



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 2006 - Aprile 2006: Attività didattica per il corso di Biochimica e Biologia Molecolare svolto presso il Dipartimento di Biotecnologie dell'Università degli Studi di Bari.

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.

Marzo 2020 – : Junior group leader 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)

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 progressive (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 postdottorato, 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 beta 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 beta e Gasdermin D. Tuttavia, il meccanismo

molecolare che porta all'attivazione dell'inflammasoma NLRP3 e dei suoi componenti effettori 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.

Ricerca scientifica corrente

Attualmente la mia ricerca si incentra sul crosstalk tra infiammazione e insorgenza tumorale. Recentemente, ho scoperto un nuovo stimolo fisiologico di attivazione dell'inflammasoma NLRP3, molto abbondante nel microambiente tumorale, che potrebbe avere notevole rilevanza nella progressione della malattia e nella formazione di metastasi.

Tecniche sperimentali acquisite

Colture cellulari; CRISPR/Cas9 per il knockout e knockin, RNA interference (siRNA), sistema TRIM-away per il knockdown; produzione di lentivirus per la generazione di linee cellulari stabili; microscopia confocale per campioni fissati o live cells, 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.

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; estrazione mitocondriale da cellule e tessuti; clonaggio e sub-clonaggio genico.

Partecipazione a conferenze

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

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

Settembre 2008: Presentazione Poster presso la Gordon Research Conference, Mitochondria and Chloroplast. Biddenford, Maine.

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

Giugno 2010: Presentation orale al 15th annual ICGEB symposium. Trieste, Italy.

Giugno 2011: Presentazione orale al 16th annual ICGEB symposium. Trieste, Italy.

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

Settembre 2015: Presentazione Poster per il PCMM meeting – Harvard annual conference

Settembre 2016: Presentazione Poster per il PCMM meeting – Harvard annual conference; vincitore primo premio come miglior poster.

Settembre 2017: Presentazione Poster per il PCMM meeting – Harvard annual conference

Settembre 2018: Presentazione Poster per il PCMM meeting – Harvard annual conference (best poster award)

Settembre 2019: Presentazione orale su invito al PCMM meeting – Harvard annual conference

Articoli pubblicati

- 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.

- 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.

- 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.

- HDAC6-mediated aggresome-like mechanism for NLRP3 and Pyrin inflammasome activation

Magupalli, V.G.*†, Negro, R.*†, Yuzi, T*, Hauenstein, A.V.*, Di Caprio G., Skillern, W., Deng, Q., Orning P., Alam, H.B., Maliga, Z., Sharif, H., Hu, J., Evavold C.L., Kagan, J., Schmidt, F.I., Fitzgerald, K.A., Kirchhausen, T., Li, Y.†, Wu, H.†. (2020) **Science**, 18;369(6510):eaas8995.

*co-first author

† correspondence

- Structural basis of TRPM2-mediated Ca²⁺ signaling in NLRP3 activation (2020)
Longfei, L.* , Negro, R.* , Wu, H. (2020) **Current Opinion in Immunology**, 62:131-135.

*co-first author

- Thyroid hormone interaction with immune response, inflammation and non-thyroidal illness syndrome

De Luca, R. [†], Davis, P.J., Lin, H.J., Gionfra, F., Percario, Z.A., Affabris, E., Pedersen, J.Z., Marchese, C., Trivedi, P., Anastasiadou, E., Negro, R. [†], and Incerpi, S[†]. (2020) **Frontiers in cell and developmental biology**

[†] correspondence

- NLRP3 inflammasome assembly promoted by PAD4 leads to NETosis under sterile conditions in vitro and in vivo. **Science Immunology**, in revision

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.

- NLRP6 senses RNA viruses for inflammasome activation by phase separation into condensed phases
Shen, C.*, Negro, R.*, Li, R.*, Flavell, R., Zhu, S., Wu, H. **Cell**, manuscript in preparation

*co-first author