destino delle FAPs a livello muscolare. I risultati ottenuti sono stati analizzati mediante Real-Time PCR, Western Blot, ed Immunofluorescenza. Messa a punto il trattamento con un inibitore farmacologico delle H3K9 KMTs al fine di seguire il destino cellulare delle FAPs. I dati sono ancora in fase di analisi tramite Real-Time PCR, Western Blot, Immunofluorescenza e ChIP.</p> <p>D'ACUNTO EMANUELA. Titolo della tesi "Cellular pathways modified by pathological accumulation of neuroserpin polymers in the dementia FENIB". Trattamenti su cellule NPSC con differenziamento a sei giorni con chelante DEM al fine di valutare la morfologia mitocondriale. Messa a punto di saggi ELISA specifici nell'ambito del progetto "Developing function-blocking monoclonal antibodies against alpha 1 antitrypsin to understand its immunomodulatory functions" finanziato dall'Alpha-1 Foundation. Messa a punto della curva dose risposta per il trattamento delle cellule NPSC differenziate con agenti antiossidanti. Produzione, screening primario, secondario e amplificazione di linee clonali per la produzione di anticorpi monoclonali specifici per M anti tripsina. Trattamenti con antiossidanti alpha tocoferolo e melatonina a varie concentrazioni sulle NPSC differenziate con successiva valutazione della morfologia mitocondriale. Purificazione di anticorpi monoclonali. Messa a punto della curva dose risposta su cellule NPSC differenziate a sei giorni e trattate con il chelante extra cellulare del calcio EGTA. Valutazione della morfologia mitocondriale dopo tale trattamento.</p> <p>DEL CORPO DANIELE. Titolo della tesi "Tuning pectin methylesterification in plant immunity: regulation of pathogen induced Pectin Methylesterases (PMEs) by Subtilases (SBTs)". L'effetto dell'inserzione del TDNA</p>

	<p>sull'espressione genica della PME17 è stato valutato nei mutanti di <i>A. thaliana</i> pme17-1 e pme17-2 mediante RT-PCR semiquantitativa. Con la stessa tecnica, è stata valutata l'espressione delle SBT3.3, SBT3.4 e SBT 3.5 nei rispettivi mutanti sbt3.3-1e sbt3.3-2, sbt3.4-1 e sbt3.4-2 e sbt3.5-1 e sbt3.5-1. L'analisi è stata eseguita su foglie di piante adulte; l'espressione genica quantificata a 48 ore dall'infezione con il patogeno necrotrofo <i>Botrytis cinerea</i> è stata confrontata con quella in foglie trattate per 48 ore con il solo terreno di germinazione delle spore (mock). Il gene AtProPME17, in precedenza donato nel plasmide pGEM-T è stato utilizzato per l'amplificazione di tre regioni definite ProPME17, dominio PME17 e Pro regione, successivamente donate nel plasmide pPICZαA mediante SLIC (One-Step Sequence- and Ligation-Independent Cloning). I plasmidi derivanti sono stati purificati, linearizzati e utilizzati per la trasformazione del ceppo X33 di <i>Pichia pastoris</i>. E' stata tentata l'espressione eterologa della ProPME17, della PME17 matura e della Pro regione in <i>P. pastoris</i>. In seguito ad induzione con metanolo, il sovratanante delle colture è stato sottoposto a SDS-PAGE e ad analisi di attività PME mediante CUP plate. L'identificazione delle proteine più abbondanti in SDS-PAGE è stata condotta mediante spettrometria di massa. La PME17 matura è stata espressa con successo e purificata mediante cromatografia con colonna a scambio ionico. L'induzione dell'attività PME durante l'infezione con <i>B. cinerea</i> è stata confrontata tra i mutanti pme17-1, pme17-2, sbt3.3-1, sbt3.3-2, sbt3.4-1, sbt3.4-2, sbt3.5-1 e sbt3.5-2 e le piante di controllo. L'analisi CUP plate è stata condotta su estratti proteici di foglie trattate con il patogeno <i>B. cinerea</i> o con il mock a 24 e 48 ore post inoculo. L'effetto dell'alterata induzione dell'attività PME è stato valutato sulla risposta dei mutanti al patogeno rispetto a quella osservata nelle piante selvatiche di controllo.</p> <p>GIANNELLA EMILIA: Titolo della tesi "Transient p21 suppression as a regenerative medicine strategy". Effettuato un espianto di cellule satelliti dai muscoli di una linea di topi knockout condizionali. Verificato che il sistema cre/loxP funzionasse. Effettuati esperimenti in vivo per determinare le conseguenze dell'assenza della proteina di interesse nelle cellule satelliti. Esperimenti di rigenerazione muscolare sulla linea di topi creata.