

Biologia Strutturale – Introduzione

TECNICHE DI INDAGINE BIOSTRUTTURALE CON LUCE DI SINCROTRONE

A.A. 2022-23

TECNICHE DI INDAGINE BIOSTRUTTURALE CON LUCE DI SINCROTRONE

Alberto Cassetta

alberto.cassetta@ic.cnr.it

20 ore

6 ore di esercitazioni

040-3757525

Sonia Covaceuszach

sonia.covaceuszach@ic.cnr.it

20 ore

6 ore di esercitazioni

CNR - Istituto di Cristallografia: S.S. 14 Km 163,5

Area di Ricerca – Basovizza (Sincrotrone)



Argomenti del Corso

Lo scopo fondamentale del corso è quello di fornire una panoramica delle metodologie più avanzate in campo biologico, chimico e fisico, capaci di fornire informazioni sulla struttura tridimensionale di macromolecole di interesse biologico, in modo particolare proteine e acidi nucleici.

Una larga parte del corso riguarderà anche gli aspetti biofisici, biochimici e di biologia molecolare, legati all'ottenimento delle informazioni strutturali.

Suddivisione del corso

Sonia Covaceuszach:

- Metodi di Espressione e purificazione di proteine
- Metodi biofisici in uso per lo studio e la caratterizzazione delle proteine
- Metodi biofisici in uso per lo studio delle interazioni proteine-ligando
- Cristallizzazione di macromolecole

Alberto Cassetta:

- Panoramica dei metodi usati per la determinazione della struttura molecolare
- La cristallografia di raggi-X per la determinazione strutturale delle macromolecole biologiche
- La luce di sincrotrone, elementi di base e suo utilizzo per lo studio strutturale delle macromolecole

Più nel dettaglio (A. Cassetta)

- Biologia Strutturale: aspetti generali
- I principali metodi usati per lo studio della struttura (macro)molecolare
- Simmetria e cristalli
- I principi fisici della diffrazione
- Cristallografia di raggi-X per lo studio delle macromolecole
 - i. Aspetti Sperimentali
 - ii. Problema della fase e sua soluzione
 - iii. Raffinamento strutturale
 - iv. Validazione dei risultati e loro presentazione
- Luce di Sincrotrone
 - i. Applicazioni in biologia strutturale
 - ii. Importanza in cristallografia

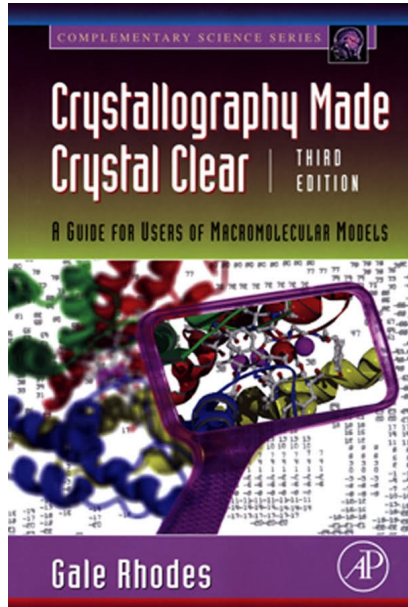
Esperienze pratiche (laboratorio)

Data: Da definire (probabilmente fine novembre/dicembre)

1. (**Da Verificare!**) Acquisizione dati cristallografici (beamline XRD1 ELETTRA)
2. Elaborazione e visualizzazione dei dati di diffrazione

- Le esperienze pratiche si svolgeranno in due pomeriggi distinti.
- Ogni esperienza richiederà 3-4 ore

Materiale Didattico

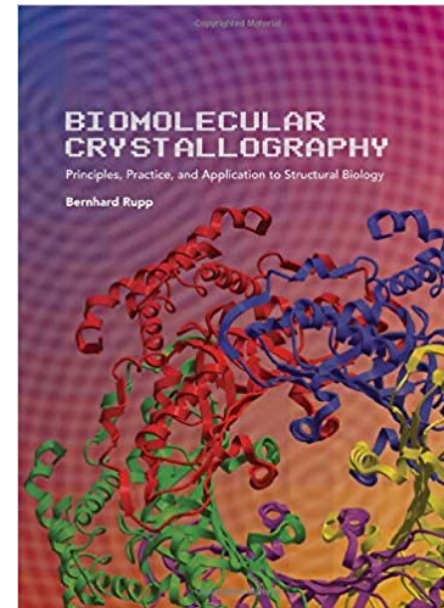


TESTO PRINCIPALE:

G. Rhodes

*Crystallography
made Crystal Clear*

Terza edizione



APPROFONDIMENTI:

B. Rupp

Biomolecular
Crystallography

I testi sono disponibili in formato elettronico presso la biblioteca di UniTS.

Eventuale Altro materiale (Estratti di libri, Pubblicazioni dalla più recente letteratura scientifica), sarà fornita tramite moodle.

PDF delle slides presentate saranno fornite tramite moodle

Esami

L'esame è unico per entrambi i docenti e consisterà in una presentazione (PowerPoint) di un articolo tratto dalla recente letteratura scientifica e inerente gli argomenti trattati nel corso delle lezioni.

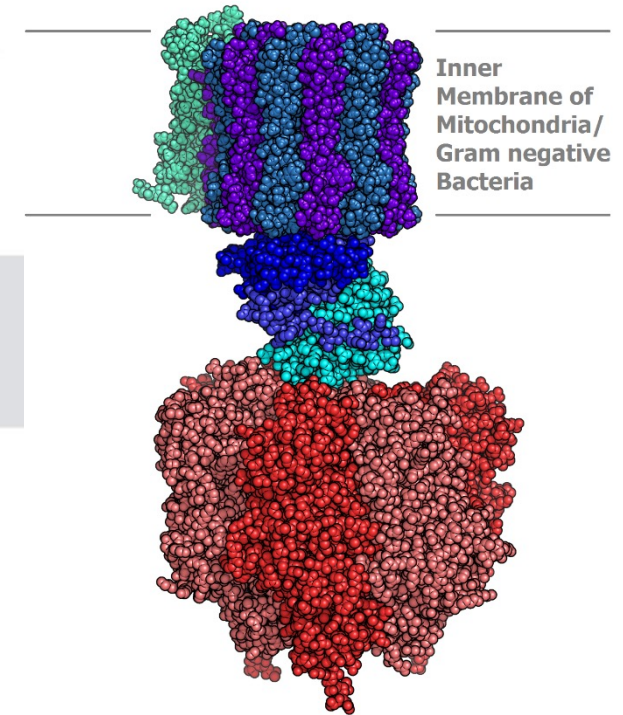
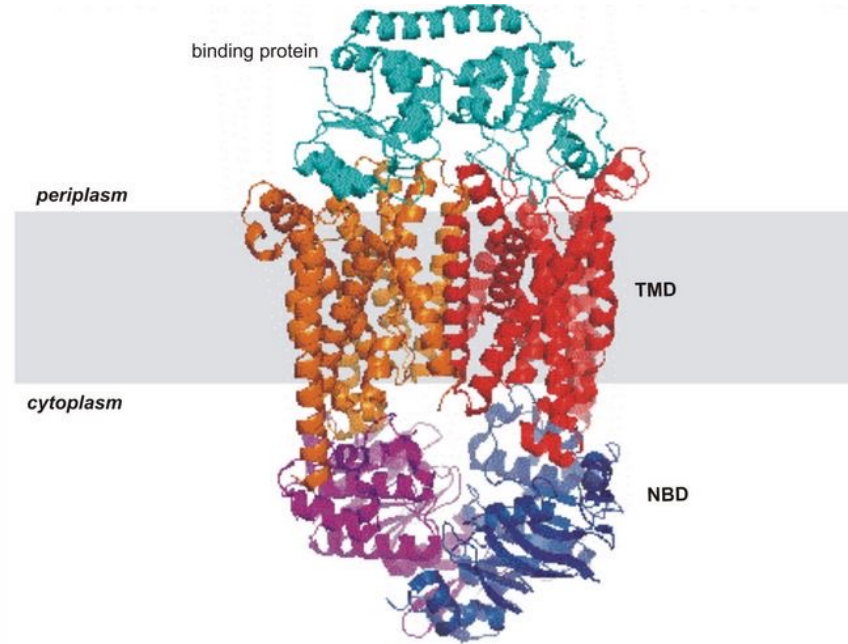
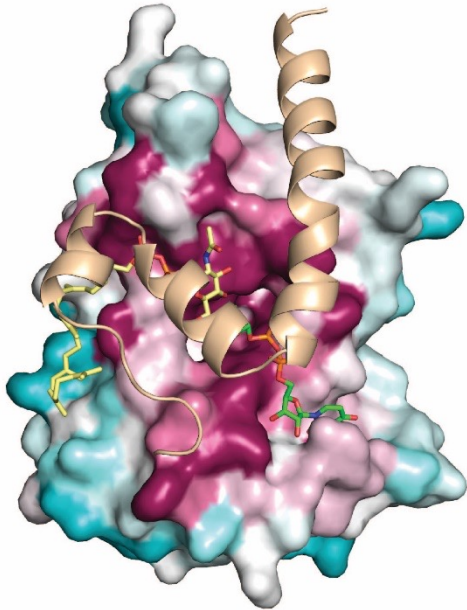
Nel corso, o al termine della presentazione i docenti faranno domande su argomenti specifici affrontati durante il corso.

L'articolo verrà scelto e assegnato dai docenti e riguarderà gli argomenti descritti da entrambi i docenti.

Si raccomanda agli studenti di contattare i docenti (indifferente quale dei due, meglio entrambi) 20-30 gg prima dell'esame in modo che venga assegnato l'articolo oggetto dell'esame

Introduzione alla Biologia Strutturale

Biologia Strutturale



Una definizione...

La **biologia strutturale** è una branca della [biologia molecolare](#) concernente lo studio dell'architettura e della morfologia delle macromolecole biologiche – in particolare [proteine](#) e [acidi nucleici](#) – e ciò che causa la struttura che queste molecole hanno

«Wikipedia»

I metodi che i biologi strutturali usano per determinare la loro struttura generalmente coinvolgono misurazioni di grandi numeri di molecole identiche effettuate nello stesso tempo. Questi metodi includono: [cristallografia](#), [NMR](#), [spettroscopia fotoelettronica](#), [microscopia elettronica](#), [microscopia crioelettronica](#), [dicromismo circolare](#)

«Wikipedia»

Perché studiare la struttura di una macromolecola?

La determinazione della struttura molecolare di una macromolecola può essere un processo lungo e complesso, perché impegnare tanto tempo e denaro?

Alla base di tutto c'è un principio, non dimostrato ma mai contraddetto:

la funzione di una (macro)molecola è strettamente legata alla sua struttura molecolare, ovvero all'arrangiamento tridimensionale degli atomi che la compongono

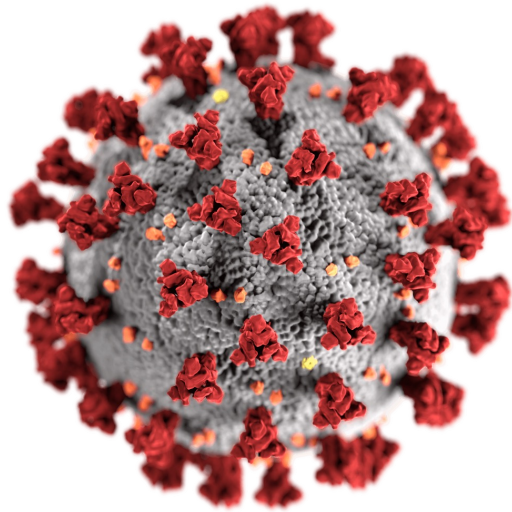
Questo principio viene espresso dal concetto di:

Relazione Funzione (o attività)/Struttura (Structure Activity Relationship)

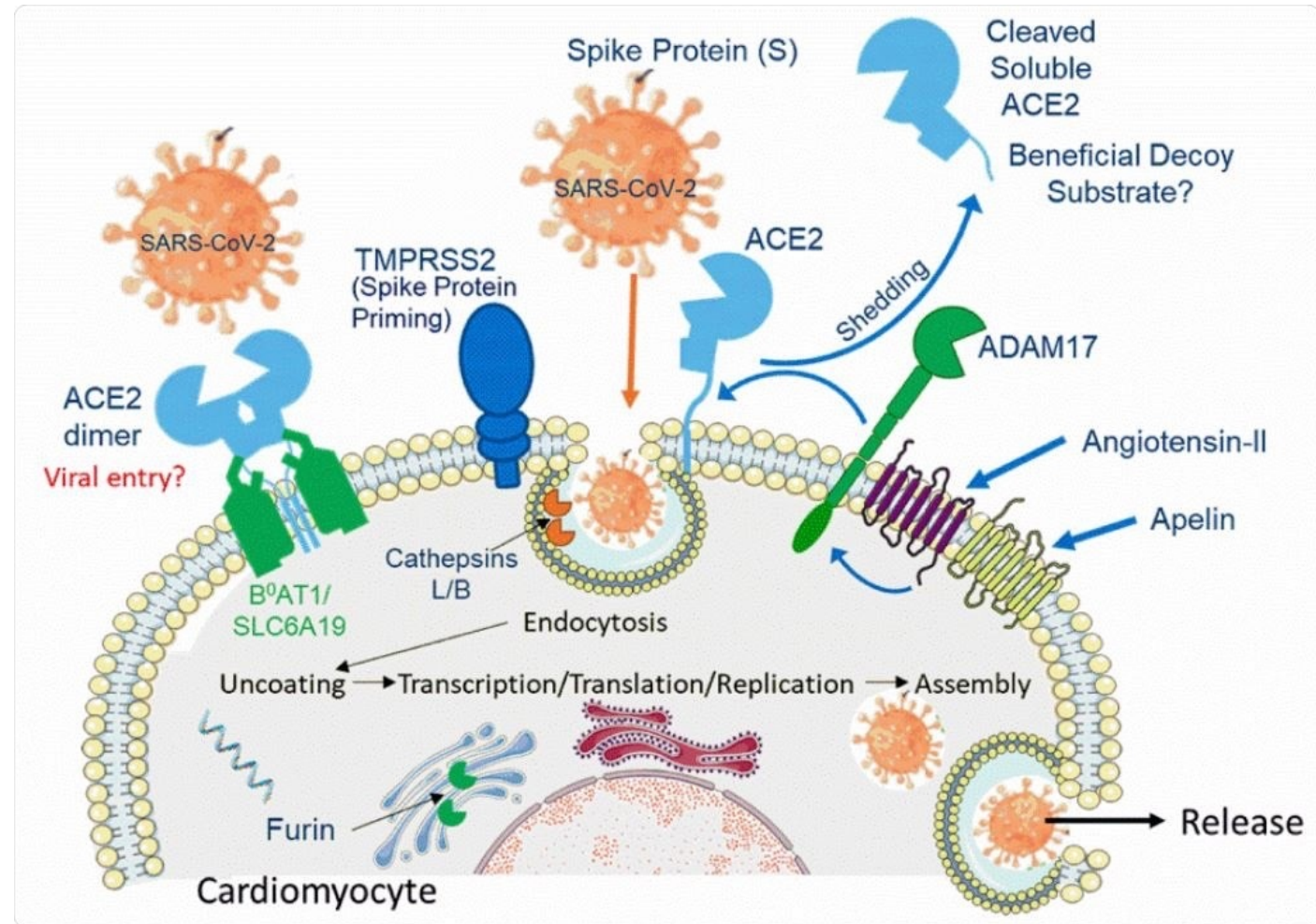
Conoscere la forma, la struttura, l'organizzazione molecolare di una (macro)molecola può aiutare a **comprendere e razionalizzare** ciò che è noto a livello funzionale della (macro)molecola ma anche a **prevedere** funzioni o possibilità non ancora note.

