

- Studio degli effetti di sovraespressione del miR-34a mediante vettori adenoassociati nel cervello di ratti in via di sviluppo.
- Studio del ruolo dell'alterazione della funzionalità nucleolare nella patogenesi di AD.
- Ruolo svolto dalle infezioni del virus Herpes Simplex di tipo 1 (HSV-1) nella compromissione dei meccanismi di riparazione del DNA nei neuroni: identificazione di rotture a singolo (*Single Sideband modulation*, SSB) e doppio filamento (*Double Sideband*, DSB) del DNA e dell'alterazione del principale meccanismo di riparazione dei DSBs (*non-homologous end joining*, NHEJ).
- Implementazione dell'infrastruttura IATRIS Neuroscienze. In particolare, l'attività del 2012 ha portato alla creazione di un sito (<http://www.iss.it/iane>), che è ora attivo in rete.
- Studio degli effetti del CNF1 in colture primarie dell'SNC di ratto e di un modello murino di sindrome di Rett.
- Le alterazioni neurogliali in corso di degenerazione retinica: studi su modelli sperimentali *in vivo* e *in vitro*.
- Ruolo dell'ipossia e dei microRNA nella regolazione del complesso associato alla distrofina (DPC): implicazioni nel differenziamento neuronale e nel deficit cognitivo associato alla Distrofia muscolare di Duchenne (*Duchenne Muscular Dystrophy*, DMD).
- Caratterizzazione dell'interazione tra beta-dystrobrevina, una componente del DPC, con il motore del trasporto intracellulare, la chinesina; studio sull'espressione nella retina di una proteina partner della distrobrevina, e fattore di suscettibilità alla schizofrenia, la disbindina.
- Organizzazione strutturale e funzionale della sinapsi in condizioni fisiologiche e in patologie neurodegenerative quali la SLA e AD.
- Identificazione tramite l'
- analisi di spettrometria di massa (MS/MS) delle modifiche post-traduzionali (fosforilazione e nitratura) indotte dal perossinitrito su specifiche tirosine della sinaptofisina e della dinamina I e loro ruolo funzionale nella regolazione del processo di eso- endocitosi delle vescicole sinaptiche.
- Caratterizzazione dei segnali cellulari derivanti da un danno eccitotossico mediato da stress ossidativo nei motoneuroni e nella corteccia cerebrale di un modello murino di SLA (G93A).
- Ruolo della fosfotirosina fosfatasi STEP nella risposta intracellulare mediata dalla cocaina e dipendente dal recettore purinico A2A nello striato.
- Individuazione di marcatori biochimici diagnostici e prognostici nel sangue periferico di pazienti con deficit neurologico (demenza di Alzheimer e *Mild Cognitive Impairment*).

Reparto Neurologia sperimentale

L'attività dell'anno 2012 ha riguardato:

– *Missione*

- Sviluppare e promuovere la ricerca sui meccanismi molecolari alla base delle patologie acute e croniche dell'SNC, con particolare interesse per il ruolo delle cellule gliali e dell'infiammazione nei processi di neurodegenerazione, neuroprotezione e neurogenesi, per lo sviluppo, a livello pre-clinico, di strategie neuroprotettive e rigenerative.

- *Attività di ricerca*
 - Ruolo dei recettori nucleari PPAR-gamma nella sopravvivenza e differenziamento degli oligodendrociti e nel processo di mielinizzazione.
 - Effetti neuroprotettivi e meccanismi di azione di lipidi ossidati di origine vegetale (fitoprostani).
 - Caratterizzazione delle funzioni microgliali in paradigmi sperimentali di patologie acute o croniche e analisi dei meccanismi di “memoria” molecolare a stimoli infiammatori successivi.
 - Analisi del fenotipo funzionale della microgliale in un modello di glioblastoma ed effetti anti-tumorali del trattamento con antagonisti del recettore per la chemochina CXCL12.
 - Effetti di livelli elevati di amminoacidi a catena ramificata ACR sulla risposta microgliale.
 - Ruolo dei recettori adenosinici e del Ca²⁺ lisosomiale nel recupero funzionale in modelli cellulari della sindrome metabolica *Niemann Pick C*.
 - Caratterizzazione degli effetti protettivi dell’enzima di riparazione MTH1 in modelli cellulari di Huntington.
 - Analisi dei livelli plasmatici di Isoprostani, come biomarcatori di stress ossidativo in una coorte di neonati gemelli: effetti del peso alla nascita e di genere.
 - Analisi dei livelli di isoprostano e della capacità anti-ossidante totale (CAT) nel plasma di coppie di gemelli adulti e anziani e loro correlazione con la cui capacità cognitive, valutata attraverso test neuropsicologici.
 - Analisi del ruolo della proteina MLC-1 nel controllo dell’ingresso di Ca²⁺ indotto da stress ipo-osmotico in un modello cellulare di leucoencefalopatia megalencefalica con cisti subcorticali.

Reparto Neuroscienze comportamentali

L’attività dell’anno 2012 ha riguardato:

- *Missione*
 - Studio delle basi fisiopatologiche dei disturbi neuropsichiatrici dall’età infantile alla senescenza.
 - Messa a punto di modelli innovativi per la fenotipizzazione di ceppi di roditori attraverso tecniche e tecnologie analitiche, biostatistiche, e mediante apparecchiature *custom-made* con sistema di automazione acquisizione dati (*high-throughput screening*).
 - Sperimentazione di prodotti e terapie comportamentali innovative per il contrasto preventivo o la riabilitazione di patologie mentali con specifici quadri nosologici.
 - Attività di formulazione di pareri formali e informali a livello intramurale, ministeriale, nazionale, sovranazionale (WHO, OCSE, ecc.).
 - Formazione nel settore fisiopatologico del comportamento e nelle neuroscienze comportamentali, inclusa supervisione per tirocini socio-sanitari.
- *Attività di ricerca*
 - Analisi di processi fisiopatologici mediante l’utilizzo di modelli animali (roditori *inbred*, *outbred*, transgenici).
 - Studi dei fattori genetici/epigenetici alla base di sindromi del neurosviluppo incluse ADHD, Tourette, sindrome di Rett e sindromi dello spettro autistico e schizofrenia: modellizzazione dei sintomi e sviluppo di terapie.