</p> <p>KUNKL MARTINA. Titolo della tesi "Role of phosphoinositide kinases in the regulation of CD28 pro-inflammatory functions in human T lymphocytes". Esperimenti per la revisione di un lavoro in pubblicazione (co-autrice). Analisi del ruolo del CD28 nell'upregolazione dell'espressione dell' IL17 e IL6 nei linfociti T umani. Studio del coinvolgimento di NF-κB e STAT3 nell'upregolazione dell'IL17 e IL6. Analisi tramite immunoprecipitazione della cromatina del coinvolgimento dei fattori di trascrizione STAT3 ed NF-κB nel promuovere la trascrizione di IL-17. Ruolo della PI3K, indotta dal CD28, nella sovraregolazione dell'IL17A. Inizio dello studio sul ruolo del CD28 e della PI3K nel regolare il metabolismo dei linfociti T di pazienti con Sclerosi Multipla.</p> <p>PASQUINI MIRIAM. Titolo della tesi "KERATITIS-ICHTHYOSIS-DEAFNESS SYNDROME:MOLECULAR DETERMINANTS AND THERAPEUTIC PERSPECTIVES". Nei primi due semestri: Genotipizzazione delle progenie nate dalle diverse iniezioni nel pronucleo del costrutto necessario alla produzione dell'animale mutante, per identificare un eventuale positivo ed utilizzarlo per espandere la colonia. Espansione della colonia murina mutante al fine di arrivare ad avere un numero sufficientemente grande di animali per poter iniziare l'esperimento. Questa procedura è molto lunga. Poi in congedo per maternità.</p> <p>PIOVESANA ROBERTA. Titolo della tesi "Cholinergic control of myelination in Schwann cells and Schwann-like cells induced from mesenchymal stem cells". Iniziato lo studio del ruolo del sottotipo recettoriale M2 nel controllo della crescita cellulare e nella migrazione, utilizzando l'agonista selettivo M2, Arecaidina propargil Ester e l'agonista non selettivo, Muscarina. Dimostrata la selettività del trattamento selettivo M2. I dati sono stati confermati dallo studio di alcuni geni coinvolti nella proliferazione ( c-jun e Egr2) tramite qPCR and Western Blotting. Il Saggio Live-Dead ha permesso di escludere l'interferenza del mio trattamento sulla vitalità cellulare. Studio dell'espressione dei fattori neurotrofici (GDNF, BDNF and GDNF) tramite qPCR. Analisi della produzione del NGF maturo e immaturo (proNGF) tramite saggio ELISA. L'analisi e' stata svolta sulle cellule Schwann-like (dASCs) che su cellule di Schwann isolate da nervi a due giorni post natali. In seguito a queste analisi svolte tutte sul modello animale (<i>Rattus norvegicus</i>), iniziata la caratterizzazione dell'espressione del recettore M2 su cellule mesenchimali differenziate verso il fenotipo Schwann-like isolate da pazienti.</p> <p>SCHIFANO EMILY. Titolo della tesi "The host-pathogen interactions in the <i>Caenorhabditis elegans</i> animal model: the role of glycosylation and a tool to screen for probiotic bacteria". Analizzata la vitalità di nematodi mutanti nel gene pmr-1, esposti a diversi patogeni Gram-positivi e Gram-negativi. Valutata la patogenicità su <i>C.elegans</i> di ceppi di <i>Escherichia coli</i> uropatogeni, attraverso esperimenti di vitalità, capacità di colonizzazione e risposta allo stress ossidativo. Analizzati su <i>C. elegans</i> gli effetti benefici di <i>Lactobacillus fermentum</i>, isolato precedentemente dalla Mozzarella di Bufala Campana, attraverso esperimenti di vitalità e capacità di colonizzazione. Analizzati gli effetti di <i>Lactobacillus fermentum</i> sul processo di invecchiamento di <i>C. elegans</i>, attraverso l'analisi di diversi marcatori.</p> <p>SPINELLO ZAIRA. Titolo della tesi "Functional characterization of Neisseria adhesin A (NadA) binding to specific receptors on human cells." Studio biochimico del legame tra Neisseria Meningitidis Adhesin A (NadA) con un recettore monocitico mediante analisi di risonanza Plasmonica di superficie. Silenziamento del recettore monocitico in cellule monocitiche THP-1 e caratterizzazione del legame con NadA ricombinante mediante analisi FACS. Nessuna delle due analisi ha dato un legame positivo. Produzione di Outer Membrane Vesicles (OMVs) dei tre ceppi di meningococco B per studiare il profilo della produzione di citokine da parte di monociti e macrofagi ottenuti da donatori (in collaborazione con l'Università di Napoli). Messa a punto del protocollo di infezione da monociti e macrofagi con ceppi capsulati di Meningococcus B (Men B) wild, knock out e iperespressione di NadA. Iniziato un secondo progetto con l'obiettivo di costruire un modello in vitro di infezione / co-infezione con <i>Haemophilus influenzae</i> non deformabile e <i>Moraxella catarrale</i> utilizzando una linea cellulare di cancro del polmone. Generazione di ceppi di Men B non incapsulati al fine di migliorare l'adesione/invasione dei batteri su monociti / macrofagi. Inibizione di test di adesione/invasione su monociti e macrofagi con ceppi di Men B allo scopo di studiare il contributo di specifici recettori monocitici. Per il secondo progetto, infezione da <i>Haemophilus influenzae</i> non tipizzabile e <i>Moraxella catarrale</i> utilizzando cellule epiteliali ben differenziate delle vie aeree da donatori di BPCO (broncopneumopatia cronica ostruttiva). In generale, studio di altre funzioni nell'interazione tra NadA e recettori specifici su monociti/macrofagi.