Struttura e Funzione (1): SARS-Cov-2

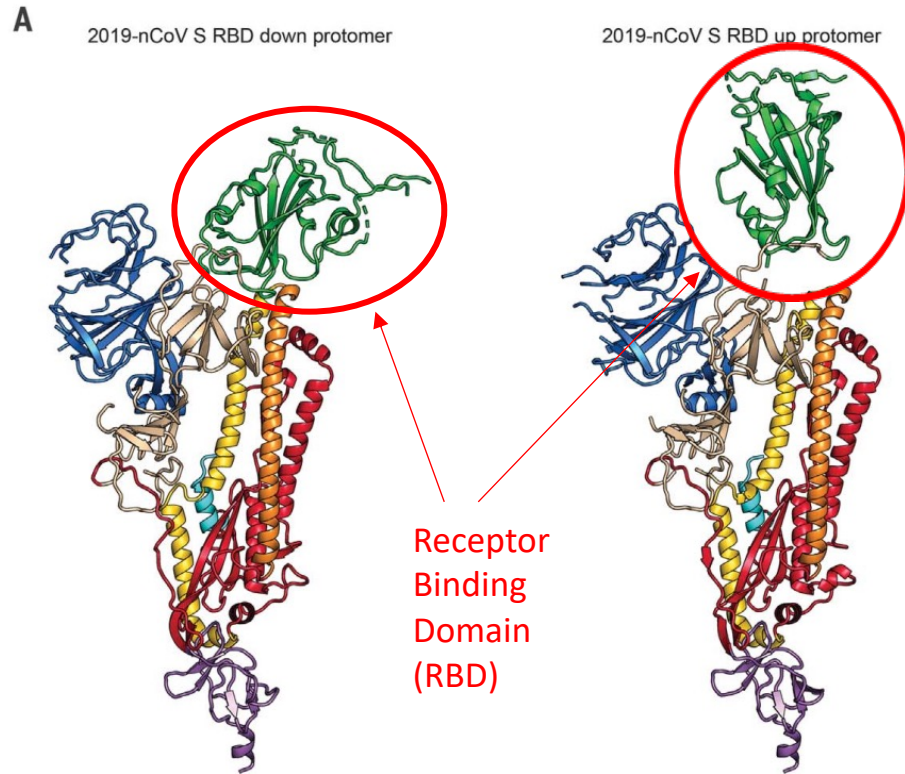
Struttura e funzione: SARS-CoV-2



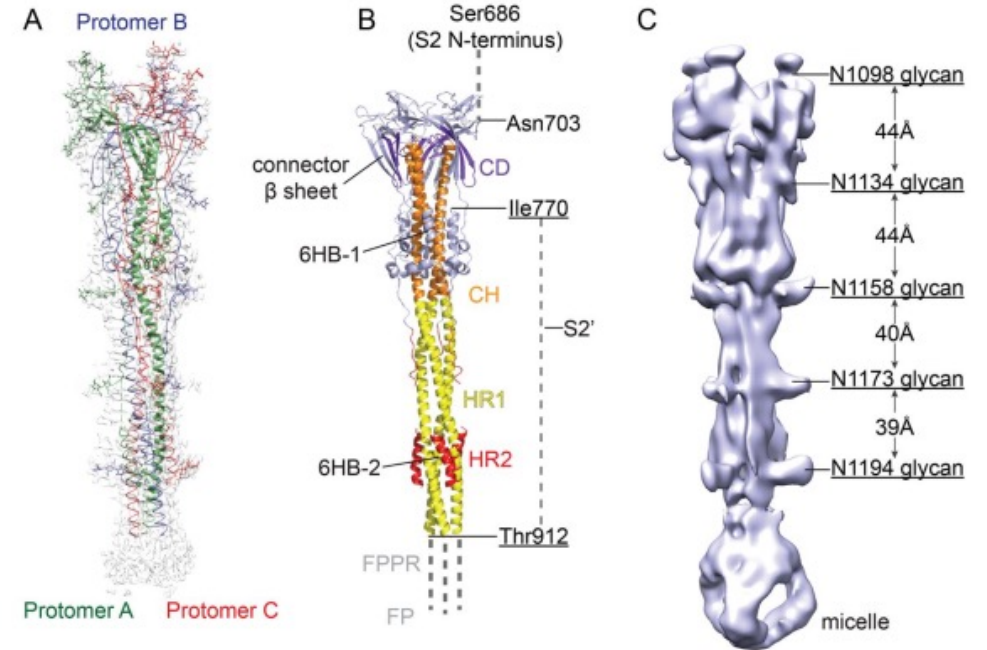
SARS-CoV-2
Virus



Struttura e funzione: Spike Protein



Pre-fusion SARS-CoV-2 Spike Protein



Post-fusion SARS-CoV-2 Spike Protein

Struttura e funzione: Spike Protein

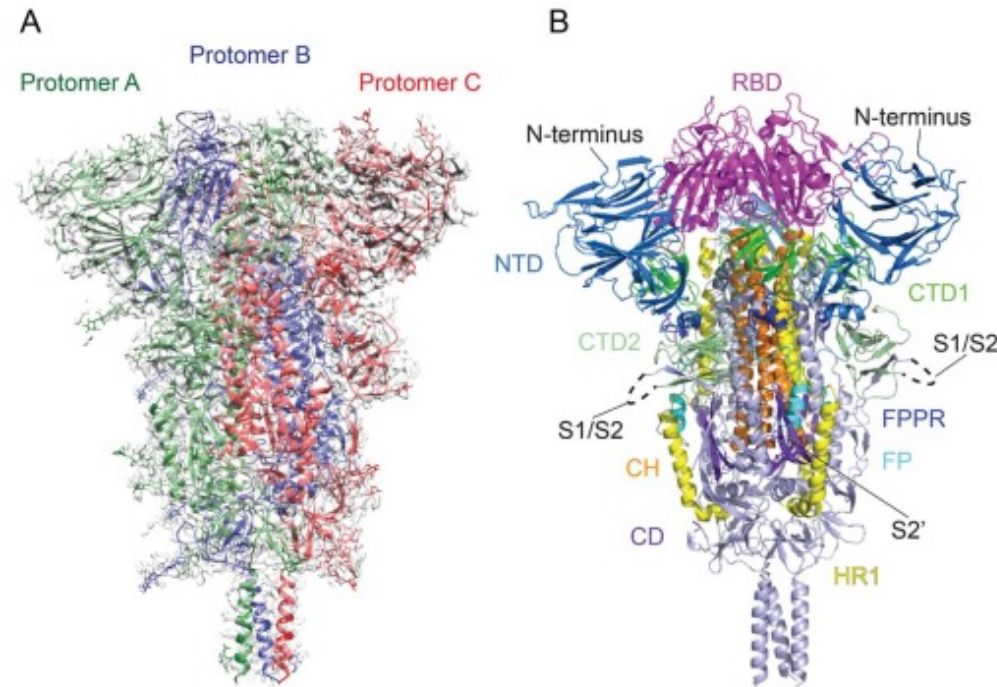
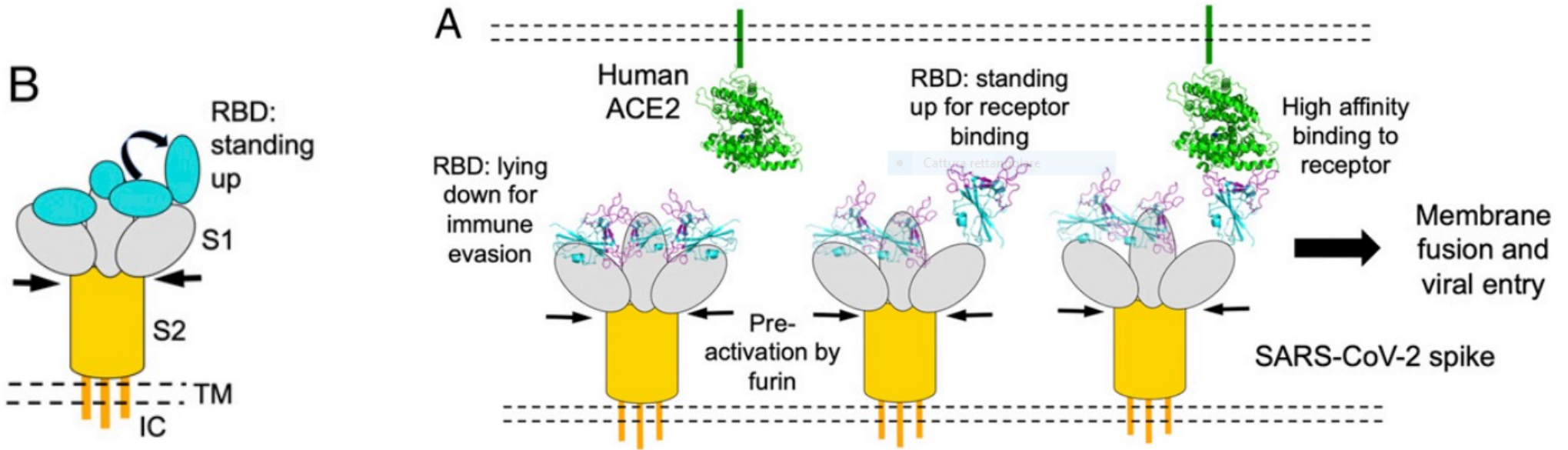


Fig. 2. Cryo-EM structure of the SARS-CoV-2 S protein in the prefusion conformation. (A) The structure of the S trimer was modeled based on a 2.9Å density map. Three protomers (A, B, and C) are colored in green, blue and red, respectively. (B) Overall structure of S protein in the prefusion conformation shown in ribbon representation. Various structural components in the color scheme shown in Fig. 1A include NTD, N-terminal domain; RBD, receptor-binding domain; CTD1, C-terminal domain 1; CTD2, C-terminal domain 2; FP, fusion peptide; FPPR, fusion peptide proximal region; HR1, heptad repeat 1; CH, central helix region; and CD, connector domain. N terminus, S1/S2 cleavage site and S2' cleavage site are indicated.

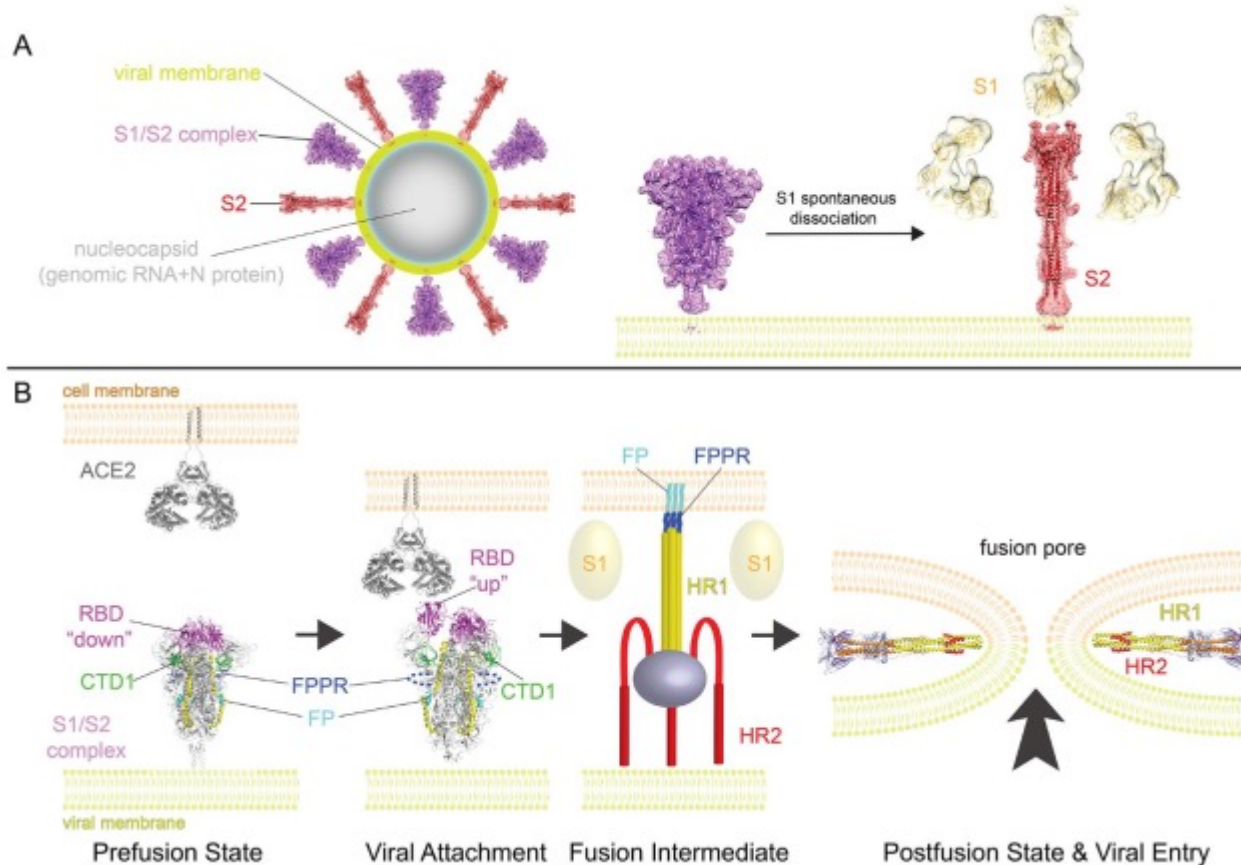
Struttura e Funzione: meccanismo di fusione



