Recenti lavori hanno enfatizzato l'importanza del gene umano L1, localizzato sul cromosoma X, nel normale sviluppo del sistema nervoso e il suo ruolo nelle patologie umane. Le sue mutazioni, infatti, sono responsabili di ritardo mentale, idrocefalo, anormale sviluppo delle maggiori vie assonali nel *corpus callosum* e nel tratto corticocospinale, oltre a deficit motori. Tale proteina è stata studiata, in collaborazione internazionale, nella sua sintesi, trasporto e localizzazione anatomica nel sistema visivo. Il pattern d'espressione della L1 suggerisce che nel precoce periodo postnatale la proteina possa supportare la fascicolazione delle fibre retiniche, mantenendole all'interno del tratto ottico, mentre la sua successiva diminuzione possa facilitare la loro arborizzazione terminale e quindi l'inizio della mielinizzazione.

AREA 4 - TUMORI

Analisi topologica della P-glicoproteina in cellule tumorali umane a fenotipo MDR

Responsabile scientifico
Maurizio Cianfriglia (Laboratorio di Immunologia)

Sintesi dell'attività svolta

Per utilizzare la P-glicoproteina come antigene bersaglio verso il quale veicolare principi attivi tramite anticorpi specifici è necessario identificare domini della molecola differentemente espressi in cellule tumorali o tessuti normali.

L'obiettivo della ricerca è quello di isolare anticorpi monoclonali in forma scFv diretti verso definiti domini della P-glicoproteina differenzialmente espressi o coinvolti nella funzione di trasporto di farmaci citotossici.

Segmenti polipeptidici corrispondenti a definiti domini della frazione extracellulare della P-glicoproteina sono stati sintetizzati, biotinilati e utilizzati per la selezione di anticorpi ricombinanti in forma scFv. Parallelamente, ibridomi secernenti immunoglobuline, capaci di inibire a seguito del legame con la P-glicoproteina la sua capacità di efflusso (reversione del fenotipo MDR), sono stati utilizzati come substrato genico per la sintesi di anticorpi ricombinanti. Questi frammenti scFv specifici saranno impiegati nella formazione di costrutti per veicolare su cellule tumorali MDR principi attivi ed enzimi capaci di convertire composti inerti in potenti citotossici.

Danno e riparazione del DNA nell'eziopatogenesi dei tumori

Responsabile scientifico
Margherita Bignami (Laboratorio di Tossicologia Comparata ed Ecotossicologia)

Sintesi dell'attività svolta

I risultati si riferiscono alle seguenti attività:

- Riparazione dei *mismatch* del DNA
  La principale via riparativa degli errori della replicazione del DNA è il mismatch repair (MMR). Difetti nel MMR sono presenti in una frazione importante dei tumori umani sia sporadici che ereditari; inoltre, un MMR difettivo è associato ad instabilità genomica (alti tassi di mutazione spontanea e indotta da esposizione ad agenti mutageni). Poiché il MMR è in grado di processare alcune basi modificate del DNA, un difetto in questa via riparativa altera inoltre la risposta ai farmaci utilizzati in chemioterapia antiblastica. Nel 2000 le ricerche si sono concentrate su:
  - ruolo relativo del MMR e della proteina p53 nella regolazione dell'apoptosi indotta dal cisplatino e da cloroetilnitrosourea;
  - identificazione di farmaci a cui i tumori con difetti nel MMR siano selettivamente sensibili, utilizzando sia modelli *in vitro* che *in vivo*;
  - identificazione delle lesioni al DNA riconosciute e processate da varie proteine del MMR e delle possibili interazioni con altri pathways di riparazione del danno al DNA;
  - quali siano i tipi di mutazioni che si accumulano in cellule con difetti nei geni del MMR;
  - possibili differenze esistenti tra cellule di roditore e umane nell'efficienza del MMR.

In particolare è stata identificata una nuova via di riparazione di un particolare tipo di *mismatch* (il *mismatch* A:C).

- Riparazione per escissione di basi (modelli *in vitro*)
  Il significato biologico della presenza di due meccanismi alternativi per la rimozione delle basi danneggiate del DNA via base *excision repair* (BER) in cellule di mammifero è ancora largamente inesplorato. Nella ricerca sono state utilizzate linee cellulari embrionali di topi *knock-out* per la maggiore DNA polimerasi della via *short-patch* BER, la DNA polimerasi β (Pol β), per studiare gli effetti biologici dell'abolizione di uno dei due meccanismi di riparazione. È stato osservato che il difetto nel gene della Pol β porta ad un accumulo di rotture a singolo filamento del DNA dopo trattamento con un agente alchilante monofunzionale mentre lascia inalterato il livello di danno e l'efficienza di riparazione delle rotture indotte da un agente ossidante. Usando un sistema di riparazione *in vitro* è stato inoltre dimostrato che, in assenza di Pol β, l'unica via di riparazione presente è il *long-patch* BER. I risultati suggeriscono che il meccanismo *short-patch* BER è la via preferenziale per la riparazione delle basi alchilate mentre i siti abasici ossidati sono il substrato per il *long-patch* BER. I due tipi di riparazione corrispondono a meccanismi specializzati per la riparazione di lesione diverse del DNA.

Epidemiologia dei tumori

Responsabile scientifico
Arduino Verdecchia (Laboratorio di Epidemiologia e Biostatistica)

Sintesi dell'attività svolta

Nel corso del 2000 l'attività ha riguardato l'epidemiologia descrittiva (studio della sopravvivenza, dell'incidenza e della prevalenza), l'epidemiologia eziologica (studio dei rischi connessi all'esposizione a radiazioni ionizzanti a bassi dosi), gli screening, la metodologia biostatistica.

Per quanto riguarda l'epidemiologia descrittiva, sono stati studiati gli andamenti e le differenze geografiche degli indicatori sopra elencati soprattutto a livello internazionale, cioè tra i Paesi europei, e tra Europa e Stati Uniti. Un risultato particolarmente rilevante è stato quello di aver messo in evidenza grandi differenze di prognosi tra i pazienti europei e quelli americani per molte sedi tumorali, e di aver quindi partecipato, con un gruppo internazionale, alla messa a punto del protocollo di un nuovo progetto (progetto CONCORD) per l'analisi e l'interpretazione di tali differenze. Lo studio degli effetti delle radiazioni è lo scopo del progetto sul profilo di rischio del personale aereonavigante dell'Aviazione Civile Italiana, alla cui descrizione si rimanda per maggiori dettagli. L'efficacia della colonscopia per la prevenzione dei tumori colorettali è stata studiata in collaborazione con l'Istituto Regina Elena di Roma. È stato messo a punto un protocollo per valutare la fattibilità in Italia di uno screening basato su questa metodica.

L'attività nel settore della biostatistica è stata soprattutto rivolta alla messa a punto di metodi per la stima della prevalenza. Il software relativo è attualmente in corso di implementazione quale componente del software SEER* STAT, prodotto e distribuito dal NCI-NIH.

I geni homeobox nell'ematopoiesi adulta: ruolo funzionale nella proliferazione e differenziazione dei progenitori e delle cellule staminali

Responsabile scientifico
Luciano Cianetti (Laboratorio di Ematologia e Oncologia)

Sintesi dell'attività svolta

Nell'anno 2000 la ricerca ha riguardato essenzialmente lo studio della regolazione del gene umano che codifica per il fattore di trascrizione homeobox HOXD3, implicato nella proliferazione e differenziazione cellulare.

