

## DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA CELLULARE E NEUROSCIENZE

Il Dipartimento si occupa dello studio delle malattie genetiche, endocrino-metaboliche, neurologiche (con particolare riguardo alle malattie rare) e delle immunoterapie.

L'attività di ricerca, intervento e formazione del Dipartimento è dedicata a patologie e nuovi mezzi terapeutici, individuati come prioritari dal PSN, quali le malattie nervose e mentali, le malattie endocrino-metaboliche ad elevato impatto socio-sanitario e dell'età evolutiva, le malattie genetiche rare, l'immunoterapia dei tumori. L'attività di ricerca del Dipartimento svolge una funzione di supporto per la sorveglianza degli eventi patologici sul territorio e l'individuazione di fattori di rischio familiari e/o ambientali anche mediante il coordinamento di specifici Registri Nazionali per la prevenzione, la diagnosi ed il trattamento di numerose patologie. I progetti di ricerca in corso, con numerose collaborazioni nazionali ed internazionali sono oltre 70. Tra questi vi sono numerosi studi tra i quali: lo studio dei processi patogenetici e riparativi della malattia di Alzheimer; lo studio della vulnerabilità psico-fisica allo stress; gli studi sulla BSE (*Bovine Spongiform Encephalopathy*) e sulle malattie umane ad essa correlate; lo studio della fisiopatologia dello stress ossidativo nelle malattie degenerative e quello dei meccanismi di crescita e regressione dei tumori. Il Dipartimento ha il compito di valutare la qualità dei prodotti per terapia genica e terapia cellulare. Al Dipartimento fa capo la rete europea sulle malattie rare.

### Resoconto attività 2004

#### Reparto Biochimica

Il Reparto intende integrare metodologie sperimentali e computazionali su alcuni modelli d'interazione proteina-proteina e proteina-lipidi sui quali esistono in Istituto competenze e risorse d'eccellenza. Particolare attenzione sarà dedicata all'acquisizione delle nuove metodologie d'analisi della struttura delle proteine, al fine di migliorare la progettazione e produzione di nuove molecole risultanti da mutazioni o dalla combinazione di specifici domini proteici. Allo scopo saranno impiegati sistemi computazionali e software dedicati allo studio della struttura delle proteine affiancate da metodologie sperimentali chimico-fisiche, biologiche e immunochimiche. Nuovi modelli matematici saranno applicati alla descrizione di alcuni processi cellulari come reti metaboliche e trasduzioni del segnale, integrando continuamente dati sperimentali ed elaborazioni numeriche.

Nel 2004 il Reparto si è occupato principalmente di:

– *Sviluppo di approcci di proteomica e biologia computazionale*

La ricerca è stata indirizzata a comprendere se il profilo d'idrofobicità relativo alla sequenza amminoacidica potesse rivelare le somiglianze della struttura primaria tra proteine che, pur avendo una struttura 3D molto simile, possiedono sequenze amminoacidiche con identità non superiori al 20%. A questo scopo è stato sviluppato un software applicativo basato su un algoritmo che allinea due proteine sulla base del loro profilo d'idrofobicità. L'applicativo, chiamato PROFALIGN, è inoltre in grado di fare allineamenti locali e riuscendo ad individuare i domini con più alta corrispondenza.

#### — *Immunodeficienze primitive*

Lo studio ha riguardato la definizione della natura e del grado di deficit immunitario T cellulare associato alla aumentata suscettibilità ad infezioni, malattie autoimmuni e neoplasie in pazienti con immunodeficienze primitive (PID). In particolare è stato evidenziato: 1) un difetto nell'omeostasi T cellulare in pazienti affetti da Immunodeficienza Comune Variabile (ICV) che comprende un gruppo eterogeneo di sindromi, ancora non ben differenziabili tra loro, ad eziologia sconosciuta, in cui può essere presente un difetto combinato B e T; 2) un aumento dell'apoptosi T linfocitaria in pazienti affetti da Sindrome Linfoproliferativa Autoimmune (ALPS) caratterizzata da un difetto dell'apoptosi Fas-indotta. Nell'ambito di questo progetto è stato inoltre condotto uno studio *in vitro* sulla suscettibilità dei linfociti all'apoptosi indotta da un anti-folato, la pirimetamina (pyr), e sui meccanismi molecolari responsabili dell'effetto proapoptotico di questo farmaco.

### **Reparto Fisiopatologia dei radicali**

In questi ultimi 10-15 anni i radicali liberi hanno conquistato un posto di grande rilevanza in medicina. Questo interesse è legato ad alcune scoperte fondamentali, avvenute nella seconda metà del '900. Molti studi hanno dimostrato che i radicali sono prodotti negli esseri viventi non solo per "errore" o come sostanze "indesiderate" ma svolgono funzioni essenziali di messaggero con reazioni di tipo redox. Questa doppia anima - modulatori dei segnali cellulari/agenti citotossici - è oggi considerata una costante dell'attività biologica dei radicali. Gli obiettivi degli studi sulla fisiopatologia dei radicali e dello stress ossidativo nelle patologie degenerative saranno:

- l'identificazione di target specifici per il radicale NO e le specie reattive da esso derivate;
- lo studio del meccanismo d'inattivazione e del metabolismo di agenti pro-ossidanti e l'azione di agenti pro-ossidanti e riducenti sul metabolismo dei lipidi;
- la regolazione della produzione di radicali in modelli cellulari e animali rilevanti per le patologie degenerative;
- il *signaling* cellulare indotto da radicali e specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto: ruolo nei processi degenerativi e differenziativi;
- lo studio dei lipidi quali molecole strutturali, modulatori di signaling e di espressione genica;
- l'individuazione di antiossidanti naturali presenti nella dieta come possibili agenti preventivi nelle patologie degenerative.

L'attività 2004 è stata focalizzata allo studio della reattività in sistemi biologici e dei meccanismi di "signaling" del perossinitrito (ONOO<sup>-</sup>), un ossidante fisiologico derivato dalla reazione tra i radicali ossido nitrico (NO) e superossido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). La conoscenza della biochimica delle specie reattive dell'azoto è alla base di molte strategie terapeutiche miranti a rallentare o prevenire le patologie degenerative. In questo anno abbiamo dimostrato che: 1) il perossinitrito modifica selettivamente alcuni residui aminoacidici (Tyr, Trp) della lipoproteina LDL, una reazione inibita da antiossidanti polifenolici a struttura catechinica e dai polifenoli contenuti nel vino rosso; 2) l'emoglobina ossigenata reagisce con i nitriti formando intermedi radicalici e nitrotirosine, una reazione non osservata con il radicale NO; 3) il perossinitrito è in grado di ossidare l'acido ialuronico [M1] attraverso la formazione di radicali del polisaccaride, primo passo verso la degradazione della molecola e può contribuire alla progressione dell'artrite reumatoide, patologia su base infiammatoria ad eziologia ignota; 4) specie reattive dell'azoto con attività nitrosante e nitrante si formano a livello gastrico quando i nitriti della saliva

incontrano il pH acido. I nitriti della saliva producono a pH acido ossidi di azoto potenzialmente tossici insieme al radicale NO che, a livello gastrico, svolge importanti attività fisiologiche (vasodilatazione, attività antimicrobica, produzione del muco, motilità gastrica); 5) il perossinitrito inibisce l'attività della fosfatasi 1alfa attraverso la fosforilazione in tirosina mediata dalle *src* chinasi.