</p> <p>TRANI GIULIA. Titolo della tesi: "Study of patients fibroblasts with mitochondrial disease: assessment of the pathological phenotype associated with genes involved in the mitochondrial quality control." Mutational analysis of different mutations in DNM1L and LONP1 genes in different patients. Demonstration in different tissues (muscle biopsy specimen and cultured fibroblasts) of the effect of the mutations at protein level. Evaluation of the proliferation rate of cultured fibroblast mutated in LONP1; evaluation of the effect of the mutations in LONP1 and DNM1L on the single subunits of the different OXPHOS complexes. Evaluation of the effect of the mutations at the energetic and oxidative stress level. Demonstration of the functional consequences of the identified mutations examining the roles of the affected residues in the crystal structure of the specific protein. Evaluation of the mitochondrial network controlled by the activity of Drp1 and Lonp1, in the presence or not of a mitochondrial stressor.</p> <p>VALENTINA VAPORE. "Yeast as a tool to unveil the cellular and molecular mechanisms underlying neurodegeneration in FENIB disease". Messa a punto di un protocollo sperimentale di estrazione di proteine native in un ceppo di lievito wild type trasformato con i plasmidi pUG35 e pESC, contenenti i geni della neuroserpina, wild type e mutata. La neuroserpina quando mutata è responsabile dell'insorgenza della FENIB (Familial encephalopathy with neuroserpin inclusion bodies), una grave patologia neurodegenerativa rara. Tale protocollo è volto alla purificazione dei polimeri di neuroserpina, che si formano quando è presente il gene in forma mutata. Trasformazione del ceppo di lievito mutante per il gene lsm4 con il vettore di espressione pUG35, contenente sia il gene della neuroserpina wild type, sia quello in forma mutata. Verifica dell'espressione della neuroserpina in cellule di lievito tramite western blot denaturante. Messa a punto di un protocollo sperimentale di estrazione di proteine native nel ceppo di lievito mutante per il gene lsm4 al fine di isolare i polimeri di neuroserpina. Utilizzo della microscopia a fluorescenza per verificare la presenza della proteina e dei polimeri all'interno della cellula. Analisi dell'effetto della neuroserpina sulla vitalità del ceppo di lievito mutante per il gene lsm4. Quindi, è stata studiata la curva di crescita e la cinetica di morte, anche in condizioni di stress. Analisi dell'effetto della neuroserpina sulla vitalità di ceppi di lievito wild type, esperimenti il gene della neuroserpina, sia in forma wild type che mutata. Utilizzo della microscopia a fluorescenza su lievito per analizzare l'effetto della neuroserpina sui compartimenti cellulari e la sua relativa localizzazione all'interno della cellula.</p> <p>ZENNARO ALESSANDRO. Titolo della tesi "Influence of intestinal environment on the expression of virulence genes in <i>Shigella</i>". Verificata l'espressione dell'operone srz di <i>Escherichia coli</i> in risposta a differenti stimoli ambientali. Verificata la capacità di alcune molecole prodotte dal tratto gastro intestinale di interagire con <i>Shigella</i>. Studiata la modulazione dell'espressione dei geni di virulenza di <i>Shigella flexneri</i> da parte di alcune molecole, in particolare di ormoni. Per verificare il meccanismo coi cui le catecolammine interagiscono con il batterio è stato generato un mutante nel sistema a due componenti di <i>Shigella</i>, con il quale il batterio interagisce con gli ormoni.</p>
Relazione attività di ricerca anno precedente	AMENDOLA DIEGO: Le problematiche tecniche riguardanti le procedure di rigenerazione virale sono state risolte mettendo a punto un nuovo protocollo di elettroporazione utilizzando il Nucleofector. Sono stati generati nuovi virus ricombinanti mediante la tecnica di mutagenesi del BAC. Tali virus sono stati propagati ottimizzando le procedure di replicazione al fine di ottenere quantitativi virali maggiori. I virus ricombinanti sono stati caratterizzati valutando il loro tropismo e la loro diffusione in linee cellulari diverse; sono stati analizzati i complessi glicoproteici di membrana, interazioni tra proteine virali e proteoma del virione. Tutte le analisi effettuate sulla caratterizzazione funzionale della glicoproteina virale oggetto di studio sono state replicate al fine di convalidare i dati osservati.