- Nosografia degli stati vegetativi.
- Fattori di rischio per la sofferenza psichica e condizioni di stress in fasi critiche dello sviluppo e nell'adulto. Individuazione di indici neurobiologici (*Nerve Growth Factor*, NGF; *Brain-Derived Neurotrophic Factor*, BDNF) e fattori epigenetici predittivi di vulnerabilità alla psicopatologia.
- Effetti di esposizione ad ambienti estremi (iper-, micro-gravità; isolamento socio-sensoriale protratto; regioni polari) sul sistema nervoso e sul comportamento.
- Studi preclinici e clinici mirati alla valutazione della relazione tra stress e progressione tumorale.
- Studi di fattori di rischio o di protezione in età adolescenziale per comportamenti impulsivi, *gambling* e vulnerabilità all'offerta di sostanze d'abuso.
- Valutazione ontogenetica delle conseguenze a breve e a lungo termine della somministrazione di farmaci psicoattivi, droghe d'abuso e alcol.
- Ricerche sui fattori precoci di vulnerabilità alle malattie dell'invecchiamento, con particolare riferimento al ruolo dell'obesità materna nella vita prenatale.
- Studi multicentrici per l'applicazione della riabilitazione equestre nella schizofrenia in fase di esordio e nelle sindromi dello spettro autistico.
- Impiego del primate non umano *Callithrix jacchus*, mediante un approccio etologico, come modello animale per lo studio di patologie legate all'ansia, deficit dell'attenzione e *gambling*.
- Impiego di modelli animali acquatici, tra cui popolazioni transgeniche di zebrafish, per studi di neurotossicità legata alla salubrità delle carni, in appositi locali autorizzati alla stabulazione di queste specie in alternanza alla presenza di colonie di roditori.
- *Attività istituzionale e di controllo*
 - Espressione di pareri in merito alle richieste di autorizzazione in deroga, secondo il DL.vo 11/1992 sull'impiego degli animali nella sperimentazione animale.
 - Espressione di pareri in risposta a interrogazioni parlamentari.
 - Sviluppo di linee-guida in materia di interventi assistiti con gli animali e pari opportunità dei disabili.
 - Tavolo interistituzionale per gli interventi terapeutici e riabilitativi in agricoltura.
 - Partecipazione a commissioni di esperti della CE sulla nuova Direttiva europea 2010/63 in materia di benessere degli animali usati nella ricerca biomedica.
 - Progettazione, sviluppo e aggiornamento del sito istituzionale NeCo (<http://www.iss.it/neco/>), dedicato alla divulgazione informatica e multimediale delle attività scientifiche, formative, e istituzionali.

Reparto Neurotossicologia e neuroendocrinologia

L'attività dell'anno 2012 ha riguardato:

- *Missione*
 - Validazione e studio di modelli sperimentali di disturbi del neurosviluppo umano: ruolo dei fattori ambientali, vulnerabilità genetica e loro interazione nell'eziologia di tali condizioni.
 - Studi epidemiologici e clinici sui disturbi neuro comportamentali in età evolutiva.
 - Sviluppo e applicazione di metodi di analisi statistica complessi per variabili di tipo comportamentale, sia in modelli animali sia nella sperimentazione clinica.

– *Attività di ricerca*

- Neurotossicologia: effetti avversi sullo sviluppo neurocomportamentale e sulla vulnerabilità ad alterazioni neuroendocrine e patologie neurodegenerative di esposizione fetale e perinatale a pesticidi organo fosforici.
- Modelli murini di disturbi del neuro sviluppo umano: studio di ceppi murini transgenici portatori di mutazioni in geni candidati per i disturbi dello spettro autistico e della sindrome di Rett; identificazione di marcatori precoci e loro validazione da utilizzare per la valutazione a livello preclinico dell'efficacia di trattamenti protettivi e riabilitativi.
- Epidemiologia e clinica: studi di carattere epidemiologico e clinico su disturbi neurocomportamentali in età evolutiva (disturbi dello spettro autistico, ADHD, sindrome di Tourette e disturbi ticcosi); predisposizione degli strumenti per un'indagine sui servizi per l'autismo.

Reparto Terapia genica e cellulare

L'attività dell'anno 2012 ha riguardato:

– *Missione*

- Supporto allo sviluppo dei prodotti medicinali per terapia cellulare e genica in Italia.
- Supporto alle commissioni competenti per l'approvazione delle sperimentazioni cliniche concernenti Prodotti Medicinali per Terapie Avanzate.
- Supporto all'avanzamento della Medicina Traslazionale.

– *Attività di ricerca*

- Studio dei meccanismi di regolazione del differenziamento eritroide.
- Studio del ruolo del recettore per i glucocorticoidi e degli estrogeni nel sistema emopoietico.
- Studio del ruolo degli snip del recettore dei glucocorticoidi nell'eziopatogenesi della Policitemia vera e della Blackfan-Diamond Anemia.
- Identificazione di analoghi dei glucocorticoidi con capacità eritropoietica.
- Amplificazione in vitro di cellule eritroidi primarie a scopo di trasfusione.
- Amplificazione e caratterizzazione di cellule mesenchimali amplificate in vitro a scopo terapeutico.
- Effetti di Nef sulla regolazione dei macrofagi umani.

DIPARTIMENTO DI EMATOLOGIA, ONCOLOGIA E MEDICINA MOLECOLARE

Il Dipartimento di Ematologia, Oncologia e Medicina Molecolare (EOMM) svolge attività di ricerca nel campo dei tumori, delle malattie del sangue e delle cellule staminali, come anche in alcune aree della genetica e della medicina cardiovascolare. La ricerca svolta all'interno del Dipartimento è mirata a comprendere i meccanismi che controllano la crescita, la maturazione e la morte cellulare in condizioni normali e nel corso di malattie. Durante queste ricerche una speciale attenzione è rivolta allo sviluppo di nuovi marcatori diagnostici e terapie e farmaci innovativi, aspetti particolarmente importanti nel caso delle malattie oncologiche ed ematologiche a causa della loro diffusione ed elevato impatto socio-sanitario.

Nel Dipartimento medici e biologi lavorano fianco a fianco per comprendere i processi che portano le cellule staminali a formare cellule mature specializzate, come quelle che formano il sangue, i muscoli e il sistema nervoso. Infatti la comprensione di questi processi potrà portare in futuro ad utilizzare le cellule staminali per riparare i tessuti danneggiati o per sostituire organi colpiti da malattie. Nel campo delle cellule staminali una particolare area di ricerca è rappresentata dallo studio delle cellule staminali neoplastiche, che sono state recentemente indicate come responsabili dello sviluppo dei tumori e della resistenza alle terapie antineoplastiche. Altri progetti di ricerca all'interno del Dipartimento sono dedicati allo studio delle nefropatie e di malattie genetiche rare, quali le talassemie, le malattie lisosomiali e la sindrome di Noonan.

Un importante settore di ricerca è costituito dalla genomica e dai microRNA, piccoli geni non codificanti che inibiscono la sintesi di specifiche proteine e che sono alla base di numerosissimi processi fisiologici e patologici.

Nel Dipartimento sono di recente confluiti gruppi di ricerca provenienti dal Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze impegnati in studi di immunoregolazione, con particolare riferimento al ruolo di citochine e chemochine nella risposta immune innata e acquisita, di immunologia dei tumori e immunoterapia sperimentale e clinica.

Il Dipartimento è quindi ora ulteriormente impegnato nello sviluppo di diverse tipologie di modelli murini rilevanti per studi di patogenesi e terapia delle malattie umane, con particolare riferimento ai tumori.

Inoltre, il Dipartimento è anche direttamente coinvolto nel coordinamento di studi clinici di fase I e di fase II in pazienti con melanoma basati su protocolli derivanti dalle ricerche condotte in Istituto in questi ultimi anni, utilizzando vaccini tumorali o farmaci cellulari (prodotti dell'Officina Farmaceutica "Farmaci Biologici Cellulari" – FaBioCell), da soli o in combinazione con chemioterapia.

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 Oncotecnologico e i Programmi Italia-USA sulla Oncoproteomica e sui microRNA.