B

Features of viral entry	SARS-CoV	SARS-CoV-2	Implications for SARS-CoV-2
Frequency of RBD standing up	High	Low	Immune evasion (hidden RBD)
Human ACE2-binding affinity by RBD	Low	High	Enhanced entry (compensation for hidden RBD)
Pre-activation by furin	No	Yes	Enhanced entry into some types of cells (compensation for hidden RBD)

Struttura e funzione: fusione

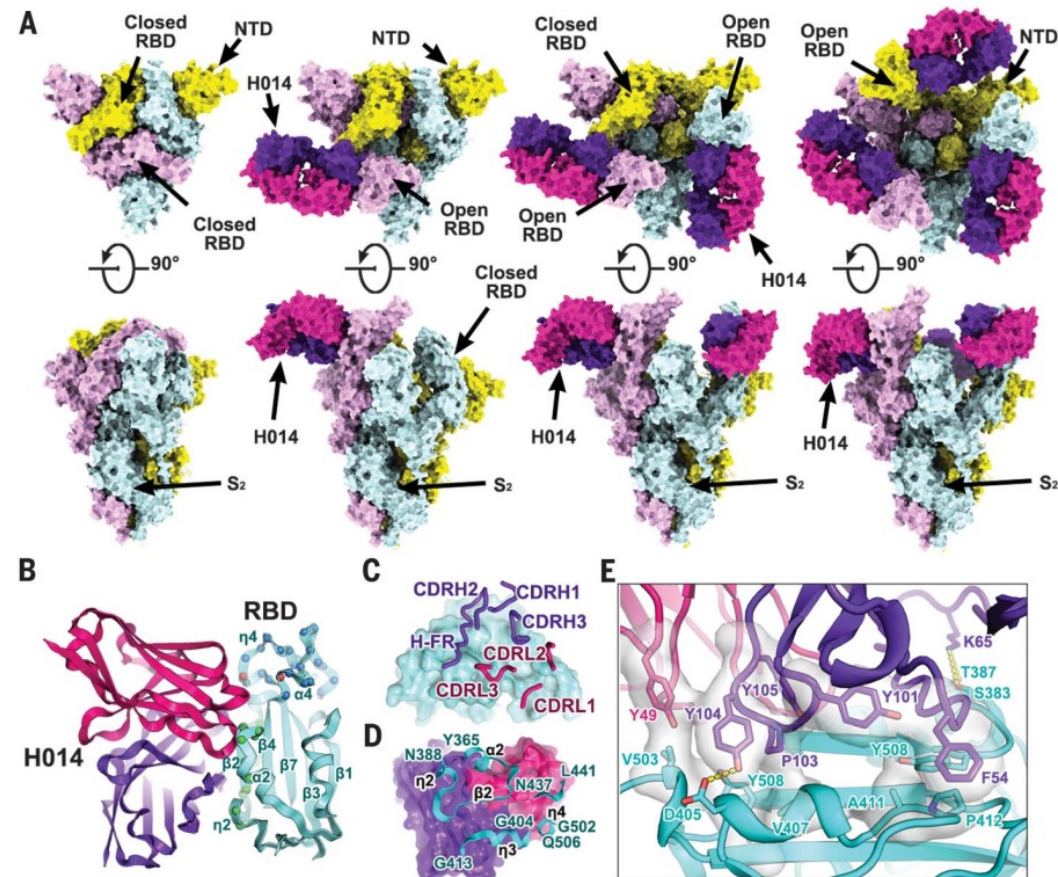


Lo studio biostrutturale della proteina Spike, dei suoi diversi stati e della sua interazione con ACE2, ha permesso di chiarire il meccanismo molecolare di fusione del virus SARS-CoV-2.

Questa informazione si sta rivelando importante per lo sviluppo sia di vaccini che di farmaci opportuni.

Struttura e funzione: Anticorpi anti-spike

Fig. 2. Cryo-EM structures of the SARS-CoV-2 S trimer in complex with H014. (A) Orthogonal views of SARS-CoV-2 S trimer with three RBDs in the closed state (left), one RBD in the open state and complexed with one H014 Fab (middle), two RBDs in the open state and each complexed with one H014 Fab. NTD, N-terminal domain. All structures are presented as molecular surfaces with different colors for each S monomer (cyan, violet, and yellow), and the H014 Fab light (hot pink) and heavy (purple-blue) chains. (B) Cartoon representations of the structure of SARS-CoV-2 RBD in complex with H014 Fab with the same color scheme as in (A). Residues that constitute the H014 epitope and the RBM are shown as spheres and colored in green and blue, respectively. The overlapped residues between the H014 epitope and the RBM are shown in red. (C and D) Interactions between the H014 and SARS-CoV-2 RBD. The CDRs of the H014 that interact with SARS-CoV-2 RBD are displayed as thick tubes over the cyan surface of the RBD (C). The H014 epitope is shown as a cartoon representation over the surface of the RBD (D). (E) Details of the interactions between the H014 and SARS-CoV-2 RBD. Some residues involved in the formation of hydrophobic patches and hydrogen bonds are shown as sticks and labeled. Color scheme is the same as in (A). Abbreviations for the amino acid residues: A, Ala; D, Asp; F, Phe; G, Gly; K, Lys; L, Leu; N, Asn; P, Pro; Q, Gln; S, Ser; T, Thr; V, Val; and Y, Tyr.



Struttura e funzione: Vaccini

Immunogenicity and structures of a rationally designed prefusion MERS-CoV spike antigen

Jesper Pallesen^{a,1}, Nianshuang Wang^{b,1,2}, Kizzmekia S. Corbett^{c,1}, Daniel Wrapp^b, Robert N. Kirchdoerfer^a, Hannah L. Turner^a, Christopher A. Cottrell^a, Michelle M. Becker^d, Lingshu Wang^e, Wei Shi^e, Wing-Pui Kong^e, Erica L. Andres^d, Arminja N. Kettenbach^{b,f}, Mark R. Denison^{d,g}, James D. Chappell^d, Barney S. Graham^c, Andrew B. Ward^{a,2}, and Jason S. McLellan^{b,2}

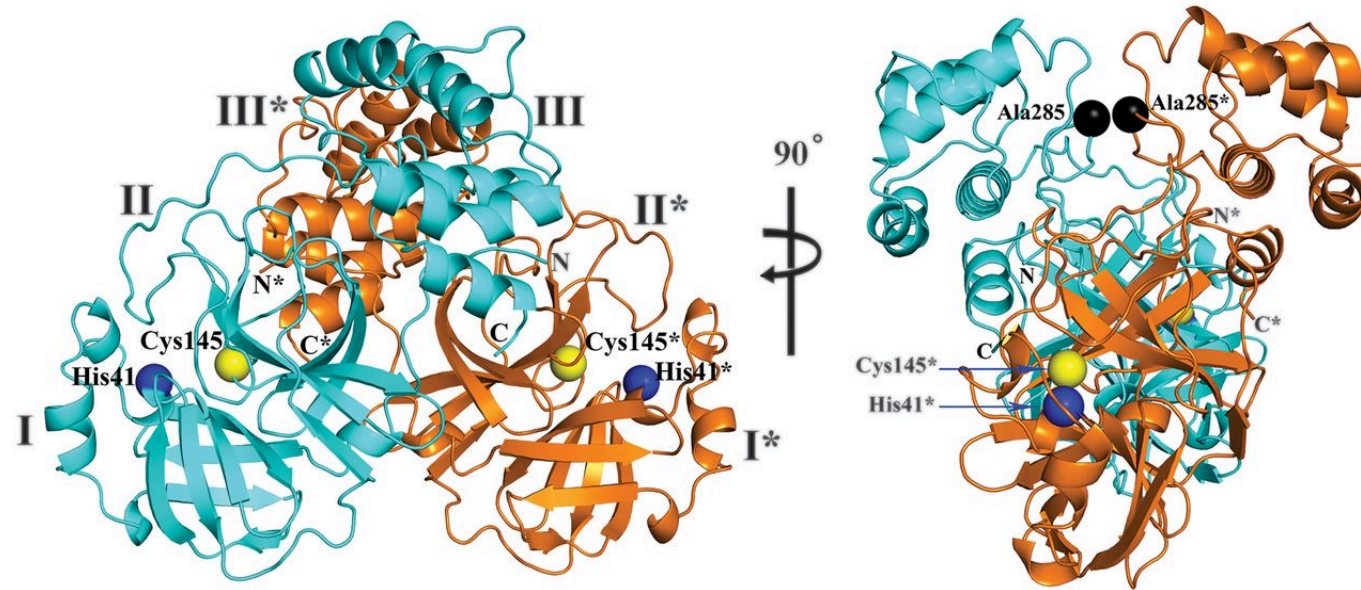
<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1707304114>

La doppia mutazione V1060 e L1061 in proline (mutante 2P), stabilizza la forma di pre-fusione di Spike.

Il mutante 2P mostra una maggiore immunogenicità ed è la forma di Spike espressa nei vaccini Biontech e Moderna

Struttura e funzione (2): proteasi-Mpro

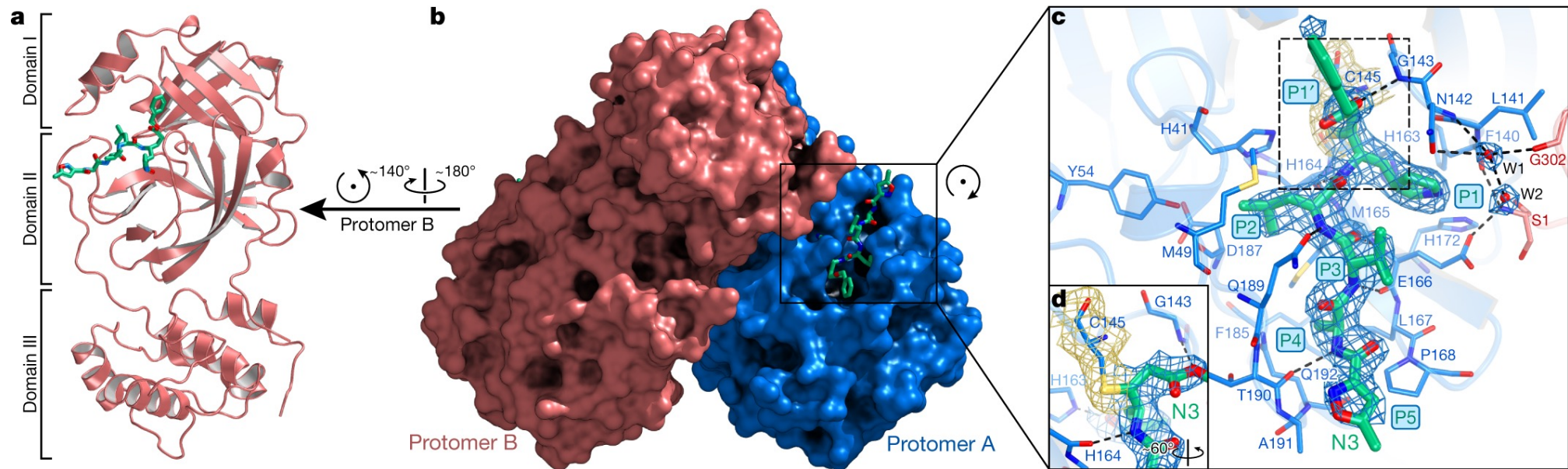
SARS-CoV-2 Main Protease (M^{pro} o 3CL^{pro})



Il meccanismo di replicazione di SARS-CoV-2 comporta l'espressione di due polipeptidi (pp1a e pp1ab) successivamente soggetti all'azione di due proteasi

La Main Protease è una delle due proteasi responsabili dell'azione proteolitica ed è quindi **ESSENZIALE** per la replicazione del virus

Inibizione di M^{pro}



L'inibizione di M^{pro} è una modo promettente per bloccare la replicazione del Virus

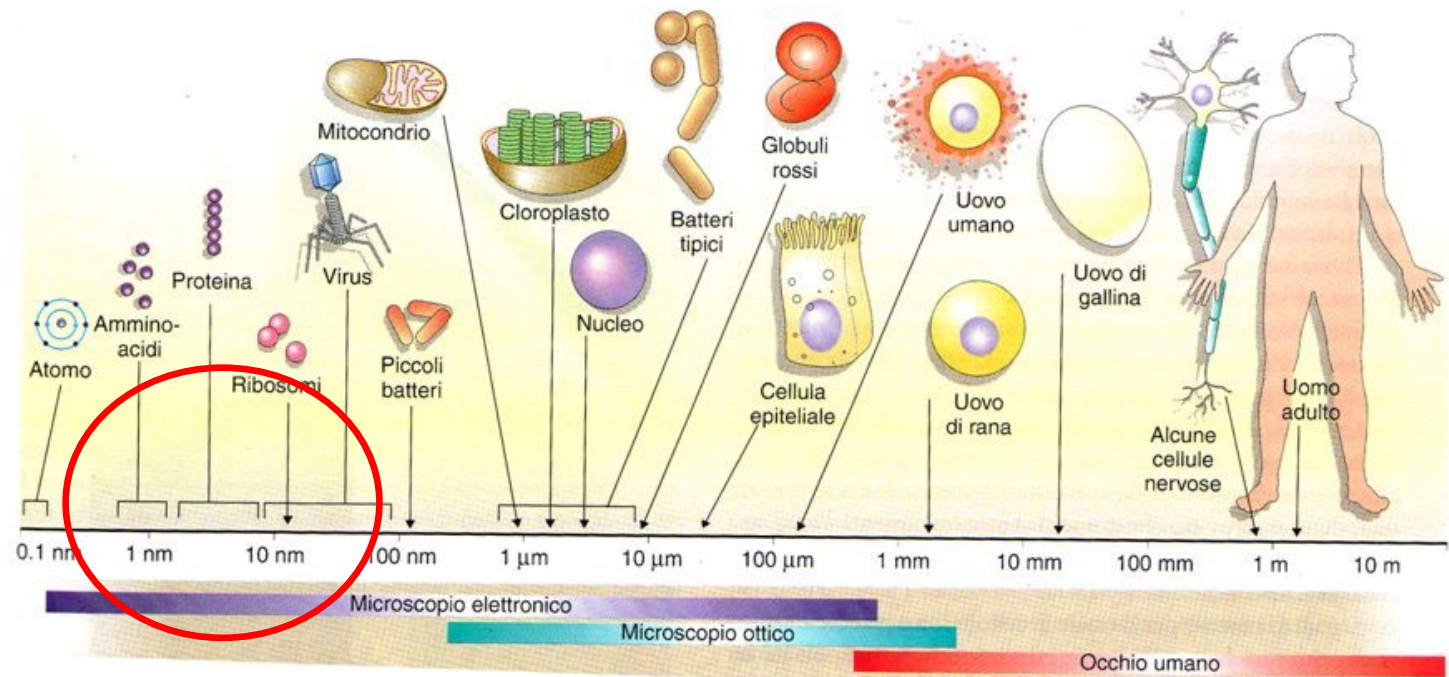
La conoscenza della **STRUTTURA** molecolare di M^{pro} e dei suoi complessi con gli inibitori permette una progettazione razionale di nuovi e più potenti molecole con attività antivirale