### **Reparto *Imaging molecolare e cellulare***

Con la dizione “Molecular and Cellular *Imaging*” viene oggi definita a livello internazionale la nuova area di ricerca biomedica che, partendo dall’informazione genomica e dai recenti progressi conoscitivi e tecnologici della biologia cellulare e dell’*imaging in vivo*, si propone la caratterizzazione e il monitoraggio non invasivo di meccanismi molecolari specifici di patologie tumorali e neurodegenerative, al fine di potenziare gli attuali strumenti di diagnosi, prevenzione e terapia. In questa area gli obiettivi sono:

- l’identificazione mediante *imaging* e spettroscopia a Risonanza Magnetica (RM) di marcatori molecolari di patologie tumorali e neurodegenerative *in vivo*, come base per il potenziamento dei metodi di diagnosi, prognosi e terapia;
- lo sviluppo a livello preclinico di metodi non invasivi di *imaging* di parametri funzionali e di marcatori molecolari di progressione patologica, in relazione alle caratteristiche genetiche, istopatologiche e molecolari di malattie tumorali e neurodegenerative;
- la valutazione di protocolli clinici basati sull’uso di sonde molecolari specifiche, agenti di contrasto e segnali RM per la rivelazione e il monitoraggio non invasivo *in vivo* di alterazioni fisiopatologiche e biochimiche associate alla patologia e alla risposta a terapie convenzionali e innovative;
- l’identificazione e/o evidenziazione di molecole e/o steps responsabili del traffico cellulare di segnali, molecole ed organelli citoplasmatici e loro relazione con componenti del citoscheletro, sia a seguito di attivazione recettoriale che di contatto intercellulare con bersagli tumorali sensibili in cellule di interesse immunologico e/o patologiche.

Le attività del Reparto nel 2004 sono state principalmente indirizzate alla caratterizzazione di parametri di *imaging* molecolare mediante risonanza magnetica (RM) *in vitro* ed *in vivo* e di *imaging* cellulare mediante tecniche di microscopia a fluorescenza, allo scopo di identificare nuovi indicatori di patologia, con particolare riguardo a malattie tumorali e neurodegenerative. In particolare è stato studiato: il ruolo dei derivati dal metabolismo della fosfatidilcolina (PC) come “fingerprint” di progressione tumorale di carcinomi umani dell’ovaio e del colon-retto, al fine di promuovere lo sviluppo di metodi innovativi di *imaging* non-invasivo *in vivo*; l’espressione, localizzazione subcellulare e attivazione dell’enzima fosfolipasi C PC-specifica nella progressione tumorale e nella stimolazione di cellule del sistema immunitario.

Nel campo della diagnostica oncologica, è proseguito uno studio multicentrico non-randomizzato, coordinato dall’ISS a livello nazionale e svolto presso oltre venti Centri oncologici italiani, volto a definire il ruolo dell’*imaging* RM nella diagnosi precoce del carcinoma mammario in soggetti ad alto rischio genetico (completamento degli iter diagnostici di primo round).

Infine, utilizzando tecnologie RM ad altissimo campo (16.4 T) sono state determinate composizione e struttura di b-glucani di *C. albicans* ad attività immunomodulatoria.

Per la sicurezza dell’impiego di apparecchiature RM, in campo clinico-diagnostico, è stato validato un nuovo metodo per la determinazione quantitativa dell’interazione del campo magnetico con dispositivi cardiovascolari.

## Reparto Immunoregolazione

Lo sviluppo delle ricerche di questi ultimi anni nel settore dell'immunologia cellulare e dell'immunoregolazione ha evidenziato l'importanza di fattori solubili (in particolare citochine e chemochine) quali agenti principali coinvolti nella regolazione della risposta immune, sia in condizioni fisiologiche che patologiche. Le attuali attività comprendono progetti sui meccanismi della risposta immune ad agenti patogeni (con particolare riferimento ad HIV-1) e progetti finalizzati allo sviluppo di terapie innovative. Tali attività includono il coordinamento di un progetto europeo riguardante lo studio dei mediatori dell'immunità innata e dell'immunità acquisita e la continuazione di ricerche sull'AIDS tese soprattutto a definire i meccanismi attraverso i quali HIV-1 (o particolari proteine del virus, quali gp120 e vpr) interagiscono con cellule del sistema immune, quali principalmente cellule dendritiche (DC) e monociti/macrfagi umani. Il Reparto conduce anche ricerche in modelli murini, basate sull'uso di topi knock-out (KO) per i recettori di interferone (IFN) o altri ceppi di topi (transgenici o KO) di particolare interesse, compresi topi KO per il fattore di trascrizione ICSBP, che rappresentano un modello animale di particolare interesse per l'analisi del ruolo di sottotipi di DC nel controllo di infezioni virali e della crescita neoplastica. Il Reparto è inoltre responsabile di un'intensa sperimentazione su modelli di topi SCID ricostituiti con cellule umane per progetti di ricerca sull'AIDS e di interesse oncologico. Tale attività, svolta da personale altamente qualificato in una "facility P3" con caratteristiche uniche in Italia, comprende collaborazioni crescenti con diversi gruppi interni ed esterni all'ISS; il gruppo è altresì coinvolto in ricerche di implementazione dei modelli stessi, che presentano applicazioni potenziali multiple in campo biomedico. Il Reparto si è fatto inoltre promotore di un "progetto DNA microarray" dell'ISS, che include anche la prospettiva di attivazione di una *facility* dell'ISS, con funzioni di preparazione dei "chip" e supporto all'analisi dei dati, la cui realizzazione richiederà un'adeguata valutazione del personale nell'ambito di una strategia dipartimentale.

Nel 2004 sono state svolte le seguenti attività:

- uno studio clinico di fase I-II per la valutazione dell'efficacia di una vaccinazione contro antigeni di melanoma in associazione a chemioterapia. Lo studio, eseguito presso l'IFO "Regina Elena" e il Policlinico di Tor Vergata, ha già concluso l'arruolamento della maggior parte dei pazienti e completato l'analisi di una parte dei parametri ematochimici e immunologici previsti;
- uno studio della combinazione di chemioterapia e immunoterapia in modelli animali. Questo progetto, svolto utilizzando tumori impiantati nel topo;
- uno studio dell'effetto di interferon di tipo I (IFN) come adiuvante nella vaccinazione contro antigeni virali e tumorali;
- uno studio sugli effetti immunomodulatori della gp120 di HIV-1 in cellule dendritiche. In un modello di cellule dendritiche generate da monociti in presenza di GM-CSF e IL-4 è stato dimostrato che l'interazione della gp120 ricombinante con cellule dendritiche ne determina alterazioni funzionali e maturazione aberrante;
- la valutazione del ruolo potenziale del nuovo antigene tumorale BORIS. È stata svolta la prima fase di caratterizzazione delle proprietà immunogenetiche del "cancer-testis" BORIS per la valutazione del suo potenziale uso come target per trattamenti immunoterapeutici di neoplasie come il cancro del seno, del polmone, della prostata ed alcuni tumori ematologici.