Il Dipartimento coordina inoltre, su incarico del Presidente, il Gruppo Interdipartimentale di Oncologia (GIO), interagendo con la rete degli IRCCS oncologici di Alleanza contro il Cancro (ACC) e svolgendo attività di supporto al progetto nazionale "ISS per ACC". In aggiunta, il Dipartimento coordina i nodi nazionali per la partecipazione alle Infrastrutture di Ricerca Europee EATRIS e BBMRI.

Infine, il Dipartimento partecipa ad una serie di valutazioni di grande importanza per la sicurezza dei cittadini. Tra queste, ricordiamo le verifiche di qualità sugli emoderivati, la

valutazione delle sperimentazioni cliniche sull'uomo con farmaci di nuova istituzione e il controllo delle nuove terapie nel settore emato-oncologico. In futuro i ricercatori del Dipartimento EOMM continueranno a impegnarsi per approfondire e comprendere questi e altri argomenti, con la speranza di sviluppare nuove piattaforme diagnostiche e terapie efficaci per un numero sempre maggiore di patologie, con particolare riferimento allo sviluppo di terapie innovative del cancro.

Resoconto attività 2012

Le attività del Dipartimento del 2012 hanno registrato uno sviluppo importante delle principali linee di ricerca e di coordinamento di progetti nazionali già in atto e la continuazione del costante impegno di parte del personale in attività di controllo e istituzionali tipiche della missione del dipartimento stesso.

Aspetti rilevanti delle ricerche condotte nel 2012 hanno riguardato i seguenti temi: caratterizzazione di cellule staminali tumorali (CST o *Cancer Stem Cell*, CSC) in diversi modelli e individuazione di inibitori e anticorpi monoclonali diretti contro tali cellule, anche mediante analisi fosfoproteomica delle vie di trasduzione dei segnali; caratterizzazione delle cellule staminali mesenchimali (CSM) presenti nell'intestino umano e dell'effetto positivo di CSM da cordone ombelicale nell'amplificazione dei progenitori ematopoietici *in vitro* e *in vivo*; studi riguardanti l'isolamento e l'amplificazione di cellule endoteliali da sangue di cordone ombelicale umano; studi di proteomica sui meccanismi di regolazione della crescita e diffusione metastatica del melanoma cutaneo; studi di correlazione malattia renale cronica/malattie cardiovascolari e sugli effetti di diverse tecniche emodialitiche sui livelli di vitamine antiossidanti; studi sui microRNA come potenziali marcatori diagnostici e bersagli terapeutici in tumori solidi (melanoma, glioblastoma e carcinoma del polmone e del colon) e come fattori chiave nel controllo dell'ematopoiesi e dell'eritropoiesi; messa a punto di metodologie per lo studio degli esosomi e del loro ruolo nei fenomeni di comunicazione intercellulare e quali potenziali marcatori diagnostici antitumorali; caratterizzazione del meccanismo d'azione di nuovi farmaci anti-tumorali; studi della relazione fra ematopoiesi e angiogenesi studiata in modelli sperimentali; identificazione di nuovi geni-malattia implicati nelle RASopatie e in altre malattie dello sviluppo e dei sottostanti meccanismi patogenetici; studi di oncogenomica diretti alla comprensione del significato biologico e della rilevanza clinica delle mutazioni somatiche di JAK3 nelle leucemie linfoblastiche acute e alla caratterizzazione dei profili mutazionali delle CST; studi rivolti alla comprensione dei meccanismi cellulari alla base dell'aumentata autofagia nella malattia di Gaucher; studi dei meccanismi molecolari e cellulari che regolano la risposta immunitaria e il ruolo di loro alterazioni nella patogenesi di alcune malattie infettive, neoplastiche, infiammatorie e autoimmuni; studi cellulari e molecolari su cellule dendritiche (*Dendritic Cells* – DC) murine e umane finalizzate allo sviluppo di nuovi farmaci cellulari per l'immunoterapia dei tumori; sviluppo di modelli murini di topi *knock-out*, transgenici e/o immunodeficienti per studi di patogenesi di alcune malattie umane e di terapie innovative contro i tumori; sviluppo di strategie terapeutiche di chemio-immunoterapia in modelli di tumori murini; generazione di anticorpi monoclonali contro antigeni tumorali per lo sviluppo di kit diagnostici nel carcinoma del colon-retto; studi sui meccanismi molecolari alla base del sinergismo tra chemioterapia e immunoterapia in modelli murini e in pazienti con neoplasie ematologiche. A queste attività di ricerca di base e preclinica si sono aggiunte quelle tese all'attivazione di studi clinici, quali la preparazione di farmaci cellulari all'officina farmaceutica FaBioCell (IFN-DC per uno studio di Fase I in pazienti con melanoma; cellule NK per il trattamento di pazienti con neoplasie ematologiche) e il coordinamento di studi clinici (studio di fase II per la valutazione dell'efficacia di un vaccino peptidico contro antigeni di melanoma in

associazione a dacarbazina). Il Dipartimento ha gestito progetti speciali di valenza nazionale e internazionale, quali il Programma Oncotecnologico, quello Italia-USA sulla Oncoproteomica, il progetto "ISS per ACC" e i progetti per lo sviluppo dei nodi nazionali per le Infrastrutture di Ricerca Europee EATRIS e BBMRI. Infine, il dipartimento ha svolto diversi tipi di attività istituzionali, quali: i) verifiche di qualità e sicurezza sugli emoderivati; ii) valutazione delle sperimentazioni cliniche sull'uomo con farmaci di nuova istituzione e il controllo delle nuove terapie nel settore emato-oncologico; iii) controllo di stato di emoderivati prima dell'immissione in commercio, sorveglianza post-marketing e la farmacovigilanza di medicinali emoderivati; consulenza per l'SSN per la diagnosi di anemie ereditarie da difetto enzimatico e di membrana eritrocitaria; iv) aggiornamento del Registro Nazionale delle Coagulopatie Congenite.

Descrizione dei Reparti

Reparto Applicazioni cliniche delle terapie

Il Reparto di Applicazioni cliniche delle terapie biologiche nasce nell'aprile 2008 con l'intento di promuovere la ricerca e l'applicazione in ambito clinico di strategie terapeutiche basate sull'uso di prodotti biologici di nuova generazione. In particolare, il Reparto si occupa prevalentemente di immunoterapia dei tumori senza tralasciare le possibili implicazioni che gli sviluppi delle conoscenze in questo ambito potrebbero avere anche su altre patologie (infettive, degenerative o autoimmuni).

L'intento è di mettere a frutto le conoscenze precliniche e cliniche elaborate dai propri ricercatori e di collaborare con altre istituzioni di ricerca e con istituzioni cliniche per promuovere la realizzazione nell'uomo di nuovi protocolli terapeutici e valutarne gli effetti e l'efficacia. Le tematiche da sviluppare riguarderanno l'uso di citochine, di DC e di linfociti in combinazione o meno con agenti chemioterapici ed, eventualmente, altri farmaci, per potenziare le risposte immunitarie contro i tumori.

Il Reparto ha, inoltre, il compito specifico di mantenere costantemente aggiornate le conoscenze nel settore delle bioterapie sia attraverso un'attività di *horizon scanning* che di ricerca attiva in modelli animali e nell'uomo per disegnare, coordinare e monitorare studi clinici di immunoterapia e più in generale di bioterapia con il fine ultimo di fornire *proof of concept* per l'applicazione clinica di terapie biologiche.