Biologia Strutturale: Cosa studiamo

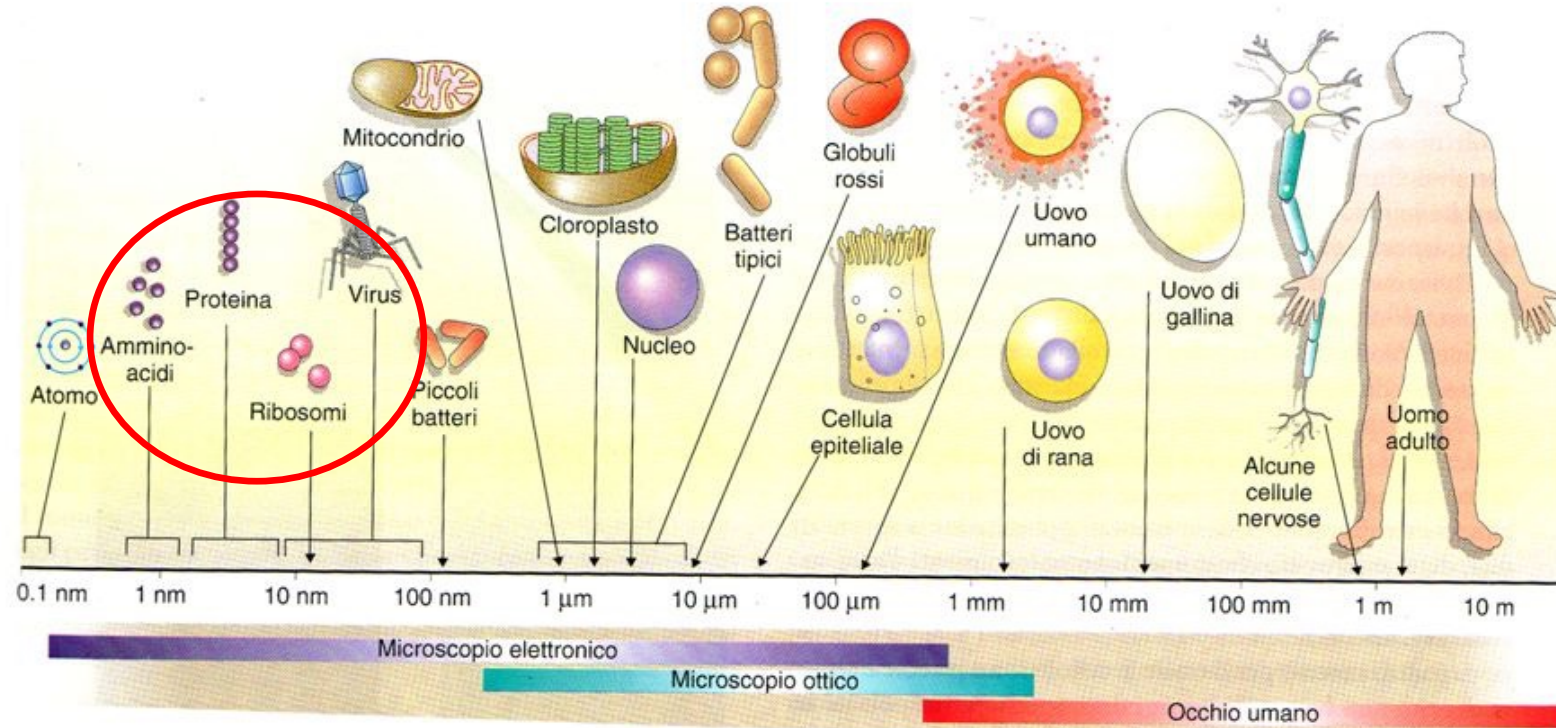
Ambito della Biologia Strutturale: Dimensioni

L'ambito di interesse della Biologia Strutturale è piuttosto circoscritto. E' limitato alla struttura molecolare di macromolecole biologiche (proteine, acidi nucleici, per lo più) su scala atomica o quasi atomica (molecolare).

In generale in biologia strutturale sono oggetto di studio quelle strutture biologiche di natura macromolecolare, di dimensioni variabili dalla decina di Å fino al centinaio di nm, osservabili con un dettaglio dell'ordine di 1 Å (0.1 nm) e comunque non superiore ai 30 Å.



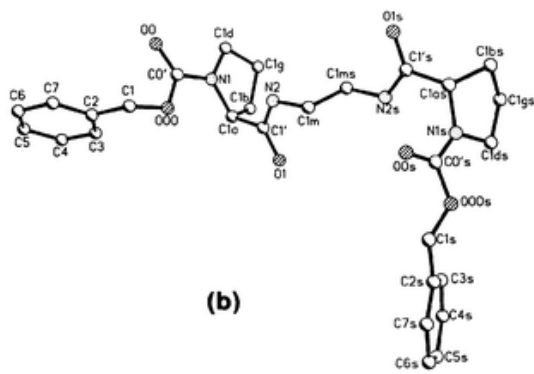
Metodi di Indagine e Dimensioni



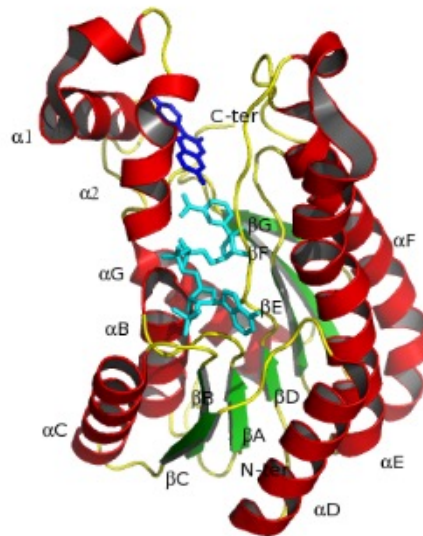
Lo strumento usato per l'osservazione è commisurato alle dimensioni dell'oggetto di studio (**ma non solo microscopio elettronico: cristallografia di raggi-X, NMR**)

Complessità delle strutture studiate in Biologia strutturale

I sistemi studiati possono variare molto in dimensioni, dai pochi residui (Peso Molecolare inferiore al migliaio a complesse macchine molecolari multi-dominio (peso molecolare di milioni di Dalton))



Penta-peptide
Risoluzione elevata



270 aminoacidi.
Risoluzione atomica

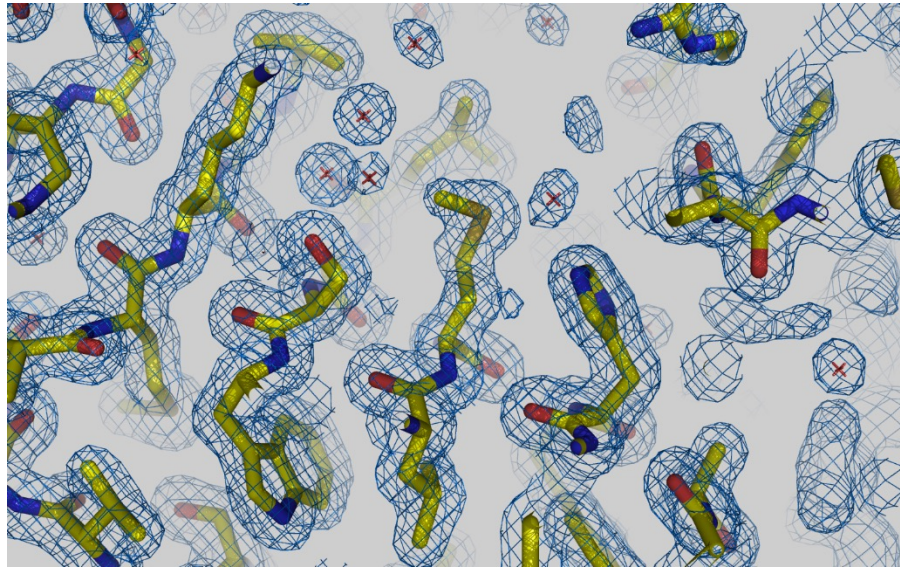


1.93 MDa
Risoluzione quasi-atomica

Dettaglio della struttura di una molecola (risoluzione)

Anche il dettaglio (risoluzione) della struttura studiata può variare molto, da risoluzione atomica a strutture a bassissima risoluzione

Regione N-terminale del distroglicano



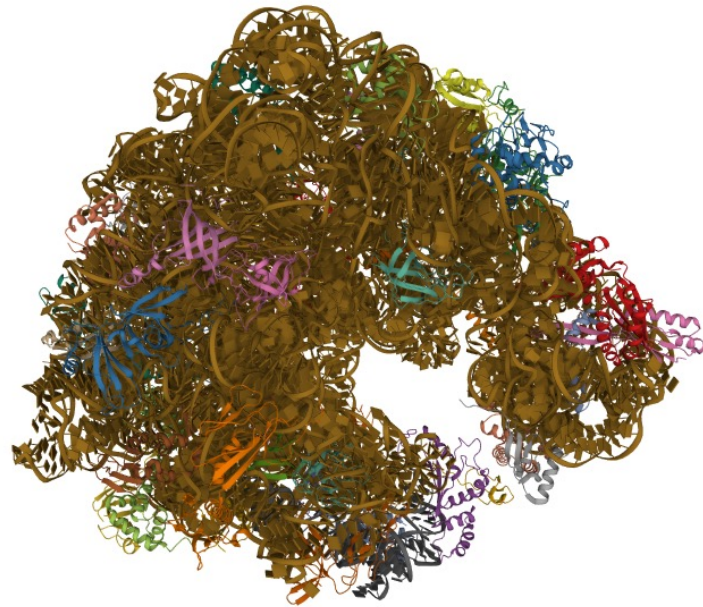
Mappa di densità elettronica cristallografica (1.6 Å)



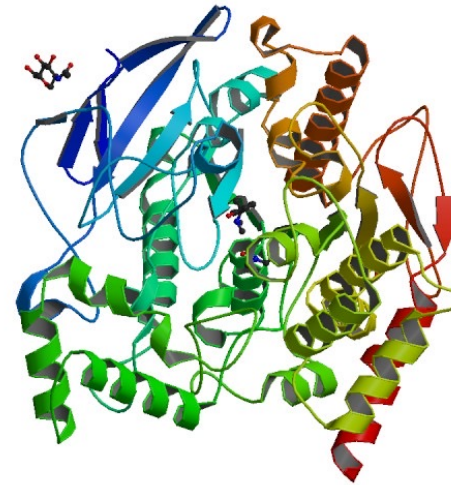
Ricostruzione della 'shape' da esperimenti SAXS (20 Å)

Complessità e Funzione

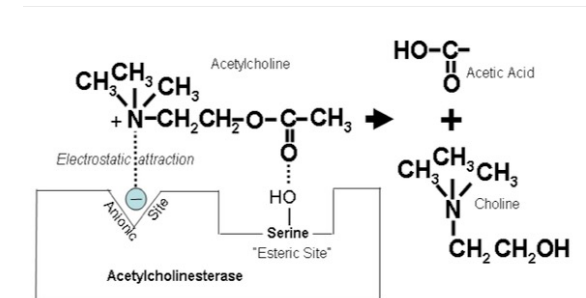
La complessità di una struttura è legata alla complessità delle funzioni



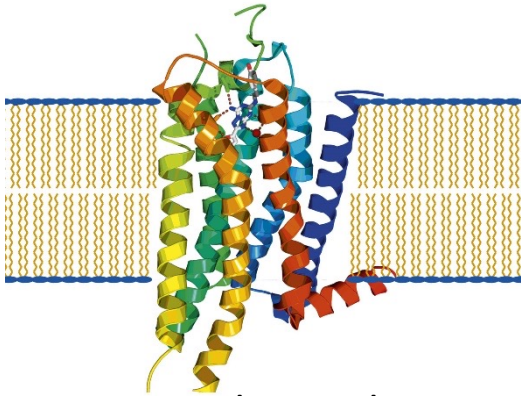
Ribosoma 70S ribosome di *M. tuberculosis*
(MW: 2.2 Mda)
Funzioni e Struttura complesse



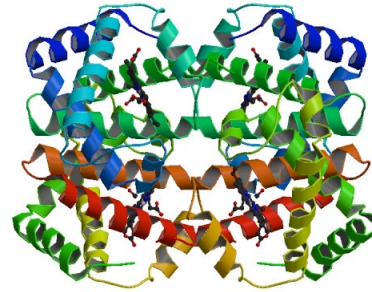
Acetilcolina Esterasi (MW 60 KDa)
Struttura e funzione semplice



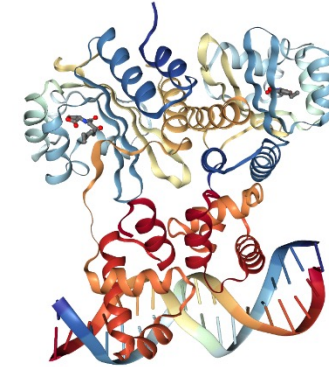
Funzione delle macromolecole



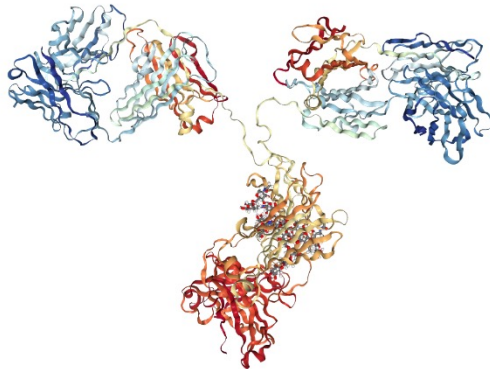
Recettori di membrana
(GPCR)



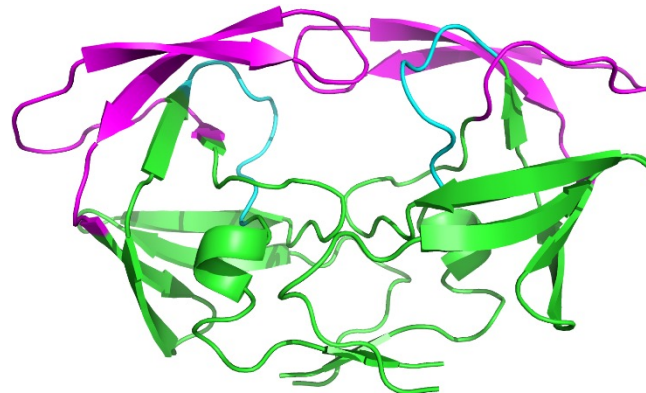
Funzione di Trasporto
(Hb:O₂)



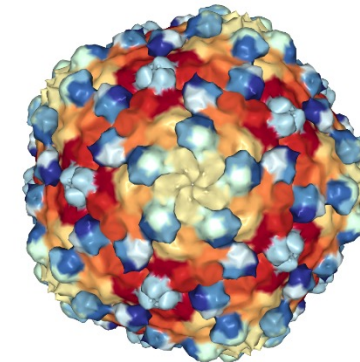
Fattori trascrizionali
(TraR)



Immunoglobulina
(mAB)



Funzione Enzimatica
(proteasi Hiv)



Funzione strutturale
(capside Siphovirus)

L'importanza dei dettagli (risoluzione)

Non necessariamente una struttura a risoluzione atomica è più informativa di una struttura a risoluzione più bassa, tutto dipende dall'informazione che si vuole estrarre dalla struttura molecolare sperimentalmente determinata.

