

Reparto Neurotossicologia e neuroendocrinologia

L'attività dell'anno 2013 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.

Attività istituzionali e di controllo

- Autorizzazioni in deroga per l'uso di modelli animali per la sperimentazione su richiesta del Ministero della Salute.
- Pareri su mozioni e interrogazioni parlamentari sui temi dell'autismo su richiesta del Ministero della Salute.
- Gestione del sito istituzionale sui disturbi dello spettro autistico.

Formazione

- Corso di formazione per il riconoscimento precoce dei disturbi dello spettro autistico indirizzato ai pediatri.
- Diffusione della conoscenza scientifica in corsi e convegni.

Altre attività

- *Scientific advice* su pratiche EMA per l'AIFA.
- Scientific expertise per l'EFSA.

Reparto Terapia genica e cellulare

L'attività dell'anno 2013 ha riguardato:

Missione

- Miglioramento dell'efficacia delle terapie avanzate in Italia mediante studi sperimentali e supporto ai gruppi accademici e non profit che li sviluppano.

Attività di ricerca

- Identificazione del ruolo dei glucocorticoidi in mielodisplasie.
- Regolazione della proliferazione cellulare in cellule umane primarie identificando varianti geniche associate ad alto rischio di sviluppo di leucemie e mielodisplasie.

- Attività di supporto della medicina traslazionale per i prodotti medicinale per terapie avanzate.
- Studio del ciclo cellulare e senescenza, caratterizzazione immunofenotipica e capacità di differenziamento.

Attività istituzionali e di controllo

- Consulenza sugli aspetti regolatori dello sviluppo di prodotti medicinali per terapie avanzate.
- Attività di consulenza per ricercatori degli IRCSS nei modi di sviluppo dei PMTA sia come parte delle attività della commissione per l'autorizzazione alle sperimentazioni cliniche di fase I sia direttamente agli sperimentatori che ne fanno richiesta.
- Ispezioni per l'autorizzazione di impianti GMP e GLP.
- Partecipazione all'Infrastruttura di Ricerca Europea per la Medicina Traslazionale EATRIS.
- Costituzione di infrastrutture di ricerca e innovazione pan-europee, che sono state identificate dalla European Strategy Forum for Research Infrastructure (ESFRI) su mandato del Consiglio Competitività dell'Unione.
- Partecipazioni a commissioni AIFA per l'autorizzazione al commercio di farmaci.
- Commissione Interministeriale di Valutazione (CIV) delle biotecnologie presso il Ministero della Salute.
- Terapia Genica del CAT (EMA, Londra).
- Gruppo di lavoro sulle cellule staminali presso il Ministero della Salute.
- Comitato Scientifico per la sperimentazione del trattamento con medicinali per terapie avanzate a base di cellule staminali mesenchimali (istituito con il DM del 18/6/2013).
- Gruppo di lavoro sui prodotti cellulari della Farmacopea Europea (EDQM)
- Sperimentazioni cliniche di Fase I, II e III.
- Procedure europee di VHP (Voluntary Harmonisation Procedures) sulle Terapie Cellulari.

Formazione

- Attività istituzionali di consulenza sullo sviluppo in medicina traslazionale dei nuovi prodotti per terapia cellulare e genica.

Convenzioni

- Convenzione con l'AIFA per le attività svolte per la valutazione dei dossier su qualità e sicurezza sulle sperimentazioni di Fase II/III.

Altre attività

Citofluorimetria. Coordinamento delle attività di laboratorio inerenti l'uso del cell sorter in dotazione del Reparto. Assistenza continua a gruppi sia interni sia esterni al Dipartimento di BCN nell'acquisizione, purificazione e analisi di campioni cellulari offrendo inoltre consulenza sulle strategie e sulle impostazioni sperimentali in ambito citofluorimetrico. Numerose collaborazioni sono state attivate con strutture esterne all'ISS sia universitarie sia IRCSS.

DIPARTIMENTO DI EMATOLOGIA, ONCOLOGIA E MEDICINA MOLECOLARE

Il Dipartimento di Ematologia, Oncologia e Medicina Molecolare (EOMM) svolge attività di ricerca principalmente 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 e ematologiche a causa della loro diffusione e elevato impatto socio-economico e 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. Le ricerche in atto includono anche studi di validazione di biomarcatori predittivi di risposta, consistenti nell'analisi della risposta alle *targeted therapies* in relazione al profilo molecolare dei tumori di origine, per individuare una relazione fra la responsività alla terapia e lo stato di attivazione di alcune molecole chiave, individuate come potenziali biomarcatori. 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. Alcuni progetti saranno finalizzati all'identificazione dei geni-malattia coinvolti in un ampio gruppo di malattie rare (displasie scheletriche, sindromi malformative e malattie neurodegenerative) utilizzando approcci genomici (sequenziamento dell'esoma e del trascrittoma).

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- e 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 alla rete stessa. In aggiunta, il Dipartimento coordina i nodi nazionali per la partecipazione alle Infrastrutture di Ricerca Europee EATRIS e BBMRI e partecipa, insieme al Dipartimento di BCN, allo sviluppo del nodo nazionale per l'Infrastruttura di Ricerca Europea ECRIN.

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, alla medicina rigenerativa e a malattie ematologiche e rare di particolare impatto socio-economico e sanitario.

Resoconto attività 2013

Le attività del Dipartimento del 2013 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 2013 hanno riguardato i seguenti temi: caratterizzazione di cellule staminali tumorali (CST) 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 TRAIN co-finanziato da "ISS per ACC" e Commissione Europea per progetti di mobilità di giovani ricercatori nel settore dell'oncologia traslazionale, un progetto per l'accREDITAMENTO di sistemi di qualità degli IRCCS di ACC mediante il modello dell'OECI, 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).