Non ultimo, l'*expertise* dei ricercatori del Reparto sarà messo a disposizione dell'Istituto e dell'accademia per la comprensione e il superamento dei problemi tecnici e regolatori che rendono difficile l'applicazione e la diffusione delle bioterapie.

Il Reparto ha svolto le seguenti attività:

– *Studi preclinici*

- Analisi, mediante *microarray*, della modulazione dell'espressione genica in cellule mononucleate del sangue periferico (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*, PBMC) e analisi di alcune citochine rilasciate nel siero di pazienti trattati con ciclofosfamide. I campioni sono stati processati e l'analisi genomica e proteomica portate a termine. Il lavoro è stato inviato per la pubblicazione su una rivista internazionale.
- Studio comparativo, mediante tecniche di *microarray*, del profilo dei messaggeri indotti da diversi agenti chemioterapici aventi o meno effetto promuovente la risposta immune antitumorale nel topo. Terminata la parte di valutazione degli effetti biologici *in vivo*, è stata ultimata la raccolta dei campioni di tessuto per l'estrazione degli mRNA e è stata effettuata l'ibridazione sui *chip* per *microarray*. La valutazione

bioinformatica dei dati è stata ultimata. Il lavoro è in fase di stesura per l'invio ad una rivista internazionale.

- Studio della maturazione delle DC durante lo sviluppo neonatale nell'uomo. Le analisi sui preparati freschi di DC da cordone ombelicale mostra una risposta alla stimolazione con interferon alfa anche in questo tipo di cellule molto immature. L'analisi genomica degli mRNA è stata conclusa, la valutazione bioinformatica dei dati è stata ultimata. Il lavoro è in fase di stesura per l'invio ad una rivista internazionale.
- Caratterizzazione fenotipica e costruzione di anticorpi monoclonali verso l'antigene tumore associato COA-1 espresso nel carcinoma del colon-retto. È stato preparato un pannello di anticorpi monoclonali contro la proteina COA-1 ricombinante. Uno di questi anticorpi mostra una reattività selettiva e specifica contro tessuti paraffinati di Carcinoma del colon-retto (*Colorectal cancer*, CRC) proponendosi come strumento di indagine diagnostica e prognostica per questo tipo di tumore. La ricerca mediante tecniche ELISA messe a punto *ex novo* della proteina nel siero dei pazienti CRC sta dando dei risultati positivi apparentemente predittivi di progressione di malattia.
- Studio dell'effetto immunomodulante della ciclofosfamide e dei suoi derivati sulle DC di topo e sull'induzione di apoptosi immunogenica nel tessuto tumorale al fine di valutare l'effetto combinato dei chemioterapici sull'innesco e il potenziamento della risposta immunitaria antitumorale. Lo studio continua in collaborazione con l'Institut Gustave Roussy, Villejuif, Francia per stabilire il ruolo dell'interferon di tipo I nell'induzione di apoptosi immunogenica in modelli sperimentali murini.
- Definizione del ruolo di IRF-1 nella mediazione dell'effetto antitumorale determinato dalla combinazione di chemio e immuno-terapia in modelli sperimentali murini. Lo studio è in fase di ultimazione.
- Studio di strategie terapeutiche di chemio-immunoterapia in modelli murini di tumore spontaneo della mammella su topi transgenici Her2-NEU. Lo studio è in fase avanzata di completamento con risultati preliminari molto incoraggianti.
- *Studi clinici*
 - Studio di fase I/II per la valutazione dell'efficacia di un vaccino peptidico contro antigeni di melanoma in associazione a chemioterapia (Dacarbazina). La fase di preparazione dello studio si è conclusa. Il numero dei pazienti arruolati è arrivato a 34 e tutti i pazienti hanno terminato il ciclo completo di trattamento. Si sta procedendo alla valutazione delle risposte immunologiche e cliniche e all'arruolamento dei pazienti mancanti.
 - Sugli stessi pazienti del punto precedente è in corso un tipo di analisi multiparametrica che valuta la modulazione contemporanea di diversi parametri immunologici nell'intento di trovare dei correlati di risposta clinica alla chemio-immunoterapia.
 - Ha avuto inizio, in collaborazione con il Reparto di Immunoterapia sperimentale il *trial* clinico di fase I di vaccinazione mediante inoculo intralesionale di IFN-DC in pazienti con melanoma superficiale. Cinque pazienti sono stati già sottoposti a trattamento. Sono in corso i test immunologici per la valutazione delle risposte antitumorali.

Reparto Biochimica e biologia molecolare clinica

Il Reparto ha svolto le seguenti attività:

- *Progetti di ricerca*

Nell'ambito del progetto di ricerca CNS9 "Valutazione della storage lesion delle emazie portatrici di difetti congeniti del globulo rosso: il deficit enzimatico di glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PD) e il trait sferocitico", svolto in collaborazione con UOC di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale del Policlinico Umberto I di Roma, sono stati analizzati i preparati di emazie per trasfusione di donatori normali e con deficit di G6PD e valutate le modificazioni, indotte dalla conservazione, del profilo reologico e della morfologia dei globuli rossi, le anomalie strutturali della membrana cellulare e le alterazioni delle capacità metaboliche e ossido-riduttive eritrocitarie per studiare la *storage lesion* e la vitalità delle emazie a diversi tempi di conservazione.

Inoltre nell'ambito del progetto di ricerca "Alterazioni emoreologiche e fenomeno del *no-reflow* nell'infarto acuto" svolto in collaborazione con l'Università Cattolica del Sacro Cuore di Roma, è cominciato uno studio sulle alterazioni emoreologiche nel setting dell'infarto acuto, modificazioni che si ipotizza possano essere un fattore importante nello sviluppo del fenomeno del *no-reflow*. Sono stati valutati i parametri emoreologici viscosità plasmatica, viscosità ematica nativa e normalizzata, viscoelasticità e aggregazione di tre gruppi di pazienti STEMI, NON STEMI e angine stabili mettendoli in relazione ai parametri cardiologici, chimico clinici, coagulativi, ecocardiografici, per verificare l'esistenza di una associazione tra alterazioni emoreologiche e incidenza di *no-reflow*.

– *Attività di controllo e valutazione*

L'attività istituzionale del Reparto riguarda il Controllo di Stato dei medicinali emoderivati, albumina, fattori della coagulazione, inibitori plasmatici e plasma inattivato prima dell'immissione in commercio (Decreto 31 marzo 2008) con il rilascio di un certificato valido in tutti i paesi membri dell'UE nell'ambito dell'*European Network of Official Medicines Control Laboratories* (OMCL). Il Reparto di Biochimica e Biologia Molecolare Clinica, in qualità di OMCL italiano per gli emoderivati, partecipa all'attività di certificazione di standard e preparazioni di riferimento internazionali in collaborazione con l'EDQM.

Nel 2012 è stato sottoposto ad un *Reassessment Audit* da parte dell'EDQM per le attività di *batch release* degli emoderivati per la conformità alla norma ISO/IEC 17025 e alla EC *Administrative Procedure for Official Control Authority Batch Release* con esito positivo. Effettua inoltre la sorveglianza post-marketing e farmacovigilanza dei medicinali emoderivati su richiesta dell'AIFA e la valutazione dei dossier di Plasma Master File.