Sono state avviate collaborazioni con l'NIH (Dr. Marincola) per lo sviluppo di piattaforme innovative di DNA *microarray* per la rilevazione rapida di polimorfismi in citochine, recettori di citochine e geni coinvolti nelle vie di trasduzione del segnale di citochine allo scopo di

identificare *marker* predittivi della suscettibilità alle malattie, della risposta ai vaccini e dell'outcome clinico in pazienti con differenti patologie, incluso il cancro.

## Reparto Immunoterapia Sperimentale

Il progresso recente delle ricerche nel settore dell'immunologia e delle biotecnologie ha aperto nuove opportunità allo sviluppo di strategie di immunoterapia contro i tumori ed infezioni croniche gravi nell'uomo, che meritano particolare attenzione per le potenziali ricadute sulla salute pubblica. L'attività del Reparto sarà finalizzata all'attivazione di sperimentazioni cliniche innovative nel settore nell'immunoterapia, intervenendo in diverse fasi cruciali, quali:

- la preparazione di protocolli clinici basati su ricerche sviluppate in ISS;
- il coordinamento di studi multicentrici;
- la preparazione di reagenti speciali per uso clinico;
- lo sviluppo e l'implementazione di metodiche di monitoraggio immunologico nel contesto di trials clinici nel settore dell'immunoterapia.

Il gruppo afferente al Reparto ha di recente attivato due studi clinici basati sul nuovo concetto di uso di interferon (IFN) alpha come adiuvante nella:

- vaccinazione contro l'epatite B (progetto coordinato dall'ISS e finanziato dalla Comunità Europea);
- vaccinazione di pazienti con melanoma metastatico con peptidi da antigeni tumore-associati (progetto 1% dell'ISS in collaborazione con l'Istituto Nazionale Tumori di Milano e l'Istituto Dermopatico dell'Immacolata di Roma).

Il coordinamento di entrambi questi studi clinici, associato con l'impegno di monitoraggio immunologico sulle cellule detritiche circolanti, rappresentano importanti attività correnti del Reparto. Il gruppo è attualmente coinvolto nella preparazione di altri protocolli di studi clinici nel settore dell'immunoterapia dei tumori e nello sviluppo di tecnologie di preparazione di cellule dendritiche compatibili con l'uso clinico.

Un'attività importante del Reparto consisterà nell'attivazione del Centro di terapia cellulare dell'ISS per la preparazione, in condizioni GMP, di cellule e reagenti per studi clinici che, almeno in una prima fase, saranno orientati nel settore dell'immunoterapia dei tumori e di infezioni croniche gravi.

Nel 2004 il Reparto ha operato nei seguenti ambiti:

- *Attività di coordinamento di progetti e di organizzazione, gestione e monitoraggio di studi clinici.*
  - Progetto dimostrativo “Evaluation of the adjuvant activity of IFN-alfa in vaccination strategies against HBV” (*IFN-alfa and HBV vaccine*) (V Programma Quadro CE) per la valutazione in due studi clinici dell'attività adiuvante di IFN-alfa nella vaccinazione contro HBV in soggetti sani e in pazienti emodializzati.
  - Progetto di ricerca finalizzata 2003 (durata 24 mesi): “Carcinoma del colon-retto: marcatori prognostici e strategie terapeutiche su base immunologica”.
  - Completamento delle attività di monitoraggio dello “Studio clinico di fase I/II per la valutazione dell'effetto adiuvante di Interferone-alfa nella vaccinazione di pazienti affetti da melanoma stadio IV con i peptidi MART-1:26-35(27L) e gp100:209-217(210M)” (*IFNaMVI*), coordinato dal Dott. F. Belardelli ed effettuato presso l'Istituto Nazionale per lo studio e la Cura dei Tumori di Milano (Dott. G. Parmiani) e l'Istituto Dermopatico dell'Immacolata (IDI) di Roma (Dott. E. Bonmassar).

- Disegno, preparazione del protocollo e organizzazione, in collaborazione con il Reparto di Immunoregolazione, dello “Studio clinico per la valutazione delle interazioni tra chemioterapia e immunoterapia di pazienti affetti da melanoma” (*DTIC-IFNa-MV*), coordinato dal Dott. E. Proietti e in corso di svolgimento presso l’Istituto Regina Elena - Polo Oncologico (Prof. F. Cognetti) e l’Università di Tor Vergata (Dott. M. Roselli) (Pazienti reclutati: 7 dei 12 previsti, di cui 5 hanno completato il protocollo e 2 sono in corso di trattamento).
- Organizzazione del convegno “International Meeting on Cancer Vaccines”, che si è svolto all’ISS il 19-20 aprile 2004.
- *Attività brevettuale.*
  - Attività finalizzata alla registrazione o prosecuzione/estensione di brevetti, riguardanti: a) metodi di preparazione di cellule presentanti l’antigene (APC) mediante uso di IFN di tipo I (US 09/845042-WO 02/088328; EP 02290994.9-WO 03/089629); b) utilizzo di IFN di tipo I come adiuvante di vaccini (EP 01830261.2-CWO 02/083170); c) particelle chimeriche da virus vegetali come veicolo di antigeni (IT RM000327-EP167530A2); d) un nuovo antigene associato al carcinoma del colon-retto (US 60/512,040- PCT/EP2004/12087).
- *Attività scientifica.*
  - Valutazione degli effetti di interferone-alfa (IFN-alfa) utilizzato come adiuvante di vaccini nell’ambito degli studi clinici di vaccinazione: a) di pazienti con melanoma (studio *IFNaMV1*); b) di soggetti sani o emodializzati contro HBV.
  - Studi pre-clinici per la valutazione dell’efficienza di cellule dendritiche generate in presenza di IFN-alfa (IFN-DC) (secondo il metodo oggetto del brevetto US 09/845042-WO 02/088328) come adiuvanti cellulari di vaccini terapeutici contro il cancro o infezioni croniche gravi. Studi di caratterizzazione degli effetti precoci di IFN-alfa sul differenziamento di monociti umani in APC.
  - Attività finalizzate allo sviluppo e validazione di procedure GMP per la preparazione di IFN-DC per uso clinico, a seguito del trasferimento presso il Reparto di una metodologia sviluppata dall’industria IDM (licenziataria del brevetto US 09/845042-WO 02/088328) e utilizzata in studi clinici.
  - Studi di caratterizzazione immunologica di un nuovo antigene (COA-1) associato al carcinoma del colon retto (CRC) riconosciuto sotto forma di epitopo immunogenico associato alle molecole MHC di classe II.

## Reparto Malattie rare

Le malattie rare, pur essendo rare come singole condizioni, sono molto numerose e pertanto rappresentano una significativa porzione delle patologie umane (circa il 10%). Nel complesso costituiscono un ampio ed eterogeneo gruppo di malattie (circa 6000 secondo la WHO), accomunate dalla bassa prevalenza nella popolazione (5 casi per 10.000 abitanti nella popolazione europea secondo i criteri adottati dall’UE).