Se l'interesse è esclusivamente nel cambiamento di strutture secondarie, potrebbe non essere necessario spendere tempo e fatica nell'ottenere una struttura cristallografica o NMR, può bastare un semplice esperimento di **Dicroismo Circolare**.

Se l'interesse è in cambiamenti conformazionali consistenti che coinvolgono parti rilevanti della struttura, un esperimento di **Small Angle X-ray Scattering (SAXS)** può darci questa informazione anche a bassa risoluzione .

Se invece l'interesse è lo studio dettagliato delle interazioni specifiche tra molecole (proteina/proteina, proteina/ligando) allora si deve fare ricorso ad una tecnica come la **cristallografia di raggi-X** o all'**NMR** (anche se esistono approcci ibridi per 'modellizzare' l'interazione).

La variabile tempo

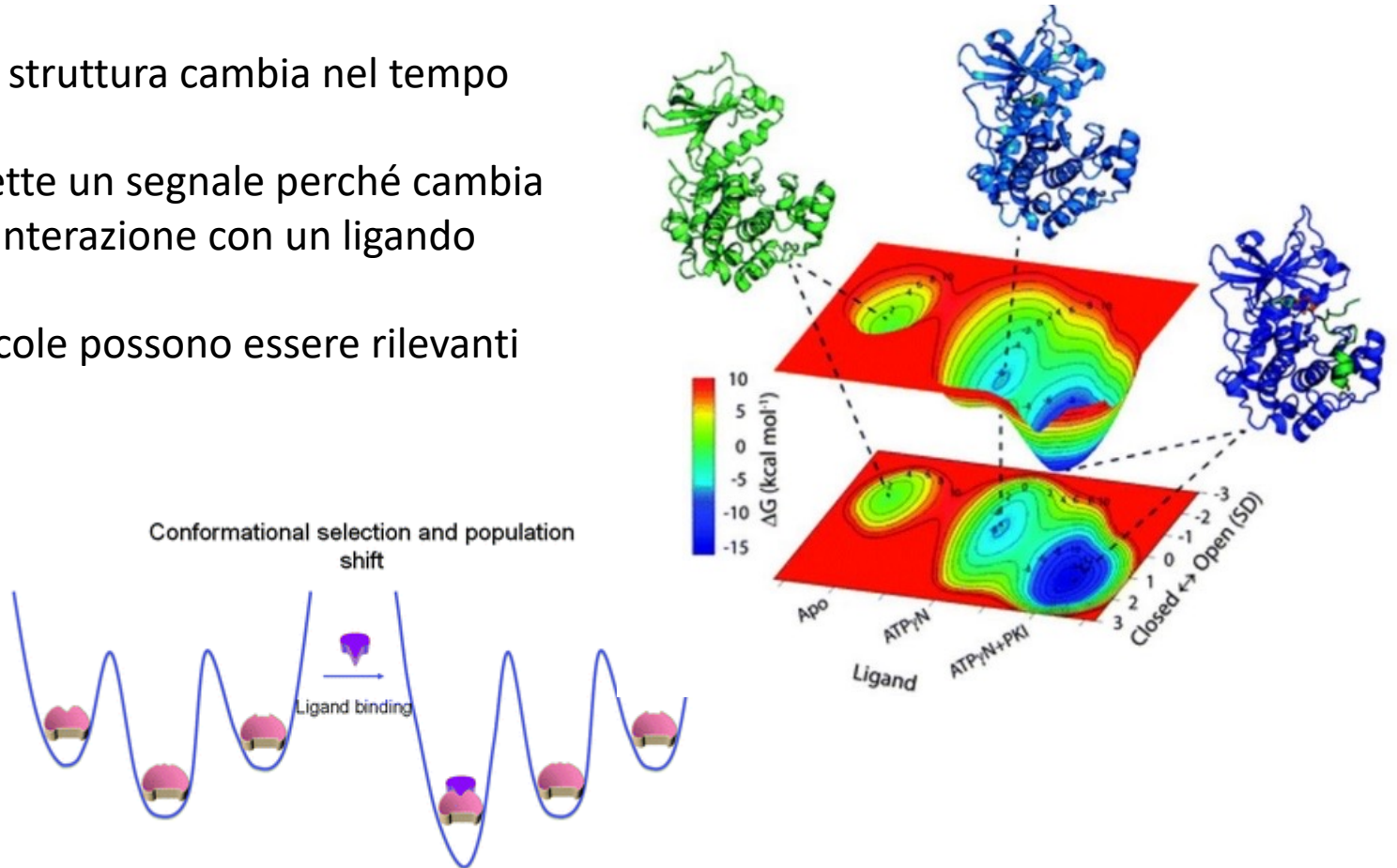
Le macromolecole non sono entità statiche!

- Un enzima funziona perché la sua struttura cambia nel tempo (sito attivo)
- Un recettore di membrana trasmette un segnale perché cambia la sua struttura in seguito ad una interazione con un ligando

Gli aspetti dinamici delle macromolecole possono essere rilevanti per la loro funzione

Non tutte le tecniche a disposizione del biologo strutturale sono adatte a studiare la dinamica di una macromolecola.

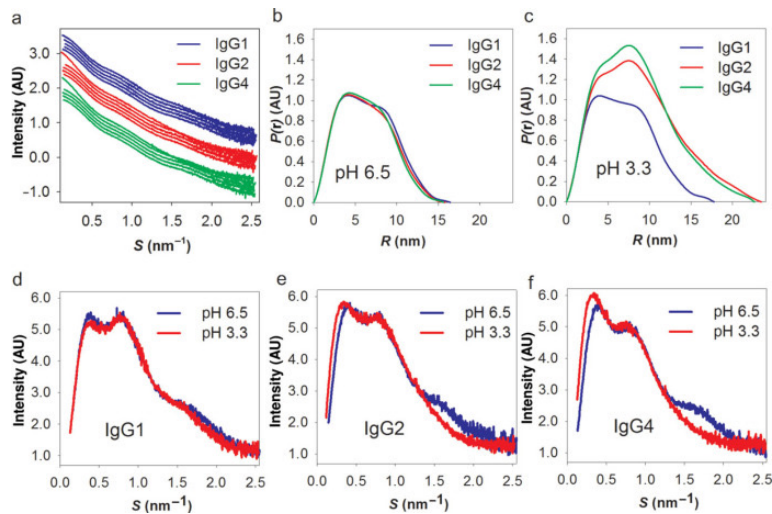
L’NMR è sicuramente la tecnica più adatta per lo studio della dinamica



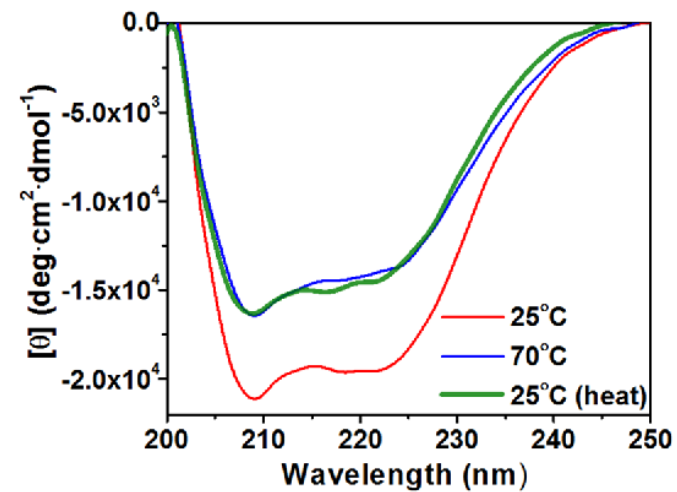
La variabile ambiente

In determinate situazioni può essere utile valutare l'effetto dei parametri chimico-fisici sulla struttura (pH, forza ionica, temperatura, pressione di O₂, illuminazione ...)

Anche in questi casi la determinazione della struttura completa ad alta risoluzione può non essere necessaria



Spettri SAXS a pH diversi



Spettro CD a diverse T

Obiettivi e procedure sperimentali

Obiettivi in biologia strutturale

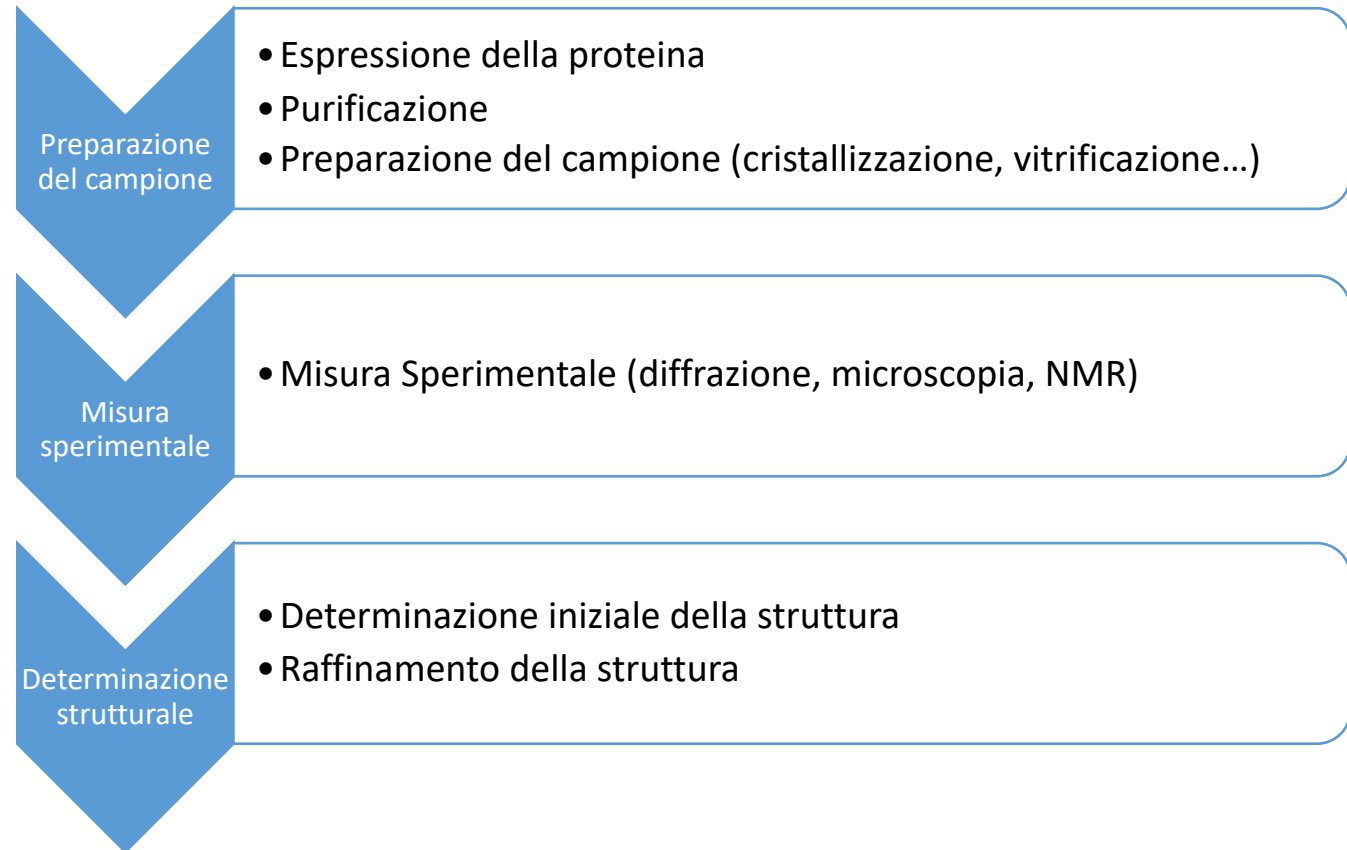
Gli obiettivi della biologia strutturale sono:

- 1) Determinare l'architettura (possibilmente su scala atomica, se necessario) delle macromolecole biologiche
 - 2) Associare la struttura della macromolecola alla funzione (o funzioni) nota
 - 3) Collocare la struttura determinata nel contesto delle strutture (architetture) note
 - 4) Prevedere, sulla base dell'architettura molecolare, eventuali nuove (dis)funzioni della macromolecola o modulazioni della sua attività/funzione
- Il punto 1 riguarda la determinazione sperimentale della struttura (**fondamentale!**)
 - Il punto 2 riguarda lo studio della relazione tra la struttura e la funzione (biochimica, biologia molecolare)
 - Il punto 3 riguarda l'analisi dell'architettura della struttura (folding)
 - Il punto 4 riguarda la previsione di contesti biologici funzionalmente nuovi e/o lo studio di possibili molecole antagoniste (o agoniste)

Determinazione Strutturale

La determinazione della struttura è chiaramente il passo più importante.