Nel Reparto si effettuano indagini specialistiche per la diagnosi delle seguenti anemie ereditarie: anemie da difetto enzimatico (deficit di glucosio-6-fosfato deidrogenasi, piruvato chinasi ed esochinasi); anemie da difetto di membrana eritrocitaria (sferocitosi ed ellissocitosi ereditarie).

– *Attività svolta nel 2012*

- Controllo di Stato di emoderivati prima dell'immissione in commercio (315 lotti), la sorveglianza post-marketing e la farmacovigilanza di medicinali emoderivati, e la consulenza per l'SSN per la diagnosi di anemie ereditarie da difetto enzimatico e di membrana eritrocitaria.
- Progetto di ricerca "Valutazione della storage lesion delle emazie portatrici di difetti congeniti del globulo rosso: il deficit enzimatico di glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PD) e il trait sferocitico": sono state analizzate unità di emazie con deficit di G6PD per studiare l'invecchiamento di eritrociti durante la conservazione in vitro a scopo trasfusionale.

- Progetto di ricerca “Alterazioni emoreologiche e fenomeno del no-reflow nell’infarto acuto”: sono stati valutati pazienti STEMI, NON STEMI e angine stabili per valutare una possibile associazione tra parametri emoreologici e incidenza di no-reflow.

Reparto Biotecnologie oncologiche ed ematologiche

L’attività del Reparto di Biotecnologie Ematologiche e Oncologiche è incentrata sull’isolamento e caratterizzazione di cellule staminali da tumori solidi (colon, polmone, glioblastoma, prostata, melanoma, sarcoma, mammella e ovaio), con l’obiettivo di individuare, fra le molecole chiave che regolano la sopravvivenza e proliferazione di queste cellule, nuovi potenziali bersagli di terapia. Le molecole identificate costituiscono anche una importante fonte di biomarcatori, indicatori delle caratteristiche molecolari del paziente, che rappresentano non solo degli utili strumenti per la formulazione di una più accurata prognosi, ma anche per la suddivisione dei pazienti in coorti e la definizione di protocolli di terapia personalizzati. Oggetto di questa analisi sono i geni che, se mutati o espressi in maniera aberrante, risultano responsabili dell’insorgenza e sviluppo delle patologie tumorali e della resistenza alle terapie antitumorali. L’identificazione delle molecole oggetto di studio è svolta con tecniche di analisi molecolare quali RT PCR, *western blotting* o ELISA, ma negli ultimi anni lo studio si è esteso all’analisi di espressione dei microRNA, degli esosomi e all’analisi fosfoproteomica delle vie di trasduzione attivate tramite l’innovativa tecnologia della *reverse phase protein microarray* (RPPM). Sulla base delle molecole identificate, le unità di ricerca sono impegnate nella messa a punto di nuovi farmaci (inibitori o anticorpi monoclonali) diretti contro le cellule staminali tumorali, e alla loro validazione *in vitro* e su modelli preclinici *in vivo*. Infine, i laboratori situati nella sede distaccata di via Giano della Bella ospitano la sede di una Biobanca di cellule staminali tumorali, dove vengono raccolti i campioni tumorali, ematici e di tessuto sano di pazienti oggetto di resezione chirurgica nelle numerose unità cliniche affiliate all’Istituto. Le linee di cellule staminali tumorali ottenute dai campioni, dopo essere state espanse, genotipizzate e bancate presso la Biobanca, sono messe a disposizione dei ricercatori per la loro attività scientifica.

Nel corso del 2012, l’attività di ricerca è stata in gran parte incentrata sull’individuazione di alcuni inibitori e anticorpi monoclonali diretti contro le cellule staminali tumorali di colon e polmone, sullo screening di un’ampia libreria di microRNA e sull’analisi fosfoproteomica delle vie di trasduzione attivate in numerose linee. È stata inoltre incrementata la collezione di cellule staminali tumorali custodite presso la Biobanca ISS, che proseguirà nel corso di quest’anno.

Reparto Cellule staminali ed endotelio

L’attività del Reparto nel 2012 è stata incentrata su differenti linee di ricerca:

- *Cellule staminali mesenchimali*

Abbiamo identificato e caratterizzato le cellule staminali mesenchimali presenti nell’intestino umano normale e patologico. Queste cellule presentano caratteristiche simili alle cellule staminali mesenchimali canoniche del midollo osseo, studiate in precedenza. Comunque le caratteristiche delle cellule staminali mesenchimali di differente origine sono state comparativamente analizzate per espressione dei geni della famiglia HOX e TALE in una specifica pubblicazione.

- *Isolamento e amplificazione di cellule endoteliali da sangue di cordone ombelicale umano*

I nostri studi sono stati rivolti alla purificazione e all’amplificazione di cellule endoteliali a partire da cellule CD34+ isolate da sangue di cordone ombelicale. Precedentemente

abbiamo ottenuto queste cellule da colture di CD34+ in presenza di mezzo condizionato di linee di epatociti di topo. Abbiamo cercato di ottenere gli stessi risultati coltivando le cellule in presenza di micro vescicole: esosomi, isolati da cellule endoteliali primarie. I risultati sono stati positivi e ora procediamo con la caratterizzazione dei fattori di crescita e dei microRna, presenti all'interno di essi.

– *Unità Proteomica*

L'attività di ricerca è stata focalizzata sui meccanismi di regolazione della crescita e diffusione metastatica del melanoma cutaneo, con particolare attenzione ai meccanismi di coinvolgimento dell'enzima transglutaminasi, e sull'identificazione di nuovi markers tumorali nel siero di pazienti oncologici. Inoltre è stata svolta attività di supporto con analisi proteomiche (MALDI-TOF e LC-MS/MS) e di profilo di espressione di citochine (*Bio-Plex assay*), collaborando con altre Unità dello stesso Reparto o con altri reparti del Dipartimento EOMM o di altri Dipartimenti (BCN, Farmaco, MIPI, SPVSA).

Reparto Emoglobinopatie ed ematopoiesi

Sulla base degli incoraggianti risultati ottenuti *in vitro* e *in vivo* si stanno valutando possibili *trials* clinici di fase I e II con talidomide e/o stem cell factor (SCF) in pazienti β -talassemici. In particolare, nell'ambito del progetto di ricerca finalizzata Malattie Rare "New therapeutic approaches in the human beta-thalassemia treatment: *in vitro* and *in vivo* studies", proponiamo uno studio integrato *in vitro* e *in vivo* per identificare nuove terapie di trattamento della β -talassemia umana con particolare riferimento a tre aspetti di grande rilevanza clinica: i) l'induzione di alti livelli di sintesi di HbF; ii) la riduzione del sovraccarico di ferro; iii) il controllo dell'aspetto emoreologico e coagulativo. Uno dei principali obiettivi è, inoltre, quello di dimostrare i meccanismi molecolari alla base della riattivazione dell'HbF con talidomide e/o SCF. In questo contesto, stiamo attualmente espandendo una colonia di topi *knock-in* per le catene globiniche umane alfa e gamma normali nonché per catene beta umane eterozigoti normale/falciforme. Questi animali rappresentano un modello di riattivazione dell'emoglobina fetale, e verranno quindi utilizzati come modelli preclinici dei trattamenti farmacologici descritti. L'effetto dello SCF sarà valutato anche su alcuni geni coinvolti nel sovraccarico del ferro, tipico di questa malattia. Ad esempio, la comprensione del ruolo del sistema epcidina-ferroportina nel sovraccarico di ferro dovuto ad eritropoiesi inefficace e la sua eventuale modulazione da parte dello SCF e/o agenti simili si presenta come un promettente approccio terapeutico del sovraccarico di ferro presente nella talassemia e in altre malattie. In parallelo, lo studio della regolazione della ferroportina da parte del miR-221/222 durante l'eritropoiesi normale e talassemica offre l'opportunità di identificare potenziali targets per nuove terapie. È iniziato, inoltre, anche uno studio sulla ricerca di eventuali associazioni tra la presenza di determinati SNPs nel promotore del gene della Ferroportina e un quadro clinico di iperferritinemia.

