

Qualificazione professionale

Diploma Liceo Scientifico conferito nell'anno scolastico 1999/2000

Laurea in Scienze Biologiche con punteggio 109/110 assegnato dall'Università degli Studi di Bari nell'anno accademico 2004/2005 con tesi sperimentale in Biochimica e Biologia Molecolare dal titolo: "Effetti del knock-out di DmTTF, fattore di terminazione di trascrizione mitocondriale di *Drosophila melanogaster*"; Supervisore: Prof. Palmiro Cantatore e Prof.ssa Marina Roberti (Dipartimento di Biochimica e Biologia Molecolare)

Esame di stato in Scienze Biologiche conferito nella seconda sessione dell'anno accademico 2004/2005

Esperienze professionali

Novembre 2005 - Ottobre 2008: Dottorato di ricerca in Biologia Medica e Biochimica Medica. primo vincitore del concorso per il XXI ciclo di Dottorato. L'attività di ricerca è stata condotta presso i laboratori del Dipartimento di Biochimica Medica e Biologia Medica dell'Università degli Studi di Bari, sotto la supervisione della Prof.ssa Vittoria Petruzzella e del Prof.re Sergio Papa. Titolo della tesi: "Analisi molecolare in pazienti con alterata stabilità del DNA mitocondriale e caratterizzazione strutturale della elicasi mitocondriale Twinkle"

Gennaio 2008 - Ottobre 2008: Visiting student presso il laboratorio di Biologia Molecolare e Biochimica della Michigan State University, East Lansing (Michigan, USA) sotto la supervisione della Prof.ssa Laurie S. Kaguni

Marzo 2009 - Aprile 2012: Post-dottorato presso l'International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB) situato a Monterotondo (Roma) nel gruppo di Ematologia Molecolare, sotto la supervisione del Dr. Dimitar Efremov

Gennaio 2013 - Marzo 2020: Post-dottorato presso l'Harvard Medical School, Dipartimento di Chimica Biologica e Farmacologia Molecolare - Immune Disease Institute presso il Boston Children's Hospital (Massachusetts, USA) sotto la supervisione della Prof.ssa Hao Wu

Agosto 2020 – Luglio 2022: Borsista presso l'IRCCS "S. de Bellis" di Castellana Grotte (BA), Italia

Agosto 2022 – Ricercatore sanitario (piramide della ricerca) presso l'IRCCS "S. de Bellis" di Castellana Grotte (BA), Italia

Corsi professionali

- Docente STEM – Boston Children's Hospital/Harvard Medical School (2017)
- Genetica e Genomica dal cancro – Harvard Medical School (2020)
- Immuno-oncologia – Harvard Medical School (2020)
- Next Generation Sequencing (2021)
- Incontri di aggiornamento scientifico (2021)
- Formazione generale e specifica lavoratori – alto rischio (2021)

Ricerca scientifica precedente

Durante il percorso di Dottorato di ricerca, presso l'Università degli Studi di Bari, il filone di ricerca si è concentrato sulle disfunzioni mitocondriali nelle patologie umane al fine di caratterizzare nuove alterazioni del genoma mitocondriale, come ad esempio, mutazioni puntiformi, delezioni, riarrangiamenti o delezioni dello stesso. In particolare, sono stati analizzati geni nucleari che influenzano la stabilità del genoma mitocondriale in una famiglia italiana i cui membri erano affetti da una forma autosomiale dominante di oftalmoplegia esterna progressiva (adPEO) associate a delezioni multiple del DNA mitocondriale. Da questo studio è emersa una mutazione in eterozigosi (c.907C>T; p.R303W), situata nel dominio N-terminale dell'enzima Twinkle (elicasi mitocondriale) in sei membri della famiglia, all'interno della quale due individui erano affetti da una forma tardiva di adPEO e mostravano segni di disfunzione mitocondriale. Parte di questo studio è proseguito con l'analisi dell'alterazione del numero di copie del DNA mitocondriale a seguito della suddetta mutazione. Tali dati sono stati pubblicati sulla rivista *Neuromuscular Disorders*.