Lo scopo 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

- 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 ed è stata effettuata l'ibridazione sui *chip* per *microarray*. Sulla base dei dati risultanti dall'analisi bioinformatica si è deciso di procedere alla ulteriore valutazione di geni coinvolti nel sistema interferon.
- Studi *in vitro* e *in vivo* su linea MCA205 e C57BL/6 per dimostrare il coinvolgimento del *pathway* dei recettori endosolici dell'IFN di tipo I e di TLR3 nella risposta alla terapia con antraci cline. Lo studio, in collaborazione con l'Institut Gustave Roussy, Villejuif, Francia, chiarisce il ruolo dell'interferon di tipo I nell'induzione di apoptosi immunogenica in modelli sperimentali murini. Il lavoro giunto a conclusione è prossimo alla pubblicazione su un'importante rivista scientifica.
- 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 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. Si sta procedendo alla raccolta e caratterizzazione di ulteriori campioni di siero di pazienti con storia clinica nota per costruire un data base più ampio e significativo.
- 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 ha dimostrato il coinvolgimento di IRF-1 nell'effetto immunoadiuvante della ciclofosfamide in combinazione con immunoterapia adottiva antitumorale. Un ultimo esperimento di conferma è in fase di preparazione.
- 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 e i risultati mostrano come la chemioterapia sia in grado di rompere la tolleranza immunologica indotta dal tumore e rendere quest'ultimo sensibile al trattamento immunoterapico. Il lavoro giunto a conclusione è prossimo alla stesura per l'invio ad una rivista scientifica.
- Studio del microambiente tumorale con particolare riferimento al ruolo dei macrofagi associati al tumore (TAM) nella risposta anti-tumorale in modelli murini.

— 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. L'arruolamento dei pazienti è stato temporaneamente interrotto per consentire una valutazione interinale dei risultati immunologici e clinici. Questi ultimi mostrano un significativo incremento del periodo privo di malattia e del tempo totale di sopravvivenza. Sono state pianificate ulteriori analisi immunologiche per chiarire meglio i meccanismi coinvolti nell'azione terapeutica.
- È in corso, in collaborazione con il Reparto di Immunoterapia sperimentale, lo studio 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. I test

immunologici per la valutazione delle risposte antitumorali sono stati messi a punto e sono in corso le analisi sui singoli pazienti.

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, è continuato lo studio delle unità di emazie per trasfusione di donatori normali e con *trait* sferocitico per caratterizzare la *storage lesion* e la vitalità delle emazie a diversi tempi di conservazione. Sono state valutate le modificazioni delle proprietà reologiche e della morfologia dei globuli rossi, le anomalie strutturali della membrana cellulare e le alterazioni delle capacità metaboliche e ossido-riduttive eritrocitarie confrontando emazie normali e con difetto congenito.
 - 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 proseguito lo studio dei pazienti STEMI, NON STEMI e angine stabili per valutare le alterazioni emoreologiche nel setting dell'infarto acuto. Sono stati valutati i parametri emoreologici viscosità plasmatica, viscosità ematica nativa e normalizzata, viscoelasticità e aggregazione di tre gruppi di pazienti 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*.
 - Nell'ambito del progetto finalizzato “*New therapeutic approaches in the human beta-thalassemia treatment: in vitro and in vivo studies* U04- Studi clinici nella β -Talassemia: nuove strategie” è iniziato uno studio per 1) valutare il profilo emoreologico di pazienti con β -talassemia intermedia e *major* in relazione ai parametri di disfunzione endoteliale in presenza o meno di terapia ferro-chelante e 2) sviluppare nuove strategie terapeutiche con la finalità di ridurre le reazioni infiammatorie e la disfunzione endoteliale.
- Attività di controllo e valutazione

Il Reparto, in qualità di Laboratorio Ufficiale per il Controllo dei medicinali (*Official Medicines Control Laboratory*, OMCL) emoderivati, effettua il Controllo di Stato dei medicinali albumina, fattori della coagulazione, inibitori plasmatici e plasma inattivato prima dell'immissione in commercio secondo quanto previsto dal Decreto 31 marzo 2008, con il rilascio di un certificato per ciascun lotto di medicinale valido in tutti i Paesi membri dell'UE nell'ambito del Network Europeo dell'EDQM.

Nell'ultimo anno ha partecipato a due Studi Collaborativi europei organizzati dall'EDQM riguardanti il Fattore VIII (BSP 112) e l'assegnazione dei valori allo Standard di Riferimento Internazionale dell'Attivatore della Precallicreina (BSP 119).

È stata effettuata la sorveglianza *post-marketing* e farmacovigilanza dei medicinali emoderivati e la valutazione tecnico-scientifica di dossier dei farmaci emoderivati su richiesta dell'AIFA.

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).

Reparto Biotecnologie oncologiche ed ematologiche

L'attività del Reparto di Biotecnologie ematologiche e oncologiche è basata sullo studio delle cellule staminali dei tumori (Cellule Staminali Tumorali, CST), finalizzato all'individuazione di terapie antitumorali innovative tramite inibizione dei meccanismi responsabili della sopravvivenza e proliferazione tumorale.

Nei laboratori della Biobanca di cellule staminali tumorali, così come in alcuni laboratori del Reparto, si svolge la fase preliminare di isolamento di cellule staminali da tessuto, che in coltura danno origine alle corrispondenti linee cellulari, successivamente caratterizzate e crioconservate per i futuri usi sperimentali.