Nell'ambito dello studio dei meccanismi alla base della resistenza all'attività antiplastrinica dell'aspirina in pazienti con disordini cardiovascolari, svolto in collaborazione con l'Università degli Studi di Roma "Sapienza", nell'anno precedente avevamo dimostrato che la proteina MRP4, che ha il ruolo di trasportatore di anioni organici e è contenuta nelle piastrine umane, limita e rende meno efficace l'azione dell'aspirina; i dati ottenuti suggeriscono che MRP4 ha la capacità di disintossicare le piastrine dall'aspirina prima che questa sia in grado di ridurre la funzionalità piastrinica e quindi di esercitare la funzione antiaggregante per la quale viene somministrata. La ricerca è quindi proseguita con lo studio dei meccanismi molecolari che sono alla base dell'over-espressione di MRP4 nei megacariociti e nelle piastrine di soggetti in terapia antiplastrinica. Nello studio, ancora in corso, noi abbiamo indagato se il trattamento a lungo

termine con aspirina influenzasse l'espressione genica dei megacariociti portando alla up-regolazione della proteina MRP4 nelle piastrine umane. I nostri risultati indicano che la proteina MRP4 può essere over-espressa dal trattamento con aspirina e, per la prima volta, abbiamo evidenze che il trattamento *in vivo* influenza il pattern piastrinico proteico attraverso la regolazione genica nei megacariociti. Tali studi sono ancora in corso per maggiori approfondimenti.

Notevole importanza riveste poi lo studio funzionale di alcuni microRNA nella regolazione di specifici geni target nell'ematopoiesi normale e patologica. L'attività di ricerca è stata soprattutto focalizzata sul ruolo e l'espressione del miR-486 nel differenziamento eritropoietico umano normale e patologico con particolare riferimento ai geni coinvolti nella regolazione delle catene γ -globiniche. Parallelamente è stata intrapresa una collaborazione con l'Istituto Regina Elena riguardante lo studio del microRNAs Let-7c nella leucemia mieloide acuta (*Acute Myeloid Leukemia*, AML). Let-7c è under-espresso nella leucemia promielocitica acuta (*Acute Promyelocytic Leukemia*, APL) mentre in pazienti trattati con successo con acido retinoico (*Retinoic acid*, RA) viene up-regolato. L'espressione forzata di Let-7c in linee leucemiche e in blasti di pazienti con AML induce il differenziamento granulocitario. Abbiamo inoltre identificato Pbx-2 come target funzionale di Let-7c.

Nell'ambito dei progetti riguardanti la caratterizzazione di CSC di colon, gli studi che intendiamo condurre o proseguire riguardano: i) l'analisi fosfoproteomica comparativa di CSC di colon resistenti a inibitori di EGFR; ii) modelli di terapia personalizzata del tumore di colon mediante analisi *in vitro* e xenograft di CSC.

Per quanto riguarda l'attività istituzionale il Reparto si è dedicato all'espletamento di pratiche di comma C e di mutuo riconoscimento concernenti controlli e pareri di competenza sull'immissione in commercio di specialità medicinali e fattori di crescita ricombinanti nonché autorizzazioni alla sperimentazione animale ai sensi degli art. 8-9 del DL.vo116.

Nel 2012 sono stati studiati i seguenti argomenti: meccanismi molecolari alla base della riattivazione dell'HbF nella β -talassemia; espressione dei geni FPN1, GDF15 e TWSG1 in soggetti β -talassemici trattati o meno con SCF; ruolo del microRNAs Let-7c nella AML; over-espressione di MRP4 nella resistenza all'attività antiplastrinica dell'aspirina; analisi fosfoproteomica comparativa di metastasi di CSC di colon in altri tessuti.

Reparto Fisiopatologia delle malattie genetiche

L'attività di ricerca si inquadra nell'ambito dell'oncogenomica e della genetica umana e medica. Diverse linee di ricerca sono dirette alla comprensione delle basi molecolari delle RASopatie e di altre malattie dello sviluppo attraverso l'uso di nuove tecnologie di sequenziamento ad alta processività che consentono di acquisire e interpretare le informazioni contenute nel genoma e nel trascrittoma. Il ruolo patogenetico delle lesioni molecolari sottostanti queste malattie viene caratterizzato utilizzando modelli animali (*C. elegans*) e sistemi sperimentali *in vitro*. Nell'ambito dell'oncogenomica, l'attività è rivolta all'identificazione di nuovi eventi molecolari implicati nell'oncogenesi e allo studio della rilevanza biologica e clinica della disregolazione funzionale delle proteine JAK nelle leucemie acute linfoblastiche. Infine, l'attività di ricerca è rivolta alla comprensione dei meccanismi molecolari e cellulari alla base della sindrome di Gaucher.

Per quanto riguarda l'attività svolta nel 2012 una prima linea di ricerca è stata finalizzata all'identificazione di nuovi geni-malattia implicati nelle RASopatie e in altre malattie dello sviluppo e alla comprensione dei sottostanti meccanismi patogenetici. Tra i diversi risultati ottenuti, l'attività sperimentale ha portato all'identificazione di UBE3B quale gene responsabile, quando mutato, della sindrome di Kaufman. Studi di oncogenomica sono stati inoltre diretti alla

comprensione del significato biologico e della rilevanza clinica delle mutazioni somatiche di JAK3 nelle leucemie linfoblastiche acute e alla caratterizzazione dei profili mutazionali delle cellule staminali tumorali (polmone e colon-retto). Infine, l'attività di ricerca è stata rivolta alla comprensione dei meccanismi cellulari alla base dell'aumentata autofagia nella malattia di Gaucher causata da deficit di saposina C.

Reparto Fisiopatologia delle malattie renali e patologie correlate

Come negli anni precedenti l'attività del Reparto si è svolta nell'ambito oltre che della fisiopatologia delle malattie renali anche in quello dell'oncologia sperimentale.