Durante il periodo del primo post-dottorato, svolto presso l'International Centre of Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB) mi sono occupato dello studio di regolatori negativi, come ad esempio le proteine tirosine fosfatasi, nello sviluppo della leucemia cronica linfocitaria (CLL). In particolare, ho studiato la fosfatasi PTPN22 dal punto di vista funzionale e molecolare. Abbiamo riscontrato che PTPN22 è overespressa in linfociti B affetti da CLL; questa overespressione inibisce significativamente l'apoptosi indotta dall'antigene nei linfociti B primari agendo sul blocco del recettore BCR e sul signaling pathway sottostante, il quale regola negativamente la sopravvivenza di tali linfociti. Inoltre, si è visto che PTPN22 regola positivamente il pathway antiapoptotico, mediato da AKT, che sostiene i segnali di sopravvivenza dei linfociti B CLL. Infine, l'attività di PTPN22 può essere fortemente modulata dagli inibitori della PKC, come ad esempio ruboxistaurin and sotrastaurin, risultando in un aumento del tasso apoptotico dei linfociti B CLL esposti a stimoli proapoptotici. Per tali ragioni la fosfatasi PTPN22 rappresenta un meccanismo protettivo che permette ai linfociti B CLL, attivati dagli autoantigeni, di evadere la selezione negativa, mettendo pertanto in risalto come tale meccanismo potrebbe essere impiegato terapeuticamente contro PTPN22 per mezzo degli inibitori della PKC. Tali dati sono stati pubblicati sulla rivista *Blood*.

Durante il secondo post-dottorato, presso l'Harvard Medical School, mi sono occupato degli eventi spazio-temporali che coinvolgono il pathway TLR4-NLRP3. In particolare, la ricerca è stata incentrata sull'attivazione dell'inflammasoma NLRP3 e di tutti i componenti associati come ASC, Caspasi-1, interleuchina-1 β e Gasdermin D, coinvolti nella risposta pro-infiammatoria mediata dai macrofagi. A seguito della loro stimolazione con cristalli di urato e tossine batteriche, quali nigericina, l'inflammasoma NLRP3 viene attivato e assemblato in un unico speck perinucleare richiamando, in seguito, l'adattatore ASC e le proteine effettrici, quali Caspasi-1, interleuchina-1 β e Gasdermin D. Tuttavia, il meccanismo molecolare che porta all'attivazione dell'inflammasoma NLRP3 e dei suoi componenti effettrici è ancora oggetto di studio da parte di numerosi laboratori. Con questo studio abbiamo caratterizzato ed elucidato una parte fondamentale di questo meccanismo di attivazione, finemente regolato da molteplici fattori cellulari, la cui ricerca è culminata con la pubblicazione di un articolo pubblicato su *Science*.

Un secondo studio al quale ho dedicato la mia attenzione presso l'Harvard Medical School si è focalizzato sul processo di separazione di fase intracellulare di proteine dell'inflammasoma NLRP6 a seguito del riconoscimento e legame diretto con RNA virale. Questa ricerca è culminata con la pubblicazione di un articolo pubblicato su *Cell*.

Ricerca scientifica corrente

Attualmente la mia ricerca si incentra sul crosstalk tra infiammazione e insorgenza tumorale. Recentemente, ho scoperto un nuovo meccanismo di immuno-resistenza utilizzato esclusivamente dalle cellule tumorali, e non dalla controparte normale, per eludere i sistemi di sorveglianza immunogenica. Nello specifico, le cellule tumorali si disfano di proteine pro-apoptotiche quali la gasdermina E, facente parte dell'immunità innata, attraverso un suo rilascio esosomiale, al fine di accelerare pathways di progressione cellulare a discapito di quelli apoptotici.

Inoltre, sono interessato al nuovo emergente concetto di separazione di fase intracellulare e il suo possibile ruolo nella patogenesi e farmaco-resistenza.