I problemi sanitari connessi a questo gruppo di malattie umane derivano dalle scarse conoscenze scientifiche per la comprensione delle loro basi eziologiche e patogenetiche. Conseguentemente, vi sono gravi carenze e ritardi nello sviluppo di strumenti diagnostici (precoci ed efficienti), di terapie innovative (farmacologiche, cellulari e geniche) e strategie riabilitative. Pertanto, i principali problemi sanitari derivanti dalle malattie rare richiedono di:

- sviluppare programmi di ricerca sulla eziopatogenesi, su eventuali fattori di predisposizione, sui marcatori diagnostici precoci, sulle terapie adeguate;
- attivare una rete di sorveglianza per le malattie rare, centrata sul Registro Nazionale esistente;
- promuovere e realizzare programmi nazionali ed internazionali di ricerca di base, clinica e socio-sanitaria.

Al Reparto è assegnato il coordinamento del progetto europeo “Network of Public Health Institution on Rare Diseases (NEPHIRD)”. Saranno messi a punto modelli di studio epidemiologici a livello europeo, studi sulla qualità di vita dei soggetti con malattia rara e indicatori di sanità pubblica.

Nel corso del 2004 il Reparto ha continuato e sviluppato le seguenti attività:

- Identificazione di aberrazioni genetiche in tumori rari (tumori pancreatici endocrini non secernenti); tali tumori presentano una grande eterogeneità genetica, sia in termini di amplificazioni che di delezioni.
- Caratterizzazione molecolare dei meccanismi patogenetici nella sindrome di Nijmegen, una malattia rara caratterizzata da difetti nei *pathway* di risposta al danno al DNA. Sono stati analizzati gli end-point legati alla radiosensibilità cellulare e alla riparazione delle DSB (mediante uno specifico saggio di elettroforesi in campo pulsato), congiuntamente all'espressione basale di proteine coinvolte nei pathways di riparazione delle DSBs o nell'attivazione per fosforilazione di specifici substrati che giocano un ruolo nei checkpoint del ciclo cellulare e nella riparazione.
- Caratterizzazione di sequenze endogene genomiche: è stata effettuata un'ampia disamina circa i fattori endogeni ed esogeni che contribuiscono alla modulazione dell'espressione di queste sequenze nell'organismo.
- Controllo esterno di qualità dei test genetici: è stato completato il quarto trial nazionale che ha visto la partecipazione di 87 laboratori pubblici che effettuano diagnosi molecolare e citogenetica, sia prenatale che post-natale.
- Aggiornamento e mantenimento del Registro nazionale malattie rare (istituito mediante DM 279/2001) e collegamento con la rete nazionale delle malattie rare.
- Aggiornamento e mantenimento del sito web dedicato alle malattie rare (<http://www.malattierare.iss.it>); il sito fornisce una guida per operatori sanitari, cittadini, pazienti e Associazioni dei pazienti e familiari alle problematiche delle malattie rare (dalla definizione, alla modalità di compilazione della Scheda del registro, alle Associazioni di patologie rare, ecc.).
- Collaborazione con la Conferenza Stato - Regioni per il coordinamento ed il monitoraggio delle attività assistenziali sulle malattie rare. Il Reparto partecipa attivamente alle Riunioni della Conferenza Stato-Regioni, inoltre ha recentemente realizzato un database per la elaborazione e valutazione di Schede per specifiche malattie rare candidate all'inclusione del DM 279/2001.

## **Reparto Metabolismo ed endocrinologia molecolare e cellulare**

L'attività di ricerca del Reparto è stata diretta allo studio dei meccanismi biochimici, molecolari e cellulari coinvolti nell'eziopatogenesi delle patologie endocrino-metaboliche e dello sviluppo. In particolare sono state sviluppate le seguenti tematiche:

- Lo studio delle risposte cellulari correlate al metabolismo del glucosio in eccesso, dal quale è emerso che l'alto glucosio è in grado di modificare mediatori, secreti dai preadipociti, i quali hanno un ruolo nei processi di proliferazione, apoptosi e differenziamento.
- Lo studio dei meccanismi endogeni di immunosoppressione nella risposta autoimmune organo-specifica, dal quale è emerso che nelle tireopatie autoimmuni gli autoanticorpi a specificità tiroidea sono in grado di trasportare in circolo citochine immunosoppressive.
- Lo studio degli effetti sulla funzionalità tiroidea dell'esposizione a Interferenti Endocrini, che ha messo in evidenza come l'effetto tireostatico di alcuni pesticidi largamente usati in agricoltura possa essere dovuto all'induzione di una risposta autoimmune tiroide specifica.
- Lo studio delle basi molecolari dell'ipotiroidismo congenito, dal quale è emerso che mutazioni a carico del gene NKX2-5 possono essere coinvolte nell'eziologia di questa frequente patologia neonatale. È proseguita l'attività di raccolta di materiale biologico per la creazione di una banca del DNA per questa stessa patologia.
- Lo studio delle basi molecolari della sindrome di Noonan e della rilevanza clinica delle mutazioni somatiche del gene PTPN11 con ruolo oncogenico. Le ricerche hanno portato ad una prima caratterizzazione funzionale delle mutazioni del gene PTPN11, hanno dimostrato l'origine paterna delle mutazioni responsabili della sindrome di Noonan originate durante la gametogenesi e hanno confermato l'attività oncogenica promossa da specifiche mutazioni somatiche di PTPN11, estendendo il contributo di queste ultime alla leucemia linfoblastica acuta.

Per ciò che riguarda l'attività istituzionale del Reparto, è proseguita l'attività di sorveglianza relativa Registro degli Assuntori dell'Ornone della Crescita e al Registro Nazionale degli Ipotiroidei Congeniti per il quale è stato anche organizzato il workshop annuale con la partecipazione di tutti i Centri di screening e follow-up operanti sul territorio nazionale.

Verranno studiati i meccanismi biochimici, molecolari e cellulari alla base di patologie endocrino-metaboliche e di malattie dello sviluppo che rivestono particolare rilievo socio-sanitario per l'elevata frequenza con cui si manifestano nella popolazione e per le sequele cronico-degenerative che determinano.

Le complicanze vascolari del diabete e la sindrome plurimetabolica verranno affrontate mediante:

- studio dei meccanismi molecolari e cellulari alla base della disfunzione endoteliale, che rappresenta la lesione chiave della vasculopatia diabetica, mediante l'utilizzo di modelli sperimentali *in vitro* e *in vivo*;
- studio del ruolo dell'iperglycemia nella regolazione del rimodellamento del tessuto adiposo, e quindi nello sviluppo dell'obesità, in corso di sindrome plurimetabolica.

L'ipofunzione tiroidea verrà approfondita con lo studio di:

- meccanismi biochimici e molecolari che regolano la risposta autoimmune organo-specifica con particolare attenzione all'interazione tra autoanticorpi organo-specifici e citochine immunomodulanti;
- fattori di rischio per le malformazioni associate all'ipotiroidismo congenito e la valutazione dell'insorgenza di Ipotiroidismo Congenito (IC) in gravidanze multiple;
- effetti dell'esposizione ad *Endocrine Disruptor Chemical* ad azione tireostatica.