(rispetto ai dottorandi del III anno):	<p><b>BOUSSADIA ZAIRA:</b> Titolo della tesi "A new cell labelling strategy to study the biogenesis of exosomes and their role in human melanoma progression driven by microenvironmental acidic pH.". Si è concluso il lavoro riguardante il ruolo degli esosomi nella progressione tumorale, in cui sono stati aggiunti dei dati riguardanti l'aspetto prognostico (PrognScan). Revisione del lavoro riguardante gli esosomi nella progressione del melanoma. Inoltre sono stati approfonditi i dati di metabolismo dei lipidi degli esosomi fluorescenti. Fine della revisione con aggiunta di dati ex vivo su biopsie di pazienti e dati sull'influenza dell'ambiente acido nel trasferimento degli esosomi su cellule riceventi. Pubblicazione del lavoro. Ultimi esperimenti riguardanti la biogenesi degli esosomi, per conclusione lavoro.</p> <p><b>LEO MANUELA.</b> Titolo della tesi "Mitochondria and metabolism: the role of SAGA complex in budding yeast respiration". Caratterizzazione del ruolo dell'acetilazione nella regolazione dei livelli di espressione e della localizzazione dell'ubiquitina proteasi Ubp8 utilizzando ceppi deleti nella HAT Gcn5 e dopo trattamento con inibitori specifici. Tagging proteico e creazione di ceppi deleti nella E3 ubiquitina ligasi Psh1, analisi della sua localizzazione cellulare e della sua funzione come interattore della ubiquitina proteasi Ubp8. Studio dell'interazione tra la HAT Gcn5 e la HDAC Hda1 nella modulazione della localizzazione mitocondriale di Gcn5 tramite creazione dei ceppi deleti, tagging proteico e purificazione selettiva delle frazioni nucleari e mitocondriali. Studio delle modifiche post traduzionali di Gcn5 nella regolazione della localizzazione cellulare attraverso esperimenti di purificazione selettiva delle forme ubiquitinate e sumoilate nella frazione mitocondriale.</p> <p><b>LIRONI DAMIANO:</b> Titolo della tesi: "Native and chimeric receptors that modulate the immune response in plants". Caratterizzazione dei mutanti AtLYK2, analizzando le diverse risposte iniziali e tardive sul trattamento con chitina. Analizzate la produzione di ROS e la deposizione di Callose. Convalida si esperimenti precedenti. Clonazione per l'analisi del BifC per testare l'interazione tra LYK2 e altre proteine LYK. Analisi proteomica di purificazione per affinità su piante LYK2-RFP e profilatura metabolica durante l'innesco su entrambe le linee di knock-down e di sovraespressione. Una quantità considerevole di dati è stata prodotta dall'approccio -omico. Ampia analisi dei dati sui risultati proteomici e metabolomici utilizzando la programmazione R.</p> <p><b>LOCCI FEDERICA.</b> Titolo della tesi "Homeostasis of plant Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs) in Immunity and Development". Sono state analizzate le proprietà biochimiche della proteina CELLOX: l'enzima è stato purificato dal mezzo di <i>Pichia pastoris</i> tramite due tappe cromatografiche (cromatografia a scambio anionico e cationico) e le sue caratteristiche biochimiche ( ottimo di pH, Km, Vmax e kcat) sono state analizzate tramite saggio enzimatico colorimetrico (Arancio Xilenolo). Oltretutto, le piante doppio-omozigoti F3 degli incroci eds1-2xOGM, mpk6xOGM ed ndr1XOGM sono state analizzate in termini di recupero del fenotipo (crescita della parte aerea e radicale). Sono stati purificati (tramite HPLC) i prodotti di reazione dell'enzima CELLOX (cellotriosio e cellotetraosio ossidati). Dopo aver controllato la loro purezza tramite spettrometria di massa, è stata testata la capacità di questi zuccheri di indurre geni di difesa (tramite RT qPCR). Le piante