L'attività scientifica dei diversi gruppi afferenti al Reparto, pur se molto diversificata, si articola intorno a due obiettivi comuni: lo sviluppo e validazione di nuove molecole in grado di inficiare la sopravvivenza delle CST e l'individuazione di molecole con funzione di biomarcatori predittivi di risposta, in grado cioè di predire l'efficacia dei trattamenti terapeutici a bersaglio molecolare (definiti anche *targeted therapies*).

La ricerca di nuovi agenti terapeutici è basata sull'analisi del ruolo dei microRNA e sullo sviluppo e validazione di anticorpi monoclonali e inibitori di proteine ad attività enzimatica.

I microRNA, piccole molecole di RNA non codificante, costituiscono dei regolatori dell'attività post-trascrizionale, e numerosi dati scientifici ne indicano il coinvolgimento nella progressione dei tumori. L'analisi dei profili di espressione dei miR nelle cellule tumorali attraverso metodiche come l'analisi di *microarray* o la PCR quantitativa, oppure lo screening di ampie librerie di sequenze antago-miR, denominate *locked nucleic acids* (LNA) ha permesso di identificare alcuni miR con ruolo oncogeno e oncosoppressore, che sono stati poi sperimentalmente silenziati o sovraespressi per verificarne gli effetti sulla crescita tumorale. Si è potuto così studiare, nel corso del 2013, il ruolo dei miR-361-3p, 512-5p e 1271 nel carcinoma mammario, sia nelle cellule *in vitro* che nei modelli tumorali *in vivo*, e valutare potenziali strategie terapeutiche LNA-mediate. Con analoghe modalità è stato portato avanti lo studio del ruolo dei miR-15a e 16 nello sviluppo di metastasi ossee da carcinoma prostatico.

Sempre nell'ambito delle terapie a bersaglio molecolare, è in corso da alcuni anni una linea di attività incentrata sulla generazione e valutazione dell'attività funzionale di anticorpi monoclonali contro le CST di polmone, in particolare il tumore del polmone non a piccole cellule di tipo squamoso, dotati di valore diagnostico e potenziale ruolo terapeutico. Dopo la generazione degli anticorpi, l'attività di questi ultimi è valutata sia in coltura (attraverso citometria a flusso) che su tessuto (con analisi immunoistochimica) nel confronto fra cellule tumorali e cellule sane, per sincerare la loro specificità verso il tessuto tumorale.

Per quel che riguarda invece la messa a punto di nuove molecole antitumorali di sintesi, è stato recentemente approfondito il ruolo antitumorale dell'ABT-737, un inibitore delle proteine Bcl-2/Bcl-XL, verso le CST quiescenti di polmone.

La validazione di biomarcatori predittivi di risposta consiste nell'analisi della risposta alle *targeted therapies* in relazione al profilo molecolare dei tumori di origine, per individuare una relazione fra la responsività alla terapia e lo stato di attivazione di alcune molecole chiave, individuate come potenziali biomarcatori. È questo il caso della proteina EGFR, per la quale in questi anni è stato valutato lo stato di attivazione in relazione alla responsività verso i trattamenti con erlotinib e gefinitib, due inibitori di tirosin chinasi, in CST e modelli tumorali di polmone. Nell'ambito del carcinoma renale, invece, a partire da CST, tessuti e plasma di pazienti è possibile realizzare dei profili molecolari paziente-specifici basati sull'espressione di geni e miRNA, attraverso estrazione di DNA e RNA e successiva analisi tramite DNA sequencing, miRNA *array* e *reverse phase protein microarray* (RPPM); i profili molecolari ottenuti sono poi messi in relazione con la sensibilità dei pazienti alle *targeted therapies*. Per

quel che riguarda il tumore del colon, è stata approfondita l'analisi dell'espressione della proteina Cripto-1, della quale è stata individuata la progressiva down-modulazione durante il differenziamento. L'identificazione di meccanismi di omeostasi cellulare in grado di controllare la stabilità nell'espressione della proteina nella popolazione staminale ha aperto la strada ad ulteriori possibili indagini circa il possibile ruolo dell'omeostasi dei sistemi cellulari in risposta alle *targeted therapies*. Infine, utilizzando l'ampia base dati del database del *Cancer Genome Atlas project*, è in corso uno screening bioinformatico per la ricerca di biomarcatori prognostici, predittivi e di farmacoresistenza nel carcinoma di colon, mammella e polmone, svolto attraverso analisi comparativa di dati riguardanti i profili di espressione di RPPM, analisi del genoma e del trascrittoma, farmaco sensibilità e farmaco resistenza di librerie di composti di interesse farmacologico.