Utilizzando costrutti bicistronici trasfettati nella linea cellulare NTera2 clone D1, indotta con acido retinoico, è stata definita una regione Internal Ribosobe Entry Site con la capacità di attivazione e

regolazione della traduzione. Con metodica analoga sono state individuate alcune regioni genomiche a monte del gene con attività di promotori di trascrizione.

È stata studiata la distribuzione dei trascritti dei geni HOXD3 e HOXD4 nei diversi compartimenti subcellulari (nucleo, citoplasma, polisomi), mettendo in evidenza una modificazione post-trascrizionale del messaggero consistente nella rimozione di parte del trascritto, che potrebbe avere un ruolo regolativo nell'espressione del prodotto proteico. Per quest'ultimo studio sono state messe a punto le condizioni per la preparazione di mRNA dai detti compartimenti subcellulari.

Interazione tra agenti antineoplastici e strutture subcellulari in cellule tumorali farmacosensibili e farmacoresistenti

Responsabile scientifico
Giuseppe Arancia (Laboratorio di Ultrastrutture)

Sintesi dell'attività svolta

È proseguito lo studio sui meccanismi di farmacoresistenza del melanoma. In particolare, è stata analizzata l'espressione delle molecole di adesione sulle linee di melanoma resistenti (M14 Dx).

È stata osservata una progressiva diminuzione di ICAM-1 (recettore per l'LFA-1), CD44 (recettore dell'acido ialuronico), VLA-5 (recettore della fibronectina) e VLA-2 (recettore del collagene) nelle cellule M14 Dx, inversamente correlata al livello di espressione della P-glicoproteina (P-gp).

Inoltre, l'analisi della localizzazione intracellulare delle proteine *actina-relate* quali l'ezrina, la radixina e la moesina (erm), ha dimostrato una stretta associazione tra erm, P-gp e CD44.

È proseguito inoltre lo studio sui meccanismi di interazione tra molecole ad azione farmacologica e membrane-modello. Le proprietà termodinamiche e strutturali di monostrati lipidici, depositati all'interfaccia acqua/aria (film di Langmuir) e/o su supporti planari (film di Langmuir-Blodgett), sono state studiate sia con misure di tensione superficiale che con tecniche di microscopia a forza atomica. Un peptide ad elevata azione antibiotica, la gramicidina A (gA), è stata inserita nelle membrane-modello in concentrazione crescente e sono state studiate le alterazioni prodotte. I risultati hanno evidenziato la formazione di diversi stati di aggregazione della gA e, in alcuni intervalli di concentrazione, la formazione di complessi gA-fosfolipide.

Nell'ambito della ricerca di nuove modalità di trattamento per il superamento della resistenza, è proseguito lo studio su linee sensibili (LoVo WT) e polifarmacoresistenti (LoVo DX) di adenocarcinoma del colon.

È stato dimostrato che il trattamento combinato con aminoossidasi di siero bovino (BSAO) e spermina induce la formazione di prodotti, quali H_2O_2 e aldeidi, che inducono citotossicità ed evidenti alterazioni morfologiche e ultrastrutturali (mitocondri), soprattutto a carico delle cellule resistenti.

L'analisi mediante citofluorimetria ha rivelato che, in seguito al trattamento, le cellule LoVo DX subiscono una più precoce ed evidente depolarizzazione dei mitocondri rispetto alle cellule sensibili.

Modulazione dell'attività anti-tumorale delle cellule NK umane

Responsabile scientifico
Carlo Ramoni (Laboratorio di Immunologia)

Sintesi dell'attività svolta

È stato analizzato il ruolo della fosfolipasi C specifica per fosfatidilcolina (PC-plc) durante l'attivazione delle cellule NK umane mediante rIL-2 e la sua importanza nella esocitosi dei granuli litici. Gli aspetti nuovi di questo lavoro sono:

- dimostrazione di almeno due isoforme nelle cellule NK;
- dimostrazione della traslocazione della PC-plc lungo i microtubuli;
- discreta co-localizzazione dell'enzima nei vari organelli;
- coinvolgimento della PC-plc nell'attività citolitica delle cellule NK.

I recettori dei fattori di crescita nell'ematopoiesi normale e leucemica

Responsabile scientifico
Ugo Testa (Laboratorio di Ematologia e Oncologia)

Sintesi dell'attività svolta

Gli studi si sono rivolti a due filoni di ricerca:

- nell'ambito del primo sono stati condotti studi che hanno consentito di chiarire in parte i meccanismi trascrizionali e post-trascrizionali, responsabili dell'elevata espressione dei recettori 1 e 2 della transferrina nelle cellule eritroidi normali;
- nell'ambito del secondo è stata studiata la cinetica di espressione nonché la regolazione dell'espressione della catena recettoriale beta (βc) dei recettori dell'interleuchina-3 e del GM-CSF.

Nel loro complesso gli studi hanno fornito un contributo alla comprensione dei meccanismi attraverso i quali i recettori di membrana regolano la differenziazione emopoietica.

Regolazione dei geni omeotici e ruolo nella trasformazione neoplastica

Responsabile scientifico
Alessandra Carè (Laboratorio di Ematologia e Oncologia)

Sintesi dell'attività svolta

I dati mostrano il ruolo fondamentale del gene umano HOXB7 nella proliferazione e nell'angiogenesi tumorale in cellule di melanoma e carcinoma mammario.

Studi funzionali mediante trattamento con oligomeri antisenso o espressione ectopica mediante trasduzione genica hanno dimostrato l'induzione da parte di HOXB7 di una serie di fattori di crescita e proteasi, comprendente bFGF, VEGF, GROα, IL-8, ANG-2, MMP-9, mentre i corrispondenti recettori non vengono modulati.

Il conseguente aumento di vascolarizzazione e tumorigenicità è stato dimostrato *in vitro* mediante esperimenti di co-cultura delle cellule tumorali con cellule endoteliali e *in vivo* mediante inoculo sotto cute del tumore in topi nudi.

Dati preliminari suggeriscono inoltre un ruolo di HOXB7 anche nella via di trasduzione del segnale bFGF/src/cav-1, correlata alla trasformazione cellulare.

Parallelamente, è stato studiato il processo apoptotico, basato sulla deregolazione del pathway Fas/FasL, come evento chiave nello sviluppo di disordini emolinfopoietici.

Ruolo delle citochine e dei fattori di trascrizione da esse indotti nel controllo della proliferazione e del differenziamento

Responsabile scientifico
Angela Battistini (Laboratorio di Virologia)

Sintesi dell'attività svolta

Il fattore di trascrizione IRF-1 è stato identificato come un fattore chiave nella trascrizione del gene della nitrossido sintetasi in risposta a stimoli infiammatori quali lipopolisaccaridi e interferon gamma. Lo studio del promotore della forma inducibile dell'enzima ha, infatti, evidenziato come le sequenze che legano il fattore di trascrizione IRF-1 e il suo repressore IRF-2 siano responsabili anche del silenziamento del gene in seguito a stimoli antinfiammatori quali l'IL-4.

IRF-1 è un fattore coinvolto in molteplici processi cellulari, che vanno dalla difesa dalle infezioni alla modulazione della risposta immune e anche del differenziamento a seconda del tipo cellulare esaminato. Recentemente è stato dimostrato che IRF-1 gioca un ruolo chiave nel differenziamento granulocitario. In un sistema di cellule non trasformate in grado di differenziare a neutrofili è stato dimostrato come la espressione costitutiva di IRF-1 sia in grado di indurre l'espressione di marker tipici del differenziamento anche in assenza delle citochine stimolatorie. Ancor più dimostrativo il blocco dell'attività di IRF-1 attraverso il suo repressore IRF-2, che abolisce completamente il differenziamento anche in presenza di citochine.