Attualmente, per la genetica molecolare dei difetti congeniti dello sviluppo, l'interesse è rivolto principalmente verso:

- l'identificazione e caratterizzazione funzionale degli eventi molecolari alla base delle sindromi di Noonan, cardiofaciocutanea e Costello;

- la comprensione delle cause molecolari dell’ipotiroidismo congenito primario isolato e associato ad altre malformazioni congenite.

Particolare interesse è rivolto allo studio del significato funzionale delle mutazioni nel gene PTPN11 e del loro ruolo nella patogenesi e progressione leucemica.

Fanno capo al Reparto il Coordinamento del Registro Nazionale Ipotiroidei Congeniti (DPCM 9 luglio 1999, pubblicato nella G.U. 22 luglio 1999, n. 170) corredata da Banca Biologica e del Registro Nazionale degli Assuntori di Ormone della Crescita (DM 29 novembre 1993, pubblicato nella GU 11 dicembre 1993, n. 290).

## Reparto Neurobiologia molecolare

È proseguita, nel sistema nervoso centrale, l’identificazione delle proteine associate alla distrobrevina, una componente del complesso multiproteico distrofina-distroglicano, e la caratterizzazione biochimica e cellulare dell’interazione della distrobrevina con chinesina e con la subunità regolatoria della proteina chinasi A. Sono stati studiati i meccanismi neurotossici coinvolti nella malattia di Alzheimer, per mezzo dell’utilizzo di co-culture astrociti-neuroni e di modelli animali; è stata altresì studiata la plasticità sinaptica ed analizzata l’attivazione di segnali intracellulari attivi in condizioni fisiologiche o patologiche, quali ischemia, epilessia e malattia di Huntington o indotte da stress ossidativo.

Sono stati studiati i meccanismi di riparo del DNA ed in particolare dei *Double Strand Breaks* (DSB) in cellule neuronali al fine di valutare la potenzialità dei neuroni post mitotici di riparare il danno cellulare in situazioni patologiche e di effettuare il riarrangiamento del DNA durante lo sviluppo neuronale.

L’analisi del ruolo delle proteine chinasi MAPK/ERK, la cui attivazione è correlata con la epilettogenesi, in fettine combinate di ippocampo e corteccia entorinale di roditore, hanno evidenziato i meccanismi fisiologici, che intervengono nella genesi, nella propagazione e nella modulazione della scarica epilettica.

Sono stati preparati animali transgenici, esperimenti, selettivamente nelle cellule del Purkinje del cervelletto, il dominio E della Sinapsina Ia di ratto, al fine di caratterizzare il ruolo della Sinapsina Ia nei meccanismi di rilascio di neurotrasmettore, specificamente nella sinapsi cellule del Purkinje-nuclei profondi.

Saranno studiati, a livello molecolare, particolari complessi multiproteici di membrana che partecipano all’organizzazione strutturale e funzionale dei contatti specializzati tra neuroni, tra le cellule gliali e lamina basale o, ancora, tra cellule gliali e cellule endoteliali a livello della barriera emato-encefalica. Complessi simili al complesso di proteine associate alla distrofina (DPC), inizialmente identificato nel muscolo scheletrico in quanto coinvolto in numerose distrofie muscolari, sono presenti nel sistema nervoso. Tali complessi stabiliscono una connessione diretta tra matrice extracellulare e citoscheletro. Nell’ottica della duplice funzione dei DPC di stabilizzazione della membrana e di partecipazione ai meccanismi di trasduzione dei segnali cellulari ed attraverso l’allestimento di modelli cellulari (colture primarie di ippocampo, granuli cerebellari e neuroni retinici) ed *ex vivo* (preparazioni sinaptosomiali, fettine ippocampali), saranno inoltre studiati i segnali molecolari che vengono attivati nei processi neurotossici, con particolare riguardo alla malattia di Alzheimer, alla tossicità mediata da amminoacidi eccitatori e alle patologie neurodegenerative retiniche. L’obiettivo sarà la comprensione dei meccanismi patogenetici del danno neuronale e la sperimentazione *in vitro* di agenti neuroprotettivi. Alterazioni nel trasporto e nel processamento di proteine di membrana possono sia interferire con i corretti meccanismi di trasduzione dei segnali cellulari sia contribuire alla formazione di peptidi neurotossici. Tale fenomeno appare di notevole rilevanza

nella malattia di Alzheimer, dove l'alterato metabolismo della beta amiloide dà inizio o contribuisce alla patogenesi della malattia.

Il riparo del DNA è essenziale per mantenere l'integrità del genoma. Sebbene le mutazioni avvengano frequentemente durante la mitosi e la meiosi, anche il DNA dei neuroni post-mitotici è sottoposto al danno causato da vari agenti, tra cui i radicali liberi. Questi danni comprendono mutazioni di una base (*mismatch*) o rotture dell'intero cromosoma (DSB). In particolare, la presenza di DSB è stata associata al processo di invecchiamento e alla progressione di diverse patologie neurodegenerative, e la potenzialità del cervello adulto di riparare i DSB è stata evidenziata *in vitro* utilizzando estratti cellulari. Lo studio condotto nel nostro laboratorio, in collaborazione con il Medical Research Council di Cambridge (UK), ha dimostrato per la prima volta l'attività di riparo del DNA direttamente in colture primarie di neuroni post-mitotici. Tale attività aumenta in seguito a stimoli apoptotici ed è associata all'aumentata espressione di proteine coinvolte nei meccanismi di riparo del DNA quali *Homologous Recombination* (HR) e *Non-Homologous End-Joining* (NHEJ).

È stato studiato il ruolo del dominio E delle Sinapsine nelle sinapsi centrali attraverso la realizzazione di una linea di topi transgenici in grado di esprimere la porzione più conservata di tale dominio in maniera specifica nelle cellule del Purkinje del cervelletto. Esprimendo esclusivamente il peptide E nelle cellule del Purkinje, si è potuto studiare la sinapsi "cellule del Purkinje – nuclei profondi" mantenendo inalterati il resto dei circuiti cerebrali. Per guidare l'espressione del peptide E nelle cellule del Purkinje, abbiamo utilizzato il promotore della proteina L7, la cui espressione è limitata a tale popolazione neuronale. Gli studi effettuati sui topi mutanti, hanno dimostrato che l'overespressione del dominio E delle sinapsine accelera gli step finali dell'esocitosi e, in generale, aumenta l'andamento del ciclo delle vescicole sinaptiche.

## Reparto Neuroscienze comportamentali

Nel 2004 il Reparto si è occupato di:

- Analisi delle basi neurobiologiche di comportamenti animali mediante l'utilizzo di ceppi murini transgenici (alfa GDI, p66Shc, PSD 95, Reeler, R6/2, TG2576).
- Utilizzo di ambienti arricchiti per primati e roditori, finalizzato a ricerche per la riduzione dello stress psicofisico in soggetti mantenuti in cattività e all'analisi neurobiologica dei fattori proteici che nel sistema nervoso centrale regolano i meccanismi di coping allo stress.
- Validazione di modelli animali di transizione adolescenziale per lo studio: i) di comportamenti devianti e la vulnerabilità all'abuso di sostanze; e ii) di sindromi di iperattività/impulsività conseguenti a sofferenza ipossica neonatale, con analisi dell'efficacia modulatoria di variabili socio-ambientali e/o agenti psicoattivi.
- Valutazione del fenotipo comportamentale di modelli murini di patologie neurodegenerative, quali la malattia di Alzheimer e la corea di Huntington, e di un modello di encefalopatia ipossico-ischemica.
- Schematizzazione dei metodi di analisi dei dati comportamentali, oggetto di una serie di capitoli di prossima pubblicazione nei Current Protocols in Toxicology.
- Attività crescente di espressione di pareri, di docenza e di diffusione al pubblico generale su temi di rapporto uomo/animale e altri aspetti di tipo zooantropologico. In collaborazione con il Settore Attività Editoriali e l'Ufficio Relazioni Esterne si è interagito con insegnanti e scolaresche al fine di captare talenti precoci e contrastare la "crisi di vocazioni" per le discipline scientifiche di base a livello di iscrizioni universitarie.