Tutte le analisi successive sono conseguenti alla conoscenza più o meno dettagliata dell'architettura molecolare della macromolecola studiata

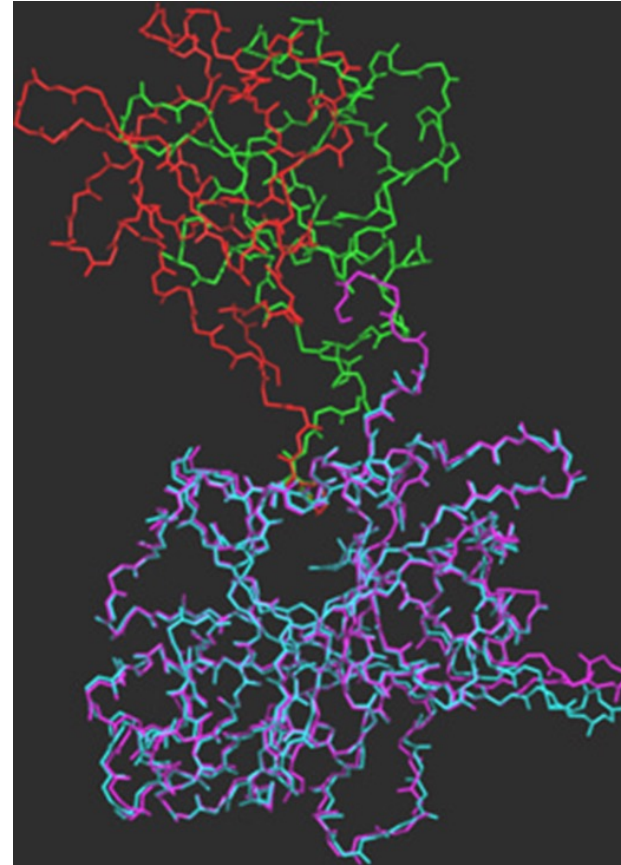


Omogeneità del campione studiato

Va sottolineato che uno degli assunti di base degli studi strutturali è che **le macromolecole oggetto di studio devono essere tra loro uguali**, un sistema eterogeneo non è adatto ad uno studio mirato all'ottenimento di informazioni strutturali precise (a meno di casi semplici)

Il concetto di omogeneità non è riferito solo alla composizione chimica ma anche all'assunzione di una conformazione definita.

Eterogeneità conformazionale

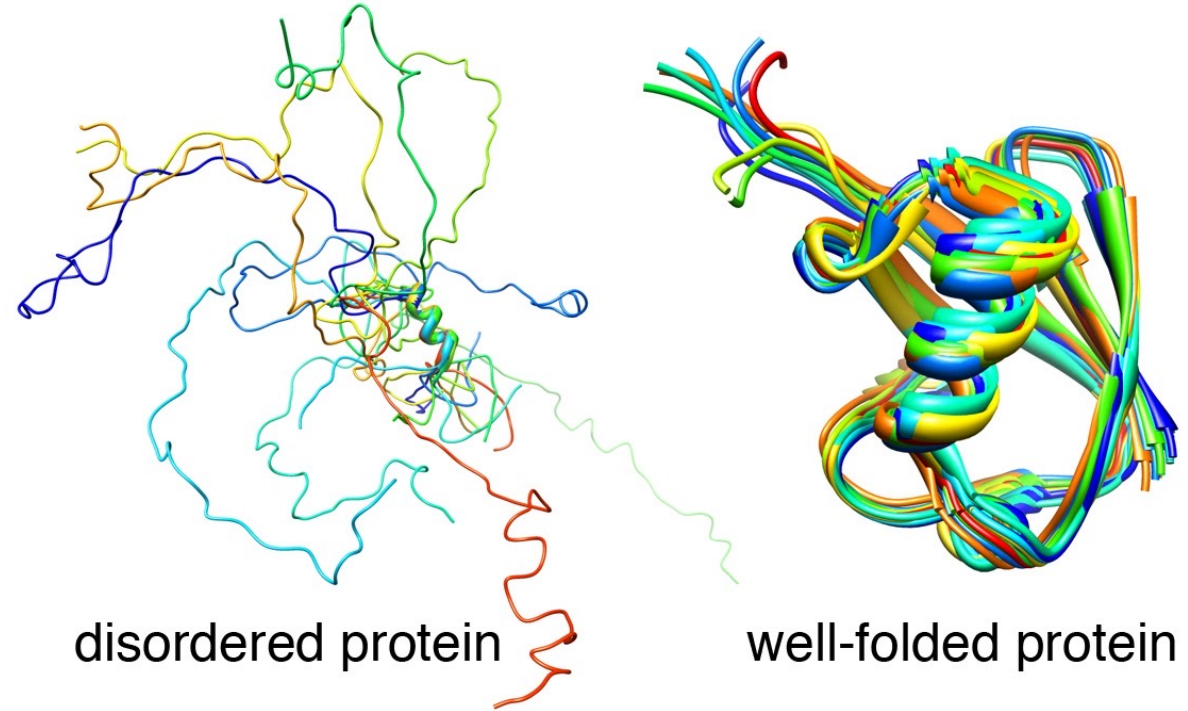
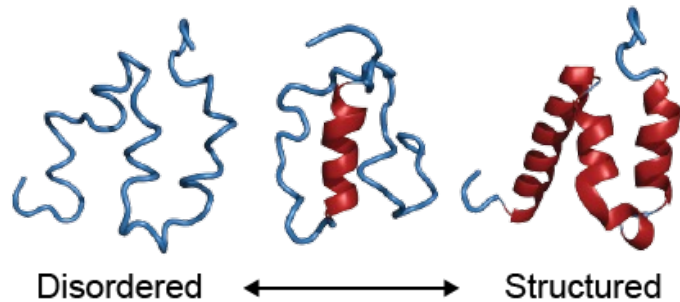


Proteine intrinsecamente disordinate (IDP)

Una conseguenza della omogeneità conformazionale esclude le proteine intrinsecamente disordinate (IDP) dalla possibilità di studio strutturale 'convenzionale'.

Le informazioni ottenibili sulle IDP (tramite NMR o CD) sono necessariamente limitate.

The protein disorder continuum



Dal gene alla struttura

- E' errato pensare che il contesto in cui opera il biologo strutturale riguardi solo e soltanto le tecniche utili alla determinazione della struttura tridimensionale, in modo più o meno preciso, di una macromolecola.
- Ciò che differenzia le modalità della biologia strutturale dalle tecniche di determinazione strutturali pure e semplici (cristallografia, NMR, CryoEM), è un approccio globale al problema della struttura, un approccio che è spesso definito come: 'From gene to Structure' o anche Genomica Strutturale

Il problema strutturale viene affrontato partendo dal gene, selezionando con attenzione il **target** dello studio ed eventualmente modificandolo in modo da rendere possibile il suo studio strutturale.

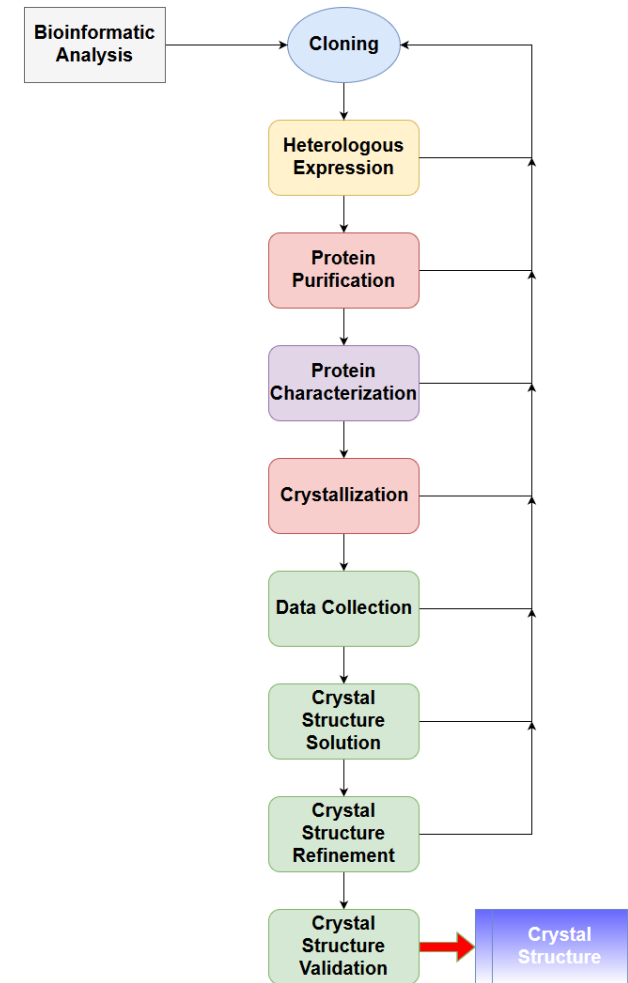
Le tecniche della Biologia Molecolare sono quindi essenziali per la preparazione di campioni adatti allo studio strutturale.

Un possibile workflow (cristallografico)

Il cammino che va dalla selezione del gene alla struttura finale può essere lungo e laborioso (non sempre...)

La mole di lavoro può essere davvero elevata, con diversi tentativi ed errori. L'approccio è giustificato dalla quantità di informazione ottenuta come risultato (la struttura tridimensionale)

Tuttavia l'informazione deve essere utile a chiarire problematiche aperte sulla natura e funzione della macromolecola oggetto di studio.

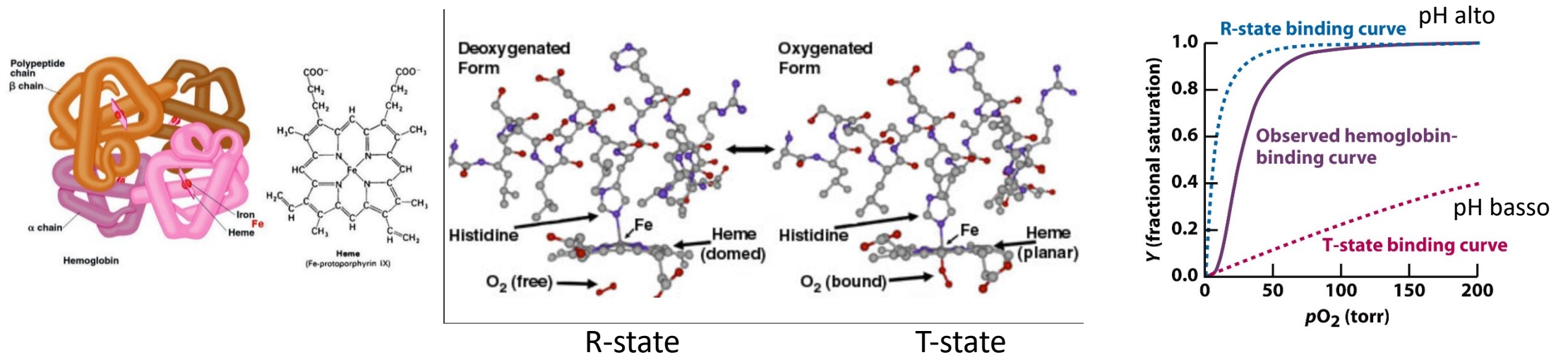


Struttura e funzione

L'aspetto forse più importante del conoscere la struttura atomica di una macromolecola è quello legato alla comprensione della funzione della macromolecola e la sua contestualizzazione nel sistema di nozioni chimiche, fisiche e biologiche a già a disposizione.

L'approccio 'strutturale' allo studio di un sistema biologico è (quasi) sempre conseguente a studi precedenti di tipo biologico/chimico/fisico.

La conoscenza della struttura può aiutare a spiegare il dato biologico precedentemente acquisito



Architettura molecolare

- E' noto che le proteine globulari assumono conformazioni precise, caratteristiche della proteina stessa
- L'architettura della macromolecola è in relazione alla funzione e alla sequenza
- Il numero di possibili conformazioni, indipendentemente dalla struttura primaria (sequenza di aminoacidi), non sembra essere infinito.

Top of CATH Hierarchy (4 Classes)

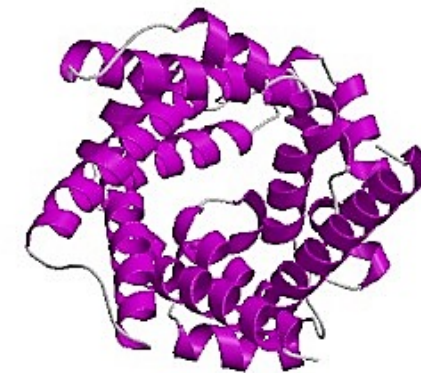
▲	C	1	Mainly Alpha	<i>5 Architectures, 405 Folds, 2174 Superfamilies, 90302 Domains</i>
▷	A	1.10	Orthogonal Bundle	<i>291 Folds, 1226 Superfamilies, 60694 Domains</i>
▷	A	1.20	Up-down Bundle	<i>104 Folds, 832 Superfamilies, 25152 Domains</i>
▷	A	1.25	Alpha Horseshoe	<i>6 Folds, 106 Superfamilies, 3466 Domains</i>
▷	A	1.40	Alpha solenoid	<i>2 Folds, 2 Superfamilies, 13 Domains</i>
▲	A	1.50	Alpha/alpha barrel	<i>2 Folds, 8 Superfamilies, 977 Domains</i>
▷	T	1.50.10	Glycosyltransferase	<i>7 Superfamilies, 967 Domains</i>
▲	T	1.50.40	Mitochondrial carrier fold	<i>1 Superfamilies, 10 Domains</i>
	H	1.50.40.10	Mitochondrial carrier domain	<i>10 Domains</i>

Select a CATH node...