Per quanto riguarda la parte del progetto volta allo studio della regolazione dell'espressione di geni ubiquitari ma iperespressi in poche cellule specializzate, lo studio della regolazione tessuto specifica del recettore della transferrina ha portato all'identificazione di alcuni fattori di trascrizione che giocano un ruolo chiave nella trascrizione del gene durante il differenziamento eritroide. Tra questi Ets-1 è stato dimostrato legarsi specificamente a sequenze *consensus* sul promotore prossimale e di essere poi down-modulato durante il differenziamento terminale. La sua espressione costitutiva in un sistema modello è stata, infatti, vista interferire in maniera discreta con il differenziamento eritroide terminale, confermando anche in cellule di mammifero l'oncogenicità di alcuni membri della famiglia di fattori di trascrizione Ets.

Ruolo degli interferoni e di altre citochine macrofagiche nel controllo della crescita neoplastica e sviluppo di nuove terapie antitumorali

Responsabile scientifico
Maria Ferrantini (Laboratorio di Virologia)

Sintesi dell'attività svolta

È stata valutata l'attività adiuvante di un plasmide codificante IFN-α1 murino nel rompere la tolleranza verso l'antigene TRP-2 del melanoma metastatico murino B16 in topi singenici C57BL/6. I risultati finora ottenuti indicano che l'espressione *in vivo* di IFN-α, in seguito ad inoculo del plasmide, in associazione con un plasmide codificante TRP-2 o in topi precedentemente immunizzati contro questo antigene, è in grado di indurre una risposta immune protettiva contro il tumore, normalmente non stimolata dal solo antigene in topi singenici.

L'attività futura sarà concentrata sulla definizione dello schema ottimale di immunizzazione, sulla comparazione dell'effetto adiuvante della somministrazione del plasmide codificante IFN rispetto alla citochina e sulla caratterizzazione dei correlati immunologici della protezione.

Segnali NMR come marcatori metabolici della trasformazione neoplastica e della risposta alla terapia. Sviluppo di nuovi metodi in oncologia

Responsabile scientifico
Franca Podo (Laboratorio di Biologia Cellulare)

Sintesi dell'attività svolta

L'attività ha soprattutto riguardato l'identificazione di parametri di spettroscopia e imaging NMR come indicatori di crescita tumorale, diagnosi differenziale e risposta ad induttori di apoptosi *in vitro* e *in vivo*.

Nel corso del 2000 sono state ottenute nuove evidenze su:

- relazione tra formazione di lipidi mobili (ML) e domini di membrane in cellule eritroleucemiche; formazione di ML nel citoplasma di cellule linfoblastoidi indotte da apoptosi;
- ruolo della fosfolipasi C specifica per fosfatidilcolina e sua compartimentazione subcellulare in cellule stimolate a livello recettoriale;
- attività di un analogo fluorurato della deossicitidina (Gemcitabina) nell'induzione di apoptosi in cellule di glioma (C6) *in vitro* e *in vivo*.

Sono stati inoltre sviluppati nuovi metodi NMR in doppia risonanza 13C-1H per la rivelazione selettiva di metaboliti del glucosio *in vitro* e *in vivo*.

Strategie terapeutiche antitumorali: studio dei meccanismi di azione e sviluppo di nuovi protocolli di immunoterapia in associazione con chemioterapia

Responsabile scientifico
Enrico Proietti (Laboratorio di Virologia)

Sintesi dell'attività svolta

L'attività scientifica svolta nel 2000 si è focalizzata sullo studio dell'effetto della ciclofosfamide sull'induzione di interferon di tipo I e sulle conseguenze di questo fenomeno sulla risposta immunitaria. I risultati descritti nell'anno precedente avevano messo in evidenza il ruolo fondamentale, *in vivo*, dell'interferon di tipo I nel potenziare la risposta antitumorale di linfociti immuni trasferiti adottivamente in topi portatori di tumore trattati con ciclofosfamide. I risultati sperimentali, ottenuti nello svolgimento del presente progetto, hanno dimostrato che una singola iniezione di ciclofosfamide in topi normali induce rapidamente produzione di interferon di tipo In (IFN). Analisi al citofluorimetro delle sottopopolazioni linfocitarie murine hanno mostrato che all'aumento di IFN si associa un aumento dei linfociti di memoria e una prolungata sopravvivenza e proliferazione dei linfociti immuni trasferiti adottivamente nel topo.

AREA 5 - MALATTIE INFETTIVE E PARASSITARIE

Diagnosi, patogenesi e terapia delle micosi invasive e delle mucose

Responsabile scientifico
Flavia De Bernardis (Laboratorio di Batteriologia e Micologia Medica)

Sintesi dell'attività svolta

I risultati ottenuti riguardano:

- Candidiasi vulvovaginale
  Sono proseguite le ricerche per valutare la risposta anti-*Candida* a livello delle mucose. Nel modello di vaginite sperimentale nella ratta abbiamo evidenziato se anticorpi anti-*Candida* e immunità cellulo-mediata vengono indotti a livello vaginale. Infatti, durante l'infezione da *C. albicans* sono state riscontrate elevate concentrazioni di citochine T-helper 1, un marcato aumento di linfociti vaginali CD4+, attività proliferative *in vitro* di linfociti vaginali stimolati con mannano e assenza di proliferazione delle cellule del sangue, linfonodi e milza. In complesso, i risultati ottenuti enfatizzano il ruolo protettivo dell'immunità sia umorale che cellulo-mediata a livello vaginale e costituiscono una base per una possibile strategia di vaccinazione o immunoterapia.
- Studio di immunomodulatori fungini
  È stata caratterizzata la produzione di citochine da parte di colture di moniti umani stimolati con le due diverse forme di crescita di *C. albicans*. La forma miceliale invasiva (M) stimolava meno efficacemente la produzione di IL-12 e di chemochhine quali MIP-1α MIP-1β, IL-8 e MCP-1, rispetto alla forma lievito commensale (Y).

La dissezione chimico-enzimatica dei diversi componenti parietali suggeriva che componenti parietali β-glucanici, fossero i principali mediatori dell'induzione di chemochine. Coerentemente, esperimenti di immunofluorescenza dimostravano che tali componenti induttivi erano significativamente meno espressi sulla superficie delle cellule M rispetto alle cellule Y. Questi dati suggeriscono che la virulenza attribuita alle forme M possa anche dipendere dalla mancata stimolazione di IL-12 e dal concomitante difettivo reclutamento leucocitario ai siti di infezione.

Sono proseguiti gli studi sulla MP-65, una mannoproteina di 65 kDa di *C. albicans*, bersaglio maggiore della immunità cellulo-mediata nell'uomo. Èstato clonato il gene codificante per MP65 di *C. albicans* e il suo omologo di *S. cerevisiae*. I prodotti genici sono stati espressi in *E. coli* e purificati. Le due proteine ricombinanti sono state saggiate in linfoproliferazione: mentre la rScMP65 si è dimostrata non stimolatoria, rCaMP65 è stata in grado di indurre stimolazione linfocitaria in tutti i donatori testati. Inoltre, cellule T CD4+ generate con CaMP65 nativa rispondono anche a rCaMP65; rCaMP65 è un valido reagente per gli studi immunologici.