Le neuroscienze neurocomportamentali studieranno:

- la vulnerabilità psicofisica e lo stress: analisi delle interazioni fra sistema nervoso, sistema endocrino e sistema immunitario nella risposta allo stress e ruolo regolativo delle neurotrofine. Studio dei fattori di rischio socioambientale per l'insorgenza di comportamenti devianti in età adolescenziale e giovanile. Validazione di agenti terapeutici innovativi, perfezionati attraverso l'utilizzo di appropriati modelli animali di stress psicosociale acuto/cronico (e/o attivi sulla percezione del dolore), per lo studio di fenomeni di plasticità comportamentale e relative basi neurali. Valutazione dell'impatto di stimoli stressanti di diversa natura, intensità e durata quali fattori di rischio per lo sviluppo di alcune patologie psichiatriche, per esempio forme depressive e dissociative. Utilizzo di modelli transgenici per patologie psichiatriche;
- i modelli sperimentali di danno cerebrale precoce, di sindromi di ritardo mentale o disturbi attenzionali/cognitivi nel bambino: analisi dei fattori di rischio e studio dei meccanismi patogenetici. Altre attività riguardano la selezione di indicatori precoci di danno con potenziale trasferibilità clinica, sia a livello comportamentale che biochimico, tali da consentire: a) la valutazione preclinica di trattamenti neuroprotettivi e/o di riabilitazione nel modello animale; b) l'individuazione di condizioni a rischio per lo sviluppo di disturbi comportamentali e cognitivi in relazione a patologie umane a elevato impatto sociosanitario (encefalopatia ipossica/ischemica, sindromi di ritardo mentale a base genetica e non, ADHD, schizofrenia). Tali attività di ricerca potranno, con le opportune integrazioni, riflettersi nella stesura di linee-guida;
- i modelli sperimentali su primati non umani per lo studio del ruolo dei fattori sociali nello sviluppo dei processi cognitivi;
- la neurotossicologia e teratologia comportamentale: analisi degli effetti avversi sullo sviluppo neurocomportamentale di xenobiotici di varia natura;
- l'adeguamento a livello nazionale degli standard di *animal care* per la riduzione delle condizioni stressanti o dolorose per il soggetto animale sperimentale, con estensione alla tutela del benessere psicofisico degli animali da reddito. Etica della sperimentazione su primati non umani e contributi alla rielaborazione della legislazione europea in merito.

Le neuroscienze comportamentali sono sostenute da metodi di analisi statistica complessi, per variabili di tipo comportamentale sia in sperimentazione clinica che in modelli animali, e dai futuri sviluppi che riguarderanno:

- la caratterizzazione dei criteri per il miglioramento della qualità del dato sia nella sperimentazione animale che nella sperimentazione clinica;
- lo sviluppo di tecniche biostatistiche per l'ottimizzazione del disegno sperimentale e per l'analisi dei dati raccolti in sperimentazione animale e clinica riguardanti lo studio della patogenesi e delle potenziali terapie di specifiche patologie neurologiche e psichiatriche ad eziologia multifattoriale.

## **Reparto Patologie neurologiche degenerative e infiammatorie**

Il Reparto svolge attività di ricerca indirizzata alla comprensione dei meccanismi patogenetici, all'individuazione di nuove procedure o marker diagnostici, ed allo sviluppo di approcci terapeutici innovativi nel campo delle malattie degenerative ed infiammatorie del sistema nervoso. L'attività di ricerca è suddivisa in quattro diverse aree:

- *Cellule gliali e loro ruolo nelle patologie neurodegenerative*  
Studio delle cellule gliali (microglia, astrociti e oligodendrociti) come cellule effettive o bersaglio nei meccanismi di patogenesi delle malattie neurodegenerative, di malattie neurologiche su base auto-immunitaria o ipossico-ischemiche. Definizione dei

meccanismi molecolari alla base dei processi di attivazione microgliale, in grado di sostenere una risposta infiammatoria locale anche in assenza di infiltrato di cellule immunitarie ematiche, per lo sviluppo di strategie di intervento farmacologico specifiche ed integrate al fine di promuovere le attività gliali neuroprotettive e di prevenire gli effetti citotossici legati ad una protratta ed eccessiva risposta della microglia.

– *Encefalopatie spongiformi trasmissibili (TSE) o malattie da prioni*

Ricerca di fattori endogeni o esogeni diversi dalla proteina prionica (PrP) coinvolti nell'eziosepatogenesi delle TSE. Identificazione e caratterizzazione di ceppi circolanti in Italia di TSE umani ed animali. Basi molecolari di amiloidogenesi della PrP. Meccanismo di trasporto dell'agente infettivo dalla periferia al SNC. Meccanismo d'azione di farmaci anti-prioni. Sviluppo di nuove metodiche diagnostiche (incluso tecniche di *imaging*) e di amplificazione della PrP *in vitro*. Sviluppo di nuove tecniche per inattivare i prioni. Misura della dose infettiva minima di BSE in grado di infettare i primati per via orale. Valutazione del rischio di trasmettere la BSE all'uomo attraverso il consumo di pesci alimentati con mangimi infetti da BSE.

– *Malattia di Alzheimer e altre demenze*

Analisi dei geni coinvolti nella patogenesi della malattia di Alzheimer e nelle demenze frontotemporali. Analisi del rapporto genotipo-fenotipo della malattia. Ricerca di potenziali fattori di rischio. Regolazione dell'espressione dei geni coinvolti nell'Alzheimer (meccanismi genetici ed epigenetici). Meccanismo di deposizione dell'amiloide in diversi tipi cellulari. Modelli animali e cellulari per la definizione dei meccanismi molecolari della patologia.

– *Malattie infiammatorie e demielinizzanti del sistema nervoso centrale*

Studi in modelli animali e su tessuto cerebrale umano autoptico dei meccanismi immunopatogenetici implicati nella cronicizzazione del processo neuroinfiammatorio nella sclerosi multipla, con particolare attenzione al ruolo svolto da mediatori solubili (citochine/chemiochine) e da cellule presentanti l'antigene (microglia/cellule dendritiche). Sviluppo di nuove terapie immunomodulatorie e neuroprotettive in modelli preclinici di sclerosi multipla. Definizione dei meccanismi molecolari che sottendono i processi di demielinizzazione e rimielinizzazione. Studi sulla funzione di un gene, MLC-1, implicato in una forma rarissima di leucodistrofia, la leucoencefalopatia megalencefalica.