Nel corso dell'anno 2012 si è conclusa l'attività sperimentale prevista dalla collaborazione con il CNESPS per la valutazione della incidenza di Malattia Renale Cronica (MRC) e della correlazione tra funzionalità renale e patologia cardiovascolare in una popolazione generale del centro Italia. Lo studio ha utilizzato la banca biologica e il database del progetto MATISS (1986-2010). I risultati ottenuti hanno consentito di confermare la bassa incidenza di MRC nel nostro paese e di dimostrare per la prima volta che in una popolazione generale anziana (60-74 anni) a bassa incidenza di MRC e a basso rischio cardiovascolare, una modesta riduzione della funzionalità renale, pari ad un tasso presunto di filtrazione glomerulare (*estimated Glomerular Filtration Rate*, eGFR) compreso tra 60 e 90 mL/min/1,73 m², si accompagna ad un aumento significativo di rischio di morte e di eventi cardiovascolari indipendente dai fattori di rischio tradizionali. Da notare, nella stessa popolazione un importante, indipendente aumento del rischio era associato anche con un aumento dell'eGFR oltre i valori di normalità (≥ 109 mL/min/1,73 m²), un fenomeno che riteniamo almeno in parte ascrivibile all'abitudine al fumo, più frequente in questa classe di soggetti. I risultati ottenuti rappresentano una solida base per prossimi studi su scala nazionale, in parte già avviati, mirati a valutare l'effettivo potere predittivo dell'eGFR nella popolazione anziana e l'eventuale inserimento di questo parametro nell'equazione di rischio del progetto CUORE, uno strumento oggi largamente utilizzato per la prevenzione primaria del rischio cardiovascolare nel nostro paese.

Contestualmente sono proseguite le attività sperimentali relative allo studio clinico longitudinale, multicentrico, mirato a valutare gli effetti a breve e lungo termine di trattamenti emodialitici innovativi su infiammazione e stress ossidativo e, in particolare, sui livelli ematici delle vitamine A, C ed E di pazienti con MRC in stadio terminale. La fine delle attività sperimentali è prevista entro l'anno 2013. Parallelamente è stato condotto anche uno studio analitico in vitro relativo alla stabilità della vitamina C in campioni di sangue e plasma, che ha consentito di caratterizzare le cinetiche e le specie molecolari maggiormente implicate nella degradazione *ex-vivo* di questa vitamina nonché di individuare procedure e metodi che ne consentano il dosaggio affidabile nel contesto clinico e laboratoristico.

In ambito oncologico, a seguito di uno screening di una *library* di inibitori di microRNA, sono state identificate alcune molecole in grado di inibire la proliferazione cellulare e di indurre apoptosi in cellule derivate da carcinomi polmonari e di mammella (staminali tumorali e linee immortalizzate commerciali). Si sta valutando il potenziale terapeutico di queste molecole *in vivo*, utilizzando modelli murini di xenotrapianto con il fine ultimo di proporre per la sperimentazione clinica gli inibitori più efficaci. Lo screening della *library* sarà esteso a cellule staminali tumorali derivate da tumori di colon e prostata.

Nell'ambito dello studio delle cellule staminali di glioblastoma (*Brain Tumor Stem Cell*, BTSC) e del cancro al colon sono state effettuate diverse attività al fine di individuare le vie di segnale alla base della proprietà tumorigeniche delle cellule staminali tumorali. Mediante saggi Affymetrix e Real-Time, è stata dimostrata una diversa modulazione di alcuni micro-RNAs nelle BTSC rispetto alle staminali neurali normali. Per ora l'attenzione è rivolta al miR-135b

che in molte BTSC risulta fortemente down-regolato. Il ripristino della sua espressione, attraverso vettori lentivirali, riduce la capacità proliferativa, clonogenica e migratoria delle BTSC *in vitro*. Sarà comunque necessario confermare l'effetto del miR-135b *in vivo* e aumentare il numero di linee ingegnerizzate per validare il dato. Sempre sulle linee di BTSC sono stati valutati gli effetti di una *library* di inibitori di protein-chinasi evidenziando l'attività dell'UCN-01, un inibitore non selettivo di PKC, e di inibitori di Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) anche in associazione con la tradizionale chemioterapia del glioblastoma basata sulla temozolomide. In collaborazione con la neurochirurgia dell'Ospedale Gemelli, ci si è inoltre occupati dell'isolamento di una linea di cordoma, un particolare sarcoma che si origina da residui della notocorda e per il quale non è disponibile una terapia efficace. Nel caso oggetto dello studio si è giunti alla individuazione di una terapia indirizzata allo specifico paziente che ha mostrato una remissione sintomatologica significativa.

È inoltre proseguita l'attività di caratterizzazione fenotipica, immunoistologica e funzionale dei nuovi anticorpi monoclonali rivolti verso le cellule staminali di glioblastoma e carcinoma del colon generati negli anni precedenti.

È stata svolta anche un'attività sperimentale in collaborazione con il Reparto di Tossicologia Genetica del Dipartimento AMPP effettuando analisi di marcatori molecolari e biochimici (micronutrienti, metil citosine, ROS) nell'ambito di studi sulla stabilità genomica in popolazioni umane.

Al personale del Reparto è affidato il compito della gestione della *facility* di citofluorimetria del dipartimento nella quale si effettuano analisi e *sorting* mediante citofluorimetria multiparametrica oltre che nell'ambito dei progetti del Reparto anche a supporto degli altri reparti del dipartimento o in collaborazione con altri dipartimenti dell'Istituto o con gruppi di ricerca di altre istituzioni.

Un'altra struttura aperta a collaborazioni all'interno e all'esterno dell'Istituto oltre che allo svolgimento di progetti indipendenti, è costituita dalla *facility* di fosfoproteomica dove sono studiate le vie di trasduzione del segnale coinvolte nello sviluppo, nella progressione e nel processo di metastatizzazione dei tumori. In alcuni progetti in corso ci si avvale del modello delle cellule staminali tumorali e, in particolare, ci si sta occupando di confrontare i livelli di attivazione delle principali vie di segnale coinvolte nella sopravvivenza, proliferazione e crescita del tumore del colon retto in xenotrapianti sottocutanei da cellule staminali tumorali e campioni tumorali congelati. La *facility* si appoggia sulle strutture della Biobanca di Cellule Staminali Tumorali e comprende strumentazioni tecnologicamente avanzate che consentono lo studio mediante proteomica a fase inversa (RPPA) dalla preparazione dei campioni alla lettura e analisi dei risultati.

Per quanto riguarda l'attività istituzionale ci si è occupati della informazione, formazione e addestramento del personale di ruolo (tempi determinati e nuovi assunti) e non di ruolo (tesisti, borsisti, ecc.), e di supporto metodologico e tecnico specialistico al Servizio Prevenzione e protezione, per contribuire alla tutela della salute e della sicurezza dei lavoratori afferenti al Dipartimento.

Altra attività istituzionale svolta dal Reparto è rappresentata dall'impegno, crescente rispetto al passato, nella valutazione dei protocolli di studio clinico e nella estensione di pareri per la Commissione per la valutazione della sperimentazione clinica di fase I e su quesiti rivolti all'Istituto da altre amministrazioni.

Nel corso del 2012 sono state svolte le seguenti attività:

- studio di correlazione malattia renale cronica / malattie cardiovascolari;
- effetti di diverse tecniche emodialitiche sui livelli di vitamine antiossidanti;
- caratterizzazione di nuovi anticorpi monoclonali verso CSC;

- microRNA come potenziali bersagli terapeutici nel cancro del polmone, colon e nel glioblastoma;
- screening librerie di inibitori di chinasi su CSC di glioblastoma.