Enterovirus e virus enteritogeni: caratterizzazione strutturale, antigenica e funzionale di poliovirus e rotavirus

Responsabile scientifico
Lucia Fiore (Laboratorio di Virologia)

Sintesi dell'attività svolta

I risultati della ricerca hanno riguardato:

- Poliovirus
  Sono state messe a punto metodiche per l'identificazione rapida di poliovirus in campioni clinici e ambientali e per il dosaggio rapido, nei sieri dei pazienti, degli anticorpi neutralizzanti contro il poliovirus. Sono stati prodotti e caratterizzati anticorpi monoclonali neutralizzanti di classe IgA contro i sierotipi 1, 2 e 3 di poliovirus. I risultati ottenuti hanno dimostrato che l'N-AgIII è il principale target per l'immunità mucosale intestinale per i tre poliovirus. È stato messo a punto un modello innovativo di infezione orale per il poliovirus utilizzando topi transgenici per il recettore di poliovirus. L'insorgenza di paralisi dopo somministrazione di virus selvaggi risulta essere dose-dipendente; circa il 40% dei topi presenta chiari segni di malattia. Questo modello appare adeguato a studi volti a definire i siti di replicazione del poliovirus nell'intestino e a valutare il ruolo degli anticorpi di classe IgA prodotti nella protezione dall'infezione orale e nella resistenza alla malattia.
- Rotavirus
  È stato riscontrato, attraverso confronto di sequenze riportate in banche dati, che un peptide di 12 aminoacidi, contenente un epitopo per linfociti B e T della proteina PAR O1 di parietaria, aveva una omologia di sequenza con l'estremità C-terminale della proteina VP4 di Rhesus rotavirus (RRV). È stata dimostrata una cross-reattività immunologica tra anticorpi umani, antirotavirus purificati per cromatografia di affinità utilizzando la proteina VP4 di Rhesus rotavirus espressa in baculovirus e anticorpi ANTIPAR 01 umani purificati utilizzando la proteina PAR O1, il maggior allergene del polline di parietaria. Il significato biologico di tale ritrovamento è in corso di studio.

Eziopatogenesi e diagnosi delle infezioni croniche da virus epatitici

Responsabile scientifico
Maria Rapicetta (Laboratorio di Virologia)

Sintesi dell'attività svolta

L'attività di ricerca è stata focalizzata sui due aspetti dello studio della patogenesi delle infezioni da virus dell'epatite B (HBV) e dell'epatite C (HCV) e dello studio strutturale dei virus associati a tali infezioni particolarmente per ciò che concerne le implicazioni biologiche e patologiche della variabilità genomica virale. Le ricerche sono state sviluppate per quanto concerne il primo aspetto attraverso la messa a punto e utilizzazione di modelli sperimentali *in vivo* e *in vitro*. Per gli studi patogenetici di HBV e dei meccanismi correlati all'insorgenza di epatocarcinoma HCC è stato utilizzato il modello *in vivo* WHV-Marmota monax. È stato dimostrato in tale modello che le interazioni del genoma virale in elementi genetici e regolativi particolari (locus B3N, locus Win) possono indurre attivazione del proto-oncogene N-Myc 2 con un meccanismo, attualmente allo studio, di attivazione "a distanza". Tali studi possono contribuire all'identificazione dei meccanismi di tipo diretto correlati all'epatocarcinogenesi.

Nello stesso modello è stata inoltre dimostrata, attraverso infezioni sperimentali, la presenza di modulazioni della quasispecie virale nella fase acuta dell'infezione che possono avere un ruolo significativo nello stabilirsi delle fasi di cronicità e persistenza virale.

Per quanto concerne il virus HCV, gli studi in sistemi di espressione *in vitro* delle proteine strutturali (CORE, ENV) hanno messo in evidenza il loro coinvolgimento nell'ambito di meccanismi di citopatogenicità.

Lo studio delle caratteristiche strutturali di HBV e HCV è stato particolarmente focalizzato sulle caratteristiche della variabilità genomica e dell'espressione fenotipica e relative implicazioni sull'evoluzione virale (studi filogenetici) su particolari caratteristiche biologiche (associazione con differenti livelli patogenetici, alterazione del grado di rilevabilità diagnostica). Tali studi sono stati effettuati in collaborazione con Unità cliniche (epatologia, gastroenterologia, malattie infettive) ed epidemiologiche.

Fattori eco-biologici favorenti la diffusione di artropodi di interesse sanitario in Italia: identificazione del ruolo vettore e valutazione di metodi di prevenzione e lotta

Responsabile scientifico
Michele Nino Maroli (Laboratorio di Parassitologia)

Sintesi dell'attività svolta

Per la valutazione di nuovi metodi di prevenzione contro la leishmaniosi viscerale è stata completata una prova di campo per monitorare l'efficacia di collari protettivi impregnati con deltametrina, applicati ad una popolazione canile di un focolaio della Campania.

Nei due anni di studio è stato osservato che l'impatto di questa misura di prevenzione sull'incidenza della leishmaniosi canina è trascurabile, essendo non significativa rispetto al controllo, quando la forza di trasmissione del parassita è bassa, mentre è evidente (protezione >80%) durante stagioni ad alta trasmissione.

Nell'ambito degli studi sulla identificazione della capacità vettrice degli artropodi è stato indagato il ruolo di una mosca carnaria, *Sarcophaga argyrostoma*, nella disseminazione di *Trichinella spiralis*. Dalla sperimentazione è risultato che la mosca ha un limitato ruolo come ospite paratenico se paragonato a quello dei mammiferi caratterizzati da uno spiccato comportamento cannibalistico/spazzino. Fra le ricerche sulla biologia dei flebotomi, sono stati completati gli studi sulla filogenesi del sottogenere *Larroussius* e sulla ultrastruttura delle ghiandole seminali di *Phlebotomus perniciosus*.

Fattori di virulenza di batteri anaerobi patogeni per l'uomo

Responsabile scientifico
Paola Mastrantonio (Laboratorio di Batteriologia e Micologia Medica)

Sintesi dell'attività svolta

È stato identificato il gene slpA che codifica per la proteina precursore del S-layer presente nei ceppi virulenti di *Clostridum difficile* C253 e 79-685. Tale proteina presenta un dominio di ancoraggio C-terminale altamente conservato, simile a quello riscontrato nell'adesina Cwp66 presente nel ceppo 79-685. La proteina presenta inoltre un domino SLH e un dominio N-terminale variabile che media l'adesione cellulare. Il gene che codifica per la proteina precursore del S-layer e l'adesina Cwp66 sono presenti in un locus genetico di 17 ORF, undici dei quali esibiscono una simile struttura a due-domini che probabilmente codifica per proteine di superficie.

L'identificazione di questo cluster di geni sul genoma di *Clostridium difficile* è un risultato importante nella caratterizzazione del processo di colonizzazione delle cellule dell'ospite. Infatti, questo microorganismo in modo analogo ad altri batteri potrebbe avere numerose proteine esposte in superficie che agiscono come adesine.

Fattori di virulenza e caratterizzazione molecolare di patogeni enterici

Responsabile scientifico
Ida Luzzi (Laboratorio di Batteriologia e Micologia Medica)

Sintesi dell'attività svolta

È stata studiata l'infezione da *Helicobacter pylori* (HP) in diversi gruppi di popolazioni attraverso approcci differenti: risposta anticorpale specifica verso HP e verso CagA, presenza di antigene fecale di HP, caratterizzazione molecolare dei ceppi isolati. I risultati hanno mostrato come l'infezione da HP abbia una prevalenza variabile nelle diverse popolazioni esaminate (dal 25 al 90%). La ricerca dell'antigene fecale rappresenta uno strumento diagnostico non invasivo con buona sensibilità e specificità. Infine si conferma come i ceppi di *H. pylori* che codificano per l'isola di patogenicità (PAI) risultino fortemente associati con le patologie gastroeduodenali più gravi.