Reparto Cellule staminali ed endotelio

L'attività di ricerca è stata focalizzata sulle cellule stromali mesenchimali. Abbiamo recentemente isolato e caratterizzato gli osteoprogenitori o periciti CD146+ da midollo osseo di donatori normali. Le cellule CD146+ rappresentano la frazione multipotente delle cellule stromali mesenchimali, dato che una singola cellula CD146+ è capace di generare *in vivo* osso e nicchia ematopoietica quando trapiantata nel topo. Sulla base delle caratteristiche fenotipiche e funzionali di queste cellule, inizialmente isolate da midollo osseo, siamo stati successivamente in grado di riconoscerle e isolarle da polpa dentaria, tonsilla, fegato fetale, amnios, ileo e colon normali o sede di malattia di Crohn. A dispetto di una identità fenotipica, definita mediante 44 antigeni di superficie, si stanno definendo differenze significative sul profilo del differenziamento e della espressione degli HOX nelle mesenchimali di differente origine tissutale. Parallelamente cominciamo ad evidenziare differenze del trascrittoma e delle funzioni immunomodulatorie. Abbiamo inoltre ottimizzato la loro funzione di supporto dell'ematopoiesi inducendone il differenziamento osteoblastico. Le cellule stromali mesenchimali vengono attualmente utilizzate in studi clinici sperimentali di fase 2 e fase 3 sulla base delle loro caratteristiche immunomodulatorie (GVHD, *Crohn's disease*, *type I diabetes*, *multiple sclerosis*, *septic shock*), antiapoptotiche e rigenerative (*heart infarction*, *chemo/radioprotection*) e differenziative (*tendon*, *meniscus*, *cartilage and bone regeneration*). Riteniamo che l'utilizzo in clinica di queste cellule, nonostante i promettenti risultati e la assenza di tossicità acuta riportati ad oggi, sia prematura in assenza di una precisa comprensione meccanicistica e funzionale delle stesse. In particolare siamo interessati allo studio della funzione immunomodulatoria da esse esercitata e in particolare al loro ruolo nella patogenesi delle malattie croniche intestinali (*Inflammatory Bowel Disease*, IBD) come la malattia di Crohn, in rapido aumento nei Paesi altamente civilizzati. La nostra interpretazione sull'effetto positivo esercitato dal loro utilizzo sistemico nella malattia di Crohn è che le mesenchimali intestinali vadano incontro ad esaurimento numerico o funzionale e risultino quindi insufficienti a mantenere localmente adeguati livelli di tolleranza immunitaria. È stato individuato un sistema di coltura ed espansione degli emangioblasti, rarissime cellule staminali capaci di generare sia cellule ematopoietiche, che endoteliali e ora si è alla ricerca dei meccanismi che regolano le transizioni e gli equilibri dinamici fra cellule staminali e cellule differenziate. Infine, nell'ambito dello studio sieroproteomico, sono state individuate molecole con valenza diagnostica nel melanoma e in altre neoplasie in frequente aumento.

Reparto Emoglobinopatie ed ematopoiesi

Nell'ambito del progetto di ricerca finalizzata Malattie Rare "New therapeutic approaches in the human beta-thalassemia treatment: in vitro and in vivo studies", abbiamo proseguito lo studio integrato *in vitro* e *in vivo* per identificare nuove terapie di trattamento della β -talassemia umana con particolare riferimento all'induzione di alti livelli di sintesi di emoglobina fetale (HbF) con nuove molecole, alla riduzione del sovraccarico di ferro nonché al controllo dell'aspetto emoreologico e coagulativo. Uno dei principali obiettivi è stato, inoltre, quello di dimostrare alcuni dei meccanismi molecolari alla base della riattivazione dell'HbF con lo *stem cell factor* (SCF). A tale riguardo, è stata analizzata l'espressione dei fattori trascrizionali attraverso i quali lo SCF può indurre la sintesi di HbF in colture eritroidi unilinea di cellule CD34+ isolate dal sangue periferico umano (PB). Abbiamo dimostrato che la riattivazione di HbF indotta dallo SCF implica una coordinata down-modulazione di BCL11A, SOX6 e KLF1, tre noti repressori della trascrizione della γ -globina. Abbiamo inoltre espanso colonie di topi transgenici con geni globinici umani alfa, gamma e beta normali nonché beta falcemici eterozigoti. Questi animali rappresentano un ottimo modello per gli studi preclinici di nuovi approcci terapeutici per le β -emoglobinopatie.

Notevole importanza riveste poi lo studio dei miR nella regolazione genica dell'ematopoiesi normale e patologica. Abbiamo analizzato il ruolo funzionale del miR-486-3p nel differenziamento eritropoietico mediante esperimenti di over-espressione/inibizione in colture eritroidi di progenitori PB-CD34+. Il miR-486-3p, attraverso la regolazione del suo target diretto BCL11A, modula l'espressione della γ -globina. Abbiamo quindi analizzato in un limitato numero di pazienti β -talassemici, i livelli proteici di BCL11A e di γ -globina nonché l'espressione del miR-486-3p. I nostri dati indicano che il livello medio di espressione del miR-486-3p, significativamente più elevato nei talassemici, possa essere legato agli alti livelli di HbF presenti in questi pazienti.

L'effetto dello SCF è stato valutato anche su alcuni geni coinvolti nel sovraccarico di ferro, tipico di questa malattia. L'analisi del ruolo della via di *signaling* epcidina-ferroportina (FPN1) nel sovraccarico di ferro dovuto ad eritropoiesi inefficace ha prodotto risultati preliminari molto incoraggianti: pazienti con β -talassemia major e intermedia, caratterizzati da una marcata over-espressione del gene FPN1 e GDF15 rispetto ai soggetti normali, mostrano una risposta significativa al trattamento *in vitro* con lo SCF che sembra riportare i livelli di espressione dei geni a valori simili a quelli normali. In parallelo, lo studio sulla ricerca di associazione tra SNPs nel promotore di FPN1 e un quadro clinico di iper-ferritinemia ha indicato che la variazione di sequenza in posizione -2162 potrebbe essere responsabile della forte inibizione dell'attività del promotore P2 var II-noIRE in condizioni basali e della insensibilità al trattamento con emina.