Tecniche sperimentali acquisite

Metodologie biochimiche: espressione (in cellule di insetto *Sf9*) e purificazione di proteine (con resina Ni-NTA e colonna Superdex 200); western blot; gel-shift assay; in vitro phase separation assay; fluorescence polarization assay; mitochondrial helicase assay

Metodologie di biologia molecolare: estrazione di acidi nucleici e proteine da cellule e tessuti; elettroforesi per acidi nucleici e proteine; analisi spettrofotometriche per acidi nucleici e proteine; PCR; RT-PCR; long-range PCR; sequenziamento di DNA; Real-time RT-PCR; digital droplet PCR; mutagenesi sito-specifica; estrazione mitocondriale da cellule e tessuti; clonaggio e sub-clonaggio genico; CRISPR/Cas9 per il knock-out e knock-in, RNA interference (siRNA), sistema TRIM-away per il knock-out di proteine; produzione di lentivirus per la generazione di linee cellulari stabili geneticamente modificate

Metodologie di biologia cellulare: colture cellulari; microscopia confocale (spinning disk e laser scanning) per campioni fissati e live cells imaging, FRET (la cui analisi statistica effettuata con il software Matlab); FRAP; microscopia super-resolution (STORM e SIM); saggi SEAP ed ELISA; citofluorimetria per analisi e sorting; estrazione di linfociti da sangue periferico e isolamento dei linfociti B; purificazione di linfociti B e T da milza e cavità peritoneale di topi; isolamento dei macrofagi dal midollo osseo; immortalizzazione di cellule primarie; saggi di apoptosi; saggi di mobilitazione degli ioni calcio intracellulari; generazione di organoidi di cellule tumorali (3D culture); saggi di proliferazione cellulare mediante crystal violet assay; saggi di migrazione cellulare mediante scratch test

Partecipazione a conferenze

Settembre 2006: Mitochondrial, from Molecular insight to Physiology and Pathology. University of Bari, Bari Italia.

Settembre 2007: National Conference SIB (Italian Biochemistry Society). Riccione, Italy. National Conference SIB (Italian Biochemistry Society), Riccione, Rimini, Italia

Settembre 2008: Presentazione Poster presso la Gordon Research Conference, Mitochondria and Chloroplast. Biddeford, ME, USA

Dicembre 2009: Presentazione orale alla 51st American Society of Hematology, New Orleans, LA, USA

Giugno 2010: Presentazione orale al 15th annual ICGB symposium, Trieste, Italia

Giugno 2011: Presentazione orale al 16th annual ICGB symposium, Trieste, Italia

Settembre 2014: Presentazione Poster per il PCMM meeting – Harvard annual conference; vincitore miglior poster

Settembre 2015: Presentazione Poster per il PCMM meeting – Harvard annual conference, North Falmouth, MA, USA

Settembre 2016: Presentazione Poster per il PCMM meeting – Harvard annual conference; North Falmouth, MA, USA; vincitore miglior poster

Settembre 2017: Presentazione Poster per il PCMM meeting – Harvard annual conference, North Falmouth, MA, USA

Settembre 2018: Presentazione Poster per il PCMM meeting – Harvard annual conference, North Falmouth, MA, USA; vincitore miglior poster

Settembre 2019: Presentazione orale su invito al PCMM meeting – Harvard annual conference, North Falmouth, MA, USA

Ottobre 2021: Partecipazione al Inflammasome meeting: The next frontier – Embo hybrid Workshop, Monaco, Germania

Seminari su invito

Dicembre 13, 2019: Novartis Pharma AG (“Novartis”), Basel, Svizzera – Titolo: “New insights into NLRP3 and Pypin Inflammasome activation mechanisms”

Dicembre 16, 2019: Universität Bern, Berna, Svizzera – Titolo: “New insights into NLRP3 and Pypin Inflammasome activation mechanism”

Agosto 19, 2019: UNIL, Université de Lausanne, Lausanne, Svizzera – Titolo: “New insights into NLRP3, Pypin and NLRP6 Inflammasome property, activation and function”

Agosto 21, 2019: Inselspital Hospital Bern, Berna, Svizzera – Titolo: “New insights into NLRP3, Pypin and NLRP6 Inflammasome property, activation and function”

Maggio 3, 2023: Scuola di Dottorato di Ricerca in “Neuroscienze Applicate”, Dipartimento DiBraiN – Università degli Studi di Bari Aldo Moro “Inflammasoma: dal meccanismo di attivazione all'utilizzo come biomarker nella sperimentazione traslazionale”