Sono state eseguite analisi molecolari rispetto alla presenza di plasmidi coniugativi in grado di trasferire orizzontalmente i geni di antibiotico-resistenza in *Salmonella*. Su questi plasmidi sono stati geneticamente mappati i geni responsabili di fenotipi di resistenza multipla. Tali geni sono stati clonati e sequenziati così

come le regioni fiancheggianti sui plasmidi di resistenza. Si è potuta quindi ricostruire l'evoluzione di elementi genetici come trasposoni e integroni, localizzati sui plasmidi coniugativi responsabili dell'acquisizione e della diffusione dei geni di resistenza.

Identificazione di geni coinvolti nei meccanismi di farmacoresistenza, patogenicità e suscettibilità in protozoi parassiti

Responsabile scientifico
Marina Gramiccia (Laboratorio di Parassitologia)

Sintesi dell'attività svolta

I contributi delle tecniche biochimiche e molecolari allo studio delle malattie parassitarie hanno fornito la possibilità di indagare sulle differenze intraspecifiche di protozoi parassiti e di valutare le relative ricadute sul piano strettamente correlato alla malattia.

Il presente progetto ha avuto come obiettivi lo studio dei meccanismi di:

- patogenicità in *Leishmania infantum*;
- patogenicità in *Toxoplasma gondii*;
- suscettibilità parassita-vettore.

I risultati ottenuti hanno permesso di:

- interpretare gli episodi di ricaduta clinica nella leishmaniosi viscerale (LV) e la struttura molecolare dei due maggiori zimodemi di *L. infantum* responsabili di LV in Italia, attraverso lo studio dei cariotipi molecolari e l'utilizzazione di marker molecolari riferiti ai cromosomi 6-19;
- sequenziare e far trascrivere *in vitro* il gene della cisteina proteinasi in ceppi a diversa virulenza di Toxoplasma e successivo confronto;
- isolare il SAG 5 in *T. gondii*;
- completare lo studio filogenetico del sottogenere *Larroussius* e in particolare delle popolazioni italiane di *P. perniciosus*.

Identificazione e valutazione di prodotti immunogenici e farmacologici per il controllo e la terapia di infezioni da protozoi sistemici

Responsabile scientifico
Luigi Gradoni (Laboratorio di Parassitologia)

Sintesi dell'attività svolta

Nel campo della leishmaniosi viscerale umana è stato validato un protocollo per la terapia dell'adulto immunocompetente con un nuovo complesso lipidico dell'amfotericina B. Nel campo della leishmaniosi canina è stata valutata la risposta immunocellulare comparata a tre adiuvanti vaccinali. Sono stati individuati nuovi aspetti immunopatologici legati all'anemizzazione e alla risposta funzionale dei leucociti polimorfonucleati; infine, è stata messa a punto un'analisi in western blotting delle proteine antigeniche di Leishmania riconosciute nelle varie fasi evolutive dell'infezione in cani trattati con proteine ricombinanti e di controllo.

È stata completata la messa a punto di un metodo rapido per la genotipizzazione di *Plasmodium* su portatori di gametociti. Per la discriminazione di specie di *Babesia* è stato individuato come marcatore efficace il gene per la β-tubulina.

Tra i target biologici di sostanze farmacologicamente attive, sono state identificate le proteasi a cisteina di *Plasmodium* e *Trypanosoma* come bersaglio di prodotti a rilascio di ossido nitrico.

Infezioni emergenti associate a virus trasmessi da mammiferi e/o artropodi: aspetti ecoepidemiologici, patogenetici e molecolari

Responsabile scientifico
Colomba Giorgi (Laboratorio di Virologia)

Sintesi dell'attività svolta

La sorveglianza di casi di meningite e/o meningoencefalite virus-associate ha permesso di individuare nuovi focolai di virus trasmessi sia da zecche (TBE) che da flebotomi (TOS). L'analisi molecolare degli isolati, sia da vettori che da pazienti, non ha evidenziato differenze genomiche significative. Sono state allestite tecniche diagnostiche sierologiche (ELISA) e molecolari (PCR) per una rapida diagnosi di eventuali casi di malattia *Hantanvirus*-associati. Le proteine N espressa in *E. coli*, e le glicoproteine, espresse mediante baculovirus in Sf9 del virus Toscana sono state valutate come antigeni virali in un saggio Western-blotting diagnostico. I risultati suggeriscono che la rN può essere un utile antigene per la diagnosi, al contrario delle glicoproteine che mostrano una risposta eterogenea per la probabile circolazione di varianti virali. Mediante un sistema virale ricostituito *in vitro* è stato dimostrato che è possibile il riassortimento tra due phlebovirus (*Toscana* e *Rift Valley fever*); i riassortanti devono avere i segmenti S ed L dello stesso virus.

Infezioni da *Legionella pneumophila*

Responsabile scientifico
Maddalena Castellani Pastoris (Laboratorio di Batteriologia e Micologia Medica)

Sintesi dell'attività svolta

Sono state osservate la capacità di un ceppo virulento di *Legionella pneumopila* di indurre la produzione di elevate quantità di alcune citochine proinfiammatorie (TNFa, IL-1b, IL-6) da parte dei macrofagi peritoneali di topino suscettibile A/J infettato per via intraperitoneale e l'assenza di tale capacità da parte di un suo mutante avirulento. Ciò ha consentito di notare che anche la somministrazione per via intranasale dà luogo ad una espressione differenziale dell'mRNA per tali citochine nel tessuto polmonare dei topini trattati con i due diversi ceppi, e che il ceppo virulento veniva eliminato dal tessuto polmonare con una progressione molto più rapida rispetto al ceppo virulento. Inoltre, topini inoculati con flagelli parzialmente purificati mostrano un aumento dei livelli di TNFa e una maggiore espressione dell'mRNA nelle cellule dell'essudato peritoneale. Questi risultati suggerirebbero un ruolo del flagello nella virulenza del microrganismo e un possibile coinvolgimento del TNFa (in alte dosi) nella malattia umana.

Infezioni da micobatteri

Responsabile scientifico
Lanfranco Fattorini (Laboratorio di Batteriologia e Micologia Medica)

Sintesi dell'attività svolta

Per quanto riguarda lo studio delle infezioni da *Mycobacterium avium*, è stato visto che topi immunizzati per via intranasale, intradermica o intraperitoneale con piccole dosi di *M.avium* (20 CFU) generano risposte protettive di tipo Th1 o Th2 a seconda, rispettivamente, della minore o maggiore quantità di micobatteri ritrovati nei tessuti. Fra le vie esaminate, quella intranasale è risultata essere la meno infettante e quella più prona a generare risposte Th1 (induzione di IFN-γ e assenza di IgG1, IgG2a e IL-4). Nel modello di infezione in topo beige, *M. celatum*, un micobatterio simile a *M. avium*, è risultato essere sensibile al trattamento terapeutico con claritromicina e azitromicina. Per quello che concerne le infezioni da *M. tuberculosis*, in uno studio nazionale iniziato nel marzo 1998 e condotto in collaborazione con il gruppo SMIRA (Italian Multicentre Study on Antituberculosis Drug Resistance) e il Laboratorio Nazionale di Riferimento sulla Multiresistenza nella Tubercolosi di Villa Marelli (Milano), è stata allestita in Istituto una collezione di 146 ceppi monoresistenti ai farmaci antitubercolari comprendente 61 stipiti MDR (resistenti ad almeno isoniazide e rifampicina).