Nell'ambito dello studio dei meccanismi alla base della "resistenza all'aspirina" in pazienti con disturbi cardiovascolari, svolto in collaborazione con l'Università Sapienza di Roma, negli anni precedenti avevamo evidenziato che l'aspirina può essere espulsa dalle piastrine attraverso il trasporto mediato dalla proteina MRP4 (*multidrug resistance protein-4*), e la over-espressione di questo trasportatore è alla base del fallimento dell'azione antiplastrinica dell'aspirina. La ricerca è quindi proseguita analizzando gli effetti che l'aspirina induce sull'espressione genica nei megacariociti portando alla over-espressione di MRP4 nelle piastrine di soggetti in terapia antiplastrinica a lungo termine. I nostri risultati indicano che la capacità dell'aspirina di aumentare l'espressione di MRP4 è dovuta all'attivazione del recettore nucleare PPAR α e che il trattamento *in-vivo* con aspirina influenza il pattern piastrinico proteico attraverso la regolazione genica nei megacariociti.

Infine, nell'ambito dei progetti riguardanti la caratterizzazione di cellule staminali tumorali (CSC) di colon, gli studi compiuti durante lo scorso anno hanno permesso la validazione delle

CSC come modelli predittivi di risposta a terapia nei pazienti, specificamente per quanto riguarda l'effetto dell'inibitore di EGFR cetuximab. Esperimenti preliminari di fosfoproteomica indicano che lo stato di attivazione del *pathway* di EGFR potrebbe costituire un indicatore di sensibilità in linee individuali.

Attività istituzionale

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.vo 116.

Reparto Fisiopatologia delle malattie genetiche

L'attività di ricerca del Reparto si inquadra nell'ambito dell'oncogenomica e della genetica molecolare, umana e medica. Diverse linee di ricerca sono dirette alla comprensione delle basi molecolari delle RASopatie, un gruppo di malattie dello sviluppo con predisposizione all'insorgenza di neoplasie, e di altre malattie genetiche rare, attraverso l'uso di nuove tecnologie di sequenziamento ad alta processività del genoma e del 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. Infine, l'attività di ricerca è volta alla comprensione dei meccanismi molecolari e cellulari alla base della sindrome di Gaucher.

Per quanto riguarda l'attività svolta nel 2013 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 un nuovo gene malattia implicato nelle RASopatie e alla comprensione delle cause molecolari alla base della sindrome di Fine-Lubinsky e della sindrome di Primrose. Studi di oncogenomica sono stati diretti alla caratterizzazione dei profili mutazionali delle cellule staminali tumorali (polmone e colon-retto). Infine, l'attività di ricerca è stata rivolta allo studio delle varianti della saposina C associate a una forma rara di malattia di Gaucher.

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.

Per quanto riguarda lo studio delle malattie renali, nel corso dell'anno 2013 si è concluso lo studio in collaborazione con il Centro Nazionale di Epidemiologia Sorveglianza e Promozione della Salute 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 dimostrato per la prima volta che in una popolazione generale anziana a basso rischio cardiovascolare e bassa prevalenza di insufficienza renale cronica (definita come velocità stimata di filtrazione glomerulare, eGFR, < 2), variazioni anche modeste della eGFR in aumento o in diminuzione (2 o ≥ 109 mL/min/1,73m²) sono associate ad un aumento di incidenza di eventi cardiovascolari e di mortalità per tutte le cause. I risultati ottenuti suggeriscono che la eGFR potrebbe essere utilmente considerata nella predizione del rischio per questa fascia di popolazione e rappresentano una solida base per prossimi studi su scala nazionale.

Nel corso dell'anno si sono anche concluse 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 malattia renale cronica in stadio terminale. Lo studio ha consentito di dimostrare che, in confronto al trattamento di emodiafiltrazione standard, la emodiafiltrazione con re-infusione dell'ultrafiltrato consente di ridurre significativamente la perdita intradialitica di vitamina C, un fenomeno ascrivibile al risparmio di vitamina C endogena durante la fase convettiva di depurazione. Lo studio ha inoltre dimostrato che, nell'ambito delle tecniche con re-infusione endogena, l'utilizzo di membrane ad alto cutoff di PM consente una migliore depurazione di molecole a medio e alto PM (tra le quali la retinol binding protein) e un modesto ma significativo miglioramento della condizione di ipervitaminosi A riscontrata in questi pazienti. Nel corso dello studio è stato messo a punto un nuovo metodo analitico RP-HPLC-UV in modalità a soppressione ionica per il dosaggio semplice e affidabile della vitamina C e dell'acido urico in plasma umano. È proseguito ed è in corso di finalizzazione lo studio analitico relativo alla stabilità della vitamina C in campioni di sangue e plasma umani che ha consentito di caratterizzare le cinetiche di degradazione *ex vivo* di questa vitamina nonché di mettere a punto una procedura semplice che ne consenta il dosaggio affidabile in contesti clinici e di ricerca.

Per quanto riguarda l'oncologia, a seguito di uno screening di una *library* di inibitori di microRNA abbiamo identificato 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). Abbiamo esteso lo screening della *library* a cellule tumorali di colon, mutanti nel *pathway* di KRAS. L'identificazione di alterazioni specifiche in tumori portatori di tali mutazioni infatti potrebbe condurre a nuove strategie terapeutiche per quei pazienti che non rispondono alle attuali terapie con inibitori dell'EGFR poiché le mutazioni che attivano la *pathway* di KRAS generalmente conferiscono resistenza all'antagonismo del signaling di EGFR. È prevista inoltre la verifica *in vivo* dei risultati ottenuti *in vitro* con l'utilizzo di modelli di tumori xenogenici indotti dall'iniezione di cellule staminali tumorali di carcinoma del colon-retto umane in topi gravemente immunodeficienti.