T3 omozigoti sovra-esprimenti CELLOX sono state analizzate sia per controllare il livello di trascritto di CELLOX (tramite RT qPCR) sia per la loro attività ossidativa sul cellotriosio (tramite estrazione di proteine totali e successivo saggio enzimatico dell'Arancio Xilenolo). Oltretutto, si è analizzato il livello di trascritto di OGM dopo induzione da beta-estradiolo nelle piantule degli incroci doppio-omozigoti F3 NahGxOGM, rbohdxOGM e eds1-2xOGM (tramite RT qPCR). E' stata analizzata l'induzione genica di OGOX1 e CELLOX a seguito di infezione con <i>Botrytis cinerea</i> e trattamenti con flg22, elf18, OG e cellotriosio (tramite RT qPCR). Le caratteristiche strutturali della proteina CELLOX sono state analizzate utilizzando strumenti di modellistica bioinformatica (swissmodel.expasy.org; CCP4mg; Signal IP 4.1 Server; LAlign software). Oltretutto, sono stati ottenuti semi T2 da <i>Arabidopsis</i> trasformata con il CRISPR/Cas9 contro OGOX1 e OGOX2. E' stata analizzata la crescita in vitro di <i>Botrytis cinerea</i> su cellotriosio ossidato come unica fonte di carbonio, misurandone la crescita del micelio dopo 4 giorni. Le piante omozigoti sovra-esprimenti CELLOX sono state analizzate a seguito di infezione con il patogeno <i>Pseudomonas syringae</i>. Sono stati generati incroci F1 CELLOXxOGOX1. Infine, semi T2 sono stati ottenuti da <i>Arabidopsis</i> trasformate stabilmente con i costrutti POGOX1::GFP-OGOX1 e POGOX2::OOGOX2-GFP.</p> <p><b>NISI PAOLA SERENA:</b> Titolo della tesi "Genetic and epigenetic mechanisms controlling Neural Stem/Progenitor Cell fate". Generazione e manipolazione di colture cellulari di NSPCs derivanti dalla corteccia embrionale di topo, overesprimenti il gene che codifica per la forma solubile della proteina TSK (TSK-S) e GFP, come cultura di controllo. Colture cellulari di NSPCs in adesione e caratterizzazione dei livelli di espressione della proteina TSK-S tramite analisi di Western blot ed immunofluorescenza. Caratterizzazione dei livelli di espressione dell'mRNA di TSK e dei geni da esso regolato, in colture cellulari in adesione di NPCSS. Colture cellulari in sospensione di NSPCs adulte (SVZ) sovraesprimenti costitutivamente ed in maniera inducibile il gene <i>Dbx2</i>. Analisi dei livelli di espressione dei markers dell'aging nelle due colture overesprimenti <i>Dbx2</i>. Analisi di immunofluorescenza e quantificazione delle cellule positive ai markers di proliferazione <i>Ki67</i> e <i>pHH3</i>. Analisi del ciclo cellulare di colture di NSPCs overesprimenti <i>Dbx2</i>. Caratterizzazione della coltura di NSPCs overesprimente TSK-S tramite analisi di immunofluorescenza per il marker di staminalità <i>Nestin</i>. Quantificazione delle analisi condotte precedentemente ed internship al Babraham Institute di Cambridge (UK) per imparare la tecnica di CRISPR-Cas9 per l'eventuale applicazione nelle nostre colture cellulari di NSPCs.</p> <p><b>PIPPA SIMONE.</b> Titolo della tesi "Selezione di inibitori delle demetilasi istoniche e loro utilizzo per comprendere il ruolo della metilazione della lisina 4 dell'istone H3 nella regolazione trascrizionale". Valutazione dell'effetto di miR 486 sull'accumolo di istone H2AX fosforilato in cellule di cancro al seno MCF-7 dopo irradiazione. Valutazione dell'effetto di inibitori chimici degli enzimi <i>KDM5/JARID1</i> sull'accumolo di istone H2AX fosforilato in cellule di cancro al seno MCF-7 dopo irradiazione. Valutazione dell'arricchimento della proteina <i>KDM5B</i> sul promotore del gene <i>BRCA1</i> in cellule di cancro al seno MCF-7 trasfettate con miR 486. Validazione del meccanismo di targeting del 3'UTR di <i>KDM5B</i> dei miR 381 e 486 mediante trasfezione di cellule HEK-293 con i suddetti miR e con 3'UTR di <i>KDM5B</i> mutato nei seed dei rispettivi miRNAs.