Infezioni da virus influenzali: aspetti clinici, epidemiologici, patogenetici e molecolari

Responsabile scientifico
Isabella Donatelli (Laboratorio di Virologia)

Sintesi dell'attività svolta

Nel corso del 2000 sono proseguiti gli studi riguardanti i virus influenzali circolanti nell'uomo e in alcune specie animali. La caratterizzazione dei virus isolati nella popolazione ha permesso di individuare, come ogni anno, le varianti virali emergenti da inserire nella nuova composizione vaccinale. Nell'ambito di questa attività sono stati attivati cinque nuovi centri periferici di collaborazione.

Per quanto riguarda i virus circolanti negli animali, è stato ultimato il sequenziamento genomico di virus H5N2 isolati in allevamenti avicoli italiani. È stata condotta un'analisi filogentetica comparativa tra le sequenze ottenute e quelle relative a virus del pollo H5N1, dichiarati dalla WHO potenzialmente pandemici per l'uomo, e isolati contemporaneamente nell'uomo ad Hong Kong.

L'analisi ha permesso di escludere un collegamento evolutivo e quindi un rapporto di derivazione diretta tra i due gruppi di virus.

Studi volti al chiarimento dei meccanismi molecolari responsabili della trasmissione interspecie hanno, infine, riguardato il sequenziamento aminoacidico delle HA dei virus responsabili delle pandemie del 1957 e 1968 e di epizoozie suine verificatesi nel 1979. I dati ottenuti hanno rivelato una derivazione aviaria della HA avente un alterato riconoscimento del recettore (legame dell'acido sialico al galattosio), che costituisce un prerequisito essenziale per l'efficace replicazione e disseminazione dei ceppi epidemici nelle nuove specie animali.

Meccanismi di difesa contro le infezioni: regolazione dei geni indotti dagli interferoni e coinvolti nei processi di immunità innata

Responsabile scientifico
Eliana Marina Coccia (Laboratorio di Immunologia)

Sintesi dell'attività svolta

Gli studi condotti in questi ultimi anni hanno avuto come obiettivo l'analisi del ruolo svolto dalle citochine, e in particolare dagli interferoni (IFNs), nell'induzione dei processi di immunità innata. In particolare, si è voluto indagare in diverse linee macrofagiche il meccanismo attraverso il quale citochine anti-infiammatorie come l'IL-4 inibiscono o attenuano l'espressione dell'enzima nitrossido sintetasi (iNOS) indotta dagli IFN in considerazione dell'elevato potere citotossico di questa attività enzimatica e del suo ruolo nell'induzione di uno stato infiammatorio.

Gli studi si sono estesi inoltre sull'induzione differenziale di citochine regolatorie e infiammatorie da parte di macrofagi e cellule dendritiche infettate con il *Mycobacterium tuberculosis*. Infatti è stato evidenziato che mentre i macrofagi rilasciano citochine infiammatorie, le cellule dendritiche producono soprattutto citochine immunomodulatrici, quali IFN di tipo I e IL-12. Questa produzione correla con un differente potenziale stimolatorio e polarizzante verso linfociti CD4.

Meccanismi molecolari nella regolazione dello sviluppo dei parassiti malarici

Responsabile scientifico
Clara Frontali (Laboratorio di Biologia Cellulare)

Sintesi dell'attività svolta

Continuando la linea di ricerca sul differenziamento sessuale in *Plasmodium falciparum*, è stata ulteriormente caratterizzata la regione regolativa di un gene (Pfg 27/25) espresso precocemente nei gametociti. Un altro gene (Pfg 377) specificamente espresso nei gametociti femminili è stato utilizzato per mettere a punto un saggio in grado di rivelare la presenza di cloni multipli in individui affetti e di valutare la potenziale trasmissibilità dei singoli cloni. Avvalendosi di antisieri contro il prodotto di gene Pfg 377 e contro la tubulina specifica dei gametociti maschili, si è potuto dimostrare che la determinazione del sesso avviene durante la maturazione dello schizonte, quando nel parassita aploide viene imboccata la via del

differenziamento sessuale. Un importante strumento per l'analisi delle regioni subtelomeriche (contenenti famiglie di geni spesso coinvolte nel meccanismo di variazione antigenica) è stato messo a punto con la costruzione di un vettore lineare capace di indurre e selezionare genotipi con delezioni terminali predeterminate, stabilizzando contemporaneamente il cromosoma che ha subito la delezione. È proseguito infine il lavoro di analisi al calcolatore di sequenze codificanti e non codificanti di *P. falciparum* e di *P. berghei*, con interessanti implicazioni evolutive.

Meccanismo d'azione ed effetti *in vitro* e *in vivo* di tossine prodotte da batteri enteropatogeni

Responsabile scientifico
Gianfranco Donelli (Laboratorio di Ultrastrutture)

Sintesi dell'attività svolta

Recentemente sono stati svolti studi diagnostico-epidemiologici sulla presenza di *Vibrio* spp. e *Aeromonas* spp. nel Mar Adriatico, che hanno permesso tra l'altro di verificare il grado di polimorfismo intra-specie e le fluttuazioni di espressione dei fattori di virulenza in rapporto alle condizioni ambientali. Sono state quindi avviate ricerche comparative, sia per frequenza di isolamento che per espressione di fattori di virulenza, tra ceppi delle specie batteriche suindicate isolati da:

- acque costiere;
- acque provenienti da impianti di depurazione per molluschicoltura;
- molluschi e cefalopodi sia di provenienza nazionale che di importazione. L'attività citotossica e la capacità adesiva dei ceppi è stata valutata mediante saggi di citotossicità *in vitro*.

Inoltre è stato condotto uno studio approfondito sull'attività enterotossica e citotossica della tossina TDH di *Vibrio parahaemolyticus*, importante agente di gastroenterite da ingestione di prodotti ittici, alla cui tossina sono stati attribuiti in altri Paesi, e in Giappone in particolare, effetti anche letali nell'uomo, presumibilmente riferibili alla sua attività cardiotossica.

Le meningiti batteriche

Responsabile scientifico
Paola Mastrantonio (Laboratorio di Batteriologia e Micologia Medica)

Sintesi dell'attività svolta

Meningite meningococcica. L'analisi PCR-RFLP per i geni *por*A e *por*B di *Neisseria meningitidis* è stata utilizzata per la tipizzazione di 64 ceppi isolati da casi di malattie invasive. La tecnica è stata utilizzata con successo anche sui ceppi pervenuti non-vitali e su campioni di liquor prelevati da pazienti con meningite meningococcica confermata solo mediante PCR. Profili RFLP, facilmente paragonabili tra loro, sono stati ottenuti per tutti i ceppi inclusi quelli risultati non-tipizzabili o non sottotipizzabili con i metodi sierologici. I risultati confermano l'utilità della PCR-RFLP per i geni *por*A e *por*B di *N.meningitidis* nel differenziare ceppi appartenenti allo stesso sierotipo e nel fornire profili utili per la caratterizzazione di ceppi non sierotipizzabili circolanti negli ultimi anni in numero sempre maggiore.