È proseguita poi l'attività di ottenimento e caratterizzazione di linee di cellule staminali tumorali particolarmente di carcinoma del colon-retto e glioblastoma multiforme in collaborazione con centri clinici.

È stato inoltre effettuata un'analisi delle vie di trasduzione del segnale associate all'efficacia di farmaci di nuova concezione mediante *microarray* di proteine a fase-inversa (RPPA) con i quali è possibile visualizzare lo stato di fosforilazione di un numero elevato di proteine che svolgono funzioni nelle vie di segnale coinvolte nell'oncogenesi. È stato possibile studiare gli effetti molecolari del trattamento con anticorpo monoclonale cetuximab o con la piccola molecola inibitore del EGF-R erlotinib, rispettivamente su cellule staminali tumorali da tumore del colon-retto e da carcinoma polmonare. Abbiamo inoltre confrontato, sempre a livello fosfoproteomico, campioni microdissezionati da xenotrapianti indotti dall'inoculo di cellule derivate da carcinomi del colon-retto, staminali tumorali o commercialmente disponibili (NIH-60). All'interno dello stesso esperimento è stata aggiunta un gruppo di campioni microdissezionati da tumori primari del colon-retto di stadio paragonabile a quello degli xenotrapianti utilizzati, ma non omologhi. L'intento è stato quello di definire le caratteristiche molecolari degli xenotrapianti da cellule staminali tumorali rispetto ad un tumore analogo ottenuto direttamente da paziente e rispetto agli xenotrapianti da cellule tumorali commerciali attualmente usati come modello di studio pre-clinico.

Lo studio delle cellule staminali tumorali è stato esteso al glioblastoma e abbiamo trattato, *in vitro*, diverse linee cellulari con proprietà staminali ottenute da glioblastoma, con una libreria di

inibitori di chinasi. Dopo una serie di esperimenti di titolazione dei farmaci che sono risultati efficaci al primo ciclo di trattamento, siamo riusciti a definire una cerchia ristretta di target molecolari potenzialmente utile nelle cellule staminali da glioblastoma. Attraverso l'inibizione simultanea dei target prescelti con il farmaco UCN-01, un analogo della staurosporina, siamo riusciti a indurre morte in buona parte delle nostre linee cellulari staminali di glioblastoma, sia *in vitro* sia *in vivo*.

È proseguita l'attività di caratterizzazione fenotipica, immunohistologica e funzionale dei nuovi anticorpi monoclonali rivolti verso le cellule staminali di glioblastoma e carcinoma del colon generati negli anni precedenti. È in corso inoltre la valutazione di nuovi anticorpi monoclonali generati mediante immunizzazione con DNA nudo codificante per antigeni identificati come maggiormente espressi nelle cellule staminali tumorali di carcinoma del colon-retto.

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.

In ambito istituzionale, nel corso del 2013 è proseguita la collaborazione con il Servizio di Prevenzione e Protezione, in particolare con la partecipazione a sopralluoghi per l'aggiornamento del DVR, a valutazioni di problematiche relative alla sicurezza dei luoghi di lavoro e alla tutela della salute dei lavoratori e ad attività di informazione e formazione specifica del personale dell'ISS, ai sensi dell'art.37 del DL.vo 81/2008 e accordo Stato-Regioni del 21/12/2011. Sono state inoltre elaborate linee guida sul corretto utilizzo delle sostanze chimiche nei laboratori. Nel 2014 proseguirà la collaborazione con il SPP per l'aggiornamento del DVR, l'attività didattica e verranno elaborate nuove linee guida relative ai rischi specifici a cui il lavoratore è esposto in relazione all'attività svolta.

Altra attività istituzionale svolta dal Reparto è rappresentata dall'impegno nella valutazione dei protocolli di studio clinico e nella estensione di pareri per la Commissione per la valutazione della sperimentazione clinica di fase I, su quesiti rivolti all'Istituto da altre amministrazioni e in procedure di autorizzazione al commercio di nuovi farmaci con procedura centralizzata europea.

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, neoplastiche, infiammatorie e autoimmuni.

Il Reparto ha svolto le seguenti attività:

Studi sul ruolo delle interazioni precoci di HIV-1 con cellule bersaglio (cellule dendritiche, macrofagi, cellule epatiche stellate), determinanti critici nella patogenesi dell'AIDS.

- Caratterizzazione delle vie di trasduzione del segnale e dei profili di espressione di microRNA in cellule dendritiche (DC) e cellule epatiche stellate (HSC) esposte alla glicoproteina virale gp120. Nel corso del 2013 è stato completato lo studio riguardante la caratterizzazione della cascata di trasduzione del segnale attivata dall'interazione precoce di HIV-1 con le DC, individuando nell'asse STAT3/IL-6 una componente chiave della risposta cellulare alla gp120. In collaborazione con l'Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma, abbiamo inoltre valutato il coinvolgimento di microRNA (miR) nella regolazione di questi processi. In collaborazione con l'Università di Firenze, lo studio del profilo di espressione di miR modulati dalla gp120 è stato esteso alle HSC.