</p> <p><b>TOCCI PIERA:</b> Titolo della tesi "<math>\beta</math>-arrestin1/YAP/mutant p53 protein complex orchestrates endothelin A receptor-driven metastatization and platinum response of ovarian cancer". Studio della capacità della proteina <math>\beta</math>-arrestina 1 in risposta all'attivazione del recettore A (ETAR) dell'endotelina (ET-1), di integrare la via di segnale di Hippo implicata nella progressione di diverse tipologie di tumore, tra cui il carcinoma ovarico. Tale studio ha dimostrato che successivamente all'attivazione di ETAR, la <math>\beta</math>-arrestina 1 interagisce con YAP, noto effettore della via di segnale di Hippo, favorendone la traslocazione nucleare e l'attivazione, attraverso un meccanismo indipendente dalle proteine G. Tale studio è stato condotto su linee cellulari di carcinoma ovarico sensibili e resistenti al cisplatino e in cellule derivanti da pazienti affette da carcinoma ovarico sieroso ad alto grado (HG-SOC), caratterizzato da resistenza alle terapie a base di cisplatino e da un'alta frequenza di mutazioni di TP53 (mutp53). Studio della capacità <math>\beta</math>-arrestina 1 di coordinare, attraverso il reclutamento di nuovi partner nucleari come mutp53, l'attività trascrizionale del complesso costituito da YAP/TEAD, favorendo la trascrizione di geni, tra cui il gene che codifica per ET-1 (EDN1), che garantiscono una persistente attivazione di YAP, sostenendo la sopravvivenza e l'invasione cellulare e la resistenza alla chemioterapia in HG-SOC. Studi funzionali volti a valutare il ruolo dell'asse ETAR/<math>\beta</math>-arrestina/YAP nel conferire protezione dall'apoptosi cellulare indotta dal trattamento con un noto chemioterapico, il cisplatino, in cellule derivanti da pazienti affette da HG-SOC. Valutazione dell'efficacia anti-tumorale e anti-metastatica in modelli clinicamente rilevanti che derivano da pazienti affette da HG-SOC (HG-SOC PDX), della terapia che prevede la somministrazione di macitentan, un antagonista di entrambi i recettori delle endoteline (ETAR e ETBR), clinicamente approvato per il trattamento dell'ipertensione polmonare, e cisplatino.</p> <p><b>TROBIANI LAURA.</b> Titolo della tesi "Analysis of the R451C Neuroigin3 Knock-In mouse, a model of a monogenic form of autism". Analisi mediante western blot ed immunofluorescenza al fine di confermare i risultati ottenuti da un precedente screening di una library di composti "FDA-approved". Generazione di nuove linee cellulari esprimenti in maniera stabile la proteina Neuroilghina3, nella forma WT o mutata (R451C). Analisi dell'azione dei composti selezionati dal precedente screening sullo stress del reticolo endoplasmatico, mediante saggi luciferasi.</p> <p><b>YE MANUELA.</b> Titolo della tesi "Analysis of RNA editing during myeloid leukemia cell differentiation. Focus on RHOA". Clonaggio di una minicassetta (EX-INT-EX) in un vettore pEGFP3 per la valutazione della diversità di splicing in seguito a mutagenesi dei siti specifici di editing. Analisi del ruolo funzionale di una nuova isoforma della GTPasi RhoA, in seguito ad over-espressione, tramite microscopia confocale e saggi di migrazione. Identificazione di possibili interattori di RhoA coinvolti nella regolazione della migrazione. Analisi dell'espressione e localizzazione di p27, possibile interattore della nostra nuova isoforma di RhoA e studio della sua attività in correlazione alla migrazione e alle variazioni nel ciclo cellulare.</p>
--	--