Modulazione della risposta immunitaria delle mucose mediante tossine proteiche, involucri virali e carrier lipidici

Responsabile scientifico
Maurizio Tomasi (Laboratorio di Biologia Cellulare)

Sintesi dell'attività svolta

L'attività è stata finalizzata alla messa a punto di protocolli per misurare, in sistemi animali modello, l'efficacia protettiva di preparati vaccinali contro paramixovirus pneumotropici. Il sistema studiato è l'infezione-protezione del virus *Sendai* in topine CB6F1. Dapprima è stata esaminata l'infettività e la

patogenicità del ceppo M di virus *Sendai* che, una volta inoculato, attraverso instillazioni intranasali, produce nei topi una polmonite acuta e mortale. L'avanzamento della malattia si accompagna con la perdita del peso corporeo; la polmonite, infatti, produce uno stato di astenia che può essere ulteriormente evidenziato attraverso l'analisi istopatologica del tessuto polmonare. Nel tentativo di sviluppare un vaccino subunitario, sono stati saggiati, per la loro efficacia protettiva, numerosi preparati. Tuttavia, ad oggi, si è ottenuta una completa protezione soltanto facendo uso di ceppi di virus *Sendai* che, adattati a crescere nelle uova, non inducono alcuna patologia. Inoltre, è proseguito lo studio sulla struttura e funzione delle glicoproteine dell'involucro del virus *Sendai*, in collaborazione con l'Università degli Studi di Ferrara.

Protozoi enterici emergenti

Responsabile scientifico
Edoardo Pozio (Laboratorio di Parassitologia)

Sintesi dell'attività svolta

I principali risultati del progetto hanno riguardato:

- lo sviluppo di marcatori molecolari (microsatelliti) per *Cryptosporidium parvum* che hanno rivelato un'elevata eterogeneità delle popolazioni di questo coccidio sia all'interno del genotipo umano che di quello animale, mostrando inoltre come l'uomo possa essere infettato da tutte queste popolazioni geneticamente differenziabili;
- la generazione di linee cellulari T specifiche da PBMC di donatori, precedentemente sensibilizzati verso *C.parvum*, verso antigeni ricombinati ha messo in evidenza che la maggioranza delle linee cellulari T specifiche sono linfociti con un fenotipo tipico delle cellule T memoria CD4+CD45RO+;
- la descrizione di una nuova specie, *T. murrelli*, agente eziologico della trichinellosi silvestre nel continente nord americano, talvolta importato in Europa;
- un polimorfismo genetico tra le popolazioni di *T. nelsoni* presenti nell'Africa sub-sahariana;
- l'identificazione di *T. pseudospiralis* quale agente eziologico della trichinellosi silvestre nel sud della Francia e il suo ruolo patogeno nell'uomo.

Qualità della vita nei pazienti con epatite cronica da HCV in trattamento con terapia antivirale

Responsabile scientifico
Alfonso Mele (Laboratorio di Epidemiologia e Biostatistica)

Sintesi dell'attività svolta

È stato avviato uno studio clinico multicentrico su due gruppi di pazienti: pazienti in trattamento per la prima volta per epatite cronica da HCV e pazienti già trattati e nei quali sia stato programmato un nuovo ciclo terapeutico per mancata risposta o ripresa di malattia dopo il ciclo precedente.

Gli obiettivi sono i seguenti:

- valutare la qualità di vita in pazienti con epatite cronica da virus C;
- valutare le modificazioni della qualità di vita durante la somministrazione della terapia antivirale e sei mesi dopo la sospensione della terapia stessa.

La resistenza agli antibiotici come problema emergente: diffusione e meccanismi molecolari

Responsabile scientifico
Annalisa Pantosti (Laboratorio di Batteriologia e Micologia Medica)

Sintesi dell'attività svolta

Il prosieguo del progetto è servito a confermare sostanzialmente i risultati degli anni precedenti: nel nostro Paese la resistenza alla penicillina in *Streptococcus pneumoniae* è moderata, anche se in ascesa (11%), mentre la resistenza alla vancomicina in enterococchi isolati da alimenti di origine animale ha mostrato una significativa diminuzione dopo la sospensione dell'uso di avoparcina. Nel corso del 2000 è stato anche affrontato un altro problema scottante: la ridotta sensibilità ai glicopeptidi (RSG) in *Staphylococcus aureus*. Mentre la "vera" resistenza ai glicopeptidi è rarissima nel mondo e assente nel nostro Paese (secondo dati riguardanti più di 1000 ceppi isolati in diversi laboratori italiani), esistono ceppi che presentano MIC (Minima Inibitoria Concentrazione) per la vancomicina elevate, seppur nei limiti della sensibilità. È stato studiato un focolaio ospedaliero di sepsi in terapia intensiva sostenuto da un unico clone di *S. aureus* con RSG e si è riscontrato che questi ceppi rappresentano un serio problema terapeutico.

Streptococchi e malattie da streptococco

Responsabile scientifico

Christina Helena M. von Hunolstein (Laboratorio di Batteriologia e Micologia Medica)

Sintesi dell'attività svolta

Nel corso dell'anno 2000 è continuato lo studio dei fattori di virulenza di GBS (Group B *Streptococcus*). Mediante l'uso di un modello murino è stato messo in evidenza il rilevante ruolo svolto dall'emolisina nella determinazione dell'artrite. È stata inoltre studiata la variabilità genetica del locus codificante per un importante antigene, la proteina C alfa, ed è continuato lo studio delle citochine coinvolte nell'artrite settica.

Per quanto riguarda *S. pyogenes* è stato studiato, anche utilizzando un ceppo di *S. gordonii* esprimente sulla superficie la proteina M6, il ruolo della proteina M nell'invasività di GAS (Group A *Streptococcus*).

Inoltre, è in corso uno studio collaborativo internazionale per paragonare la tipizzazione sierologica tradizionale per la proteina M con il nuovo metodo molecolare di *emm* typing.

È anche iniziato uno studio volto a chiarire possibili relazioni fra l'infezione streptococcica e alcuni disturbi neurologici dell'infanzia e adolescenza come la sindrome di Tourette e i tic.

Studio dei fattori di virulenza di agenti patogeni ad habitat gastrointestinale e delle loro interazioni con le cellule dell'ospite

Responsabile scientifico

Fabiana Superti (Laboratorio di Ultrastrutture)

Sintesi dell'attività svolta

Sono proseguiti gli studi sul meccanismo dell'attività antivirale della lattoferrina utilizzando come modelli un virus a DNA provvisto di involucro, il virus dell'herpes simplex di tipo 1 (HSV-1) e un virus a RNA nudo, il rotavirus. In particolare, al fine di identificare quale porzione della molecola proteica fosse coinvolta nell'azione antivirale, la lattoferrina è stata digerita tramite trattamenti enzimatici, i frammenti proteici ottenuti sono stati purificati e la loro attività è stata saggiata in diversi sistemi *in vitro*. I risultati ottenuti hanno dimostrato una non identità tra le componenti della lattoferrina dotate di attività anti-HSV-1 e anti-rotavirus. Sono in corso ulteriori studi volti ad identificare i peptidi dotati di attività antivirale e a definirne le sequenze aminoacidiche.

Sono state condotte ricerche volte ad analizzare l'influenza dei meccanismi di acido-tolleranza sulle proprietà invasive di isolati clinici di *Listeria monocytogenes*. L'efficienza di entrata e la crescita intracellulare dei ceppi acido-tolleranti sono state valutate *in vitro* utilizzando modelli, quali enterociti e macrofagi, capaci di mimare i sistemi *in vivo*. I risultati di queste ricerche hanno dimostrato come ceppi selvaggi acido-adattati di *Listeria monocytogenes* siano in grado di invadere le cellule intestinali e di proliferare in macrofagi trattati con lipopolisaccaride in modo significativamente più efficiente rispetto a ceppi selvaggi non adattati. L'analisi ultrastrutturale ha dimostrato come la capacità dei ceppi acido-tolleranti di sopravvivere e proliferare all'interno della cellula ospite sia strettamente correlata alla loro capacità di uscire dal fagosoma.