H Mitochondrial carrier domain

Go to Superfamily >

CATH ID	1.50.40.10
Domains	10
Example Domain	1okcA00 [PDB]

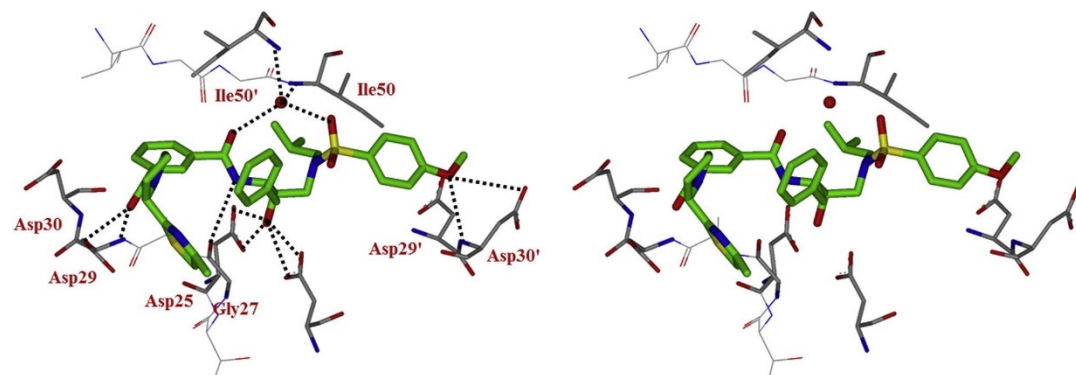
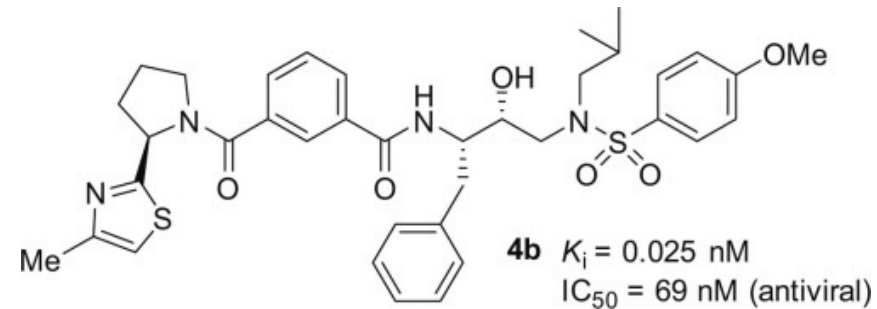
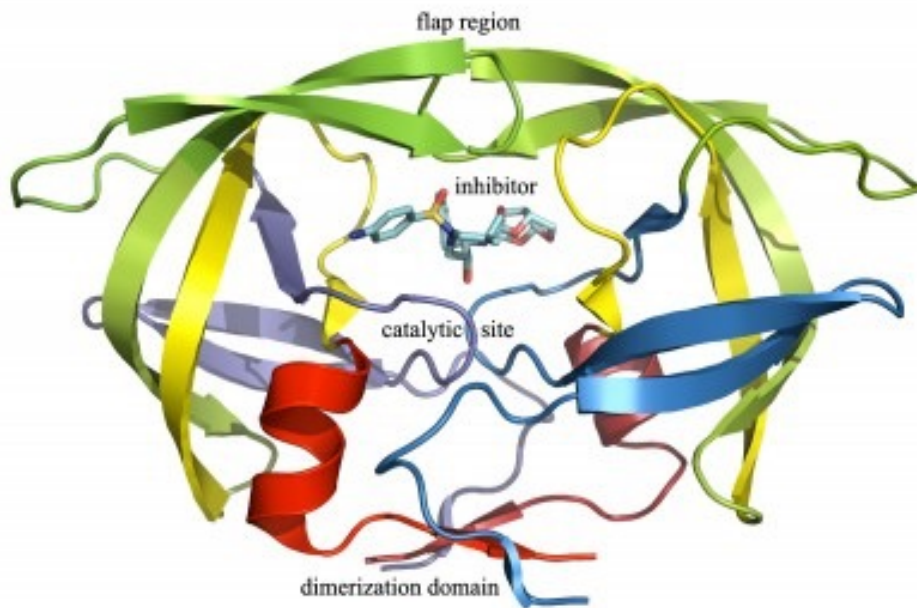


CATH: www.cathdb.info

PDB: www.rcsb.org

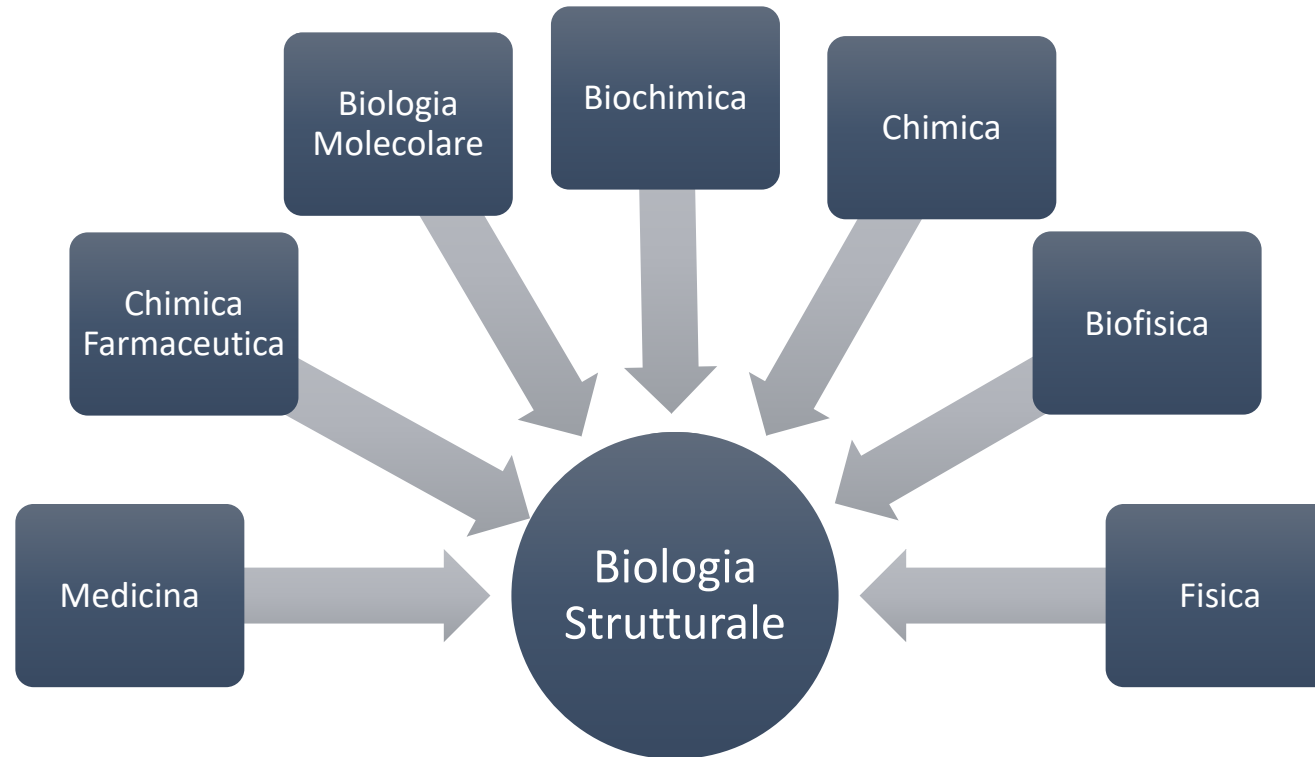
La struttura come modello predittivo

Il caso più ovvio è sicuramente quello dello Structure-based Drug Design: a partire dalla struttura della proteina bersaglio (target di interesse farmacologico) si 'disegna' un inibitore o un migliore migliore, ottimizzando l'interazione intermolecolare (legami idrogeno, tasche idrofobiche) tra proteina e ligando

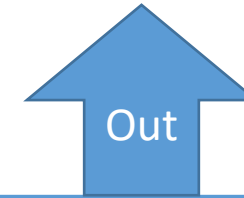
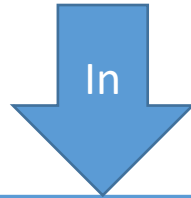


Ghosh et al. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (2017) 25, 5114-5127

La biologia strutturale e le altre discipline



Relazioni con le altre discipline



Disciplina	Utili per la Biologia Strutturale	Risultati dalla Biologia Strutturale
Biologia Molecolare	<ul style="list-style-type: none">• Espressione di proteine• DNA ricombinante	Comprensione dei fenomeni biologici a livello molecolare
Biochimica / Chimica	<ul style="list-style-type: none">• Purificazione di proteine• (cristallizzazione)	Comprensione delle reazioni chimiche e interazioni molecolari di interesse biologico
Chimica Farmaceutica	<ul style="list-style-type: none">• Nuove molecole interessanti dal punto di vista farmacologico	<ul style="list-style-type: none">• Studio delle interazioni ligando / macromolecola.• Progettazione/evoluzione di nuovi ligandi
Medicina	<ul style="list-style-type: none">• Target di studio (mutanti patologici...)	<ul style="list-style-type: none">• Comprensione dei meccanismi molecolari della malattia.• Progettazione razionale di nuovi farmaci
Fisica / Biofisica	<ul style="list-style-type: none">• Metodi• Strumentazione	Validazione di modelli teorici inerenti le macromolecole biologiche

Un po' di storia...

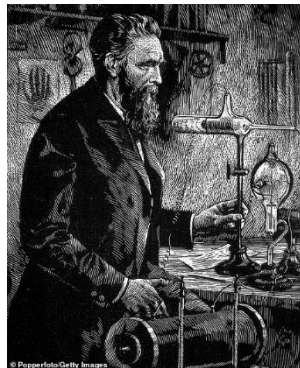
L'approccio odierno alla determinazione strutturale è il prodotto di un'evoluzione cominciata più di 100 anni fa

Per diverso tempo l'unico metodo (potenzialmente) in grado di svelare l'architettura di macromolecole più o meno complesse è stata la cristallografia di raggi-X

Nel corso degli anni, l'arricchimento dovuto a nuovi modelli teorici e tecniche sperimentali, ha reso la determinazione delle strutture tridimensionali più accessibile.

Tuttavia per lungo tempo la determinazione strutturale delle molecole è stata un'operazione complessa.

Röntgen
1895



XFEL
2019

Protein Structure Database (PDB)

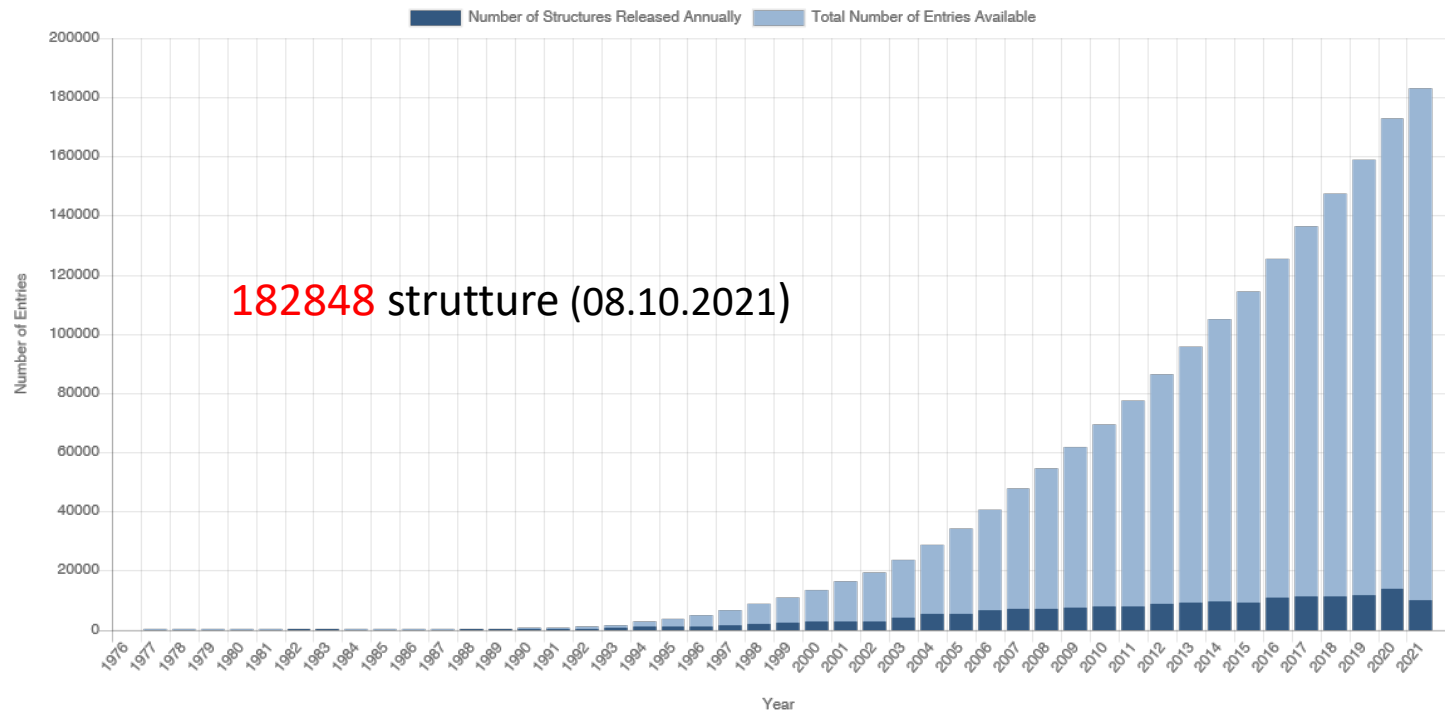
Dal 1972 esiste un database delle strutture macromolecolari, essenzialmente proteine e acidi nucleici, la cui struttura è stata determinata sperimentalmente ad un livello atomico o quasi-atomico: (Brookhaven) Protein Data Bank (**PDB**) <http://www.rcsb.org>

Le tecniche più largamente rappresentate sono:

Diffr. Raggi-X	160277
NMR	13500
Diffr. Elettroni/CryoEM	8870

Le strutture:

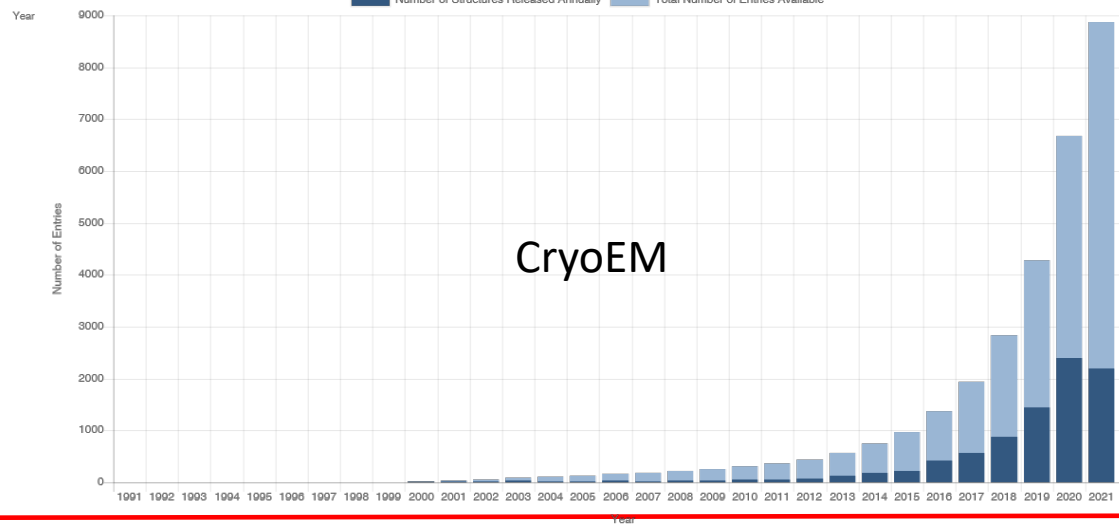
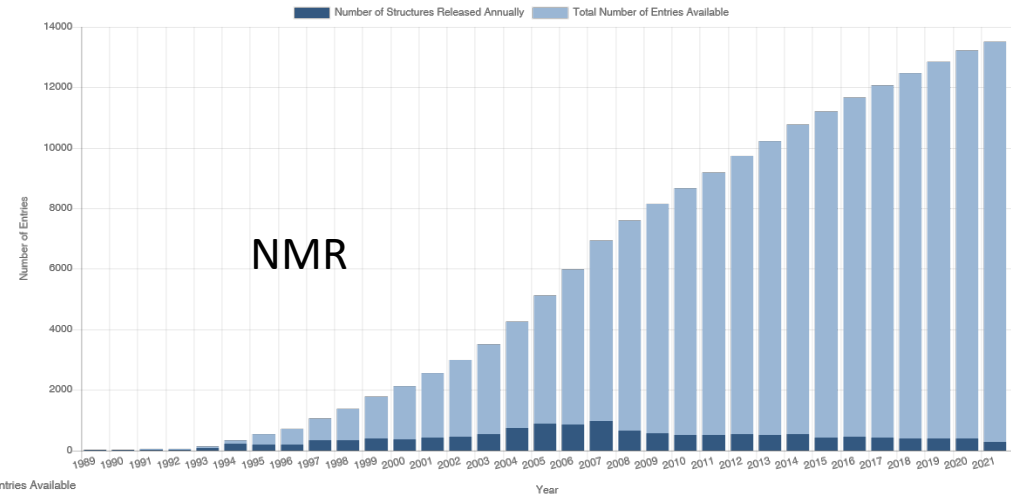
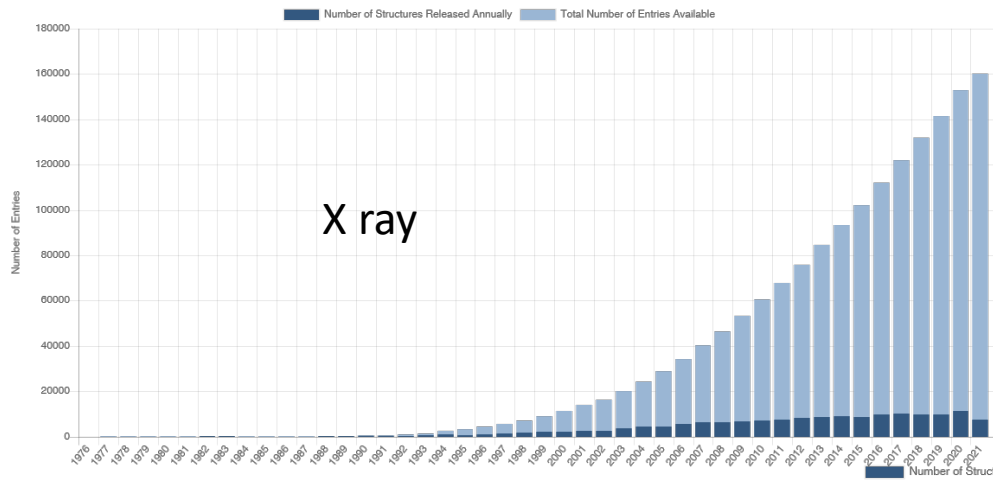
Proteine	159817
DNA/RNA	3675
Complessi proteina/Ac. Nucl	9715



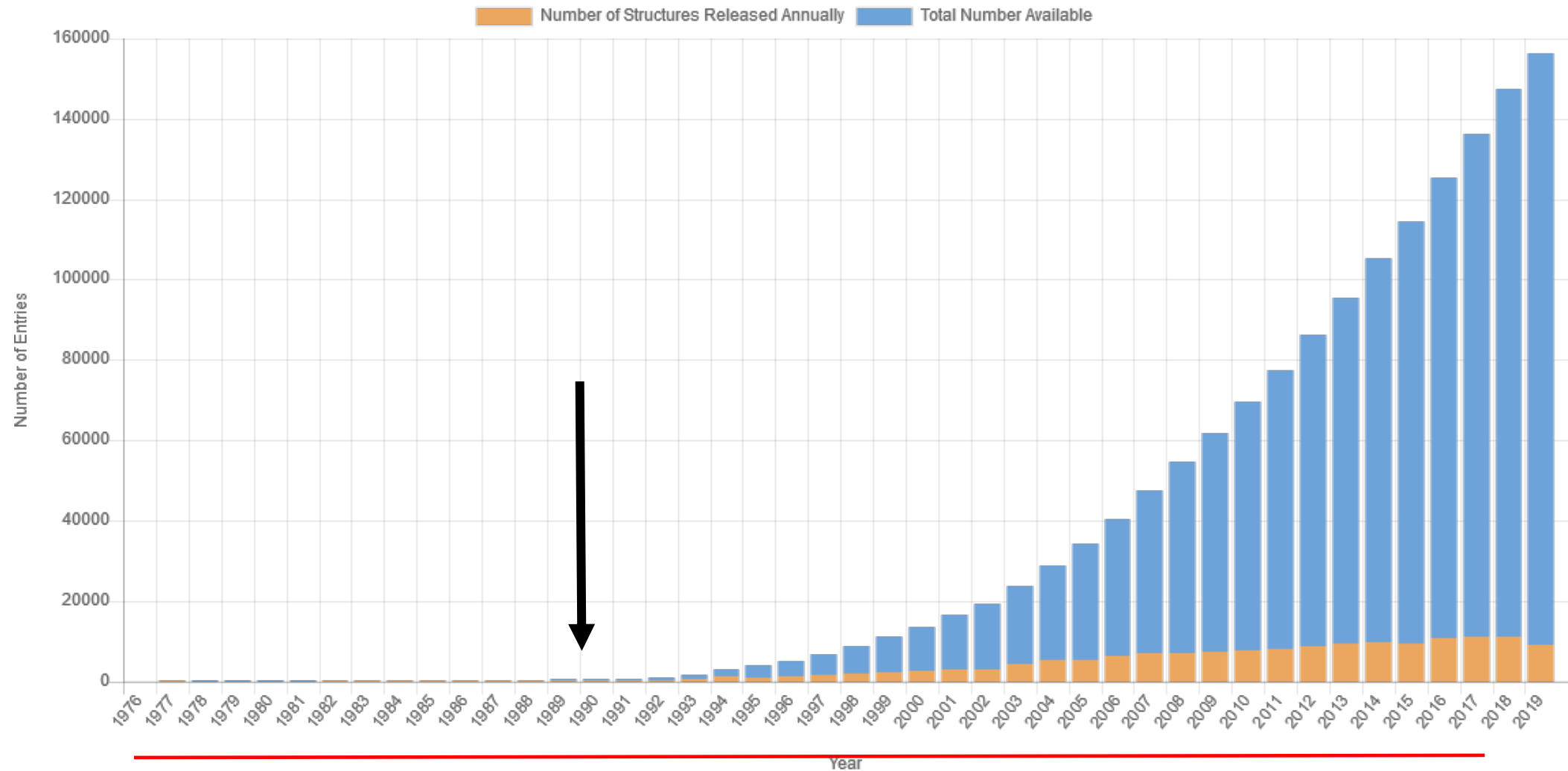
PDB: 2020 vs 2021

Metodo	2020	2021	Variazione da inizio 2021
Diffr. Raggi-X	150014	160277	7509
NMR	13133	13500	276
Diffr. Elettroni/CryoEM	6008	8870	2199
Le strutture:			
Proteine	148632	159817	8240
DNA/RNA	3454	3675	237
Complessi proteina/Ac. Nucl	8753	9715	706

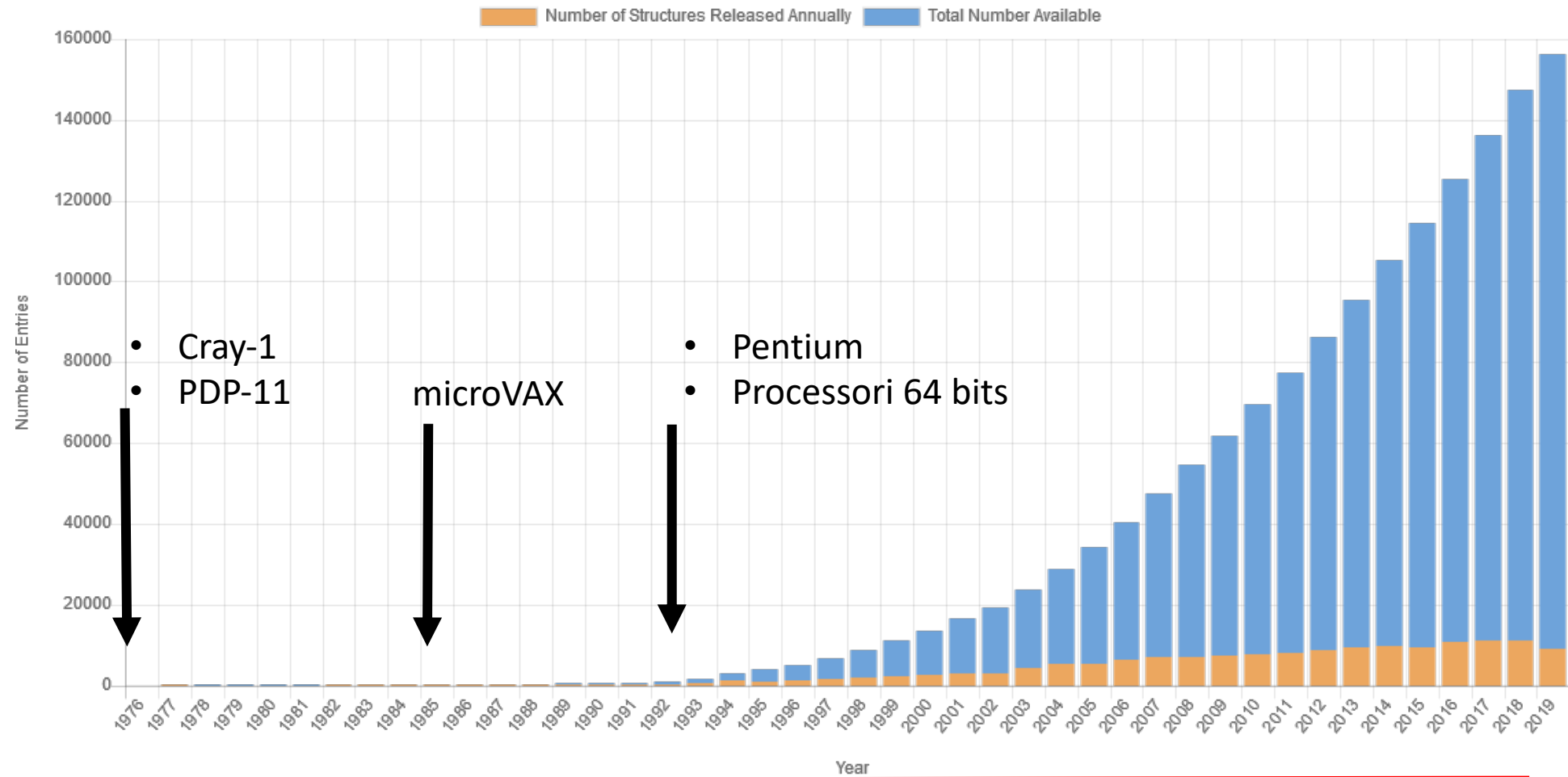
X-ray, NMR, CryoEM



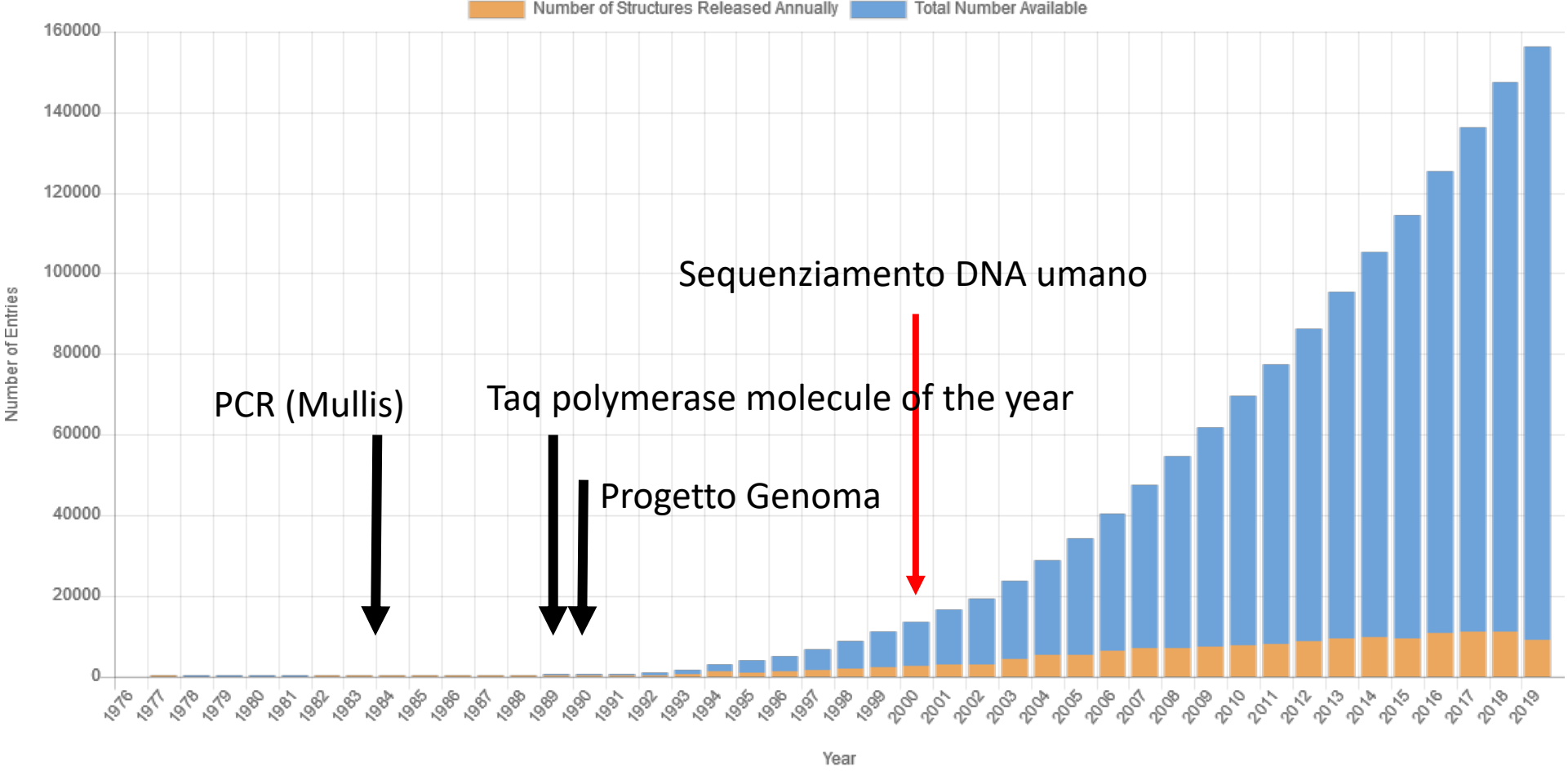
L'esplosione degli anni 90



Computer



DNA ricombinante e PCR



Luce di Sincrotrone