Maggio 12, 2023: Scuola di Dottorato di Ricerca in “Neuroscienze Applicate”, Dipartimento DiBraiN – Università degli Studi di Bari Aldo Moro “La separazione di fase induce l'attivazione dell'inflammasoma NLRP6 mediata da virus a RNA”

Maggio 26, 2023: Scuola di Dottorato di Ricerca in “Neuroscienze Applicate”, Dipartimento DiBraiN – Università degli Studi di Bari Aldo Moro “Ruolo della Gasdermina E nella morte cellulare programmata: un emergente biomarker nel meccanismo di soppressione tumorale”

Attività editoriale

Giugno 2013 – Novembre 2013: Revisore di Grants per il Bando Ricerca Finalizzata 2011-2012, Ministero della Salute

Novembre, 2022: Guest Editor e responsabile della Special Issue “NLRP3 Inflammasome and Inflammatory Diseases” – Biomedicines, MDPI

2023 - : Inizio attività su invito come revisore di manoscritti su riviste internazionali (Molecules, Journal of Personalized Medicine)

Grants e riconoscimenti

Settembre 2014: vincitore miglior poster – Harvard annual conference, North Falmouth, MA, USA

Settembre 2016: vincitore miglior poster – Harvard annual conference, North Falmouth, MA, USA

Settembre 2018: vincitore miglior poster – Harvard annual conference, North Falmouth, MA, USA

Dicembre 17, 2021: grant da parte del Ministero della Salute per “Ricerca Corrente – 2022” per il seguente progetto dal titolo: “Nanoparticelle biomimetiche come nuova strategia per il trasporto di farmaci nelle terapie oncologiche del tratto gastro-enterico”, Ruolo: Ricercatore del grant del valore pari a 25.000,00 euro

Dicembre 17, 2021: grant da parte del Ministero della Salute per “Ricerca Corrente – 2022” per il seguente progetto dal titolo: “Nuove formulazioni liposomali per il targeting simultaneo del pathway di NOTCH in epatocarcinoma e dell’inflammasoma NLRP3 in macrofagi associati a tumore” Ruolo: Ricercatore, grant del valore pari a 30.000,00 euro

Dicembre 23, 2023: grant da parte del Ministero della Salute per “Ricerca Corrente – 2022” per il seguente progetto dal titolo: “Notch ed Inflammasoma nella patogenesi del Colangiocarcinoma” Ruolo: Ricercatore, grant del valore pari a 30.000,00 euro

Dicembre 23, 2022: grant da parte del Ministero della Salute per “Ricerca Corrente – 2023” per il seguente progetto dal titolo: "Up-regolazione della proteina pro-apoptotica gasdermina E mediante inibizione del rilascio esosomiale come nuovo approccio terapeutico nell'ambito delle patologie oncologiche del tratto gastro-enterico"; Ruolo: Principal Investigator del grant del valore pari a 30.000,00 euro

Brevetti

Settembre 25, 2017: Presentazione della domanda di brevetto internazionale intitolato: “HDAC6 is required for inflammasome activation and may act as a potential therapeutic target” presso l’ufficio brevetti dell’Harvard Medical School and Boston Children’s Hospital, Boston, MA, USA

Abstracts in riviste internazionali

- Overexpression of the Protein Tyrosine Phosphatase Lyp Reduces the Responsiveness of Chronic Lymphocytic Leukemia B-Cells to B-Cell Receptor Ligation

Negro, R., Longo, P.G., Tarnani, M., Gobessi, S., Laurenti, L., Efremov, D.G.

Blood, 114 (22): 800 [IF 9.060]

- Assembly of the Nlrp3 Inflammasome Regulates NET Formation and is Promoted by the Vimentin Intermediate Filament Cytoskeletal System

Munzer, P., Negro, R., Magupalli, V., Kittisopikul, M., Vahabikashi, A., Wong, S.L., Goldman, R., Wu, H., Ridge, K., Wagner, D. (2019)

Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology, Volume 39, Supplement 1, Meeting Abstract A118 [IF 10.531]

- Molecular mechanism of RNA sensing in NLRP6 inflammasome signaling

Shen, C., Li, R., Negro, R., Flavell, R., Zhu, S., Wu, H. (2020)

Biophysical Journal, <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2019.11.1216> [IF 4.023]