Nell'ambito delle ricerche sulle co-infezioni, è stato studiato l'effetto dell'infezione da rotavirus sulla superinfezione da *Yersinia enterocolitica* e *Yersinia pseudotuberculosis* in cellule di origine intestinale (Caco-2) I risultati ottenuti hanno messo in evidenza un aumento dell'adesione e dell'internalizzazione batterica nelle cellule pre-infettate con rotavirus, dimostrando come l'infezione virale possa essere un importante fattore favorente le interazioni precoci tra *Yersinia* spp. e le cellule intestinali.

Gli studi sulle caratteristiche di virulenza di isolati clinici di *Enterococcus* spp. hanno evidenziato la capacità, particolarmente di *E. faecalis*, di esprimere il fenotipo slime+ in condizioni di stress. L'analisi genotipica ha evidenziato come dei due geni (ORFde4 e ORFde6) dell'operon *epa*, probabilmente coinvolti nella biosintesi di polisaccaridi, solo ORFde4 sembri necessario per la produzione di slime. Sempre per quanto riguarda la caratterizzazione delle proprietà adesive, sono stati verificati i meccanismi coinvolti nel processo di adesione/invasione di *Enterococcus faecalis* a cellule HeLa. È stato evidenziato come sia i microtubuli che i microfilamenti siano coinvolti nel processo di invasione degli enterococchi e come anche variazioni del pH intracellulare possano influenzare tale processo. L'utilizzo di inibitori di diverse vie ha quindi evidenziato come sia l'endocitosi mediata da recettore che la macropinocitosi potrebbero mediare l'entrata di *E. faecalis* in cellule epiteliali.

Studio della interazione del sistema immunitario con vari agenti infettivi e valutazione del ruolo delle cellule e dei fattori di regolazione che intervengono nel corso dell'immunità naturale e acquisita

Responsabile scientifico
Alessandra Siracusano (Laboratorio di Immunologia)

Sintesi dell'attività svolta

Obiettivo primario della ricerca è stato identificare antigeni nativi e ricombinanti di *E. granulosus* legati allo sviluppo di:

- meccanismi di evasione del parassita dalla risposta immunitaria dell'ospite;
- meccanismi di immunità protettiva;
- reazioni allergiche;
- strategie di immunodiagnosi e monitoraggio immunologico dei pazienti.

È stato dimostrato il ruolo svolto dall'antigene B nei meccanismi di evasione dall'immunità naturale e acquisita dell'ospite. È stata messa in evidenza una associazione tra presenza di IgE specifiche per l'antigene ricombinante EgEF-1 β/δ e manifestazioni allergiche cutanee.

Sono proseguiti gli studi volti alla caratterizzazione molecolare e immunologica degli antigeni ricombinanti HSP70 e ciclofilina. Sono continuati gli studi volti alla produzione di linee T CD4+ specifiche per il liquido cistico e per l'AgB di *E. granulosus* da pazienti con diversa evoluzione clinica della malattia. Tali linee sono state caratterizzate fenotipicamente e dal punto di vista funzionale mediante valutazione citofluorimetrica dell'espressione intracellulare.

Valutazione e prevenzione dei rischi di reintroduzione della malaria in Italia

Responsabile scientifico
Roberto Romi (Laboratorio di Parassitologia)

Sintesi dell'attività svolta

In seguito all'aumento dei casi di malaria importata in Italia durante l'ultimo decennio e alla segnalazione di casi di malaria in soggetti che non avevano mai soggiornato in Paesi endemici, il progetto si proponeva di valutare i rischi di reintroduzione della malaria in Italia studiando i fattori epidemiologici associati e fornendo il supporto tecnico-scientifico al Servizio Sanitario Nazionale per gli interventi di prevenzione.

Sono stati dunque valutati l'incidenza della malaria nei viaggiatori italiani per le diverse zone d'endemia e la possibilità che si possano verificare casi di malaria autoctona, in relazione alla presenza sul territorio di portatori di gametociti e alla distribuzione dei vettori nelle zone a rischio del nostro Paese.

È stata anche valutata la potenzialità di *Anopheles labranchiae* come vettore di malaria nel bacino del Mediterraneo.

È stata infine messa punto una tecnica di diagnostica molecolare (analisi degli eteroduplex, HDA) per l'identificazione delle specie potenzialmente vettrici di malaria nell'ambito del complesso di specie *Anopheles maculipennis.*

AREA 6 - MALATTIE METABOLICHE, CRONICO-DEGENERATIVE E CARDIOVASCOLARI

Malattia celiaca: meccanismi di tossicità dei peptidi prolamminici. Sorveglianza nazionale delle complicanze gravi

Responsabile scientifico
Massimo De Vincenzi (Laboratorio di Metabolismo e Biochimica Patologica)

Sintesi dell'attività svolta

È stato evidenziato che un peptide di 10 aa (p.m. 1156), estratto dal frumento duro, è capace d'inibire l'apoptosi in cellule intestinali Caco-2, indotta da peptidi di cereali notoriamente tossici per i celiaci.

Inoltre, per quanto riguarda il Registro delle complicanze, il campione arruolato è costituito dal 72,8% di pazienti di sesso femminile e dal 27,2% di sesso maschile. Qualche differenza emerge per l'età alla diagnosi, che è in media di 30,1 anni. Per tutti i casi, la diagnosi è stata suffragata da un esame istologico su biopsia della mucosa intestinale. Circa l'80% dei casi sono stati diagnosticati presso il centro segnalatore. Nella maggior parte dei casi (80,5%) la motivazione principale alla diagnosi è stata la presenza di sintomi o segni clinici suggestivi con qualche differenza per sesso.

La diagnosi effettuata per la presenza di patologia associata è risultata più frequente negli uomini. Nessuna differenza significativa tra i due sessi è emersa riguardo alla frequenza di diagnosi per familiarità di I° grado per celiachia (M 7%, F 4,8%).

Radicali liberi e malattie degenerative: fisiopatologia dell'ossido di azoto e di specie reattive dell'azoto

Responsabile scientifico
Maurizio Minetti (Laboratorio di Biologia Cellulare)

Sintesi dell'attività svolta

L'attività è stata focalizzata allo studio dei meccanismi biochimici e di *signalling* del perossinitrito (ONOO-), un ossidante fisiologico derivato dalla reazione tra radicale NO e superossido e coinvolto nel danno tissutale di numerose patologie degenerative.

La conoscenza delle sue reazioni con i componenti cellulari è alla base di molte strategie terapeutiche miranti a rallentare o a prevenire tali patologie.

Nel 2000 è stato dimostrato che il segnale di fosforilazione in tirosina indotto dal perossinitrito su alcune *src* chinasi coinvolge almeno due differenti meccanismi: l'ossidazione reversibile di cisteine regolatorie nel caso di *hck* e, nel caso di *lyn*, la modifica probabilmente irreversibile di uno o più aminoacidi importanti nella attivazione dell'enzima (probabili candidati tirosine e triptofani). Inoltre, *hck* precedentemente attivata è in grado di attivare *lyn*, rendendo le cisteine uno dei più importanti siti regolatori di queste chinasi.

È stato inoltre dimostrato che il perossinitrito interagisce con l'emoglobina come perossido formando ferrylEmoglobina, radicali tirosina e nitrotirosine. Mediante spettroscopia di massa (LC/ES/MS) sono stati caratterizzati i residui di tirosina coinvolti nella formazione di nitrotirosine. Dal punto di vista biologico, la reazione con l'emoglobina è probabilmente una delle più importanti reazioni di detossificazione del perossinitrito nel sangue, essendo in grado di inibire la nitrazione delle tirosine di target sia eritrocitari sia extracellulari.