- Ruolo del TLR4 nell'interazione precoce di HIV-1 con macrofagi e HSC. Sono stati condotti studi volti a verificare il coinvolgimento dei *Toll-like receptors* (TLRs) nella risposta di macrofagi e HSC alla gp120 (in collaborazione con il Dott. F. Marra, Università di Firenze). I risultati ottenuti dimostrano come il riconoscimento di TLR4 da parte della gp120 attiva risposte secretorie e migratorie in queste cellule, così come vie di trasduzione del segnale (NFkB/MAPK, inflammasoma). Inoltre, in collaborazione con l'Università Sapienza di Roma, sono in corso studi di *modeling*, volti a validare tale interazione.
- Effetti immunomodulatori di gp120 di HIV-1 in macrofagi. È stato completato e pubblicato 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 con il co-recettore CCR5, coinvolta nella produzione di CCL2.

Studi sul ruolo dell'asse CCL2/CCR2 nell'infezione da HIV-1

- Ruolo della CCL2 nella regolazione dell'espressione di fattori di restrizione in macrofagi. Nell'ambito degli studi riguardanti i meccanismi molecolari mediante i quali la CCL2 prodotta endogenamente 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/permisività all'infezione da HIV-1 dei monociti/macrofagi. Sono stati inoltre indagati i meccanismi molecolari alla base dell'induzione di A3A come conseguenza del blocco della CCL2, con particolare attenzione al ruolo dell'IFN di tipo I e delle vie di trasduzione del segnale.
- Approcci farmacologici di blocco di CCL2/CCR2. Si stanno valutando alcuni farmaci che inibiscono l'asse CCL2/CCR2 nell'ambito dell'infezione da HIV-1. In particolare, in collaborazione 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 virale in queste cellule, ma con meccanismi almeno in parte diversi rispetto a quelli che si osservano in seguito al blocco della CCL2 mediante anticorpi specifici. Inoltre, in collaborazione con *Tobira Therapeutics*, USA, sono in corso studi riguardanti il cenicriviroc, un antagonista recettoriale che blocca sia il CCR5 che il CCR2, e che è attualmente in sperimentazione clinica in pazienti HIV positivi. Nell'ambito di questi studi, stiamo analizzando l'effetto di questo composto sull'espressione di fattori di restrizione sia *in vitro* in macrofagi infettati con HIV-1 che in PBMC *ex vivo* isolati dai pazienti inclusi nella sperimentazione clinica.

Le cellule dendritiche nell'immunoterapia dei tumori: approcci molecolari per potenziare la loro attività immunostimolatoria

Manipolazione genetica e farmacologica del potenziale immunostimolatorio delle DC. Lo studio sulla caratterizzazione funzionale delle DC silenziate per STAT3 con il quale dimostriamo il ruolo di questo fattore come *check point* della soppressione delle risposte Th1 è stato completato e ampliato. In particolare, è stato approfondito il meccanismo attraverso il quale il silenziamento di STAT3 influenza il *cross-talk* con i linfociti T $\gamma\delta$. In collaborazione con l'Università di Padova e con la Fondazione Edmund Mach, *IASMA Research and Innovation Centre*, abbiamo completato l'analisi dei dati di *microarray* al fine di individuare nuovi geni e miR attivati precocemente in DC trattate con poly (I:C). È in corso l'organizzazione dei dati per la loro pubblicazione.

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" in macrofagi e DC e la loro regolazione da parte di IFN di tipo I e IL-3 è stato completato e pubblicato.

Studi sull'attività immunomodulatoria della Vitamina D3 e della lattoferrina bovina in DC.

- La vitamina D3 (vitD3) come modulatore della Sclerosi Multipla (SM): metabolismo, attività immunoregolatoria e relazione con l'IFN di tipo I in cellule dendritiche. Il progetto è giunto a conclusione e i risultati ottenuti sono stati in parte pubblicati e in parte sono in corso di finalizzazione. Gli studi svolti possono essere riassunti in due sezioni principali: (i) analisi della risposta alla 1,25(OH)2D3 in due diversi modelli di DC (IFN-DC e IL4 DC) generate *in vitro* da monociti isolati dal sangue di 3 gruppi di donatori: soggetti con MS non sottoposti ad alcuna terapia, soggetti con MS in terapia con l'IFN β e donatori sani. Lo studio dell'immunofenotipo e della capacità di produrre citochine e di attivare cellule T non ha dimostrato differenze statisticamente significative tra i gruppi sperimentali, ma ha messo in evidenza interessanti differenze tra i due modelli sperimentali. Inoltre abbiamo osservato che sia la 1,25(OH)2D3, che il suo principale precursore circolante, 25OHD3, inducono la secrezione di alti livelli di CCL2, una chemochina il cui ruolo nella patogenesi della MS è ancora controverso. I livelli di secrezione indotti nelle DC dei pazienti si sono rivelati più bassi rispetto a quelli indotti nelle DC dei donatori sani; (ii) analisi dello status della vitD nei donatori. Lo studio, effettuato affiancando alla misura della concentrazione plasmatica di 25OHD3 quella di DBP, la sua principale proteina trasportatrice, ci ha permesso di evidenziare la presenza di livelli significativamente più alti di DBP nei pazienti durante le fasi di remissione clinica, ma non durante le fasi di ricaduta, rispetto ai donatori di controllo.
- La lattoferrina bovina come regolatore della secrezione di CCL1 in monociti e DC. Nell'ambito dello studio degli effetti immunomodulatori della lattoferrina bovina (bLf) abbiamo completato il lavoro riguardante l'induzione di CCL1 da parte della bLf, caratterizzandone il meccanismo e i recettori coinvolti, evidenziando interessanti differenze nelle capacità induttive della bLf in relazione allo stadio di differenziamento cellulare.