Nell'area di ricerca delle cellule gliali e malattie neurodegenerative, nel 2004 sono proseguiti gli studi relativi ai meccanismi recettoriali che controllano l'attivazione microgliale e la risposta infiammatoria da queste sostenute nel corso di patologie neurodegenerative. Abbiamo dimostrato la presenza del recettore nicotinico alfa7 in colture microgliali e studiato gli effetti della sua attivazione da parte di agonisti specifici, quali la nicotina. I nostri risultati suggeriscono un ruolo anti-infiammatorio del sistema colinergico come già proposto per gli organi periferici (De Simone *et al.*, *J Neuroinflam* 2005). Sono proseguiti gli studi riguardanti la caratterizzazione della risposta di cellule microgliali in coltura alla stimolazione dei recettori metabotropic sensibili ai nucleotidi extracellulari (recettori P2Y): è stata analizzato il profilo di espressione con tecniche di western blot e RT-PCR e l'attività funzionale, valutandone la capacità di indurre movimenti di Ca<sup>2+</sup> intracellulare (Visentin *et al.*, in preparazione). Sono inoltre proseguiti gli studi su modelli animali e clinici per l'individuazione di marker infiammatori utili per il trattamento e il monitoraggio del decorso clinico di patologie quali Sclerosi multipla, malattia di Alzheimer, CJD e ipossia perinatale (Combrinck *et al.*, *JNNP* in press; Greco *et al.*, 2004).

Sono inoltre stati svolti i seguenti studi in pazienti con sclerosi multipla (SM) e modelli sperimentali correlati. Gli studi neuropatologici su pazienti con SM sono proseguiti nel 2004 con l'obiettivo di chiarire il significato patogenetico delle strutture simil-linfodi (follicoli B ectopici) da noi recentemente identificate nelle meningi di tali pazienti; in parallelo, sono stati avviati studi in modelli animali mirati ad interferire con la formazione di tali strutture nel cervello in corso di infiammazione.

Nel 2004 inoltre è stato inoltre completato uno studio *in vitro* e *in situ* sul ruolo dei recettori purinergici nella migrazione degli oligodendrociti. Considerata l'importanza di queste cellule nei processi di rimielinizzazione nelle lesioni demielinizzanti di SM.

Nell'ambito delle encefalopatie spongiformi trasmissibili (EST) è stato effettuato uno Studio dell'efficienza di decontaminazione degli agenti delle EST mediante alta pressione. Ed inoltre l'analisi dell'amiloidogenesi nelle EST mediante spettrometria di massa; l'applicazione dell'amplificazione della proteina prionica patologica per la diagnosi preclinica delle EST umane e animali; studio del ruolo delle cellule follicolari dendritiche, della cicloossigenasi e della prostaglandina E<sub>2</sub> in modelli animali di EST umana; studio del metabolismo della PrP in un modello cellulare che trattiene la PrP cellulare nel reticolo endoplasmatico; studi sul ruolo fisiologico e patologico del gene MLC-1.

Inoltre nel 2004 sono iniziati esperimenti per comprendere il ruolo fisiologico di MLC-1, un gene implicato in una rara forma ereditaria di leucodistrofia, la leucoencefalopatia megalencefalica con cisti subcorticali, ed espresso in astrociti del sistema nervoso centrale. Il gene MLC-1 è stato trasfettato (sia transientemente che stabilmente) in linee primarie e tumorali di cellule gliali umane ed è stata studiata la localizzazione cellulare della proteina codificata.

Sono stati analizzati pazienti affetti da Alzheimer sia nella sua forma sporadica (SAD) che familiare (FAD), oltre a soggetti neurologicamente sani, in una popolazione geneticamente isolata, quale quella della Sardegna, I risultati dell'analisi genetica condotta dal nostro gruppo, ha consentito di identificare una nuova mutazione sull'esone 4 della *PSEN2*, in un pedigree familiare che presentava una storia di demenza, da cinque generazioni. L'analisi genetica della sequenza della *PSEN2* ha mostrato una sostituzione C>T sull'esone 4, nella seconda posizione del codone 85 (A85V). La sostituzione è stata da noi individuata in quattro fratelli ed in due giovani familiari, mentre è risultata assente in 180 individui (100 soggetti di controllo ed ottanta pazienti MA), dimostrando di non essere un polimorfismo comune.

## **Reparto Terapia genica e cellulare**

In questi ultimi anni, si è assistito ad un grande sviluppo di tecnologie per il trasferimento di geni in sistemi cellulari e per il trasferimento di strategie di terapia cellulare alla sperimentazione clinica. In tale contesto, è opportuno mantenere e finalizzare un complesso di ricerche, condotte in Istituto in questo settore, inerenti sia lo sviluppo di nuovi vettori e metodiche per il trasferimento di geni in cellule sia lo sviluppo di strategie di terapia cellulare innovative.

Obiettivi del Reparto sono:

- la ricerca pre-clinica volta alla identificazione e alla valutazione in appropriati modelli sperimentali di strategie di immunoterapia per il trattamento di pazienti oncologici;
- lo sviluppo di metodologie di trasferimento genico per la terapia di patologie sia genetiche che acquisite;
- la ricerca pre-clinica volta alla identificazione dei meccanismi di controllo della proliferazione e della differenziazione in cellule primarie umane con possibili applicazioni cliniche in patologie sia genetiche che acquisite;

- l'attività regolatoria a supporto della Commissione per la sperimentazione di Fase I/II di cui al DPR 21 settembre 2001, n. 439, pubblicato nella GU 19 dicembre 2001, n. 294.

Nel 2004 il Reparto ha operato nei seguenti ambiti:

- *Attività istituzionali*
  - Ispezioni effettuate per l'Agenzia Italiana del Farmaco.
  - Analisi di dossier per la valutazione della qualità delle sperimentazioni di fase I per terapia cellulare e genica
  - Preparazione di linee guida per la Terapia Genica e la Terapia Cellulare.
- *Attività scientifica*
  - Caratterizzazione dei meccanismi di controllo della proliferazione cellulare e della "self-replicazione" in cellule staminali, progenitori e precursori emopoietici.
    - caratterizzazione dei meccanismi di controllo della proliferazione in precursori della serie eritroide in cellule primarie umane da parte di fattori di crescita emopoietici (SCF, IL-3, Eritropoietina, IL11, Tpo ecc.) e di ormoni metabolici (glucorticoidi, estrogeni o analoghi dell'insulina);
    - valutazione dell'attività di composti inibitori delle Istonedeaacetilasi (HDAC) sulla riattivazione della trascrizione dei geni globinici in cellule eritroidi primarie da soggetti normali e da pazienti con beta-Talassemia e caratterizzazione della specificità di espressione delle HDAC nella linea differenziativa eritroide.
  - Studio dei meccanismi di controllo, da parte della proteina Nef di HIV-1, dell'attività della NADPH ossidasi, un enzima chiave nella sorveglianza immunologica delle cellule fagocitarie.  
I risultati dimostrano che Nef è in grado di inibire l'attività dell'enzima NADPH ossidasi e suggeriscono fortemente che fattori solubili, in particolare l'interleukina-10, potrebbero mediare tale inibizione.
  - Generazione di un ceppo di topi 129 "wild-type" (129 wt) o KO per il recettore di IFN di tipo I (129 IFNARIKO) entrambi transgenici per l'oncogene di ratto Her-2/neu.  
Obiettivo di tale attività è di valutare il ruolo del sistema IFN di tipo I nell'insorgenza e nella progressione del carcinoma della mammella che si sviluppa spontaneamente nei topi transgenici per l'oncogene Her-2/neu.
  - Valutazione di un gammaherpesvirus murino (MHV-68) ricombinante per IFN-alfa come vaccino in grado di proteggere contro l'infezione latente a lungo termine stabilita dal virus MHV-68 "wild type" (manoscritto in preparazione).