Publicazioni in riviste internazionali

- Molecular analysis in a family presenting with a mild form of late-onset autosomal dominant chronic progressive external ophthalmoplegia (CPEO)

Negro, R., Dell'aglio, R., Zoccolella, S., Amati, A., Artuso, L., Petruzzella, V. (2009)

Neuromuscular Disorders, 19(6):423-6 [IF 4.296]

- Overexpression of the autoimmunity-associated tyrosine phosphatase PTPN22 in chronic lymphocytic leukemia enhances antiapoptotic B-cell receptor signals through selective activation of the AKT pathway

Negro, R., Gobessi, S., Longo, P., He Y., Zhang, Z.Y., Laurenti, L., and Efremov, D.G. (2012)

Blood, 119(26):6278-87 [IF 9.060]

- Molecular mechanism for NLRP6 inflammasome assembly and activation

Shen, C., Lu, A., Xie, W.J., Ruan J., Negro, R., Egelman, E.H., Fu, T.M., Wu, H. (2019)

PNAS, 116(6):2052-2057 [IF 9.412]

- HDAC6-mediated aggresome-like mechanism for NLRP3 and Pyrin inflammasome activation
Magupalli, V.G.*†, Negro, R.*†, Tian, Y.*, Hauenstein, A.V.*, Di Caprio G., Skillern, W., Deng, Q., Alam, H.B., Maliga, Z., Sharif, H., Hu, J., Evavold C.L., Kagan, J.C., Schmidt, F.I., Fitzgerald, K.A., Kirchhausen, T., Li, Y., Wu, H†. (2020)

*co-first author

† correspondence

Science, 369(6510):eaas8995 [IF 47.728]

- TRPM2, linking oxidative stress and Ca²⁺ permeation to NLRP3 inflammasome activation

Wang, L.*, Negro, R.*, Wu, H. (2020)

*co-first author

Current Opinion in Immunology, 62:131-135 [IF 7.486]

- Thyroid Hormones Interaction With Immune Response, Inflammation and Non-thyroidal Illness Syndrome

De Luca, R.†, Davis P.J., Lin, H-Y., Gionfra, F., Percario, Z.A., Affabris, E., Pedersen, J.Z., Marchese, C., Trivedi, P., Anastasiadou E., Negro, R.†, Incerpi, S.† (2021)

† correspondence

Frontiers in Cell and Developmental Biology, 8:614030 [IF 5.69]

- NLRP3 inflammasome assembly promoted by PAD4 leads to NETosis under sterile conditions in vitro and in vivo

Münzer, P., Negro, R., Fukui, S., di Meglio, L., Cherpokova, D., Sorvillo N., Shi, L., Magupalli, V.G., Gutch, S., Chu, L., Chu, L., Waterman, C.M., Goldman, R.D., Ridge, K.M., Wu, H., Wagner, D.D. (2021)

Frontiers in Immunology, 10.3389/fimmu.2021.683803 [IF 8.786]

- NLRP6 senses RNA viruses for inflammasome activation by phase separation into condensed phases

Shen, C.*, Li, R.*, Negro, R., Cheng, J., Vora, S., Fu, T-M., Wang, A., He, K., Andreeva, L., Tian, Z., Flavell, R., Zhu, S., Wu, H. (2021)

*co-first author

Cell, 10.1016/j.cell.2021.09.032 [IF 66.850]

- Beneficial Effects of Table Grape Use on Serum Levels of Omega-3 Index and Liver Function: A Randomized Controlled Clinical Trial

Notarnicola, M., De Nunzio, V., Lippolis, T., Tutino, V., Cisternino, A.M., Iacovazzi, P.A., Milella R.A., Gasparro, M., Negro, R., Polignano, M., Caruso, M.G. (2022)

Biomedicines, 10.3390/biomedicines10092310 [IF 4.757]

- Network Analysis for the Discovery of Common Oncogenic Biomarkers in Liver Cancer Experimental Models

Cabral, L.K.D., Giraudi, P.J., Giannelli, G., Dituri, F., Negro, R., Tiribelli, C., Sukowati, C.H.C (2023)

Biomedicines, 10.3390/biomedicines11020342 [IF 4.757]

Castellana Grotte, 29/05/2023