Studi sul ruolo del tessuto adiposo nella regolazione dell'infiammazione e della risposta immune (in collaborazione con il Dipartimento Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, ISS)

- Alterazioni funzionali di adipociti e cellule immuni del tessuto adiposo viscerale associate all'obesità. È stato completato lo studio sulle relazioni tra la composizione del tessuto adiposo e l'attivazione di fattori trascrizionali e sugli effetti di specifici acidi grassi, con azione pro- od anti-infiammatoria, sull'adipocita. I risultati ottenuti dimostrano l'esistenza di un circuito regolatorio all'interno del tessuto adiposo, in grado di controllare la risposta infiammatoria.
- Effetti anti-infiammatori di composti polifenolici in DC. È stato completato lo studio sulla capacità di componenti bioattivi del cibo di prevenire o migliorare alterazioni immunologiche e infiammazione inappropriata. I risultati ottenuti hanno dimostrato che il metabolita polifenolico PCA esercita effetti anti-infiammatori in DC, che correlano con una maggiore attivazione del fattore trascrizionale.
- Definizione del *cross-talk* tra adipociti e cellule immunitarie. Per valutare le interazioni funzionali tra tessuto adiposo e cellule dell'immunità innata, sono in corso studi volti a definire gli effetti dei fattori solubili prodotti da adipociti di soggetti normopeso e obesi sulle caratteristiche fenotipiche e funzionali di DC. Risultati preliminari indicano come tali interazioni inducano nelle DC maturazione e attivazione cellulare.

Ruolo dei segnali trasdotti da PRR e dei recettori degli estrogeni nella regolazione dell'omeostasi intestinale e nello sviluppo di malattie infiammatorie croniche

Nell'ambito degli studi riguardanti la regolazione dell'omeostasi intestinale, abbiamo caratterizzato gli effetti del terreno condizionato (CM) di epitelio intestinale derivato da cellule Caco-2, esposto a ligandi del TLR8, sul differenziamento *in vitro* di DC e sull'attivazione di linfociti T gd risultati ottenuti indicano che l'epitelio così stimolato favorisce il differenziamento di una popolazione cellulare con caratteristiche regolatorie, in grado di inibire fortemente la produzione di IFN-g da parte sia di linfociti T CD4+ che di cellule T gd. Studi paralleli sono stati fatti utilizzando CM da cellule epiteliali intestinali (IEC) isolate da biopsie di colon di donatori sani o pazienti con morbo di Crohn o rettocolite ulcerosa. In queste condizioni è stato osservato un effetto stimolatorio nei confronti dei linfociti T gd da parte di IEC derivate da pazienti, che si traduce in un'aumentata produzione di IFNg, e che correla con il grado di attività della malattia. Inoltre, in collaborazione con il Dipartimento BCN è stata fatta una caratterizzazione dell'espressione dei recettori degli estrogeni (ER) in cellule immuni del sangue periferico di questi pazienti, che suggerisce una relazione tra malattia e bassa espressione di ERb. Questi dati sono in corso di validazione attraverso lo studio di un numero maggiore di donatori e di pazienti in terapia con immunomodulanti.

Sferoidi tumorali 3D: un modello multicellulare superiore per studiare la biologia dei tumori

Precedenti studi del gruppo hanno dimostrato che la tecnologia avanzata dei modelli tumorali 3D (sferoidi tumorali multicellulari, MTCS) ha un potenziale unico per testare i trattamenti antitumorali in un contesto cellulare tridimensionale e in un ambiente patofisiologico, permettendo quindi di ottenere risultati più attendibili. L'uso di MTCS 3D è stato esteso a ricerche centrate ad approfondire specifici aspetti del melanoma umano. In particolare, in collaborazione con il CNR, è iniziato un nuovo studio mirato a stabilire il ruolo svolto da specifiche mutazioni geniche (es., BRAF, NRAS e p16CDKN2A) nella radioresistenza e immunogenicità dei melanomi e la loro possibile associazione con uno status metabolomico unico (ottenuto mediante 1H-NMR) la cui identificazione potrebbe aiutare a definire e sviluppare marker predittivi. Tali studi sono stati condotti avvalendosi di MTCS 3D di melanoma cresciuti da linee di melanoma derivate da librerie internazionali o, principalmente, da biopsie di tumori primari o metastatici escissi da pazienti, caratterizzate per la presenza di specifiche mutazioni nei principali geni candidati. I risultati finora ottenuti indicano che: i) MTCS di melanoma hanno caratteristiche di crescita molto diverse rispetto ai corrispondenti monolayer 2D, sottolineando la concreta importanza dell'utilizzo dei modelli tumorali 3D per ottenere risultati più veritieri nella ricerca oncologica; ii) MTCS con differenti mutazioni geniche differiscono tra loro sia morfologicamente che per le dinamiche di crescita, a conferma dell'ipotesi che la specifica mutazione genica conferisce caratteristiche ben precise al pattern tumorale.

Nuove strategie per l'identificazione di miR

Nell'ambito di uno studio coordinato dall'Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma abbiamo contribuito all'identificazione del miR-155 nel genoma di ratto attraverso nuovi approcci bioinformatici, validandone l'espressione in cellule spleniche.

Attività di formazione e valutazione

Il Reparto contribuisce alla formazione di studenti delle scuole di dottorato in Scienze Immunologiche e Malattie Infettive, Microbiologia e Sanità Pubblica, e di studenti dei corsi di laurea specialistica in Biotecnologie e in Scienze Biologiche (Sapienza, Università di Roma). Inoltre, il Reparto svolge attività di valutazione di articoli scientifici per diverse riviste internazionali.