## DIPARTIMENTO DI EMATOLOGIA, ONCOLOGIA E MEDICINA MOLECOLARE

Il Dipartimento svolge attività di ricerca in Ematologia e Oncologia, e in alcune aree delle malattie renali e cardiovascolari, delle neuroscienze e delle malattie genetiche. Diversi progetti di ricerca sono focalizzati sulle cellule staminali post-natali purificate e sui meccanismi molecolari, biochimici e cellulari che controllano la loro proliferazione e differenziazione. In particolare, la ricerca è focalizzata sulle cellule staminali ematopoietiche e neurali, con lo studio di modelli preclinici di trapianto di cellule staminali a scopo terapeutico nelle malattie degenerative cardiovascolari. Sono anche attivamente studiati i meccanismi oncogenici nei tumori solidi e nelle leucemie, sia a livello fenotipico che molecolare e funzionale. Altri progetti vertono sui meccanismi molecolari nelle malattie genetiche (emoglobinopatie e malattie lisosomiali), lo *switch* dell'emoglobina, le basi molecolari dell'arteriosclerosi, le ricerche in medicina trasfusionale e in medicina di laboratorio, lo studio dei markers diagnostici nelle nefropatie.

In diverse aree di ricerca il Dipartimento funge da centro di coordinamento di Programmi di ricerca nazionali e di collaborazione internazionale, che comprendono unità operative intra- ed extramurali: in particolare, il Programma Nazionale sulle Cellule Staminali, il Programma Oncotecnologico e i Programmi Italia-USA sulla Farmacogenomica Oncologica e sulla Terapia dei Tumori.

Il Dipartimento partecipa alla valutazione delle sperimentazioni di fase I, in particolare nel settore emato-oncologico, ed espleta controlli di qualità su sangue ed emoderivati. Infine, svolge attività di coordinamento e controllo del Servizio Trasfusionale Nazionale ed è responsabile del Registro nazionale e regionale del sangue e del plasma.

La strategia del Dipartimento sarà basata sull'interazione sinergica tra i Reparti e le diverse attività istituzionali. Verranno quindi potenziati gli interscambi tecnico-scientifici tra progetti di ricerca limitrofi, anche afferenti a Reparti diversi. Queste interazioni tecnico-scientifiche saranno ovviamente estese agli altri Dipartimenti dell'ISS e ai laboratori extramurali, anche sulla base dei Programmi di ricerca nazionale e internazionale coordinati dal Dipartimento. Sotto un altro profilo, le competenze acquisite in base alle attività di ricerca forniranno il supporto necessario per un migliore espletamento dei compiti dipartimentali di controllo, consulenza e formazione, in modo da ottenere una interazione sinergica tra queste attività istituzionali.

### Resoconto attività 2004

Il Dipartimento ha coordinato diversi Programmi di Ricerca Scientifica Nazionali e Internazionali, in particolare il Programma Cooperativo Italia-USA sulla Terapia dei Tumori, il Programma Nazionale sulle Cellule Staminali, il Programma Italia-USA di Oncologia (microRNA e Sequenze antisenso; Oncoproteomica) e infine il Programma Oncotecnologico.

## Reparto Biochimica e biologia molecolare clinica

Nel settore della diagnostica medica, diverse attività mirano a migliorare la sicurezza di qualità dei metodi applicati e degli strumenti utilizzati nei laboratori ematologici, e più in generale nella medicina di laboratorio. Questo obiettivo sarà perseguito attraverso:

- lo studio dei fattori genetici, molecolari e biochimici che sono alla base di talune anemie ereditarie (es. carenza di G6PD);
- l'individuazione di parametri diagnostici e l'elaborazione di protocolli diagnostici e di monitoraggio clinico;
- la partecipazione ad azioni europee per la definizione di standard di qualità in medicina di laboratorio;
- l'organizzazione di programmi di valutazione esterna di qualità,
- l'attività come laboratorio di riferimento in settori specialistici nell'ambito di reti internazionali;
- la certificazione di materiali di riferimento e di controllo.

Il Reparto ha svolto attività di ricerca e controllo nei settori della diagnostica delle anemie emolitiche degli emoderivati applicando nuovi protocolli per la diagnosi delle anemie emolitiche allo studio di 223 pazienti con deficit di glucosio-6 fosfato deidrogenasi (G6PD) e 106 con difetti congeniti delle proteine di membrana. Sono state descritte due nuove mutazioni del gene della G6PD e una nuova anomalia della proteina di membrana 4.1 R associata ad acantocitosi e sindrome neurodegenerativa.

## Reparto Biotecnologie oncologiche ed ematologiche

Un importante settore di attività del Dipartimento concerne la comprensione dei processi fisiologici e patologici che regolano la morte cellulare. L'avanzamento delle ricerche sull'apoptosi costituisce un obiettivo primario della ricerca biomedica di base e traslazionale, in particolare per le malattie oncologiche e per quelle degenerative. Le acquisizioni derivanti dagli studi sull'apoptosi verranno utilizzate per lo sviluppo di approcci biotecnologici e terapeutici innovativi. In oncologia si ha per obiettivo la morte delle cellule tumorali, evitando di danneggiare cellule e tessuti normali. Lo sviluppo di strategie citotossiche per i tumori chemioresistenti è associato allo studio di terapie di supporto per gli organi più suscettibili agli effetti tossici della chemioterapia e della radioterapia. Nelle malattie degenerative vengono studiate delle terapie che prevedano il blocco o il rallentamento della distruzione tissutale in associazione alla terapia cellulare rigenerativa mediante cellule staminali.

Il Reparto ha definito gli eventi precoci del segnale generato dai recettori di morte nelle cellule ematopoietiche e prodotto conoscenze innovative nel campo dei meccanismi apoptotici delle cellule staminali neurali normali e neoplastiche. Sono stati inoltre effettuati studi rilevanti studi sulla maturazione dei megacariociti con possibili implicazioni nella patogenesi dei disordini piastrinici. Infine è stato dimostrato che i carcinomi della mammella, della vescica e della prostata producono interleuchina-4, la quale agisce come fattore autocrino di crescita tumorale e di resistenza alla chemioterapia.

## Reparto Cellule staminali ed endotelio

Il Reparto ha condotto una serie di studi preclinici che hanno dimostrato che cellule CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup> isolate dal sangue cordonale possono riparare il miocardio e i muscoli scheletrici se iniettati dopo l'evento ischemico. Queste cellule, di cui sono state precedentemente descritte