Reparto Immunoregolazione

L'attività del Reparto ha avuto come obiettivo principale lo studio dei meccanismi molecolari e cellulari che regolano la risposta immunitaria e il ruolo di loro possibili alterazioni nella patogenesi di malattie infettive (HIV-1), neoplastiche (colon cancer), infiammatorie (obesità, infiammazione intestinale) e autoimmuni (sclerosi multipla).

- *Studi sul ruolo delle interazioni precoci di HIV-1 con cellule bersaglio (DC, macrofagi, cellule epatiche stellate), determinanti critici nella patogenesi dell'AIDS.*
 - Deregolazione dell'espressione di microRNA e *signal transduction pathways* in DC e cellule epatiche stellate esposte alla gp120 di HIV-1. In collaborazione con l'Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma), e l'Università di Firenze abbiamo caratterizzato il profilo di espressione di microRNA (miR) modulati dalla gp120. Nelle DC abbiamo esteso la caratterizzazione del *pathway* JAK/STAT attivato dalla gp120, definito il suo ruolo nella produzione di fattori solubili, e analizzato il ruolo di alcuni miR nella regolazione di questi processi.
 - Ruolo del TLR4 nell'interazione precoce di HIV con macrofagi e cellule epatiche stellate. In collaborazione con l'Università di Firenze abbiamo iniziato un nuovo studio sul coinvolgimento del TLR4 nella risposta alla gp120. I risultati ottenuti dimostrano che il riconoscimento di TLR4 da parte della gp120 attiva risposte secretorie e migratorie in queste cellule, così come pathways di trasduzione del segnale (MAPK, inflammasoma NALP3).
 - Effetti immunomodulatori di gp120 di HIV-1 in macrofagi. È stato completato lo studio riguardante il ruolo della fosfolipasi C fosfatidil-inositolo-specifica (PI-PLC) β 1 nella cascata di trasduzione del segnale, attivata dall'interazione della gp120 di HIV-1 con il co-recettore CCR5, coinvolta nella produzione di CCL2.
 - Ruolo della CCL2 endogena nella regolazione dell'infezione da HIV-1 in macrofagi. Nell'ambito degli studi riguardanti i meccanismi molecolari mediante i quali la CCL2 endogena prodotta dal macrofago modula la replicazione di HIV-1, abbiamo caratterizzato il ruolo di questa chemochina nella regolazione dell'espressione di fattori di restrizione cellulari (membri della famiglia APOBEC3, SAMHD1) importanti per la resistenza/permmissività all'infezione da HIV-1 dei monociti/macrofagi. Inoltre, in collaborazione con il Tobira Therapeutics (USA), sono in corso studi riguardanti l'effetto di antagonisti del CCR2, recettore per la CCL2, sull'espressione di APOBEC3A e sulla replicazione di HIV-1. Infine, in collaborazione con il Centro Ricerche Angelini di Santa Palomba, abbiamo condotto studi atti a valutare l'effetto del bindarit, un farmaco che inibisce l'espressione della CCL2, sulla replicazione di HIV-1 nei macrofagi. I risultati ottenuti dimostrano che il bindarit inibisce la replicazione di HIV-1 in queste cellule, ma con meccanismi diversi rispetto a quelli che si osservano in seguito al blocco della CCL2 mediante anticorpi specifici.
- *Le cellule dendritiche nell'immunoterapia dei tumori: approcci molecolari per potenziare la loro attività immunostimolatoria.*
 - Manipolazione genetica e farmacologica del potenziale immunostimolatorio delle DC. È stato completato lo studio sulla caratterizzazione funzionale delle DC silenziate per

STAT3 con il quale dimostriamo il ruolo di STAT3 come *check point* della soppressione delle risposte Th1, attraverso la sua capacità di ridurre il potenziale delle DC di indurre risposte Th1 e di produrre chemochine coinvolte nel loro reclutamento (Gauzzi et al., manoscritto in preparazione). Le conseguenze, apparentemente opposte, dell'inattivazione farmacologica della fosforilazione di STAT3 da parte dell'inibitore STATIC sono state invece descritte in una lettera all'editore. In collaborazione con l'Università di Padova e con la Fondazione Edmund Mach, IASMA Research and Innovation Centre abbiamo messo a punto un nuovo approccio di biologia dei sistemi per lo studio integrato del profilo di espressione genica e dei miR. È in corso la validazione di *networks* di geni e miR regolati da STAT3 in risposta a stimoli pro-infiammatori o tollerogenici. La collaborazione ha permesso anche di effettuare esperimenti di *microarray* per individuare geni e miR attivati precocemente in DC trattate con poly(I:C), un agonista del TLR3, attualmente in corso di analisi.

L'attività di ricerca svolta in questo settore ha consentito la stesura di una review sull'argomento pubblicata sui Rapporti ISTISAN.

- *Ruolo di mediatori solubili e recettori per il riconoscimento di patogeni (PRR) in macrofagi nella regolazione della risposta immunitaria*
 - Lo studio riguardante l'espressione di *C-type lectin receptors* nei macrofagi e la loro regolazione da parte di IFN di tipo I e IL-3 è stato completato e inviato per pubblicazione.
- *Studi sull'attività immunomodulatoria della Vitamina D3 e della lattoferrina bovina in DC.*
 - La vitamina D3 (vitD3) come modulatore della SM: metabolismo, attività immunoregolatoria e relazione con l'IFN di tipo I in cellule dendritiche. Sono stati condotti studi volti a identificare alterazioni nella risposta e/o nel metabolismo della vitD3 in pazienti affetti da SM così come possibili interferenze e/o sinergie tra vitD3 e IFN β , e il loro contributo alla patogenesi della malattia. Nell'ambito di questo studio abbiamo osservato differenze significative dei livelli plasmatici della *vitamin D binding protein (DBP)* nei pazienti durante le fasi di remissione clinica, ma non durante le fasi di ricaduta, rispetto ai donatori di controllo (Rinaldi *et al.*, manoscritto in preparazione), e una potenziale cooperazione tra 1,25(OH)2D3 e IFN β a livello molecolare. Inoltre, la 1,25(OH)2D3, come l'IFN, si è rivelata un potente induttore di CCL2, una chemochina il cui ruolo nella patogenesi della SM è ancora controverso
 - Ruolo della lattoferrina bovina (*bovine lactoferrin*, bLf) nel controllo dell'infiammazione e nell'omeostasi del ferro in monociti e macrofagi umani. Nell'ambito dello studio degli effetti immunomodulatori della bLf abbiamo completato il lavoro riguardante l'induzione di CCL1 da parte della bLf, e caratterizzato i recettori coinvolti. Abbiamo inoltre continuato lo studio sul ruolo della bLf nella polarizzazione M1/M2 del macrofago. I risultati ottenuti suggeriscono che la bLF possa favorire lo *shift* del macrofago verso un fenotipo M2, favorendo l'esporto e la biodisponibilità di ferro. L'attività di ricerca svolta in questo settore ha consentito la stesura di una review sull'argomento.
- *Studi sul ruolo del tessuto adiposo nella regolazione dell'infiammazione e della risposta immune.*
 - Alterazioni funzionali di adipociti e cellule immuni del tessuto adiposo viscerale associate all'obesità. In collaborazione con il Dipartimento SPVSA abbiamo studiato le relazioni tra la composizione del tessuto adiposo e l'attivazione di fattori